

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Prevalencia de la infección de la bacteria  
*Helicobacter pylori* en pacientes diagnosticados con  
adenocarcinoma gástrico en el Instituto Nacional  
de Enfermedades Neoplásicas (INEN) - Lima, Perú.**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en  
Biología

Bach. David Custodio Zegarra

Lima- Perú

2017

*Este trabajo se lo dedico a mis padres: David Custodio Curay y Leonor Zegarra Salas. Gracias a su esfuerzo, sacrificio, apoyo y paciencia desde que inicié este camino hasta el día de hoy.*

# AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia por su apoyo incondicional, y a las personas que colocaron su granito de arena para apoyarme. Agradecer de manera especial a mis amigos del Departamento de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas por brindarme la oportunidad de realizar esta investigación con su respaldo.

## RESUMEN.

La infección por *Helicobacter pylori* es una de las más comunes en todo el mundo y es un factor de riesgo para el desarrollo del cáncer. El cáncer gástrico es el segundo más común en los varones y la primera causa principal de muerte relacionada con el cáncer en Perú. Este estudio determinó la tasa de prevalencia y la carga bacteriana de *Helicobacter pylori* en muestras de cáncer gástrico de pacientes peruanos. Se obtuvieron 144 muestras de cáncer de tejido gástrico de pacientes que fueron a cirugía o gastroscopia entre abril de 2015 y septiembre de 2016 procedentes de tres tipos de muestras de tejido gástrico de cada paciente: tejido tumoral, tejido sano proximal y tejido sano distal. El ADN se extrajo del tejido y posteriormente se utilizó para la detección cuantitativa por PCR de genes de factores de colonización (*ureA* y *hspA*) y de virulencia (*vacAs*, *vacAm* y *cagA*) de *Helicobacter pylori* usando cebadores específicos. La PCR cuantitativa encontró ADN específico de *Helicobacter pylori* (pg / 100 ng de tejido). Las tasas de genes de factores de colonización positivos *Helicobacter pylori* en el tejido tumoral, tejido sano proximal y tejido sano distal fueron del 31,1%; 51,05%; 61,5% (*ureA*) y 64,3%; 65,04%; 67,3% (*hspA*), respectivamente. Las tasas de los genes de factores de virulencia fueron 67,8%; 70,6%; 73,4% (*vacAs*); 79,7%; 83,9%; 79,7% (*vacAm*); Y 81,1%; 86,7%; 86,01% (*cagA*), respectivamente. 144 pacientes con cáncer gástrico y 179 familiares de los pacientes completaron el cuestionario. Los cuestionarios mostraron que 42; 25; y 249 pacientes / parientes vivían menos de 5 años; 5-10 años; Y más de 10 años en el mismo hogar, respectivamente. La mayoría de los casos consumen agua potable (270), agua del tanque (33), agua del río (4) y otros (15) en sus residencias. Rutinariamente, los pacientes y sus familiares beben agua embotellada (5), agua hervida (283), agua filtrada (15) y agua no filtrada (20). Se concluye que *Helicobacter pylori* presenta alta prevalencia en pacientes con cáncer gástrico en Perú.

PALABRAS CLAVE: *Helicobacter pylori*, Cáncer gástrico, Adenocarcinoma gástrico, Ureasa, Proteína de shock térmico, Gen de la citotoxina vacuolizante, Gen asociado a la citotoxina.

## ABSTRACT.

*Helicobacter pylori* infection is one of the most common worldwide and is a risk factor for cancer development. Gastric cancer is the second most common cancer in males and first leading cause of cancer related death in Perú. This study was conducted to determinate the prevalence rate and bacterial load of *Helicobacter pylori* in gastric cancer samples of Peruvian patients. 144 gastric tissue cancer samples were prospectively collected from patients who went to surgery or to gastroscopy between April 2015 and September 2016. Three types of gastric tissue samples were obtained from each patient: tumor tissue, proximal healthy tissue and distal healthy tissue samples. DNA was extracted from tissue and subsequently used for quantitative PCR detection of colonization (*ureA* and *hspA*) and virulence (*vacAs*, *vacAm* and *cagA*) factors of *Helicobacter pylori* using specific primers. Quantitative PCR found *Helicobacter pylori* specific DNA (pg/100ng tissue). The rates of positive constitutive genes *Helicobacter pylori* in tumor tissue, proximal healthy tissue and distal healthy tissue, were 31.1%; 51.05%; 61.5% (*ureA*), and 64.3%; 65.04%; 67.3% (*hspA*) respectively. The rates of the virulence genes were 67.8%; 70.6%; 73.4% (*vacAs*); 79.7%; 83.9%; 79.7% (*vacAm*); and 81.1%; 86.7%; 86.01% (*cagA*), respectively. 144 gastric cancer patients and 179 relatives of them patients completed the questionnaire. Questionnaires showed that 42; 25; and 249 patients/relatives lived less than 5 years; 5-10 years; and more than 10 years at the same household, respectively. Most cases drink potable water (270), water from tank (33), water from river (4), and others (15) in their residences. Routinely, patients and relatives drink bottled water (5), boiled water (283), filtered water (15), and unfiltered water (20). *Helicobacter pylori* is highly prevalent in Peruvian gastric cancer patients.

**KEYWORDS:** *Helicobacter pylori*, Gastric cáncer, Gastric adenocarcinoma, Urease, Heat shock protein, Vacuolating cytotoxin gene, Cytotoxin associated gene.

# ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>ÍNDICE</b>  | <b>7</b>  |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>                                   | <b>10</b> |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS</b>                                    | <b>11</b> |
| <b>I. INTRODUCCION.</b>                                    | <b>14</b> |
| <b>1.1. Problema de la Investigación</b>                   | <b>15</b> |
| 1.1.1. Planteamiento del Problema                          | 15        |
| 1.1.2. Formulación del problema                            | 16        |
| 1.1.3. Objetivo general                                    | 16        |
| 1.1.4. Objetivos específicos                               | 16        |
| <b>II. MARCO TEORICO.</b>                                  | <b>17</b> |
| <b>2.1. Cáncer gástrico</b>                                | <b>17</b> |
| <b>2.2. Helicobacter pylori</b>                            | <b>18</b> |
| <b>2.3. Factores de colonización</b>                       | <b>18</b> |
| <b>2.4. Factores de virulencia</b>                         | <b>19</b> |
| <b>III. ANTECEDENTES.</b>                                  | <b>21</b> |
| <b>3.1. Cáncer gástrico</b>                                | <b>21</b> |
| <b>3.2. Helicobacter pylori</b>                            | <b>23</b> |
| <b>3.3. Relación Helicobacter pylori y Cáncer Gástrico</b> | <b>25</b> |
| <b>IV. HIPOTESIS.</b>                                      | <b>27</b> |
| <b>V. MATERIALES Y METODOS.</b>                            | <b>28</b> |
| <b>5.1. Lugar de ejecución.</b>                            | <b>28</b> |
| <b>5.2. Tipo y diseño de investigación.</b>                | <b>28</b> |
| <b>5.3. Consentimiento informado.</b>                      | <b>28</b> |

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>5.4.</b>  | <b>Ficha de recolección de datos.</b>  | <b>29</b> |
| <b>5.5.</b>  | <b>Población.</b>  | <b>29</b> |
| 5.5.1.       | Criterios de inclusión.  | 29        |
| 5.5.2.       | Criterios de exclusión.  | 29        |
| <b>5.6.</b>  | <b>Tamaño de la muestra.</b>   | <b>30</b> |
| <b>5.7.</b>  | <b>Elaboración de una base de datos.</b>   | <b>30</b> |
| <b>5.8.</b>  | <b>Obtención de la muestra biológica.</b>  | <b>31</b> |
| <b>5.9.</b>  | <b>Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN).</b>  | <b>31</b> |
| <b>5.10.</b> | <b>Cuantificación de ácidos nucleicos.</b>   | <b>32</b> |
| <b>5.11.</b> | <b>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real.</b>                                     | <b>33</b> |
| 5.11.1.      | Condiciones de la PCR.   | 35        |
| <b>5.12.</b> | <b>Análisis estadístico.</b>   | <b>36</b> |
| 5.12.1.      | Base de datos: Encuestas e Historias clínicas  | 36        |
| 5.12.2.      | Detección de genes   | 36        |
| <b>VI.</b>   | <b>RESULTADOS</b>  | <b>37</b> |
| <b>6.1.</b>  | <b>Control positivo.</b>   | <b>37</b> |
| <b>6.2.</b>  | <b>Obtención de Curvas estándar para cada cebador.</b>   | <b>37</b> |
| <b>6.3.</b>  | <b>Bases de datos.</b>   | <b>39</b> |
| 6.3.1.       | Encuestas.   | 39        |
| 6.3.2.       | Variables Clínicas.  | 42        |
| <b>6.4.</b>  | <b>Detección de los genes.</b>   | <b>45</b> |
| 6.4.1.       | Factores de colonización.  | 46        |
| 6.4.2.       | Factores de virulencia.  | 52        |
| <b>6.5.</b>  | <b>Prevalencia de <i>Helicobacter pylori</i> en pacientes afectados por adenocarcinoma gástrico.</b> | <b>59</b> |
| 6.5.1.       | Prevalencia según domicilio y procedencia.   | 60        |
| 6.5.2.       | Prevalencia según análisis de fuente de agua.  | 63        |
| 6.5.3.       | Tasas de sobrevida.  | 64        |
| <b>6.6.</b>  | <b>Significancia estadística.</b>  | <b>70</b> |



|              |                                    |           |
|--------------|------------------------------------|-----------|
| <b>VII.</b>  | <b>DISCUSION</b>                   | <b>72</b> |
| <b>VIII.</b> | <b>CONCLUSIONES</b>                | <b>82</b> |
| <b>IX.</b>   | <b>RECOMENDACIONES</b>             | <b>84</b> |
| <b>X.</b>    | <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.</b> | <b>85</b> |
| <b>XI.</b>   | <b>ANEXOS</b>                      | <b>95</b> |

# ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Curvas de fluorescencia obtenidas de la puesta a punto del cebador <i>cagA</i> para detectar el gen asociado a la citotoxina de <i>Helicobacter pylori</i> en el termociclador PCR LightCycler® 96 Instrument (ROCHE®).   | 38 |
| <b>Figura 2.</b> Curvas melting obtenidas de la puesta a punto del cebador <i>cagA</i> para detectar el gen asociado a la citotoxina de <i>Helicobacter pylori</i> en el termociclador PCR LightCycler® 96 Instrument (ROCHE®).  | 38 |
| <b>Figura 3.</b> Curva de regresión lineal obtenida para la formulación de una ecuación para el cálculo de la concentración del gen <i>hspA</i> , correspondiente a la proteína de shock térmico de <i>Helicobacter pylori</i> .   | 39 |
| <b>Figura 4.</b> Histograma de la estadísticas de la expresión de los genes constitutivos de <i>Helicobacter pylori</i> por grupo de edades de los pacientes con adenocarcinoma gástrico en el INEN.   | 40 |
| <b>Figura 5.</b> Positividad de los genes de factores de colonización (n=144).   | 60 |
| <b>Figura 6.</b> Distribución de la detección de genes de factores de colonización de <i>Helicobacter pylori</i> en muestras de agua de viviendas de pacientes diagnosticados con adenocarcinomas gástrico y <i>Helicobacter pylori</i> positivos INEN durante el periodo 2015-2016. | 64 |
| <b>Figura 7.</b> Curva de supervivencia de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico y sometidos a cirugía INEN durante el periodo 2015-2016.   | 65 |
| <b>Figura 8.</b> Curva de supervivencia de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico, sometidos a cirugía y <i>Helicobacter pylori</i> positivos y negativos en INEN durante el periodo 2015-2016.  | 67 |
| <b>Figura 9.</b> Curva de supervivencia de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico, sometidos a cirugía y <i>Helicobacter pylori</i> positivos ( <i>ureA</i> positivo y negativo) en INEN durante el periodo 2015-2016.   | 69 |
| <b>Figura 10.</b> Curva de supervivencia de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico, sometidos a cirugía y <i>Helicobacter pylori</i> positivos ( <i>hspA</i> positivo y negativo) en INEN durante el periodo 2015-2016.  | 70 |

# ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> <i>Variables usadas en la obtención de datos mediante entrevista del paciente. Se describen las variables estudiadas durante la realización del proyecto, definiendo el tipo, escala de medición, definición operacional, y forma de registro.</i> | 30 |
| <b>Tabla 2.</b> <i>Cebadores con los segmentos de las secuencias sentido y antisentido utilizadas para detectar a <i>Helicobacter pylori</i> y Temperatura de fusión (<math>T_m</math>, del inglés Melting temperatura) de cada cebador.</i>                       | 34 |
| <b>Tabla 3.</b> <i>Estadística descriptiva de los casos <i>Helicobacter pylori</i> positivos encontrados en nuestro estudio.</i>   | 39 |
| <b>Tabla 4.</b> <i>Estadística descriptiva de los casos estudiados según sexo.</i>   | 40 |
| <b>Tabla 5.</b> <i>Promedio, desviación estándar y límites de edad de los casos estudiados según la detección de los genes constitutivos de <i>Helicobacter pylori</i>.</i>  | 40 |
| <b>Tabla 6.</b> <i>Estadística del tipo de abastecimiento de agua al que tienen acceso los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico en el INEN.</i>  | 41 |
| <b>Tabla 7.</b> <i>Estadística del tipo de consumo de agua de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico en el INEN.</i>   | 41 |
| <b>Tabla 8.</b> <i>Estadística de los antecedentes gástricos pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico en el INEN.</i>  | 42 |
| <b>Tabla 9.</b> <i>Recuento estadístico de la variables recogidas de las historias clínicas de los pacientes sometidos a pruebas para la detección de <i>Helicobacter pylori</i>.</i>  | 44 |
| <b>Tabla 10.</b> <i>Recuento estadístico del registro de los pacientes con adenocarcinoma gástrico que desarrollaron metástasis en el INEN.</i>  | 45 |
| <b>Tabla 11.</b> <i>Recuento estadístico del registro de los pacientes con adenocarcinoma gástrico de INEN que tienen antecedentes de positividad a <i>Helicobacter pylori</i>.</i>  | 45 |
| <b>Tabla 12.</b> <i>Detección de los casos positivos a los factores de colonización de <i>Helicobacter pylori</i>.</i>   | 46 |
| <b>Tabla 13.</b> <i>Análisis de las concentraciones del gen constitutivo ureA por tipo de muestra.</i>   | 47 |
| <b>Tabla 14.</b> <i>Análisis de las concentraciones del gen constitutivo hspA por tipo de muestra.</i>   | 47 |
| <b>Tabla 15.</b> <i>Pacientes con al menos una muestra (tumoral, sano próximo al tumor o sano distal al tumor) positiva (n=144).</i>   | 48 |
| <b>Tabla 16.</b> <i>Genes constitutivos en muestra de tejido tumoral.</i>  | 49 |
| <b>Tabla 17.</b> <i>Genes constitutivos en muestra de tejido sano próximo al tumor.</i>  | 49 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 18.</b> Genes constitutivos en muestra de tejido sano distal al tumor. _____   | 49 |
| <b>Tabla 19.</b> Análisis de las concentraciones de los genes constitutivos en pacientes positivos para ambos genes por tipo de muestra. _____  | 50 |
| <b>Tabla 20.</b> Evaluación de concentraciones extremas del gen de colonización ureA por tipo de muestra. _____   | 51 |
| <b>Tabla 21.</b> Evaluación de concentraciones extremas del gen de colonización hspA por tipo de muestra. _____   | 52 |
| <b>Tabla 22.</b> Detección de los casos positivos a los factores de virulencia de <i>Helicobacter pylori</i> . _____  | 53 |
| <b>Tabla 23.</b> Análisis de las concentraciones del gen de virulencia vacAm en pacientes positivos para ambos genes constitutivos por tipo de muestra. _____   | 53 |
| <b>Tabla 24.</b> Evaluación de concentraciones extremas del gen de virulencia vacAm por tipo de muestra. _____  | 54 |
| <b>Tabla 25.</b> Análisis de las concentraciones del gen de virulencia vacAs en pacientes positivos para ambos genes constitutivos por tipo de muestra. _____   | 55 |
| <b>Tabla 26.</b> Evaluación de concentraciones extremas del gen de virulencia vacAs por tipo de muestra. _____  | 56 |
| <b>Tabla 27.</b> Análisis de las concentraciones del gen de virulencia cagA en pacientes positivos para ambos genes constitutivos por tipo de muestra. _____  | 56 |
| <b>Tabla 28.</b> Evaluación de concentraciones extremas del gen de virulencia cagA por tipo de muestra. _____   | 57 |
| <b>Tabla 29.</b> Pacientes con al menos una muestra (tumoral, sano próximo al tumor o sano distal al tumor) positiva (n=144). _____   | 58 |
| <b>Tabla 30.</b> Negatividad de cada uno de los genes de virulencia en pacientes con al menos uno de los genes constitutivos positivos (n=122). _____   | 59 |
| <b>Tabla 31.</b> Distribución de casos positivos de <i>Helicobacter pylori</i> según domicilio de los pacientes en Lima. _____  | 60 |
| <b>Tabla 32.</b> Distribución de casos positivos de <i>Helicobacter pylori</i> según procedencia de los pacientes en Lima. _____  | 61 |
| <b>Tabla 33.</b> Estadística del tiempo de permanencia de los pacientes con adenocarcinoma gástrico del INEN en sus domicilios. _____   | 62 |
| <b>Tabla 34.</b> Distribución de casos positivos de <i>Helicobacter pylori</i> según procedencia de los pacientes a nivel nacional (Perú). _____  | 63 |
| <b>Tabla 35.</b> Resultados del análisis de la detección de genes de factores de colonización de <i>Helicobacter pylori</i> de fuentes de agua en viviendas de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico y <i>Helicobacter pylori</i> positivos en el INEN durante el periodo 2015-2016. _____ | 64 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 36.</b> Resumen de las estadística de supervivencia de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico y sometidos a cirugía en el INEN durante el periodo 2015-2016.  | 65 |
| <b>Tabla 37.</b> Medias del tiempo de supervivencia de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico y sometidos a cirugía INEN durante el periodo 2015-2016.   | 65 |
| <b>Tabla 38.</b> Resumen de las estadísticas de supervivencia de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico, sometidos a cirugía y positivos a <i>Helicobacter pylori</i> INEN durante el periodo 2015-2016.                                       | 66 |
| <b>Tabla 39.</b> Media de la supervivencia de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico, sometidos a cirugía y positivos a <i>Helicobacter pylori</i> INEN durante el periodo 2015-2016.  | 66 |
| <b>Figura 39.</b> Tabla de mortalidad de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico, sometidos a cirugía y <i>Helicobacter pylori</i> positivos y negativos en INEN durante el periodo 2015-2016.  | 68 |
| <b>Tabla 40.</b> Resumen de las estadísticas de supervivencia de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico, sometidos a cirugía y positivos a <i>Helicobacter pylori</i> ( <i>ureA</i> positivo y negativo) en INEN durante el periodo 2015-2016. | 68 |
| <b>Tabla 41.</b> Media de la supervivencia de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico, sometidos a cirugía y positivos a <i>Helicobacter pylori</i> ( <i>ureA</i> positivo y negativo) en INEN durante el periodo 2015-2016.                    | 68 |
| <b>Tabla 40.</b> Resumen de las estadísticas de supervivencia de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico, sometidos a cirugía y positivos a <i>Helicobacter pylori</i> ( <i>hspA</i> positivo y negativo) en INEN durante el periodo 2015-2016. | 69 |
| <b>Tabla 41.</b> Media de la supervivencia de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico, sometidos a cirugía y positivos a <i>Helicobacter pylori</i> ( <i>hspA</i> positivo y negativo) en INEN durante el periodo 2015-2016.                    | 70 |
| <b>Tabla 42.</b> Diferencias entre muestras en relación a las concentraciones de los genes de factores de colonización <i>ureA</i> y <i>hspA</i> .   | 71 |
| <b>Tabla 43.</b> Diferencias entre muestras en relación a las concentraciones de los genes de virulencia <i>vacAm</i> , <i>cagA</i> y <i>vacAs</i> detectados en este estudio.   | 71 |

# I. INTRODUCCION.

El cáncer gástrico es la cuarta neoplasia más común y la segunda causa de mortalidad (Wroblewski y *col.*, 2010). Casi 1 millón de casos de cáncer gástrico son diagnosticados cada año, presentando una sobrevida a los 5 años de solo 15% (Correa y *col.*, 2004). Según la base de datos de cáncer del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas se registraron 4821 nuevos casos de neoplasia maligna de estómago entre los años 2010-2012. Y para este periodo de tiempo, se registraron un total de 25888 muertes estimadas en todo el Perú, siendo el tipo de neoplasia que más defunciones registró según el análisis de la situación del cáncer en el Perú 2016 publicado por la Dirección General de Epidemiología del Ministerio de Salud.

Existen dos variantes histológicamente distintas de carcinoma gástrico con características fisiopatológicas diferentes: primero, el adenocarcinomas tipo difuso, que afecta principalmente a gente joven y consiste en células neoplásicas con infiltración individual sin llegar a formar estructura; y segundo, el adenocarcinoma tipo intestinal que es el más prevalente y que afecta sobre los 40 años de edad y dos veces más a hombres que mujeres. El adenocarcinoma gástrico sigue una serie de etapas bien definidas, en las cuales se produce una transición de una mucosa normal a una gastritis crónica superficial, seguida de gastritis atrófica y una metaplasia intestinal para finalmente dar lugar a una displasia que degenera en adenocarcinoma (Polk & Peek., 2010).

Diversas patologías gastrointestinales, han sido asociadas con infecciones por virus y/o bacterias. En 2008, aproximadamente dos millones de nuevos casos de cáncer a nivel mundial (16%) fueron atribuidos a infecciones por diferentes agentes biológicos (Oh y Weirdepass., 2014). Si estas infecciones pudieran prevenirse y/o tratarse,

se estima que habría alrededor de un 23% menos de casos nuevos de cáncer en las regiones menos desarrolladas, y alrededor de un 7% menos de casos en las regiones desarrolladas.

En 1994 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, del inglés, *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, identificó once agentes carcinógenos del grupo 1, entre los cuales se incluye a la bacteria *Helicobacter pylori*. La infección de esta bacteria y las lesiones de la mucosa gástrica con las que guarda estrecha relación, elevan el riesgo de causar cáncer gástrico en un 75% (Wroblewski y col., 2010).

El presente proyecto tuvo por finalidad generar datos acerca de la distribución estadística de infecciones por *Helicobacter pylori* mediante la detección de los genes de factores de colonización hspA y ureA y de virulencia específicos de esta bacteria vacAs, vacAm, y cagA (Carmolinga-Ponce y col. 2011; Samareh y col. 2015) en pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico en el Instituto de Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN), durante el año 2015. Asimismo se evaluó la relación que existe entre cáncer gástrico, *Helicobacter pylori* positivo y las variables epidemiológicas obtenidas de las historias clínicas y encuestas que se realizaron a los pacientes. Este proceso implicó a participación multidisciplinaria de investigadores, oncólogos clínicos, patólogos oncólogos y biólogos del INEN.

## **1.1. Problema de la Investigación**

### **1.1.1. Planteamiento del Problema**

*Helicobacter pylori* es un microorganismo colonizador de la mucosa gástrica, reconocido como agente etiológico de enfermedades gástricas severas. No se conoce con exactitud la prevalencia de esta bacteria en la población de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico en el Instituto Nacional de enfermedades Neoplásicas (INEN).

### **1.1.2. Formulación del problema**

¿Es significativamente prevalente la infección de la bacteria *Helicobacter pylori* en pacientes diagnosticados como portadores de adenocarcinoma gástrico en el Instituto Nacional de enfermedades Neoplásicas (INEN)?

### **1.1.3. Objetivo general**

Determinar y analizar la prevalencia de la infección de *Helicobacter pylori* mediante la detección de 5 genes de la bacteria en pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico en el Instituto Nacional de enfermedades Neoplásicas (INEN).

### **1.1.4. Objetivos específicos**

- ✓ Evaluar las variables clínicas y epidemiológicas relacionadas a *Helicobacter pylori* en pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico en el Instituto Nacional de enfermedades Neoplásicas (INEN).
- ✓ Amplificar los genes de factores de colonización (*ureA* y *hspA*) y de virulencia (*vacAs*, *vacAm* y *cagA*) de *Helicobacter pylori* en las muestras de recolectadas.
- ✓ Determinar estadísticas de la mortalidad de pacientes con adenocarcinoma gástrico en *Helicobacter pylori* positivo con los pacientes con adenocarcinoma *Helicobacter pylori* negativo.
- ✓ Determinar la frecuencia y distribución en el Perú, de casos de Cáncer gástrico tratados en el INEN.
- ✓ Establecer una relación entre infección por *Helicobacter pylori* y el agua de consumo humano como posible vía de transmisión.



## II. MARCO TEORICO.

### 2.1. Cáncer gástrico

El cáncer de estómago, conocido también como cáncer gástrico, inicia en las células de la mucosa del epitelio gástrico y en su origen se consideran factores intrínsecos (factor genético) que son susceptibles a agresiones del medio ambiente o de la dieta; factores extrínsecos, que son capaces de generar mutaciones genéticas, son reconocidas como lesiones pre malignas, entre ellas, la displasia, los adenomas y más comúnmente la gastritis (Barboza y col., 1996). Múltiples mecanismos han sido asociados al proceso de carcinogénesis, siendo la inflamación crónica, la proliferación celular excesiva y la disminución de la secreción acida, los aspectos más relevantes de la infección. Sin embargo, no solo puede ser explicado con variables independientes debido a que existe una marcada variación individual y ambientales (Lee y col., 2007).

Varios estudios han mencionado la relación existente entre cáncer gástrico y la bacteria *Helicobacter pylori* como cofactor de causa (Milne y col., 1995; Wroblewski y col., 2010; Hsu y col., 2007; Uemura y col., 2010; Carmolinga-Ponce y col. 2011; Samareh y col. 2015).

En el registro de cáncer de Lima Metropolitana: Incidencia y mortalidad 2010-2012, la Dirección General de Epidemiología del Ministerio de Salud del Perú afirma que el riesgo a desarrollar cáncer de estómago está relacionado a factores dietéticos, consumo de tabaco e infecciones por *Helicobacter pylori* (Dirección General de Epidemiología del Ministerio de Salud del Perú, 2016).

## **2.2. Helicobacter pylori**

*Helicobacter pylori* es un bacilo gram negativo y microaerófilo con una morfología espiral en forma de un sacacorchos cuando se encuentra en la mucosa gástrica y menos espiral cuando crece en medios artificiales. Presenta unas dimensiones de 0.5 a 1.0  $\mu\text{m}$  de ancho y de 3  $\mu\text{m}$  de largo. Es ureasa oxidasa y catalasa positivo (Weeks y col., 2000). Tiene de 3 a 4 flagelos polares, fundamentales para su movilidad, y que están recubiertos por una vaina de estructura lipídica, igual que la membrana externa, que parece tener la misión de proteger a los flagelos de su degradación por medio ácido. Existe gran variedad genética entre cepas de *Helicobacter pylori*, lo que le confiere diferencias en su potencial patogénico y carcinogénico. La mayoría de las cepas de *Helicobacter pylori*, expresan factores de virulencia que afectan diferentes rutas de señalización del huésped. Además cuenta con un número de adhesinas que permiten su adherencia al epitelio gástrico. Esta adhesión es esencial para asegurar la prolongada persistencia de la bacteria en el estómago y para la inyección de CagA y otras proteínas en las células epiteliales del huésped (Wroblewski, Peek y col., 2013).

## **2.3. Factores de colonización**

La ureasa es la enzima más estudiada de todos los productos de *Helicobacter pylori*, y representa alrededor de un 5% del total de sus proteínas celulares (Hu y Mobley, 1990). Esta enzima permite a la bacteria neutralizar el ácido clorhídrico del estómago mediante la conversión de urea gástrica en amoníaco, generando con ello un ambiente propicio para su crecimiento (Alarcón, Barquero, y col., 2004). Se localiza en el citosol de la bacteria y en su superficie, aunque esta última localización puede tratarse de un mecanismo no específico para la exportación de la enzima; posee un peso molecular de 600 kDa y está codificada por siete genes denominados ureA (Mobley, 1996). Por otro

lado, las proteínas de choque térmico denominadas “hsp”, ubicadas en la membrana bacteriana, participan en el reconocimiento de receptores celulares y en la adherencia bacteriana. Su expresión es dependiente de las condiciones de acidez del ambiente, por lo que se considera que tienen un papel preponderante en la interacción bacteriana con las células del epitelio gástrico *in vivo* (Ortiz y Coria, 2015).

## 2.4. Factores de virulencia

*Helicobacter pylori* puede inducir la formación de vacuolas en una gran variedad de células eucariotas. Inicialmente se pensó que dicha acción no era de carácter tóxico, pues no era neutralizada por antitoxinas bacterianas; además, el amonio liberado por la actividad de la ureasa puede inducir un daño similar. Sin embargo, posteriormente se logró purificar la toxina responsable de tal alteración, la cual debido a su acción ha sido denominada “toxina vacuolizante”, ya que ella induce la formación de vacuolas en las células afectadas, hallazgo que también se ha constatado en biopsias de pacientes afectados. Contra esta toxina se han identificado anticuerpos de suero en personas infectadas con *Helicobacter pylori*, (Leunk y col. 1988; Cover y col. 1992).

La citotoxina vacuolizante es una proteína codificada por el gen asociado a la vacuolización (*vacA*), este ha sido clonado y su análisis sugiere que codifica una proteína que posee una señal aminoterminal corta, que es escindida para permitir su paso a través de la membrana citoplasmática y una carboxiterminal de 45kDa que actúa como poro. La secuencia de la toxina madura no demuestra homología con otras toxinas conocidas (Cover y col.; Telford y col. 1994). Hasta la fecha todos los aislamientos de *Helicobacter pylori* presentan en su genoma el gen *vacA*; sin embargo, la secreción de la proteína se liga con variaciones en la secuencia señal de secreción: *vacAs* (alelos *s1* y *s2*) cerca del extremo 5' del gen *vacA* y en la región media del gen: *vacAm* (alelos *m1* y *m2*) (Olaya, 2008).

Numerosos estudios describen que el desarrollo de úlcera péptica es más frecuente en pacientes con *Helicobacter pylori* que presenta el tipo s1 frente a los que presentan el s2 (Somodevilla, 2012), aunque este hecho se mantiene en menor medida en países Orientales (Pan, Kolb y col., 1998). Por otro lado, el tipo m1 ha sido asociado a un mayor daño epitelial que el tipo m2 en ensayos con determinadas líneas celulares (Atherton, Peek y col., 1997). Sin embargo otros estudios demuestran que las cepas m2 pueden ser igualmente tóxicas, con la excepción de la línea celular HeLa con la que tiene dificultades de interacción. Probablemente, las distintas formas de la toxina posean diferentes dominios de unión (Cover, Tummuru y col., 1994) siendo la codificada por el tipo m1 la que se asocia con vacuolización en una mayor variedad de células (Atherton, 1997), pero teniendo en cuenta que la región media parece tener una implicación más importante en la interacción con las células gástricas que con la acción tóxica propiamente dicha (Letley, Rhead y col., 2003).

La búsqueda de una respuesta para la incongruencia entre la citotoxicidad y la presencia del gen *vacA*, llevó al hallazgo del gen asociado a la citotoxina (*cagA*) cuya presencia se relaciona con la expresión del gen *vacA* y por lo tanto con la toxigenicidad. Además, está presente sólo en las cepas aisladas de pacientes sintomáticos. En los países desarrollados el 60% de las cepas son *cagA* positivo; pero en los países en vías de desarrollo la proporción de *cagA* positivo es mayor (Blaser, 1996).

Las cepas *cagA* positivo al ser más virulentas están asociadas con ulceración duodenal, gastritis atrófica, adenocarcinoma y recientemente se ha demostrado que producen una profunda inflamación con una densidad bacteriana en el antro gástrico de alrededor de 5 veces la inducida por cepas *cagA* negativo (Atherton y col. 1994).

Por lo tanto, la identificación de los genes *vacA* y *cagA* permite identificar las cepas con mayor virulencia y asociadas con cuadros clínicos más severos.

### III. ANTECEDENTES.

#### 3.1. Cáncer gástrico

La primera descripción de Cáncer Gástrico temprano es atribuida al alemán M. Verse en el año 1903, en su libro “La histogénesis del carcinoma de tejido mucoso” (del alemán “Die Histogenese der Schleimhautcarcinome”), pero el primero en emplear el término fue el francés Bayle en 1833 denominándolo “Cáncer gástrico en su primera etapa”.

Existen diferentes tipos de Cáncer gástrico, entre los cuales aproximadamente entre 90% y 95% de los casos son adenocarcinomas. Estos tumores se originan en las células que forman la capa mucosa del estómago. Siguiendo la clasificación de Lauren, en el Instituto de Enfermedad Neoplásicas, el adenocarcinoma de tipo intestinal representa el 52.8%, el tipo difuso el 43.3% y el tipo mixto el 3.8% (Morales y *col.*, 1996). Se observa que en los países con alto índice de cáncer gástrico existe predominio del tipo intestinal (Barboza y *col.*, 1996). El carcinoma difuso tiene una incidencia bastante similar en la mayoría de países, pero es más común en el sexo femenino y especialmente en los pacientes jóvenes (Barboza y *col.*, 1996). Broders y *col.* clasificaron los carcinomas gástricos de acuerdo a la diferenciación celular en cuatro grados: Adenocarcinoma grado I (células normales pero con núcleos grandes), grado II, grado III y grado IV (no hay formación glandular y puede observarse células gigantes y células de anillo de sello). Desde el punto de vista macroscópico, el adenocarcinoma gástrico se localiza fundamentalmente en el antro (80%) y menos comúnmente en la curvatura mayor 10% (Barboza y *col.*, 1996).

En el hospital Edgardo Rebagliati Martins (Lima, Perú) se realizó el diagnóstico histológico de 5118 casos de cáncer en el periodo 1963-2002

(Espejo, Navarrete y *col.*, 2005), mientras que en el Instituto Nacional de Enfermedades neoplásicas se han registrado 64243 casos de cáncer entre los años 2010-2012. Respecto a esto, se registraron 32865 casos de cáncer de estómago. 4821 fueron casos nuevos de cáncer de estómago en Lima Metropolitana siendo el 55,4% (2671) pacientes varones y 44,6% (2150) pacientes mujeres. La tasa de incidencia de cáncer de estómago descrita en este registro fue de 17,1 por 100000 habitantes, representando el 7.9% de todas las neoplasias malignas y siendo la segunda más importante entre pacientes hombres luego de cáncer de próstata. Además, el riesgo acumulado de desarrollar la enfermedad a los 74 años fue de 2,18% en hombres y 1,42% en mujeres (Dirección General de Epidemiología del Ministerio de Salud del Perú, 2016).

Debido a que el diagnóstico ocurre generalmente en estadios tardíos de la enfermedad, la cirugía es el único tratamiento curativo del cáncer gástrico. El pronóstico está afectado por dos factores principales: la profundidad de la penetración del cáncer primario en las paredes estomacales y la diseminación en los ganglios adyacentes. La ubicación del cáncer primario también influye en los resultados y un cáncer en la parte superior del estómago se asocia con un resultado menos favorable que aquel en la parte media e inferior del estómago (Atherton y *col.*, 2006). La tasa de mortalidad de pacientes con cáncer de estómago en Lima Metropolitana entre el 2004 y 2005 fue de 31,12%, mientras que entre los años 2010 y 2012 fue de 28,71% (Dirección General de Epidemiología del Ministerio de Salud del Perú, 2016). Según la Sociedad Americana del Cáncer en Estados Unidos se registraron 10730 muertes por cáncer de estómago de 26370 pacientes diagnosticados, siendo la tasa de mortalidad para esta enfermedad de 40,69% (American Cancer Society, 2016).

En Lima Metropolitana, el cáncer de estómago fue la primera causa de muerte entre años 2010 y 2012. Se registraron 3437 muertes por cáncer de estómago con una tasa de incidencia de 12.1 por 100000 habitantes

(Dirección General de Epidemiología del Ministerio de Salud del Perú, 2016).

### **3.2. Helicobacter pylori**

*Helicobacter pylori* fue descubierto a inicios del año 1980 y aislado en el año 1982 (Perna, Vaira y col., 2010). Originalmente se describió como un organismo similar a *Campylobacter* y luego como *Campylobacter pyloridis*; nombre de la especie que no se ajustó a las normas de nomenclatura, lo que fue enmendado como *Campylobacter pylori*. No obstante, las diferencias morfológicas de la nueva especie con las preexistentes, su patrón de ácidos grasos y diferencias genéticas, ponía en duda su inclusión en el género *Campylobacter*, lo que llevó a la propuesta del nuevo género *Helicobacter* (Goodwin y col., 1989) y ello motivó al cambio de la descripción del género *Campylobacter* (Vandamme y col., 1991).

La infección por *Helicobacter pylori* es una de las más comunes en el hombre y está distribuida mundialmente. Sin embargo su prevalencia varía según la región geográfica y de acuerdo con el nivel socioeconómico de la población (Suerbaum y col., 2002).

En poblaciones desarrolladas se han descrito tasas de prevalencia menores que en países en vías de desarrollo, hallazgo relacionado al nivel socioeconómico que predomina y condiciones de salubridad pública que en estos últimos se presenta (Ruiz y col., 2002). Actualmente se estima que más del 50% de la población mundial está infectada por *Helicobacter pylori* (Reporte del Consenso mundial de Kyoto, 2005 y Reporte de la prevalencia de *Helicobacter pylori* en los países en desarrollo de la OMS, 2010).

Un reporte reciente realizado en el pueblo joven Pampas del distrito de San Juan de Miraflores en Lima (Perú) indica una prevalencia de

*Helicobacter pylori* en más del 80% de esta población de nivel socioeconómico bajo durante el periodo 2000-2002 (Soto y col., 2012).

El Consenso Latinoamericano sobre infección por *Helicobacter pylori* celebrado en el año 2000, encontró recurrentemente que las prevalencias no varían con el estado socioeconómico, ni con el sexo, asimismo no aumenta con la edad, esto último puede ser debido a que la infección se adquiere en edad temprana y a las diferencias migratorias de estas poblaciones.

Estudios realizados en países de Europa, han descrito tasas de prevalencia variables entre 4 y 41% con un promedio de 27.1% (Gabarini y col., 1995). Otro estudio realizado en Gales, UK describe una prevalencia global de 56.9%, encontrando en pacientes de entre 25-30 años una prevalencia de 29.8% la misma que se incrementa en pacientes mayores de 45 años (Sitas y col., 1991). En países desarrollados también se han encontrado diferencias dentro de los grupos poblacionales. En Estados Unidos se han encontrado en blancos no hispanos una prevalencia de 17% frente al 42% en inmigrantes mexicanos (Everhart y col., 2000).

A pesar de la alta incidencia de la infección por *Helicobacter pylori*, los reservorios y vías de transmisión todavía no están claras, aunque se han sugerido múltiples rutas de transmisión. En países en vías de desarrollo, como el Perú hay una elevada prevalencia de enfermedades infectocontagiosas producidas por microorganismos que son viabilizados por el agua de consumo humano. En un reciente estudio se demostró que el agua de la Atarjea, central de procesamiento desde donde se distribuye el agua a la ciudad de Lima, presentaba material genético de *Helicobacter pylori* (Ramírez y col., 2004).

La erradicación de la infección de *Helicobacter pylori* es posible, disminuyendo de forma significativa el riesgo de desarrollar cáncer gástrico en pacientes que no presentan lesiones previas, reforzando así el



principio de que este organismo influye en las primeras etapas de carcinogénesis gástrica (Stolte y col., 2002). El tratamiento de la infección cuando es sintomática consiste en una combinación de tres drogas: claritromicina, amoxicilina o metronidazol y omeprazol. En pacientes con úlcera, el procedimiento habitual es erradicar la infección hasta que la úlcera sana. Desafortunadamente, se ha incrementado el número de infecciones por cepas resistentes a este tratamiento.

### **3.3. Relación *Helicobacter pylori* y Cáncer Gástrico**

La mayoría de los pacientes infectados por *Helicobacter pylori*, desarrollan lesiones no neoplásicas. Alrededor de 10% de los individuos infectados desarrollan úlceras peptídicas, solo el 1-3% desarrollan adenocarcinoma gástrico y <0.1% desarrollan linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT) (Peek, Crabtree y col., 2006).

La relación entre la bacteria, gastritis crónica y cáncer gástrico ha sido ampliamente descrita en diversos estudios a nivel mundial. En 1975 se asoció la presencia de *Helicobacter pylori* con la inflamación de la mucosa gástrica y posteriormente en 1985 con la úlcera péptica, estableciendo de este modo una relación causal entre *Helicobacter pylori* y las lesiones de la mucosa gástrica (Milne y col., 1995), con un riesgo para llegar a causar cáncer gástrico del 75%. Esto hace vital su detección temprana con la finalidad de dar tratamiento (Wroblewski y col., 2010).

La hipótesis corriente que relaciona *Helicobacter pylori* con el proceso de carcinogénesis gástrica, se basa en un daño progresivo inducido por la presencia prolongada de *Helicobacter pylori*, que lleva a lesiones que evolucionan de una gastritis superficial, gastritis crónica, gastritis atrófica donde puede encontrarse una infiltración inflamatoria importante con agregados foliculares linfoides que destruyen la mucosa a tal grado, que ocurre pérdida de la función, induciendo posteriormente una metaplasia

intestinal, displasia y generándose una patología neoplásica (Correa y col., 1992). La metaplasia intestinal puede ser considerada como una estrategia defensiva contra *Helicobacter pylori*, ya que esta bacteria sólo coloniza el epitelio gástrico (Rokkas y col., 1991).

En Taiwán, un seguimiento realizado durante 6.3 años, el cáncer gástrico se desarrolló en 1.3% de pacientes infectados por *Helicobacter pylori* y 0% en no infectados (Hsu y col., 2007). En otro estudio en la población japonesa, con un seguimiento de 7.8 años, se observó que el 2.9% de los pacientes infectados desarrollaban cáncer gástrico comparados con el 0% en el grupo de los no infectados. En esta población, el cáncer gástrico llegaría a desarrollarse en el 5% de personas infectadas por *Helicobacter pylori*, en un periodo aproximado de 10 años (Uemura y col., 2010).

En nuestro país, no se han establecido datos certeros sobre infecciones de *Helicobacter pylori* en pacientes con neoplasias gástricas, sin embargo durante el 2002 en una investigación realizada en el Policlínico Peruano-Japonés de Lima por Ruiz y col., se encontró una prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* en pacientes dispépticos que acudieron a consulta externa de un 40%. No se encontraron diferencias significativas en el predominio de la infección y su relación a los factores de: sexo, estrato socioeconómico y tiempo de enfermedad.

Dada la importancia clínica de la infección *Helicobacter pylori* en la población peruana, la detección de este microorganismo se estableció como la base para la realización de este estudio. De la misma manera se analizará si existen posibles asociaciones entre la infección de *Helicobacter pylori* y el cáncer gástrico mediante detección de los genes de factores de colonización y de virulencia específicos de *Helicobacter pylori*: hspA, ureA, vacA-s, vacA-m, y cagA (Carmolinga-Ponce y col. 2011; Samareh y col. 2015). Además se realizará un análisis epidemiológico de *Helicobacter pylori*, cáncer gástrico y las variables de estudio obtenidas de las historias clínicas y encuestas.

## IV. HIPOTESIS.

La hipótesis del presente estudio se centra en que la prevalencia de *Helicobacter pylori* en pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) es mayor comparado a la prevalencia publicada a nivel nacional y que existe una relación significativa entre el hallazgo de *Helicobacter pylori*, prevalencia de cáncer gástrico y variables epidemiológicas.

## **V. MATERIALES Y METODOS.**

### **5.1. Lugar de ejecución.**

El desarrollo de la presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio del Departamento de Investigación, y Laboratorio del Banco de Tejidos Tumorales del Departamento de Patología y del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) durante los años 2015 y 2016.

### **5.2. Tipo y diseño de investigación.**

La presente investigación se realizó en Laboratorio, buscando encontrar una vinculo estadístico entre la infección de la bacteria *Helicobacter pylori* y pacientes de adenocarcinoma gástrico. Por lo tanto se empleó un método de correlación para el análisis de los datos. El diseño de este estudio siguió las etapas de una investigación de tipo experimental o de laboratorio.

### **5.3. Consentimiento informado.**

Se elaboró un formato de consentimiento informado para la donación voluntaria de muestra al proyecto de investigación. En este consentimiento se informa y se resuelven las dudas acerca de los alcances de la participación en la investigación realizada (Anexo 1). El proyecto de investigación fue inicialmente aprobado por el Comité Revisor de proyectos del INEN. Una vez aprobado, (código INEN15-10) (Anexo 2), el proyecto, junto con el consentimiento informado, fueron sometidos al Comité de Ética del INEN para su aprobación (Anexo 3).

#### **5.4. Ficha de recolección de datos.**

Se elaboró una formato de ficha de recolección de los datos de los pacientes, donde se incluyeron además de las variables clínicas y patológicas, aquellas necesarias para la realización del estudio, como el lugar de nacimiento, lugar de residencia, edad, tipo de agua de consumo y antecedentes de enfermedad gástrica (Anexo 4). Cada paciente fue entrevistado personalmente durante su periodo de hospitalización.

#### **5.5. Población.**

La población estudiada comprendió pacientes atendidos por el Departamento de Cirugía de Abdomen del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) y diagnosticadas con adenocarcinoma gástrico.

##### **5.5.1. Criterios de inclusión.**

Se incluyó en el estudio a pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico a los cuales se le realizó gastrectomía radical o parcial por el Departamento de Cirugía de Abdomen del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) en un periodo comprendido entre los años 2015 y 2016.

##### **5.5.2. Criterios de exclusión.**

Se excluyeron del estudio a pacientes con diagnóstico de neoplasias diferentes a adenocarcinoma gástrico, pacientes  $\leq 18$  años, pacientes con historial de otra neoplasia previa, pacientes con infección activa de HIV, HBV o HCV y pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma gástrico con cirugía sin éxito (es decir sin resección de tejido).

## 5.6. Tamaño de la muestra.

El trabajo se realizó con un tamaño de muestra  $n=144$ . Las muestras fueron obtenidas de procedimientos quirúrgicos de pacientes atendidos por el Departamento de Cirugía de Abdomen de INEN.

## 5.7. Elaboración de una base de datos.

Se elaboró una base de datos en programa Excel (*Microsoft Corporation, EEUU*) de las variables obtenidas de las encuestas y revisión de las Historias Clínicas de cada paciente (Anexo 5). Se organizaron 9 variables obtenidas de las encuestas: procedencia, sexo, edad, lugar de residencia, tiempo de permanencia en el lugar de residencia, tipo de abastecimiento de agua, tipo de consumo de agua, antecedentes de enfermedad gástrica e indicios de familiares con enfermedades gástricas (Tabla 1). Por otro lado se obtuvieron 30 variables clínicas obtenidas del historial hospitalario del cada paciente.

| VARIABLE  | TIPO DE VARIABLE      | ESCALA DE MEDICIÓN                         | DEFINICIÓN OPERACIONAL                           | REGISTRO         |
|---|-----------------------|--|--|------------------|
| Procedencia                                     | Cualitativa nominal   | Nominal: Nombre del lugar                  | Entrevista, Hoja de filiación e Historia Clínica | Físico y virtual |
| Sexo  | Cualitativa nominal   | Nominal dicotómico                         | Entrevista, Hoja de filiación e Historia Clínica | Físico y virtual |
| Edad  | Cuantitativa continua | Años                                       | Entrevista y Hoja de filiación                   | Físico y virtual |
| Domicilio                                       | Cualitativa nominal   | Nominal: Nombre del lugar                  | Entrevista y Hoja de filiación                   | Físico y virtual |
| Tiempo de permanencia en el lugar de residencia | Cuantitativa continua | Años                                       | Entrevista                                       | Físico y virtual |
| Tipo de abastecimiento de agua                  | Cualitativa nominal   | Nominal: Nombre del tipo de abastecimiento | Entrevista                                       | Físico y virtual |
| Agua de consumo                                 | Cualitativa nominal   | Nominal: Tipo de agua                      | Entrevista                                       | Físico y virtual |
| Antecedentes de enfermedades gástricas          | Cualitativa nominal   | Nominal: Nombre de la enfermedad           | Entrevista e Historia Clínica                    | Físico y virtual |
| Antecedentes familiares                         | Cualitativa nominal   | Nominal: Número de personas y enfermedad   | Entrevista                                       | Físico y virtual |

**Tabla 1. Variables usadas en la obtención de datos mediante entrevista del paciente.** Se describen las variables estudiadas durante la realización del proyecto, definiendo el tipo, escala de medición, definición operacional, y forma de registro.

## **5.8. Obtención de la muestra biológica.**

Por cada paciente se tomaron tres tipos de muestras: tejido tumoral, tejido sano proximal al tumor, y tejido sano distal al tumor.

El procedimiento para la toma de muestra se realizó de la siguiente manera:

1. Diariamente se revisó la programación de cirugías para la selección de los pacientes. Posteriormente se comunicó la selección de los pacientes al Departamento de Patología.
2. El personal encargado del laboratorio llevó a sala de congelación del Departamento de Patología tubos rotulados para la toma de las muestras. Estas se tomaron con el apoyo del personal de Patología para garantizar su integridad para el posterior diagnóstico patológico del paciente.
3. Los tubos se transportaron en nitrógeno líquido a fin de mantener a las muestras en óptimas condiciones.
4. Se registró el ingreso de cada muestra y se almacenaron a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la realización del procedimiento de extracción de ADN. Cada paciente fue codificado para mantener el anonimato de los mismos. La codificación consistió en tres letras correspondientes a las iniciales del nombre y apellidos, seguidas de un número de cuatro dígitos asignado por el Banco de Tejidos Tumorales del Departamento de Patología (Anexo 6).

## **5.9. Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN).**

La extracción del ADN genómico, se realizó empleando el kit comercial *GeneJET Genomic DNA (THERMO SCIENTIFIC, Lithuania)* realizando algunas modificaciones al protocolo.

Se emplearon 20mg de tejido (almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ ), cortándolo en pequeñas piezas con ayuda de un bisturí. La lisis del tejido se realizó añadiendo 180 $\mu\text{L}$  de solución de digestión y 20 $\mu\text{L}$  de una solución de proteinasa K. La muestra se homogenizó en el agitador vortex (*Labnet International, Inc*). Seguido a esto, la muestra se incubó en el termobloque (*Thermomixer confort, Eppendorf*) a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas, agitando en el vortex cada 30 minutos. Al finalizar la digestión, se agregó 20 $\mu\text{L}$  de una solución de Rnasa A y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó 200 $\mu\text{L}$  de solución de Lisis y 400 $\mu\text{L}$  de etanol 50% con mezcla en vortex durante 15 segundos.

Para la etapa de lavados, se transfirió el contenido del tubo a una columna de purificación insertada en un tubo colector. Se agregó 500 $\mu\text{L}$  de solución de lavado I (*Wash Buffer I*) y la muestra se centrifugó a 8000xg durante 1 minuto. Se descartó el tubo colector. Seguidamente se colocó la columna en un tubo colector nuevo y se agregó 500 $\mu\text{L}$  de solución de lavado II (*Wash Buffer II*) para centrifugar la muestra al máximo de revoluciones durante 3 minutos.

Finalmente se desechó el tubo colector y se insertó la columna en un tubo de 1.5mL nuevo y rotulado. Se añadió 45 $\mu\text{L}$  de solución de elución precalentado ( $56^{\circ}\text{C}$ ) a la columna, incubando la muestra durante 2 minutos y se centrifugó el tubo durante 1 minuto a 8000xg. Se repitió esta etapa dos veces, obteniendo un volumen final de 90 $\mu\text{L}$ .

Las muestras de ADN se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su cuantificación o análisis (Anexo 7).

## **5.10. Cuantificación de ácidos nucleicos.**

Para determinar la concentración y pureza de ADN, se realizaron lecturas fluorométricas mediante el Fluorómetro Qubit (v2.0 Invitrogen by Life Technologies). Este equipo realiza lecturas de ADN a las longitudes de



onda 260 y 280nm. La relación de las absorbancias obtenidas a 260nm y 280nm (A260/A280) da idea del grado de pureza de la preparación. Para ADN, con la relación A260/A280  $\approx$  1.8 se tiene una buena pureza.

Para ello se empleó el Qubit de Alta sensibilidad (del inglés, *High sensibility (HS) dsDNA Assay kit (life technologies)*).

Las cuantificaciones se realizaron del siguiente modo: se preparó una Solución de trabajo compuesta por Qubit dsDNA HS Buffer y el Fluorocromo Qubit dsDNA HS 200x concentrado en DMSO en una proporción 199 $\mu$ L: 1 $\mu$ L.

La preparación de los estándares para la calibración del equipo se realizó usando los reactivos *dsDNA HS Estándar #1* y *dsDNA HS Estándar #2*, proveídos por el kit de cuantificación. Se preparó un tubo para cada estándar, conteniendo 190 $\mu$ L de Solución de trabajo y 10 $\mu$ L del estándar. El equipo se estandarizó cada vez que se realizaba una nueva lectura.

La muestra se preparó para la lectura colocando 199 $\mu$ L de solución de trabajo más 1 $\mu$ L de muestra de ADN. Se procedió a la lectura en el Fluorómetro, obteniendo la cuantificación en  $\mu$ g/mL ó ng/ $\mu$ L.

Para cuantificar los cebadores se siguió el mismo procedimiento, pero se empleó el reactivo Qubit de Hebra simple (del inglés, *Single-Stranded (HS) ssDNA Assay kit (life technologies)*).

### **5.11. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real.**

Las reacciones de PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) se realizaron en el *Termociclador LightCycler® 96 Instrument (ROCHE®)*. Cada mezcla de reacción contenía 1X *FastStart Essential DNA Green Master*, 400mM del cebador sentido, 400mM del cebador antisentido, 2 $\mu$ L

de dilución correspondiente de DNA y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen final de 20 µL. Las reacciones para cada cebador se realizaron de acuerdo a las temperaturas de amplificación (T<sub>m</sub>) de cada uno de los cebadores (Tabla 2).

Se emplearon cinco pares de cebadores específicos para *Helicobacter pylori* pertenecientes a 4 grupos de genes, 2 de factores de colonización y 2 de virulencia. Los genes de factores de colonización fueron: ureA del gen de Ureasa, R-(TTGTCTGCTTGTCTATCAACC) y F-(GAGAATGAGATGAACTCACCC); hspA del gen codificante de la proteína de shock térmico, R-(GCTATCTGAAAATTTGATTTCTTTTGC) y F-(TGCGCTATAGTTGTGTGCGC).

Los genes de factores de virulencia relacionados a la citotoxina vacuolizante: vacA-s, R-(GCGTCAAATAATTCCAAGG) y F-(CAATCTGTCCAATCAAGCGAG); vacA-m, R-(CTGCTTGAATGCGCCAAAC) y F-(ATGGAAATACAACAAACACAC).

El gen de virulencia asociado a la citotoxina cagA, R-(TCTAATCCTGTTTGCTCCCCA) y F-(CTCATTGCGAAGGCGACCT).

| <b>GEN</b>    | <b>CEBADORES</b> | <b>SECUENCIA</b>            | <b>T<sub>m</sub></b> |
|---------------|------------------|-----------------------------|----------------------|
| <b>hspA</b>   | <b>hspA R</b>    | GCTATCTGAAAATTTGATTTCTTTTGC | 62-59                |
|               | <b>hspA F</b>    | TGCGCTATAGTTGTGTGCGC        |                      |
| <b>Urea</b>   | <b>ureA R</b>    | TTGTCTGCTTGTCTATCAACC       | 55-58                |
|               | <b>ureA F</b>    | GAGAATGAGATGAACTCACCC       |                      |
| <b>vacA s</b> | <b>VA1 R</b>     | CTGCTTGAATGCGCCAAAC         | 52-63                |
|               | <b>VA1 F</b>     | ATGGAAATACAACAAACACAC       |                      |
| <b>vacA m</b> | <b>VAG R</b>     | GCGTCAAATAATTCCAAGG         | 52-63                |
|               | <b>VAG F</b>     | CAATCTGTCCAATCAAGCGAG       |                      |
| <b>CagA</b>   | <b>cagA R</b>    | TCTAATCCTGTTTGCTCCCCA       | 62-64                |
|               | <b>cagA F</b>    | CTCATTGCGAAGGCGACCT         |                      |

**Tabla 2.** Cebadores con los segmentos de las secuencias sentido y antisentido utilizadas para detectar a *Helicobacter pylori* y Temperatura de fusión (T<sub>m</sub>, del inglés Melting temperatura) de cada cebador.

### 5.11.1. Condiciones de la PCR.

La detección de la señal se realizó al finalizar el paso de elongación de la reacción. Las condiciones de la qPCR fueron: (i) 95°C 10min; y (ii) 95°C 15s, 60°C 20s, 72°C 20s (45 ciclos). La temperatura de fusión ( $T_m$  (50mM Na<sup>+</sup>)) varió dependiendo del cebador utilizado en la qPCR de la siguiente manera: ureA del gen de Ureasa, R (55°C) y F (58°C); hspA del gen codificante de la proteína de shock térmico, R (62°C) y F (59°C). Los genes de virulencia relacionados a la citotoxina vacuolizante: vacA-s, R (52°C) y F (63°C); vacA-m, R (52°C) y F (63°C). El gen de virulencia asociado a la citotoxina: cagA, R (62°C) y F (64°C).

Todas las reacciones incluyeron un control, donde la muestra se sustituyó por agua. Para garantizar la funcionabilidad de los cebadores se realizaron pruebas de estandarización. Como control positivo se empleó ADN genómico (ADNg) de la cepa 706557 de *Helicobacter pylori* de obtenida de la ATCC.

Las curvas estándar para cada pareja de cebadores se realizaron empleando el control positivo de ADNg *Helicobacter pylori*. Para ello se realizaron 20 diluciones seriadas del control positivo partiendo de una concentración inicial de 50ng de molde de ADNg. Se prepararon las reacciones de PCR con el molde de ADNg de cada dilución por duplicado.

Los resultados de la PCR fueron visualizados en el *Software LightCycler® 96 Instrument Manager versión SW 1.1 (Roche)*.

Los datos obtenidos en estas reacciones en el PCR tiempo real se organizaron en una hoja de cálculo de Excel 2010 (*Microsoft Office Professional Plus 2010*) obteniendo los valores logarítmicos de la concentración de las 20 diluciones del control positivo y los valores promedios de los ciclos de cuantificación (Cq). Estos datos permitieron la construcción de una curva de regresión lineal y una ecuación para calcular concentraciones de cada gen. (Anexo 8).

Los resultados de las muestras procesadas en el PCR en tiempo real se transfirieron y organizaron en hojas de cálculo Excel. Se despejaron las ecuaciones para cada gen obtenidas en las curvas de estandarización y se sustituyeron los datos de Cq para obtener el logaritmo de las concentraciones obtenidas. Se realizaron cálculos anti-logarítmicos para obtener las concentraciones reales en nanogramos (ng) y luego se transformaron a picogramos (pg) (Anexo 9). Los datos se clasificaron por gen, por paciente y por tipo de muestra (Tumor, proximal, distal).

## **5.12. Análisis estadístico.**

### **5.12.1. Base de datos: Encuestas e Historias clínicas**

Los datos obtenidos se colocaron en una hoja de cálculo Excel organizando las variables mediante una tabla de doble entrada. Se obtuvieron las estadísticas descriptivas con parámetros porcentuales de distribución en grupos. Se buscaron valores de significancia entre los grupos y subgrupos estudiados.

### **5.12.2. Detección de genes**

Se obtuvieron parámetros porcentuales de la presencia y ausencia de cada gen estudiado en la investigación. En los genes presentes se calculó la concentración real. Los datos obtenidos se colocaron en una hoja de cálculo Excel organizando las variables mediante tablas. Se obtuvieron las estadísticas descriptivas con parámetros porcentuales de prevalencia para cada tipo de muestra. Se buscaron valores de significancia entre los grupos de genes y muestras estudiadas.

## VI. RESULTADOS

### 6.1. Control positivo.

Se utilizó como control positivo ADNg *Helicobacter pylori* de ATCC (706557). Su cuantificación dio 30.8ng/μL en el fluorómetro Qubit v2.0. Siendo este último el que dio mejores cuantificaciones y señales de amplificación en la PCR Tiempo Real, por lo que se utilizó para realizar la estandarización de los cebadores.

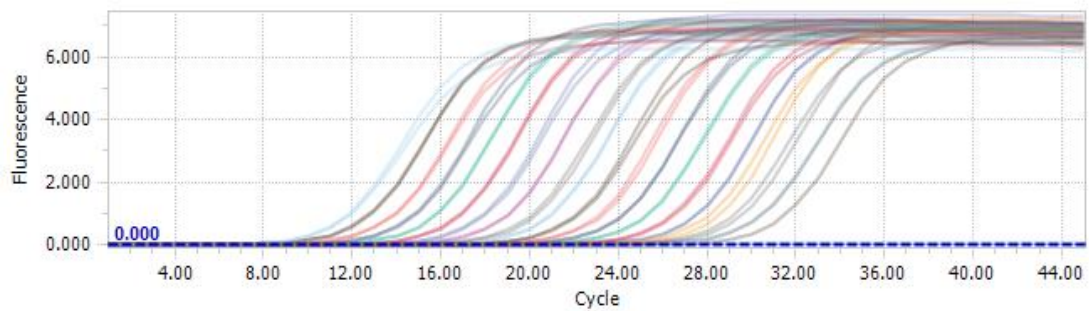
### 6.2. Obtención de Curvas estándar para cada cebador.

Para la estandarización y puesta a punto se realizó un gradiente de temperatura de los cebadores. La sensibilidad del control positivo ADNg *Helicobacter pylori* de ATCC (706557) y la señal de amplificación de los cebadores se evaluó mediante el análisis de curvas estándar para cada uno de ellos.

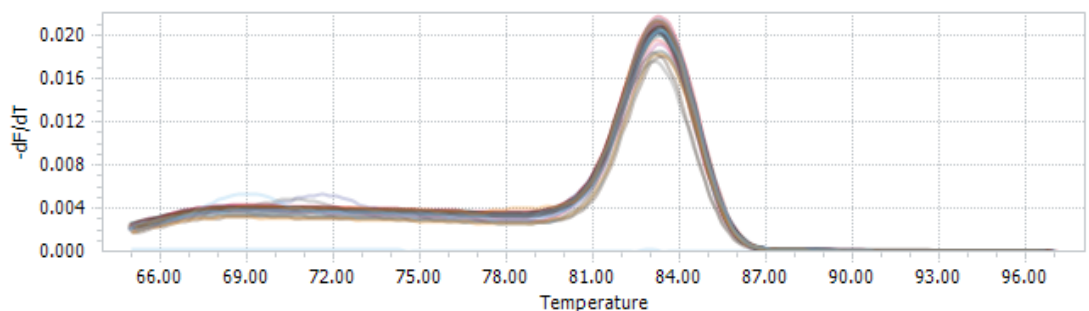
Se realizaron 20 diluciones seriadas del control positivo partiendo de un stock de 50ng de molde de DNA. Se prepararon las reacciones de PCR con el molde de ADN de cada dilución.

Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo *Real time PCR LightCycler® 96 Instrument (ROCHE®)* a las temperaturas correspondientes para cada cebador (Anexo 10) a partir de un programa estándar en placa. Se realizó una repetición para cada reacción por cebador (Figura 1 y 2).

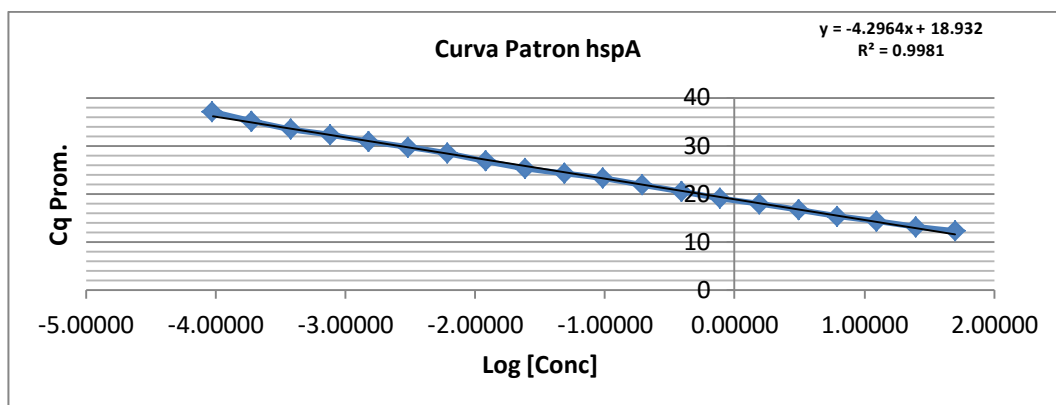
Los datos obtenidos en estas reacciones en el PCR tiempo real se organizaron en una hoja de cálculo de Excel 2010 (Microsoft Office Professional Plus 2010) obteniendo los valores logarítmicos de la concentración de las 20 diluciones seriadas del control positivo y los valores promedios de los ciclos de cuantificación (Cq). Estos datos permitieron la construcción de una curva de regresión lineal y la formulación de una ecuación para obtener las concentraciones de cada gen (Figura 3) (Anexo 11).



**Figura 1.** Curvas de fluorescencia obtenidas de la puesta a punto del cebador cagA para detectar el gen asociado a la citotoxina de *Helicobacter pylori* en el termociclador PCR LightCycler® 96 Instrument (ROCHE®).



**Figura 2.** Curvas melting obtenidas de la puesta a punto del cebador cagA para detectar el gen asociado a la citotoxina de *Helicobacter pylori* en el termociclador PCR LightCycler® 96 Instrument (ROCHE®).



**Figura 3.** Curva de regresión lineal obtenida para la formulación de una ecuación para el cálculo de la concentración del gen hspA, correspondiente a la proteína de shock térmico de *Helicobacter pylori*.

### 6.3. Bases de datos.

Se han estudiado 144 pacientes de los cuales el 49% son mujeres. De los pacientes estudiados 89.6% fueron *Helicobacter pylori* positivos (Tabla 3).

|   | Recuento | %     |
|---|----------|-------|
| <b><i>Helicobacter pylori</i> (agrupado) Negativo</b> | 19       | 10.4% |
| <b>Positivo</b>                                       | 125      | 89.6% |

**Tabla 3.** Estadística descriptiva de los casos *Helicobacter pylori* positivos encontrados en nuestro estudio.

#### 6.3.1. Encuestas.

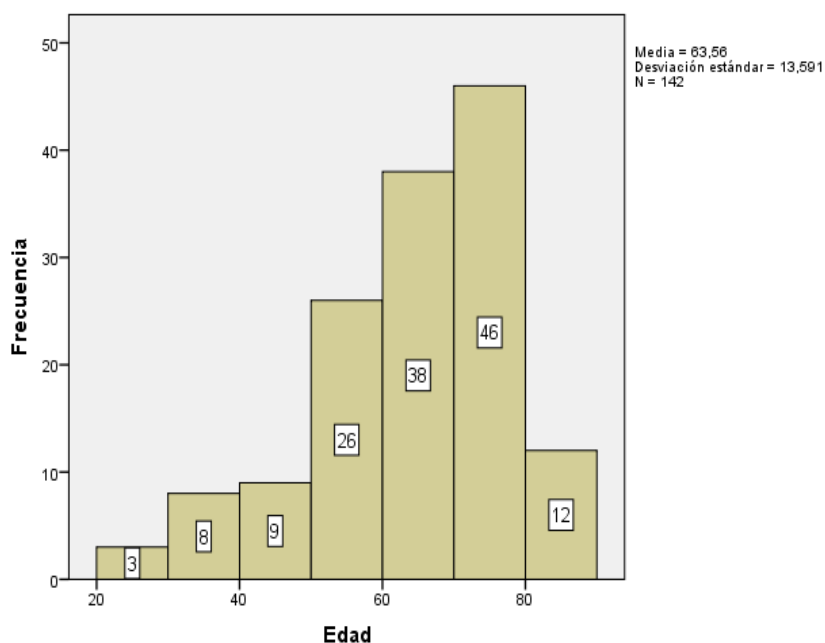
De los pacientes estudiados, el 51% fueron varones y 49% fueron mujeres (Tabla 4). La edad media de la muestra total es de 64 años (rango de 28-88) mientras la edad media de los casos positivos fue de 63 años. La edad media de los varones fue de 64. La edad media de las mujeres fue de 61. Los pacientes varones urea y hspA positivos presentaron una edad media de 61 y 62. Los pacientes mujeres urea y hspA positivos presentaron una edad media de 61 y 62. A la vez, la edad media de los pacientes con urea y hspA negativos fue de 66 en ambos (Tabla 5 y Figura 4).

| Sexo   |           |  |            |              |                     |                        |
|--------|-----------|--|------------|--------------|---------------------|------------------------|
| Válido |           |  | Frecuencia | Porcentaje % | Porcentaje válido % | Porcentaje acumulado % |
|        | Femenino  |  | 70         | 49.0         | 49.0                | 49.0                   |
|        | Masculino |  | 73         | 51.0         | 51.0                | 100.0                  |
|        | Total     |  | 143        | 100.0        | 100.0               |                        |

**Tabla 4.** Estadística descriptiva de los casos estudiados según sexo.

| Edad                |          |        |
|---------------------|----------|--------|
| N                   | Válido   | 142    |
|                     | Perdidos | 1      |
| Media               |          | 63.56  |
| Desviación estándar |          | 13.591 |
| Mínimo              |          | 27     |
| Máximo              |          | 89     |

**Tabla 5.** Promedio, desviación estándar y límites de edad de los casos estudiados según la detección de los genes constitutivos de *Helicobacter pylori*.



**Figura 4.** Histograma de la estadística de la expresión de los genes constitutivos de *Helicobacter pylori* por grupo de edades de los pacientes con adenocarcinoma gástrico en el INEN.

El 76.9% de los pacientes estudiados afirmaron poseer el tipo de abastecimiento de agua potable en casa. El 3.5%; 11.9%; y 2.1%



afirmaron poseer los abastecimientos de agua por cisterna, pozos y otros respectivamente. El 64% de los pacientes ureA positivo y el 80,9% de los pacientes hspA positivo poseían de abastecimiento agua potable (Tabla 6).

| Tipo de abastecimiento de agua |          |            |              |                     |                        |
|--------------------------------|----------|------------|--------------|---------------------|------------------------|
|                                |          | Frecuencia | Porcentaje % | Porcentaje válido % | Porcentaje acumulado % |
| Válido                         | Potable  | 110        | 76.9         | 79.1                | 79.1                   |
|                                | Cisterna | 5          | 3.5          | 3.6                 | 82.7                   |
|                                | Pozo     | 17         | 11.9         | 12.2                | 95.0                   |
|                                | Otros    | 3          | 2.1          | 2.2                 | 97.1                   |
|                                | Río      | 4          | 2.8          | 2.9                 | 100.0                  |
|                                | Total    | 139        | 97.2         | 100.0               |                        |
| Perdidos                       | Sistema  | 4          | 2.8          |                     |                        |
| Total                          |          | 143        | 100.0        |                     |                        |

**Tabla 6.** Estadística del tipo de abastecimiento de agua al que tienen acceso los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico en el INEN.

El tipo de agua más consumida por los pacientes estudiados fue en su mayoría de agua hervida (74.8%). El segundo tipo de agua más consumida es de agua domestica con filtro (9.1%). El agua embotellada, la domestica sin filtro y cruda representaron el 3.5%; 6.3%; y 3.5% respectivamente. De lo pacientes consumidores de agua hervida 63,6% fueron positivo a la detección del gen ureA y 80,5% al gen hspA (Tabla 7).

| Agua de consumo |                      |            |              |                     |                        |
|-----------------|----------------------|------------|--------------|---------------------|------------------------|
|                 |                      | Frecuencia | Porcentaje % | Porcentaje válido % | Porcentaje acumulado % |
| Válido          | Embotellada          | 5          | 3.5          | 3.6                 | 3.6                    |
|                 | Hervida              | 107        | 74.8         | 77.0                | 80.6                   |
|                 | Doméstica con filtro | 13         | 9.1          | 9.4                 | 89.9                   |
|                 | Doméstica sin filtro | 9          | 6.3          | 6.5                 | 96.4                   |
|                 | Cruda                | 5          | 3.5          | 3.6                 | 100.0                  |
|                 | Total                | 139        | 97.2         | 100.0               |                        |
| Perdidos        | Sistema              | 4          | 2.8          |                     |                        |
| Total           |                      | 143        | 100.0        |                     |                        |

**Tabla 7.** Estadística del tipo de consumo de agua de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico en el INEN.

Mientras que el 51% de los pacientes afirman no haber presentado algún antecedente clínico, 49% de los pacientes estudiados dicen haber presentado antecedentes clínicos, la gastritis fue el principal antecedente que los pacientes (29.4%). De estos, el 66,7% y 84,6% dieron positivos en la detección de los genes ureA y hspA. Otros antecedentes como úlceras, problemas gástricos permanentes (PGP) y demás representaron el 1.4%; 7%; y el 1.4% respectivamente (Tabla 8).

| Antecedentes |           |            |              |                     |                       |
|--------------|-----------|------------|--------------|---------------------|-----------------------|
|              |           | Frecuencia | Porcentaje % | Porcentaje válido % | Porcentaje acumulado% |
| Válido       | Ninguno   | 73         | 51.0         | 56.6                | 56.6                  |
|              | Gastritis | 42         | 29.4         | 32.6                | 89.1                  |
|              | Úlceras   | 2          | 1.4          | 1.6                 | 90.7                  |
|              | PGP       | 10         | 7.0          | 7.8                 | 98.4                  |
|              | Otros     | 2          | 1.4          | 1.6                 | 100.0                 |
|              | Total     | 129        | 90.2         | 100.0               |                       |
| Perdidos     | Sistema   | 14         | 9.8          |                     |                       |
| Total        |           | 143        | 100.0        |                     |                       |

**Tabla 8.** Estadística de los antecedentes gástricos pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico en el INEN.

### 6.3.2. Variables Clínicas.

Se evaluaron siete variables clínicas tomadas de las historias de los pacientes con muestras consideradas en el estudio por qPCR. Estas variables fueron: grado histológico, localización del tumor, estadio clínico, tipo de cirugía, Bormann, subtipo histológico y antecedentes gástricos (Tabla 9).

El 47.7% de los casos positivos a *Helicobacter pylori* se presentaron en tumores con grado histológico G3. Los grados histológicos G1 y G2 representaron el 18.5% y 28.5% de la población positiva a la bacteria. En el 5.4% de los casos el grado histológico fue indiferenciado (Tabla 9).

En la mayoría de los casos el tumor se ubicó en el antro estomacal (71.3%). Mientras el 23.2% de los tumores estudiados se ubicaron en el cuerpo gástrico y el 1.8% en el fondo estomacal (Tabla 9).

Las estadísticas respecto al estadio clínico revelaron que el 49.4% de los casos ya se encontraban en estadio IV. Por otro lado en el estadio 0 solo se encontró un 0.6% de los casos (Tabla 9).

En el 61% de los casos *Helicobacter pylori* positivos el tipo de cirugía realizada para extirpar el tumor fue la gastrectomía subtotal distal. El 28.7% se realizó una gastrectomía total, en el 5.5% gastrectomía total radical y en el 4.9% gastrectomía subtotal (Tabla 9).

El tipo de clasificación Bormann más recurrente en los casos positivos para la bacteria estudiada fue el tipo III con 57.2%, mientras el menos recurrente fue Bormann V con 1.3% de la población de estudio. Bormann I, II, y IV representaron el 7.5%, 14.5% y 19.5% respectivamente (Tabla 9).

Los casos positivos estudiados presentaron un subtipo histológico Intestinal dominante (41%), seguido de los subtipos difuso (19%) y mixto (15.2%). Otros subtipos representaron el 23.8% e indiferenciados el 1% (Tabla 9).

El 50.3% de los pacientes *Helicobacter pylori* positivos no presentaron algún antecedente gástrico. Por otro lado el 31.4% de los casos evidenciaron antecedentes de gastritis. En menores proporciones se observaron antecedentes de Ulceras (8.5%) y PGP (8.5%). Otros antecedentes representaron el 1.3% de la población (Tabla 9).

|                        |                              | <i>Helicobacter pylori</i> (agrupado) |       |          |       |          |       |         |
|------------------------|------------------------------|---------------------------------------|-------|----------|-------|----------|-------|---------|
|                        |                              | Total                                 |       | Negativo |       | Positivo |       | P value |
|                        |                              | Recuento                              | %     | Recuento | %     | Recuento | %     |         |
| Grado histológico      | G1                           | 27                                    | 18.6% | 3        | 20.0% | 24       | 18.5% | 0.418   |
|                        | G2                           | 44                                    | 30.3% | 7        | 46.7% | 37       | 28.5% |         |
|                        | G3                           | 66                                    | 45.5% | 4        | 26.7% | 62       | 47.7% |         |
|                        | Indiferenciado               | 8                                     | 5.5%  | 1        | 6.7%  | 7        | 5.4%  |         |
| Lugar exacto           | Antro                        | 127                                   | 69.4% | 10       | 52.6% | 117      | 71.3% | 0.103   |
|                        | Cuerpo gástrico              | 44                                    | 24.0% | 6        | 31.6% | 38       | 23.2% |         |
|                        | Fondo                        | 5                                     | 2.7%  | 2        | 10.5% | 3        | 1.8%  |         |
|                        | Otros                        | 7                                     | 3.8%  | 1        | 5.3%  | 6        | 3.7%  |         |
| Estadio clínico        | 0                            | 1                                     | .6%   | 0        | .0%   | 1        | .6%   | 0.311   |
|                        | I                            | 28                                    | 15.9% | 5        | 27.8% | 23       | 14.6% |         |
|                        | II                           | 23                                    | 13.1% | 0        | .0%   | 23       | 14.6% |         |
|                        | III                          | 36                                    | 20.5% | 3        | 16.7% | 33       | 20.9% |         |
|                        | IV                           | 88                                    | 50.0% | 10       | 55.6% | 78       | 49.4% |         |
| Tipo cirugía           | Gastrectomía subtotal        | 8                                     | 4.4%  | 0        | .0%   | 8        | 4.9%  | 0.632   |
|                        | Gastrectomía subtotal distal | 111                                   | 60.7% | 11       | 57.9% | 100      | 61.0% |         |
|                        | Gastrectomía total           | 53                                    | 29.0% | 6        | 31.6% | 47       | 28.7% |         |
|                        | Gastrectomía total radical   | 11                                    | 6.0%  | 2        | 10.5% | 9        | 5.5%  |         |
| Bormann                | I                            | 15                                    | 8.5%  | 3        | 17.6% | 12       | 7.5%  | 0.427   |
|                        | II                           | 25                                    | 14.2% | 2        | 11.8% | 23       | 14.5% |         |
|                        | III                          | 102                                   | 58.0% | 11       | 64.7% | 91       | 57.2% |         |
|                        | IV                           | 32                                    | 18.2% | 1        | 5.9%  | 31       | 19.5% |         |
|                        | V                            | 2                                     | 1.1%  | 0        | .0%   | 2        | 1.3%  |         |
| Subtipo histológico    | Intestinal                   | 52                                    | 44.1% | 9        | 69.2% | 43       | 41.0% | 0.165   |
|                        | Difuso                       | 20                                    | 16.9% | 0        | .0%   | 20       | 19.0% |         |
|                        | Otro                         | 26                                    | 22.0% | 1        | 7.7%  | 25       | 23.8% |         |
|                        | Mixto                        | 19                                    | 16.1% | 3        | 23.1% | 16       | 15.2% |         |
|                        | Indiferenciado               | 1                                     | .8%   | 0        | .0%   | 1        | 1.0%  |         |
| Antecedentes Gástricos | Ninguno                      | 84                                    | 49.7% | 7        | 43.8% | 77       | 50.3% | 0.663   |
|                        | Gastritis                    | 52                                    | 30.8% | 4        | 25.0% | 48       | 31.4% |         |
|                        | Úlcera                       | 16                                    | 9.5%  | 3        | 18.8% | 13       | 8.5%  |         |
|                        | PGP                          | 15                                    | 8.9%  | 2        | 12.5% | 13       | 8.5%  |         |
|                        | Otros                        | 2                                     | 1.2%  | 0        | .0%   | 2        | 1.3%  |         |

**Tabla 9.** Recuento estadístico de las variables recogidas de las historias clínicas de los pacientes sometidos a pruebas para la detección de *Helicobacter pylori*.

2.8% de los pacientes con adenocarcinoma gástrico desarrollaron metástasis, mientras el 5.6% no la desarrollo. El 91.6% no tuvo un registro

de desarrollo de metástasis en las historias clínicas consultadas o en el sistema (Tabla 10).

| Metástasis |                    |            |              |                     |                        |
|------------|--------------------|------------|--------------|---------------------|------------------------|
|            |                    | Frecuencia | Porcentaje % | Porcentaje válido % | Porcentaje acumulado % |
| Válido     | Negativo           | 8          | 5.6          | 66.7                | 66.7                   |
|            | Positivo           | 4          | 2.8          | 33.3                | 100.0                  |
|            | Total              | 12         | 8.4          | 100.0               |                        |
| Perdidos   | Entre NSR y vacíos | 131        | 91.6         |                     |                        |
| Total      |                    | 143        | 100.0        |                     |                        |

**Tabla 10.** Recuento estadístico del registro de los pacientes con adenocarcinoma gástrico que desarrollaron metástasis en el INEN.

Los antecedentes clínicos de los pacientes con adenocarcinoma gástrico del INEN registraron que el 18.9% dieron positivo a la presencia de la bacteria *Helicobacter pylori* en pruebas anteriores a este estudio. 10% de la población de estudio presento antecedentes negativos a la bacteria. Por otro lado el 70.6% de los pacientes no registro resultados de pruebas para esta bacteria (Tabla 11).

| <i>Helicobacter pylori</i> |          |            |              |                     |                        |
|----------------------------|----------|------------|--------------|---------------------|------------------------|
|                            |          | Frecuencia | Porcentaje % | Porcentaje válido % | Porcentaje acumulado % |
| Válido                     | Negativo | 15         | 10.5         | 35.7                | 35.7                   |
|                            | Positivo | 27         | 18.9         | 64.3                | 100.0                  |
|                            | Total    | 42         | 29.4         | 100.0               |                        |
| Perdidos                   | Sistema  | 101        | 70.6         |                     |                        |
| Total                      |          | 143        | 100.0        |                     |                        |

**Tabla 11.** Recuento estadístico del registro de los pacientes con adenocarcinoma gástrico de INEN que tienen antecedentes de positividad a *Helicobacter pylori*.

#### 6.4. Detección de los genes.

Se estudiaron 144 casos de pacientes diagnosticados como portadores de Adenocarcinomas gástrico a los cuales se realizó gastrectomías. Se analizaron muestras de tejido tumoral, tejido sano proximal al tumor y tejido sano distal tumor.

### 6.4.1. Factores de colonización.

Se analizaron las muestras correspondientes a 144 pacientes en búsqueda de la expresión de genes de factores de colonización para la especie *Helicobacter pylori* en muestras de adenocarcinoma gástrico. Se detectó que el 65.3% de la población estudiada resultó positivo al factor de ureasa (ureA) y la edad media de este grupo fue de 61 años. El 45.7% fue de los pacientes positivos a este cebador fueron mujeres y 54.3% varones. Por otro lado el 83.3% resultó positivo al factor de la proteína de shock térmico (hspA) y la edad promedio de este grupo fue de 62 años. El 47.5% fue de los pacientes positivos a este cebador fueron mujeres y 52.5% varones. Además, en el 84.7% de los casos estudiados se detectaron al menos uno de los factores de colonización estudiados (Tabla 12).

|                                     | Factor de colonización (%) |            |                      |
|-------------------------------------|----------------------------|------------|----------------------|
|                                     | ureA                       | hspA       | Urea o hspA positivo |
| <b>No de pacientes</b>              | 94 (65.3)                  | 120 (83.3) | 122 (84.7)*          |
| <b>Edad (años)</b>                  |                            |            |                      |
| Promedio / Mediana<br>Rango [28-89] | 61.4 / 63.5                | 61.9 / 64  | 62.3 / 64            |
| <b>Sexo</b>                         |                            |            |                      |
| Mujeres                             | 43 (45.7)                  | 57 (47.5)  | 59 (48.4)            |
| Hombres                             | 51 (54.3)                  | 63 (52.5)  | 63 (51.6)            |

**Tabla 12.** Detección de los casos positivos a los factores de colonización de *Helicobacter pylori*.

Del total de muestras de tejido tumoral, hubo 54 (37.5%) muestras de tejido positivos al gen ureA, el valor de concentración promedio del gen fue de 19.605 pg (rango, 0.270 a 338.660 pg). Del total de muestras de tejido sano próximo al tumor, hubo 74 (51.4%) muestras de tejido positivos al gen ureA, el valor de concentración promedio del gen fue de 97.719 pg (rango, 0.316 a 2123.341 pg). Del total de muestras de tejido sano distal al tumor, hubo 79 (54.9%) muestras de tejido positivos al gen ureA, el valor de concentración promedio del gen fue de 99.607 pg (rango, 0.146 a 1032.561pg) (Tabla 13).

| Urea                 | Muestra (%)      |                                   |                                  |
|----------------------|------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
|                      | Tumoral<br>n=144 | Sano próximo al<br>tumor<br>n=144 | Sano distal al<br>tumor<br>n=144 |
| <b>Positivos (%)</b> | 54 (37.5)        | 74 (51.4)                         | 79 (54.9)                        |
|                      | Concentraciones  |                                   |                                  |
| <b>Promedio</b>      | 19.605           | 97.719                            | 99.607                           |
| <b>Mediana</b>       | 4.893            | 11.560                            | 23.293                           |
| <b>Mínimo</b>        | 0.270            | 0.316                             | 0.146                            |
| <b>Máximo</b>        | 338.660          | 2123.341                          | 1032.561                         |

**Tabla 13.** Análisis de las concentraciones del gen constitutivo ureA por tipo de muestra.

El gen codificante de la proteína de shock térmico (hspA) se expresó en el 64.6% (93) de los casos estudiados.

El valor de concentración promedio del gen fue de 265.773 pg (rango, 0.005 a 10781.313 pg). Del total de muestras de tejido sano próximo al tumor, hubo 94 (65.3%) muestras de tejido positivos al gen hspA, el valor de concentración promedio del gen fue de 455.222 pg (rango, 0.004 a 23475.451 pg). Del total de muestras de tejido sano distal al tumor, hubo 104 (72.2%) muestras de tejido positivos al gen hspA, el valor de concentración promedio del gen fue de 412.962 pg (rango, 0.004 a 10325.929 pg) (Tabla 14).

| hspA             | Muestra (%)      |                                   |                               |
|------------------|------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
|                  | Tumoral<br>n=144 | Sano próximo al<br>tumor<br>n=144 | Sano distal al tumor<br>n=144 |
| <b>Positivos</b> | 93 (64.6)        | 94 (65.3)                         | 104 (72.2)                    |
|                  | Concentraciones  |                                   |                               |
| <b>Promedio</b>  | 265.773          | 455.222                           | 412.962                       |
| <b>Mediana</b>   | 0.480            | 2.885                             | 3.375                         |
| <b>Mínimo</b>    | 0.005            | 0.004                             | 0.004                         |
| <b>Máximo</b>    | 10781.313        | 23475.451                         | 10325.929                     |

**Tabla 14.** Análisis de las concentraciones del gen constitutivo hspA por tipo de muestra.

El análisis de las concentraciones de los genes de colonización ureA y hspA en el total de pacientes con al menos una muestra de tejido positivo a cada uno de los genes mostró que hubo 94 (65.3%) casos positivos al

gen ureA, en 12 (12.8%) casos solo la muestra de tejido distal fue positiva al gen ureA, en 6 (6.4%) casos solo la muestra de tejido proximal, en 22 (23.4%) casos solo las muestras de tejido proximal y distal, en 5 (5.3%) casos solo la muestra de tejido tumoral, en 3 (3.2%) casos solo las muestras de tejido tumoral y distal, en 4 (4.3%) casos solo las muestras de tejido tumoral y proximal y en 42 (44.7%) casos las tres muestras de tejido fueron positivas al gen UreA. Hubo 120 (83.3%) casos positivos al gen colonización hspA, en 10 (8.3%) casos solo la muestra de tejido distal fue positiva al gen hspA, en 2 (1.7%) casos solo la muestra de tejido proximal, en 15 (12.5%) casos solo las muestras de tejido proximal y distal, en 6 (5.0%) casos solo la muestra de tejido tumoral, en 10 (8.3%) casos solo las muestras de tejido tumoral y distal, en 8 (6.7%) casos solo las muestras de tejido tumoral y proximal y en 69 (57.5%) casos las tres muestras de tejido fueron positivas al gen hspA (Tabla 15).

|                           | Gen constitutivo (%)   |            | ureA ó hspA positivo |
|---------------------------|------------------------|------------|----------------------|
|                           | Urea                   | hspA       |                      |
| <b>Positivos</b>          | 94 (65.3)              | 120 (83.3) | 122 (84.7)*          |
| <b>Negativos</b>          | 50 (34.7)              | 24 (16.7)  | 22 (15.3)            |
| <b>Muestra</b>            |                        |            |                      |
| Distal                    | 12 (12.8)              | 10 (8.3)   | -                    |
| Proximal                  | 6 (6.4)                | 2 (1.7)    | -                    |
| Proximal + distal         | 22 (23.4)              | 15 (12.5)  | -                    |
| Tumor                     | 5 (5.3)                | 6 (5.0)    | -                    |
| Tumor + distal            | 3 (3.2)                | 10 (8.3)   | -                    |
| Tumor + proximal          | 4 (4.3)                | 8 (6.7)    | -                    |
| Tumor + proximal + distal | 42 (44.7)              | 69 (57.5)  | -                    |
|                           | <b>Concentraciones</b> |            |                      |
| Promedio                  | 78.062                 | 379.573    | -                    |
| Mediana                   | 11.869                 | 1.848      | -                    |
| Mínimo                    | 0.146                  | 0.004      | -                    |
| Máximo                    | 2123.341               | 23475.451  | -                    |

\* En 30 casos no hubo acuerdo de positividad.

**Tabla 15.** Pacientes con al menos una muestra (tumoral, sano próximo al tumor o sano distal al tumor) positiva (n=144).

Al analizar la presencia de genes de factores de colonización en tejido tumoral; en 46 (31.9%) casos no hubo presencia de ninguno de los genes,



en 44 (30.6%) casos solo hubo presencia de hspA, en 5 (3.5%) casos solo hubo presencia de Urea y en 49 (34.0%) casos hubo presencia de ambos genes. (Tabla 16)

| Urea (%)     | hspA (%)  |           | Total (%)   |
|--------------|-----------|-----------|-------------|
|              | Negativo  | Positivo  |             |
| Negativo     | 46 (31.9) | 44 (30.6) | 90 (62.5)   |
| Positivo     | 5 (3.5)   | 49 (34.0) | 54 (37.5)   |
| <b>Total</b> | 51 (35.4) | 93 (64.6) | 144 (100.0) |

**Tabla 16.** Genes constitutivos en muestra de tejido tumoral.

Al analizar la presencia de genes de factores de colonización en tejido sano próximo al tumor; en 40 (27.8%) casos no hubo presencia de ninguno de los genes, en 30 (20.8%) casos solo hubo presencia de hspA, en 10 (6.9%) casos solo hubo presencia de Urea y en 64 (44.4%) casos hubo presencia de ambos genes. (Tabla 17)

| Urea (%)     | hspA (%)  |           | Total (%)   |
|--------------|-----------|-----------|-------------|
|              | Negativo  | Positivo  |             |
| Negativo     | 40 (27.8) | 30 (20.8) | 70 (48.6)   |
| Positivo     | 10 (6.9)  | 64 (44.4) | 74 (51.4)   |
| <b>Total</b> | 50 (34.7) | 94 (65.3) | 144 (100.0) |

**Tabla 17.** Genes constitutivos en muestra de tejido sano próximo al tumor.

Al analizar la presencia de genes de factores de colonización en tejido sano distal al tumor; en 34 (23.6%) casos no hubo presencia de ninguno de los genes, en 31 (21.5%) casos solo hubo presencia de hspA, en 6 (4.2%) casos solo hubo presencia de Urea y en 73 (50.7%) casos hubo presencia de ambos genes. (Tabla 18)

| Urea (%)     | hspA (%)  |            | Total (%)   |
|--------------|-----------|------------|-------------|
|              | Negativo  | Positivo   |             |
| Negativo     | 34 (23.6) | 31 (21.5)  | 65 (45.1)   |
| Positivo     | 6 (4.2)   | 73 (50.7)  | 79 (54.9)   |
| <b>Total</b> | 40 (27.8) | 104 (72.2) | 144 (100.0) |

**Tabla 18.** Genes constitutivos en muestra de tejido sano distal al tumor.

En muestras de tejido tumoral de pacientes positivos a factores de colonización, el valor de concentración promedio del gen ureA fue de 19.324 pg (rango, 0.270 a 338.660 pg) y el valor de concentración promedio del gen hspA fue de 77.276 pg (rango, 0.009 a 1032.672 pg). En muestras de tejido sano próximo al tumor, el valor de concentración promedio del gen constitutivo ureA fue de 102.714 pg (rango, 0.316 a 2123.341 pg) y el valor de concentración promedio del gen constitutivo hspA fue de 140.753 pg (rango, 0.035 a 2067.394 pg). En muestras de tejido sano distal al tumor, el valor de concentración promedio del gen constitutivo ureA fue de 106.076 pg (rango, 0.146 a 1032.561 pg) y el valor de concentración promedio del gen constitutivo hspA fue de 303.903 pg (rango, 0.009 a 3728.305 pg) (Tabla 19).

|                                | Muestra                        |                             |                            |
|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
|                                | Tumoral, n=49                  | Sano próximo al tumor, n=64 | Sano distal al tumor, n=73 |
| <b>Concentraciones de Urea</b> |                                |                             |                            |
| Promedio                       | 19.324                         | 102.714                     | 106.076                    |
| Mediana                        | 4.399                          | 12.838                      | 24.407                     |
| Mínimo                         | 0.270                          | 0.316                       | 0.146                      |
| Máximo                         | 338.660                        | 2123.341                    | 1032.561                   |
|                                | <b>Concentraciones de hspA</b> |                             |                            |
| Promedio                       | 77.276                         | 140.753                     | 303.903                    |
| Mediana                        | 1.308                          | 7.115                       | 8.289                      |
| Mínimo                         | 0.009                          | 0.035                       | 0.009                      |
| Máximo                         | 1032.672                       | 2067.394                    | 3728.305                   |

**Tabla 19.** Análisis de las concentraciones de los genes constitutivos en pacientes positivos para ambos genes por tipo de muestra.

La mitad central de las concentraciones de ureA de la muestra de tejido tumoral se encuentran entre 0.849 pg ( $F_L$ ) y 17.403 pg ( $F_U$ ), y se han identificado 6 valores discordantes (todos mayores al valor de corte superior,  $F_U+1.5dF$ ); la mitad central de las concentraciones de ureA de la muestra de tejido sano próximo al tumor se encuentran entre 2.745 pg ( $F_L$ ) y 39.910 pg ( $F_U$ ), y se han identificado 13 valores discordantes (todos mayores al valor de corte superior,  $F_U+1.5dF$ ); y que la mitad central de las concentraciones de ureA de la muestra de tejido sano distal al tumor

se encuentran entre 2.801 pg ( $F_L$ ) y 83.920 pg ( $F_U$ ), y se han identificado 10 valores discordantes (todos mayores al valor de corte superior,  $F_U+1.5dF$ ). (Tabla 20)

| Muestra               | ureA, medidas resumen |       |        |             | No de datos extremos |
|-----------------------|-----------------------|-------|--------|-------------|----------------------|
|                       | $F_L-1.5dF$           | $F_L$ | $F_U$  | $F_U+1.5dF$ |                      |
| Tumoral               | -23.980               | 0.849 | 17.403 | 42.233      | 6*                   |
| Sano próximo al tumor | -53.003               | 2.745 | 39.910 | 95.658      | 13 <sup>†</sup>      |
| Sano distal al tumor  | -118.876              | 2.801 | 83.920 | 205.597     | 10 <sup>+</sup>      |

\* Casos: EAC1797, POA1751, BZS1829, FGT1937, FCD1735, FBC1820

† Casos: PCC1763, MFR-2064, MCA-2056, EZR1813, AAR-2101, MBR1816, PMB1911, JVV1772, FCD1735, FGT1937, MVS1706, RNV1745, JJC1948

+ Casos: MBR1816, IPR-1981, MCA-2056, LRJ1916, JJC1948, FGT1937, AED1811, AMD-1975, EZR1813, FCD1735

$F_L-1.5dF$  y  $F_L+1.5dF$ , valores de corte para datos discordantes.

**Tabla 20.** Evaluación de concentraciones extremas del gen de colonización *ureA* por tipo de muestra.

La mitad central de las concentraciones de *hspA* de la muestra de tejido tumoral se encuentran entre 0.030 pg ( $F_L$ ) y 6.583 pg ( $F_U$ ), y se han identificado 16 valores discordantes (todos mayores al valor de corte superior,  $F_U+1.5dF$ ); la mitad central de las concentraciones de *hspA* de la muestra de tejido sano próximo al tumor se encuentran entre 0.125 pg ( $F_L$ ) y 66.487 pg ( $F_U$ ), y se han identificado 12 valores discordantes (todos mayores al valor de corte superior,  $F_U+1.5dF$ ); y que la mitad central de las concentraciones de *hspA* de la muestra de tejido sano distal al tumor se encuentran entre 0.180 pg ( $F_L$ ) y 37.244 pg ( $F_U$ ), y se han identificado 18 valores discordantes (todos mayores al valor de corte superior,  $F_U+1.5dF$ ) (Tabla 21).

| hspA, medidas resumen |                       |                |                |                       |                      |
|-----------------------|-----------------------|----------------|----------------|-----------------------|----------------------|
| Muestra               | F <sub>L</sub> -1.5dF | F <sub>L</sub> | F <sub>U</sub> | F <sub>U</sub> +1.5dF | No de datos extremos |
| Tumoral               | -9.799                | 0.030          | 6.583          | 16.412                | 16*                  |
| Sano próximo al tumor | -99.418               | 0.125          | 66.487         | 166.030               | 12 <sup>†</sup>      |
| Sano distal al tumor  | -55.417               | 0.180          | 37.244         | 92.841                | 18 <sup>+</sup>      |

\* Casos: FTP-2113, PVM-2109, RBM-2002, GLS-1960, EAC1797, FBC1820, WCR-2117, POA1751, TMH-2139, SMC-2052, AAR-2101, VMC-2136, GBC-1995, JSD-2011, CGB-2001, CFM-2013

† Casos: JJC1948, SMC-2052, TMH-2139, RBM-2002, AMQ-2090, VMC-2136, MCA-2056, GBC-1995, JSD-2011, AAR-2101, CGB-2001, CFM-2013

+ Casos: SMC-2052, OCT1752, FCD1735, MIC-2084, WCR-2117, GUM-2077, GLS-1960, JSD-2011, GBC-1995, AAR-2101, RBM-2002, MCA-2056, IPR-1981, MFR-2064, VMC-2136, AMD-1975, CFM-2013, CGB-2001

FL-1.5dF y FL+1.5dF, valores de corte para datos discordantes.

**Tabla 21.** Evaluación de concentraciones extremas del gen de colonización hspA por tipo de muestra.

#### 6.4.2. Factores de virulencia.

Se analizaron las muestras correspondientes a 144 pacientes en búsqueda de la expresión de genes de factores de virulencia para la especie *Helicobacter pylori* en muestras de adenocarcinoma gástrico. Los genes de factores de virulencia relacionados a la citotoxina vacuolizante (vacA) y asociado a la citotoxina (cagA) se expresaron en todos los tipos de muestra con diferentes prevalencias. Se detectó que el 79.9% de los casos estudiados resultó positivo al gen cagA, y la edad promedio de este grupo fue de 62 años. El 48.7% de estos casos correspondieron a pacientes mujeres y el 51.3% a pacientes varones. El gen de la citotoxina vacuolizante se detectó en el 77.8% (vacAm) y 79.9% (vacAs) de la población estudiada. Del grupo positivo al cebador vacAm el 46.4% fueron pacientes mujeres y el 53.6% hombres. De grupo de pacientes positivos al cebador vacAs el 48.7% fueron mujeres y el 51.3% hombres (Tabla 22).

|                                     | Factores de virulencia (%) |            |            |
|-------------------------------------|----------------------------|------------|------------|
|                                     | vacAm                      | CagA       | vacAs      |
| <b>No de pacientes</b>              | 112 (77.8)                 | 115 (79.9) | 115 (79.9) |
| <b>Edad, años</b>                   |                            |            |            |
| Promedio / Mediana<br>Rango [28-89] | 62.4 / 64                  | 62.1 / 64  | 62.1 / 64  |
| <b>Sexo</b>                         |                            |            |            |
| Mujeres                             | 52 (46.4)                  | 56 (48.7)  | 56 (48.7)  |
| Hombres                             | 60 (53.6)                  | 59 (51.3)  | 59 (51.3)  |

**Tabla 22.** Detección de los casos positivos a los factores de virulencia de *Helicobacter pylori*.

El análisis de las concentraciones del gen de factor de virulencia vacAm en pacientes positivos a ambos factores de colonización en cada una de las muestras de tejido mostró que del total de muestras de tejido tumoral, hubo 45 (91.8%) muestras de tejido positivos al gen de virulencia vacAm, el valor de concentración promedio del gen fue de 45.636 pg (rango, 0.0001 a 705.775 pg). Del total de muestras de tejido sano próximo al tumor, hubo 57 (89.1%) muestras de tejido positivos al gen de virulencia vacAm, el valor de concentración promedio del gen fue de 158.092 pg (rango, 0.00005 a 2067.394 pg). Del total de muestras de tejido sano distal al tumor, hubo 66 (90.4%) muestras de tejido positivos al gen de virulencia vacAm, el valor de concentración promedio del gen fue de 376.725 pg (rango, 0.000055 a 3728.305 pg) (Tabla 23).

| vacAm                | Muestra (%)     |                               |                              |
|----------------------|-----------------|-------------------------------|------------------------------|
|                      | Tumoral<br>n=49 | Sano próximo al tumor<br>n=64 | Sano distal al tumor<br>n=73 |
| <b>Positivos (%)</b> | 45 (91.8)       | 57 (89.1)                     | 66 (90.4)                    |
|                      | Concentraciones |                               |                              |
| Promedio             | 45.636          | 158.092                       | 376.725                      |
| Mediana              | 0.645           | 7.395                         | 5.407                        |
| Mínimo               | 0.0001          | 0.00005                       | 0.000055                     |
| Máximo               | 705.775         | 2067.394                      | 3728.305                     |

**Tabla 23.** Análisis de las concentraciones del gen de virulencia vacAm en pacientes positivos para ambos genes constitutivos por tipo de muestra.

Se observa que la mitad central de las concentraciones de vacAm de la muestra de tejido tumoral se encuentran entre 0.004 pg ( $F_L$ ) y 3.418 pg ( $F_U$ ), y se han identificado 21 valores discordantes (todos mayores al valor de corte superior,  $F_U+1.5dF$ ); la mitad central de las concentraciones de vacAm de la muestra de tejido sano próximo al tumor se encuentran entre 0.008 pg ( $F_L$ ) y 19.964 pg ( $F_U$ ), y se han identificado 22 valores discordantes (todos mayores al valor de corte superior,  $F_U+1.5dF$ ); y que la mitad central de las concentraciones de vacAm de la muestra de tejido sano distal al tumor se encuentran entre 0.023 pg ( $F_L$ ) y 21.031 pg ( $F_U$ ), y se han identificado 15 valores discordantes (todos mayores al valor de corte superior,  $F_U+1.5dF$ ) (Tabla 24).

| Muestra               | vacAm, medidas resumen |       |        |             | No de datos extremos |
|-----------------------|------------------------|-------|--------|-------------|----------------------|
|                       | $F_L-1.5dF$            | $F_L$ | $F_U$  | $F_U+1.5dF$ |                      |
| Tumoral               | -5.116                 | 0.004 | 3.418  | 8.539       | 21*                  |
| Sano próximo al tumor | -29.927                | 0.008 | 19.964 | 49.898      | 22†                  |
| Sano distal al tumor  | -31.490                | 0.023 | 21.031 | 52.544      | 15+                  |

\* Casos: PHC-2067, AMQ-2090, AMD-1975, AVC-2010, MCA-2056, MBR1816, FTP-2113, CFM-2013, EAC1797, PVM-2109, RBM-2002, GLS-1960, FBC1820, WCR-2117, GBC-1995, JGR1878, TMH-2139, SMC-2052, AAR-2101, JSD-2011, VMC-2136

† Casos: FTP-2113, MVS1706, IPR-1981, JRC-2168, GLS-1960, AJV1766, WCR-2117, JVV1772, PCC1763, AVC-2010, SHR-2071, GUM-2077, JJC1948, SMC-2052, TMH-2139, RBM-2002, AMQ-2090, VMC-2136, MCA-2056, JSD-2011, GBC-1995, AAR-2101

+ Casos: LGD-1970, SMC-2052, MIC-2084, WCR-2117, GUM-2077, GLS-1960, AAR-2101, RBM-2002, MCA-2056, IPR-1981, JSD-2011, MFR-2064, VMC-2136, GBC-1995, AMD-1975

$F_L-1.5dF$  y  $F_L+1.5dF$ , valores de corte para datos discordantes.

**Tabla 24.** Evaluación de concentraciones extremas del gen de virulencia vacAm por tipo de muestra.

El análisis de las concentraciones del gen de factor de virulencia vacAs en pacientes positivos a ambos factores de colonización en cada una de las muestras de tejido mostró que del total de muestras de tejido tumoral,

hubo 46 (93.9%) muestras de tejido positivos al gen de virulencia vacAs, el valor de concentración promedio del gen fue de 4.559 pg (rango, 0.025 a 44.845 pg). Del total de muestras de tejido sano próximo al tumor, hubo 61 (95.3%) muestras de tejido positivos al gen de virulencia vacAs, el valor de concentración promedio del gen fue de 16.129 pg (rango, 0.010 a 276.053 pg). Del total de muestras de tejido sano distal al tumor, hubo 70 (95.9%) muestras de tejido positivos al gen de virulencia vacAs, el valor de concentración promedio del gen fue de 18.539 pg (rango, 0.016 a 158.197 pg) (Tabla 25).

| vacAs            | Muestra (%)     |                                  |                              |
|------------------|-----------------|----------------------------------|------------------------------|
|                  | Tumoral<br>n=49 | Sano próximo al<br>tumor<br>n=64 | Sano distal al tumor<br>n=73 |
| <b>Positivos</b> | 46 (93.9)       | 61 (95.3)                        | 70 (95.9)                    |
|                  | Concentraciones |                                  |                              |
| Promedio         | 4.559           | 16.129                           | 18.539                       |
| Mediana          | 0.775           | 2.018                            | 4.361                        |
| Mínimo           | 0.025           | 0.010                            | 0.016                        |
| Máximo           | 44.845          | 276.053                          | 158.197                      |

**Tabla 25.** Análisis de las concentraciones del gen de virulencia vacAs en pacientes positivos para ambos genes constitutivos por tipo de muestra.

Se observa que la mitad central de las concentraciones de vacAs de la muestra de tejido tumoral se encuentran entre 0.034 pg ( $F_L$ ) y 26.500 pg ( $F_U$ ), y no se han identificado valores discordantes (todos los datos dentro de los valores de corte inferior y superior,  $F_U - 1.5dF$  y  $F_U + 1.5dF$ ); la mitad central de las concentraciones de vacAs de la muestra de tejido sano próximo al tumor se encuentran entre 0.061 pg ( $F_L$ ) y 5.198 pg ( $F_U$ ), y se han identificado 14 valores discordantes (todos mayores al valor de corte superior,  $F_U + 1.5dF$ ); y que la mitad central de las concentraciones de vacAs de la muestra de tejido sano distal al tumor se encuentran entre 0.061 pg ( $F_L$ ) y 12.957 pg ( $F_U$ ), y se han identificado 14 valores discordantes (todos mayores al valor de corte superior,  $F_U + 1.5dF$ ) (Tabla 26).

| Muestra               | vacAs, medidas resumen |                |                |                       | No de datos extremos |
|-----------------------|------------------------|----------------|----------------|-----------------------|----------------------|
|                       | F <sub>L</sub> -1.5dF  | F <sub>L</sub> | F <sub>U</sub> | F <sub>U</sub> +1.5dF |                      |
| Tumoral               | -39.665                | 0.034          | 26.500         | 66.199                | 0                    |
| Sano próximo al tumor | -7.645                 | 0.061          | 5.198          | 12.904                | 14 <sup>†</sup>      |
| Sano distal al tumor  | -19.283                | 0.061          | 12.957         | 32.300                | 14 <sup>+</sup>      |

† AZR1846, AAR-2101, BZS1829, LRJ1916, EZR1813, FGT1937, OCT1752, RNV1745, FCD1735, MBR1816, PMB1911, PCC1763, JVV1772, JJC1948

+ GLS-1960, MFR-2064, PCC1763, LRJ1916, AED1811, BZS1829, MBR1816, APC1750, MVS1706, IPR-1981, AMD-1975, PMB1911, EZR1813, OCT1752 FL-1.5dF y FL+1.5dF, valores de corte para datos discordantes.

**Tabla 26.** Evaluación de concentraciones extremas del gen de virulencia vacAs por tipo de muestra.

El análisis de las concentraciones del gen de factor de virulencia cagA en pacientes positivos a ambos factores de colonización en cada una de las muestras de tejido mostró que del total de muestras de tejido tumoral, hubo 47 (95.9%) muestras de tejido positivos al gen de virulencia cagA, el valor de concentración promedio del gen fue de 3.360 pg (rango, 0.002 a 40.648 pg). Del total de muestras de tejido sano próximo al tumor, hubo 62 (96.9%) muestras de tejido positivos al gen de virulencia cagA, el valor de concentración promedio del gen fue de 10.811 pg (rango, 0.019 a 131.274 pg). Del total de muestras de tejido sano distal al tumor, hubo 70 (95.9%) muestras de tejido positivos al gen de virulencia cagA, el valor de concentración promedio del gen fue de 18.283 pg (rango, 0.008 a 222.106 pg). (Tabla 27).

| cagA                   | Muestra (%)     |                               |                              |
|------------------------|-----------------|-------------------------------|------------------------------|
|                        | Tumoral<br>n=49 | Sano próximo al tumor<br>n=64 | Sano distal al tumor<br>n=73 |
| <b>Positivos</b>       | 47 (95.9)       | 62 (96.9)                     | 70 (95.9)                    |
| <b>Concentraciones</b> |                 |                               |                              |
| Promedio               | 3.360           | 10.811                        | 18.283                       |
| Mediana                | 0.649           | 2.144                         | 4.899                        |
| Mínimo                 | 0.002           | 0.019                         | 0.008                        |
| Máximo                 | 40.648          | 131.274                       | 222.106                      |

**Tabla 27.** Análisis de las concentraciones del gen de virulencia cagA en pacientes positivos para ambos genes constitutivos por tipo de muestra.



Se observa que la mitad central de las concentraciones de cagA de la muestra de tejido tumoral se encuentran entre 0.014 pg ( $F_L$ ) y 0.555 pg ( $F_U$ ), y se han identificado 19 valores discordantes (todos mayores al valor de corte superior,  $F_U+1.5dF$ ); la mitad central de las concentraciones de cagA de la muestra de tejido sano próximo al tumor se encuentran entre 0.016 pg ( $F_L$ ) y 2.883 pg ( $F_U$ ), y se han identificado 19 valores discordantes (todos mayores al valor de corte superior,  $F_U+1.5dF$ ); y que la mitad central de las concentraciones de cagA de la muestra de tejido sano distal al tumor se encuentran entre 0.016 pg ( $F_L$ ) y 10.610 pg ( $F_U$ ), y se han identificado 12 valores discordantes (todos mayores al valor de corte superior,  $F_U+1.5dF$ ). (Tabla 28).

| Muestra               | cagA, medidas resumen |       |        |             | No de datos extremos |
|-----------------------|-----------------------|-------|--------|-------------|----------------------|
|                       | $F_L-1.5dF$           | $F_L$ | $F_U$  | $F_U+1.5dF$ |                      |
| Tumoral               | -0.796                | 0.014 | 0.555  | 1.366       | 19*                  |
| Sano próximo al tumor | -4.284                | 0.016 | 2.883  | 7.183       | 19†                  |
| Sano distal al tumor  | -15.874               | 0.016 | 10.610 | 26.500      | 12+                  |

\* Casos: OCT1752, DSV1812, PGL1868, ETS1716, PMB1911, JSD2011, AZR1846, JGC1956, BZS1829, RNV1745, SMC-2052, FGT1937, AAR-2101, FCD1735, EAC1797, MDF-1962, MBR1816, FBC1820, POA1751

† Casos: AZR1846, EZR1813, GBC1985, JSD2011, MDF-1962, LRJ1916, BZS1829, MCA-2056, VDR1947, MFR-2064, PCC1763, MBR1816, OCT1752, PMB1911, AAR-2101, RNV1745, JVV1772, FCD1735, JJC1948

+ Casos: JSD2011, AED1811, MCA-2056, PMB1911, GBC1985, IPR-1981, MFR-2064, AMD-1975, EZR1813, MVS1706, OCT1752, FCD1735

$F_L-1.5dF$  y  $F_L+1.5dF$ , valores de corte para datos discordantes.

**Tabla 28.** Evaluación de concentraciones extremas del gen de virulencia cagA por tipo de muestra.

De las concentraciones de los genes de virulencia vacAm, cagA y vacAs en el total de pacientes con al menos una muestra de tejido positivo a cada uno de los genes hubieron 112 (77.8%) casos positivos al gen de virulencia vacAm, en 4 (3.6%) casos solo la muestra de tejido distal fue

positiva al gen *vacAm*, en 2 (1.8%) casos solo la muestra de tejido proximal, en 8 (7.1%) casos solo las muestras de tejido proximal y distal, en 1 (0.9%) caso solo la muestra de tejido tumoral, en 5 (4.5%) casos solo las muestras de tejido tumoral y distal, en 3 (2.7%) casos solo las muestras de tejido tumoral y proximal y en 89 (79.5%) casos las tres muestras de tejido fueron positivas al gen de virulencia *vacAm*. Hubo 115 (79.9%) casos positivos al gen de virulencia *cagA*, en 9 (7.8%) casos solo las muestras de tejido proximal y distal fueron positivas al gen *cagA*, en 1 (0.9%) caso solo las muestras de tejido tumoral y distal, en 2 (1.7%) casos solo las muestras de tejido tumoral y proximal y en 103 (89.6%) casos las tres muestras de tejido fueron positivas al gen de virulencia *cagA*. Hubo 115 (79.9%) casos positivos al gen de virulencia *vacAs*, en 1 (0.9%) caso solo la muestra de tejido distal fue positiva al gen *vacAs*, en 10 (8.7%) casos solo las muestras de tejido proximal y distal, en 4 (3.5%) casos solo las muestras de tejido tumoral y distal, en 11 (9.6%) casos solo las muestras de tejido tumoral y proximal y en 89 (77.4%) casos las tres muestras de tejido fueron positivas al gen de virulencia *vacAs*. (Tabla 29)

|                           | Factor de virulencia (%) |             |              |
|---------------------------|--------------------------|-------------|--------------|
|                           | <i>vacAm</i>             | <i>CagA</i> | <i>vacAs</i> |
| <b>Positivos</b>          | 112 (77.8)               | 115 (79.9)  | 115 (79.9)   |
| <b>Negativos</b>          | 15 (10.4)                | 1 (0.7)     | 1 (0.7)      |
| <b>En blanco</b>          | 17 (11.8)                | 28 (19.4)   | 28 (19.4)    |
| <b>Muestra</b>            |                          |             |              |
| Distal                    | 4 (3.6)                  | -           | 1 (0.9)      |
| Proximal                  | 2 (1.8)                  | -           | -            |
| Proximal + distal         | 8 (7.1)                  | 9 (7.8)     | 10 (8.7)     |
| Tumor                     | 1 (0.9)                  | -           | -            |
| Tumor + distal            | 5 (4.5)                  | 1 (0.9)     | 4 (3.5)      |
| Tumor + proximal          | 3 (2.7)                  | 2 (1.7)     | 11 (9.6)     |
| Tumor + proximal + distal | 89 (79.5)                | 103 (89.6)  | 89 (77.4)    |
| <b>Concentraciones</b>    |                          |             |              |
| Promedio                  | 119.697                  | 6.839       | 8.351        |
| Mediana                   | 0.786                    | 0.164       | 0.198        |
| Mínimo                    | 0.000025                 | 0.0006      | 0.001        |
| Máximo                    | 3728.305                 | 222.106     | 276.053      |

**Tabla 29.** Pacientes con al menos una muestra (tumoral, sano próximo al tumor o sano distal al tumor) positiva (n=144).

De los casos con muestras de tejido negativos a los genes de factores de virulencia, del total de casos con al menos uno de los genes de factores de colonización positivos hubieron 11 (9.0%) casos con muestras de tejidos negativos al gen de virulencia *vacAm*, 1 (0.8%) caso con muestras de tejidos negativos al gen de virulencia *cagA*, 1 (0.8%) caso con muestras de tejidos negativos al gen de virulencia *vacAs*, y 12 (9.8%) casos con muestras de tejidos negativos a al menos uno de los genes de virulencia. (Tabla 30).

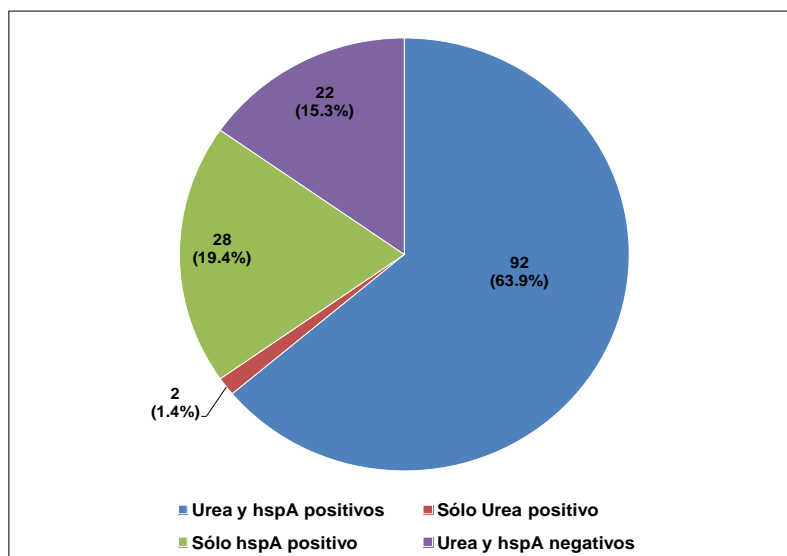
|                  | Gen de virulencia (%) |             |              |   |
|------------------|-----------------------|-------------|--------------|---|
|                  | <i>vacAm</i>          | <i>cagA</i> | <i>vacAs</i> | <i>vacAm</i> o <i>cagA</i> o <i>vacAs</i> |
| <b>Negativos</b> | 11 (9.0)              | 1 (0.8)     | 1 (0.8)      | 12 (9.8)                                  |

**Tabla 30.** Negatividad de cada uno de los genes de virulencia en pacientes con al menos uno de los genes constitutivos positivos (n=122).

### **6.5. Prevalencia de *Helicobacter pylori* en pacientes afectados por adenocarcinoma gástrico.**

Del total de pacientes estudiados, el 84.7% resultaron positivo a la presencia de la bacteria *Helicobacter pylori*. El 77.8% y 79.9% de estos casos presentaron al menos uno de los cebadores marcadores de virulencia relacionada al gen de la citotoxina vacuolizante (*vacA*). Además el 79.9% de los casos estudiados presentaron expresión de al menos uno de los cebadores relacionados al gen asociado a la citotoxina (*cagA*).

El 63.9% de los casos con muestras de tejidos positivos a ambos genes de factores de colonización, el 1.4% de casos con muestras de tejidos positivos sólo al gen *ureA*, 19.4% casos con muestras de tejidos positivos sólo al gen *hspA* y 15.3% de casos con muestras de tejidos negativos a ambos genes (Figura 5).



**Figura 5.** Positividad de los genes de factores de colonización (n=144).

### 6.5.1. Prevalencia según domicilio y procedencia.

Al clasificar el recuento de los casos *Helicobacter pylori* positivos diagnosticados con de adenocarcinoma gástrico por zona de procedencia en Lima metropolitana del paciente se obtuvo que el 37% de los pacientes viven en Lima Sur, el 19% de Lima Centro, el 17% de Lima Este, el 16% de Lima Norte y el 11% en el Callao (Tabla 31).

|                    |                    | Recuento | %   | Mediana | % Surv. 2 años | p-value |
|--------------------|--------------------|----------|-----|---------|----------------|---------|
| <b>Sector Lima</b> | <b>Lima Norte</b>  | 15       | 16% | 1.6     | -              | 0.679   |
|                    | <b>Lima Centro</b> | 18       | 19% | 1.7     | -              |         |
|                    | <b>Lima Sur</b>    | 35       | 37% | 2.0     | 76.0%          |         |
|                    | <b>Lima Este</b>   | 16       | 17% | 1.8     | -              |         |
|                    | <b>Callao</b>      | 10       | 11% | 2.0     | 100.0%         |         |

**Tabla 31.** Distribución de casos positivos de *Helicobacter pylori* según domicilio de los pacientes en Lima.

El recuento de los casos *Helicobacter pylori* positivos portadores de adenocarcinoma gástrico y su clasificación por procedencia del paciente se realizó con la información tomada de las encuestas e historias clínicas.

La mayor parte de la población positiva a la bacteria en Lima proviene de 3 distritos. En el distrito de San Juan de Lurigancho se observa la mayor prevalencia de *Helicobacter pylori* con 12.7%. Seguido a este se encuentra el distrito del Callao con 9.8% y la zona rural de Lima con 7.8% de la población infectada por la bacteria y estudiada. Mientras tanto los distritos que mostraron menos prevalencia de la bacteria fueron La Molina (1%), Miraflores (1%) y San Miguel (1%) (Tabla 32).

|                 |                         | Recuento | %     | Mediana | % Surv. 2 años | p-value |
|-----------------|-------------------------|----------|-------|---------|----------------|---------|
| Distrito Lima   | Cercado                 | 3        | 2.9%  | -       | -              | 0.556   |
|                 | Ate                     | 2        | 2.0%  | -       | -              |         |
|                 | Comas                   | 3        | 2.9%  | 0.8     | -              |         |
|                 | Chaclacayo              | 2        | 2.0%  | -       | -              |         |
|                 | Chorrillos              | 3        | 2.9%  | -       | -              |         |
|                 | El Agustino             | 5        | 4.9%  | 1.0     | -              |         |
|                 | La Molina               | 1        | 1.0%  | -       | -              |         |
|                 | La Victoria             | 2        | 2.0%  | -       | -              |         |
|                 | Lurigancho              | 2        | 2.0%  | -       | -              |         |
|                 | Lurín                   | 3        | 2.9%  | 1.0     | -              |         |
|                 | Miraflores              | 1        | 1.0%  | -       | -              |         |
|                 | Pachacamac              | 3        | 2.9%  | 1.0     | -              |         |
|                 | Pueblo Libre            | 1        | 1.0%  | -       | -              |         |
|                 | Puente Piedra           | 5        | 4.9%  | 1.5     | -              |         |
|                 | Rímac                   | 3        | 2.9%  | 1.8     | -              |         |
|                 | San Isidro              | 2        | 2.0%  | 1.0     | -              |         |
|                 | Independencia           | 2        | 2.0%  | 1.0     | -              |         |
|                 | San Juan de Miraflores  | 4        | 3.9%  | 2.0     | 71.0%          |         |
|                 | San Martín de Porres    | 3        | 2.9%  | -       | -              |         |
|                 | San Miguel              | 1        | 1.0%  | -       | -              |         |
|                 | Santiago de Surco       | 3        | 2.9%  | -       | -              |         |
|                 | Villa María del Triunfo | 4        | 3.9%  | 1.8     | -              |         |
|                 | San Juan de Lurigancho  | 13       | 12.7% | 1.0     | -              |         |
|                 | Los Olivos              | 2        | 2.0%  | -       | -              |         |
|                 | San Borja               | 2        | 2.0%  | -       | -              |         |
|                 | Villa el Salvador       | 5        | 4.9%  | 1.0     | -              |         |
| Santa Anita     | 4                       | 3.9%     | 0.9   | -       |                |         |
| Callao          | 10                      | 9.8%     | 2.0   | 100.0%  |                |         |
| Lima Provincias | 8                       | 7.8%     | 1.0   | -       |                |         |

**Tabla 32.** Distribución de casos positivos de *Helicobacter pylori* según procedencia de los pacientes en Lima.

La mayoría de pacientes (85.3%) afirman vivir en su domicilio por más de 10 años. El 4.9% de ellos tuvo una permanencia en su domicilio de entre 5 y 10 años y el 7% menos de 5 años (Tabla 33).

| Tiempo de permanencia en el lugar |                   |            |              |                     |                        |
|-----------------------------------|-------------------|------------|--------------|---------------------|------------------------|
|                                   |                   | Frecuencia | Porcentaje % | Porcentaje válido % | Porcentaje acumulado % |
| Válido                            | Menos de 5 años   | 10         | 7.0          | 7.2                 | 7.2                    |
|                                   | Entre 5 y 10 años | 7          | 4.9          | 5.0                 | 12.2                   |
|                                   | Más de 10 años    | 122        | 85.3         | 87.8                | 100.0                  |
|                                   | <b>Total</b>      | 139        | 97.2         | 100.0               |                        |
| Perdidos                          | Sistema           | 4          | 2.8          |                     |                        |
| <b>Total</b>                      |                   | 143        | 100.0        |                     |                        |

**Tabla 33.** Estadística del tiempo de permanencia de los pacientes con adenocarcinoma gástrico del INEN en sus domicilios.

A nivel nacional la mayor parte de la población positiva a *Helicobacter pylori* que fue diagnosticada de adenocarcinoma gástrico en proviene de la región Lima (22.4%). Además el 14.2% y 8.2% provienen de las regiones Cajamarca y Ayacucho respectivamente, convirtiéndose en los lugares con las mayor cantidad de provenientes para este estudio. En contraste, la menor proporción de pacientes provinieron de las regiones Ucayali (0.5%), Cusco (1.1%), Amazonas (1.6%) y Loreto (1.6%) (Tabla 34)

|                     |              | Recuento | %     | Mediana | % Surv. 2 años | p-value |
|---------------------|--------------|----------|-------|---------|----------------|---------|
| Lugar de nacimiento | Amazonas     | 3        | 1.6%  | 1.0     | -              | 0.503   |
|                     | Ancash       | 11       | 6.0%  | 1.0     | -              |         |
|                     | Apurímac     | 9        | 4.9%  | 1.0     | -              |         |
|                     | Arequipa     | 5        | 2.7%  | -       | -              |         |
|                     | Ayacucho     | 15       | 8.2%  | 1.0     | 90.0%          |         |
|                     | Cajamarca    | 26       | 14.2% | 1.0     | -              |         |
|                     | Cusco        | 2        | 1.1%  | 1.5     | -              |         |
|                     | Huancavelica | 7        | 3.8%  | 2.0     | 83.0%          |         |
|                     | Huánuco      | 14       | 7.7%  | 2.0     | 68.0%          |         |
|                     | Ica          | 4        | 2.2%  | -       | -              |         |
|                     | Junín        | 11       | 6.0%  | 1.0     | -              |         |
|                     | La Libertad  | 5        | 2.7%  | 1.0     | -              |         |
|                     | Lambayeque   | 6        | 3.3%  | 1.0     | -              |         |
|                     | Lima         | 41       | 22.4% | 2.0     | 57.0%          |         |
|                     | Loreto       | 3        | 1.6%  | 1.0     | -              |         |
|                     | Pasco        | 4        | 2.2%  | 1.0     | -              |         |
|                     | Piura        | 9        | 4.9%  | -       | -              |         |
| San Martín          | 7            | 3.8%     | -     | -       |                |         |
| Ucayali             | 1            | 0.5%     | 1.0   | -       |                |         |

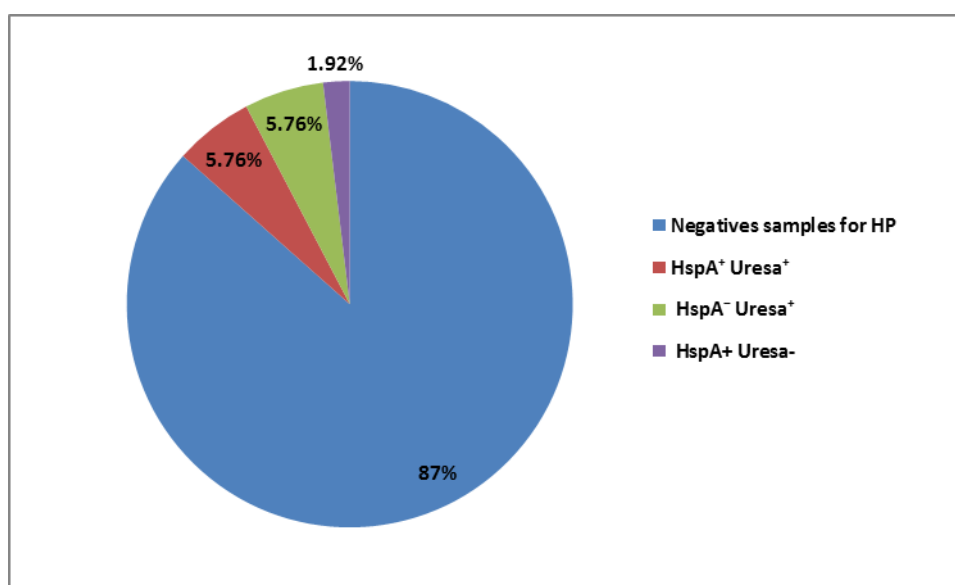
**Tabla 34.** Distribución de casos positivos de *Helicobacter pylori* según procedencia de los pacientes a nivel nacional (Perú).

### 6.5.2. Prevalencia según análisis de fuente de agua.

Las muestras de agua analizadas en búsqueda de genes de factores de colonización de *Helicobacter pylori* en las casas de los pacientes resultaron en un 87% negativas a la presencia de la bacteria. El 5.76% de las muestras de agua analizadas resultaron positivas al gen de la ureasa (ureA) y la proteína de shock térmico (hspA) al mismo tiempo. Además el 5.76% dio positivo a la presencia de ureasa y el 1.76% al gen de la proteína de shock térmico. En total se encontró que el 13.46% de las muestras de agua en las viviendas de los pacientes fueron positivas a *Helicobacter pylori* (Tabla 35 y Figura 6).

|  | Número | Porcentaje |
|--|--------|------------|
| Total de muestras procesadas                 | 52     | 100%       |
| Muestras hspA <sup>+</sup> ureA <sup>+</sup> | 3      | 5.76%      |
| Muestras hspA <sup>-</sup> ureA <sup>+</sup> | 3      | 5.76%      |
| Muestras hspA <sup>+</sup> ureA <sup>-</sup> | 1      | 1.92%      |
| Muestras positivas para HP                   | 7      | 13.46%     |
| Muestras negativas para HP                   | 38     | 87%        |

**Tabla 35.** Resultados del análisis de la detección de genes de factores de colonización de *Helicobacter pylori* de fuentes de agua en viviendas de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico y *Helicobacter pylori* positivos en el INEN durante el periodo 2015-2016.



**Figura 6.** Distribución de la detección de genes de factores de colonización de *Helicobacter pylori* en muestras de agua de viviendas de pacientes diagnosticados con adenocarcinomas gástrico y *Helicobacter pylori* positivos INEN durante el periodo 2015-2016.

### 6.5.3. Tasas de sobrevida.

Se estudiaron 144 casos de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico y sometidos a gastrectomías en el Instituto Nacional de enfermedades Neoplásicas (INEN). Posterior a esto, se registraron 28 fallecimientos y una tasa supervivencia de 80.6% de estos pacientes (Tabla 36).



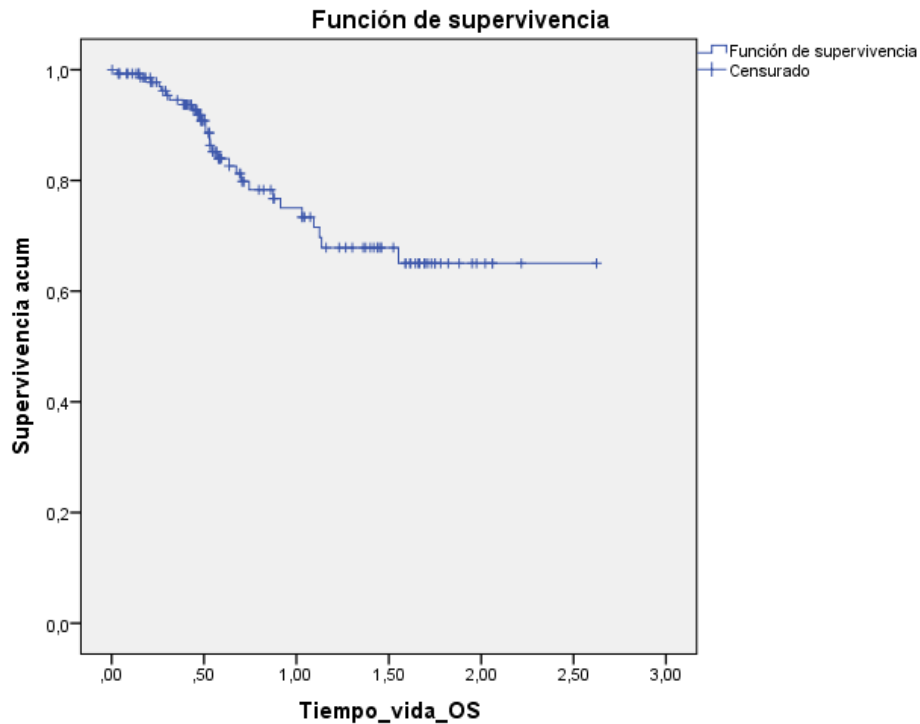
| Nº total | Nº de eventos | Censurado |            |
|----------|---------------|-----------|------------|
|          |               | Nº        | Porcentaje |
| 144      | 28            | 116       | 80.6%      |

**Tabla 36.** Resumen de las estadística de supervivencia de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico y sometidos a cirugía en el INEN durante el periodo 2015-2016.

El tiempo promedio de supervivencia de los pacientes fallecidos fue de 1.96 años, registrándose como menos tiempo de sobrevivida 1.75 años y como mayor tiempo 2.17 años (Tabla 37 y Figura 7).

| Estimación | Error típico | Media <sup>a</sup>            |                 |
|------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
|            |              | Intervalo de confianza al 95% |                 |
|            |              | Límite inferior               | Límite superior |
| 1.964      | .106         | 1.756                         | 2.172           |

**Tabla 37.** Medias del tiempo de supervivencia de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico y sometidos a cirugía INEN durante el periodo 2015-2016.



**Figura 7.** Curva de supervivencia de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico y sometidos a cirugía INEN durante el periodo 2015-2016.

De los pacientes estudiados, 125 fueron positivos a cebadores de *Helicobacter pylori* y tuvieron una tasa de supervivencia de 81.5%. En contraste, los pacientes negativos a esta bacteria resultaron en una tasa de supervivencia de 73.7% (Tabla 38).

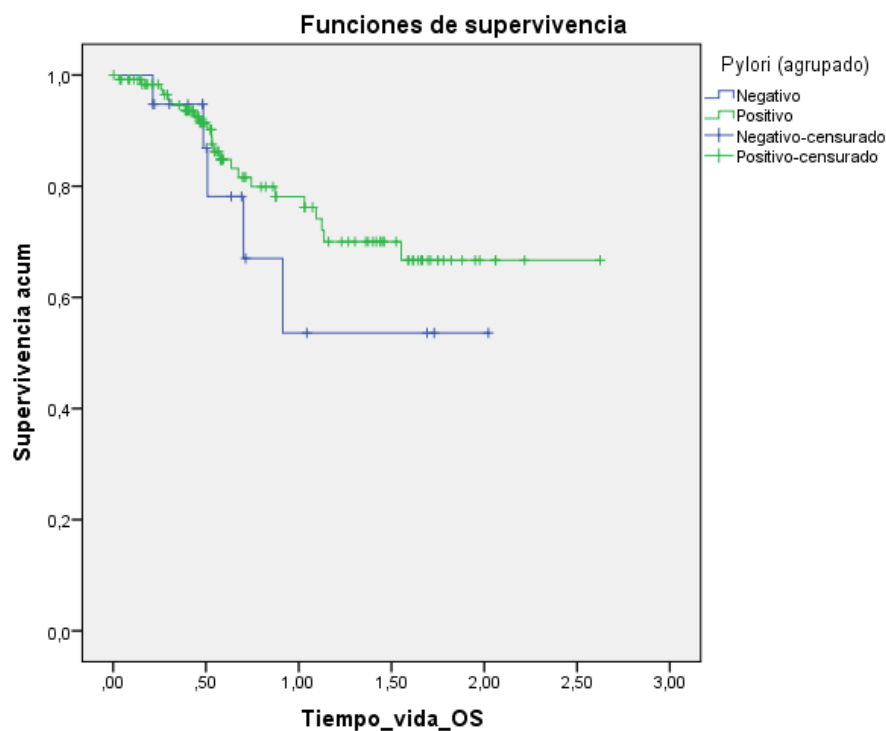
| <i>Helicobacter pylori</i> | Nº total | Nº de eventos | Censurado |            |
|----------------------------|----------|---------------|-----------|------------|
|                            |          |               | Nº        | Porcentaje |
| <b>Negativo</b>            | 19       | 5             | 14        | 73.7%      |
| <b>Positivo</b>            | 125      | 23            | 102       | 81.6%      |
| <b>Global</b>              | 144      | 28            | 116       | 80.6%      |

**Tabla 38.** Resumen de las estadísticas de supervivencia de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico, sometidos a cirugía y positivos a *Helicobacter pylori* INEN durante el periodo 2015-2016.

La sobrevivencia media de los pacientes con adenocarcinoma gástrico, sometidos a cirugía positivos a *Helicobacter pylori* que fallecieron fue de 2 años, siendo que el menor tiempo de vida que se registró fue de 1.78 años y el máximo de 2.22 años. Los pacientes de la misma población negativos a la bacteria y fallecidos tuvo un tiempo medio de supervivencia de 1.38 años, con tiempo mínimo de supervivencia de 0.9 años y máximo de 1.81 años. No se encontró una diferencia estadística entre positivos y negativos a la bacteria (Tabla 39 y Figura 8).

| <i>Helicobacter pylori</i><br>(agrupado) | Media <sup>a</sup> |              |                               |                 |
|--|--------------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
|  | Estimación         | Error típico | Intervalo de confianza al 95% |                 |
|  |                    |              | Límite inferior               | Límite superior |
| <b>Negativo</b>                          | 1.378              | .222         | .943                          | 1.814           |
| <b>Positivo</b>                          | 2.002              | .112         | 1.783                         | 2.220           |
| <b>Global</b>                            | 1.964              | .106         | 1.756                         | 2.172           |

**Tabla 39.** Media de la supervivencia de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico, sometidos a cirugía y positivos a *Helicobacter pylori* INEN durante el periodo 2015-2016.



**Figura 8.** Curva de supervivencia de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico, sometidos a cirugía y *Helicobacter pylori* positivos y negativos en INEN durante el periodo 2015-2016.

La tabla de mortalidad obtenida para este estudio muestra que los pacientes de nuestra población *Helicobacter pylori* negativo tienen el riesgo de muerte significativa en el primer año después de su cirugía, siendo que sobrevive el 64% de ellos. Después del primer año todos estos pacientes presentaron una supervivencia de 100%. En contraste, esta estadística muestra que los pacientes *Helicobacter pylori* positivo presentan un riesgo de muerte en el primer año después de su cirugía que resulta en la supervivencia del 84% de los casos. Después del primer año todos estos pacientes presentaron una supervivencia de 100%.

| Controles de primer orden             |   | Momento de inicio del intervalo | Número que entra en el intervalo | Número expuesto a riesgo | Proporción que sobrevive | Proporción acumulada que sobrevive al final del intervalo | Error típico de la proporción acumulada que sobrevive al final del intervalo |
|---------------------------------------|---|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|---|--|
| <i>Helicobacter pylori</i> (agrupado) | - | 0                               | 19                               | 14.000                   | .64                      | .64   | .13  |
|                                       |   | 1                               | 4                                | 2.500                    | 1.00                     | .64   | .13  |
|                                       |   | 2                               | 1                                | .500                     | 1.00                     | .64   | .13  |
|                                       | + | 0                               | 89                               | 111.500                  | .84                      | .84   | .03  |
|                                       |   | 1                               | 21                               | 25.000                   | .80                      | .67   | .07  |
|                                       |   | 2                               | 4                                | 2.000                    | 1.00                     | .67   | .07  |

**Figura 39.** Tabla de mortalidad de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico, sometidos a cirugía y *Helicobacter pylori* positivos y negativos en INEN durante el periodo 2015-2016.

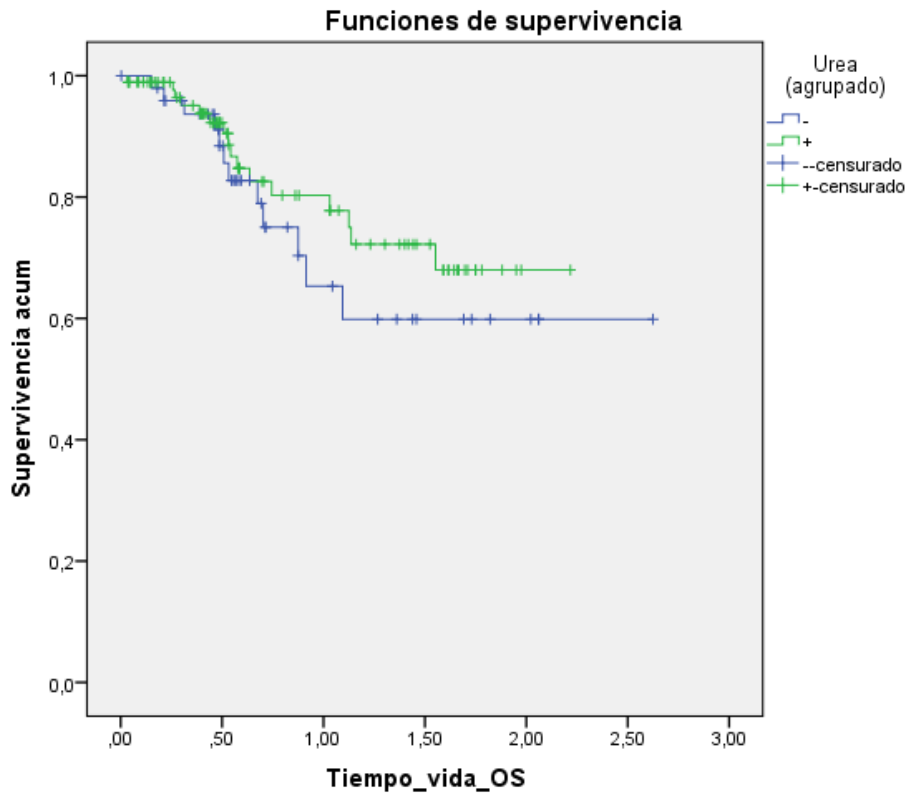
Además, el análisis de la sobrevida de los pacientes positivos a los factores de virulencia dio como resultado que el 83% de los casos ureasa (ureA) positivos con una sobrevida media de 1.75 años. Los grupos ureasa positivo y negativo no presentaron una correlación con la tasa de sobrevida (Tablas 40, 41 y Figura 9)

| Urea (agrupado) | Nº total | Nº de eventos | Censurado |            |
|-----------------|----------|---------------|-----------|------------|
|                 |          |               | Nº        | Porcentaje |
| -               | 50       | 12            | 38        | 76.0%      |
| +               | 94       | 16            | 78        | 83.0%      |
| <b>Global</b>   | 144      | 28            | 116       | 80.6%      |

**Tabla 40.** Resumen de las estadísticas de supervivencia de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico, sometidos a cirugía y positivos a *Helicobacter pylori* (ureA positivo y negativo) en INEN durante el periodo 2015-2016.

| Urea (agrupado) | Media <sup>a</sup> |              |                               |                 |
|-----------------|--------------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
|                 | Estimación         | Error típico | Intervalo de confianza al 95% |                 |
|                 |                    |              | Límite inferior               | Límite superior |
| -               | 1.840              | .186         | 1.475                         | 2.205           |
| +               | 1.756              | .100         | 1.561                         | 1.951           |
| <b>Global</b>   | 1.964              | .106         | 1.756                         | 2.172           |

**Tabla 41.** Media de la supervivencia de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico, sometidos a cirugía y positivos a *Helicobacter pylori* (ureA positivo y negativo) en INEN durante el periodo 2015-2016.



**Figura 9.** Curva de supervivencia de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico, sometidos a cirugía y *Helicobacter pylori* positivos (ureA positivo y negativo) en INEN durante el periodo 2015-2016.

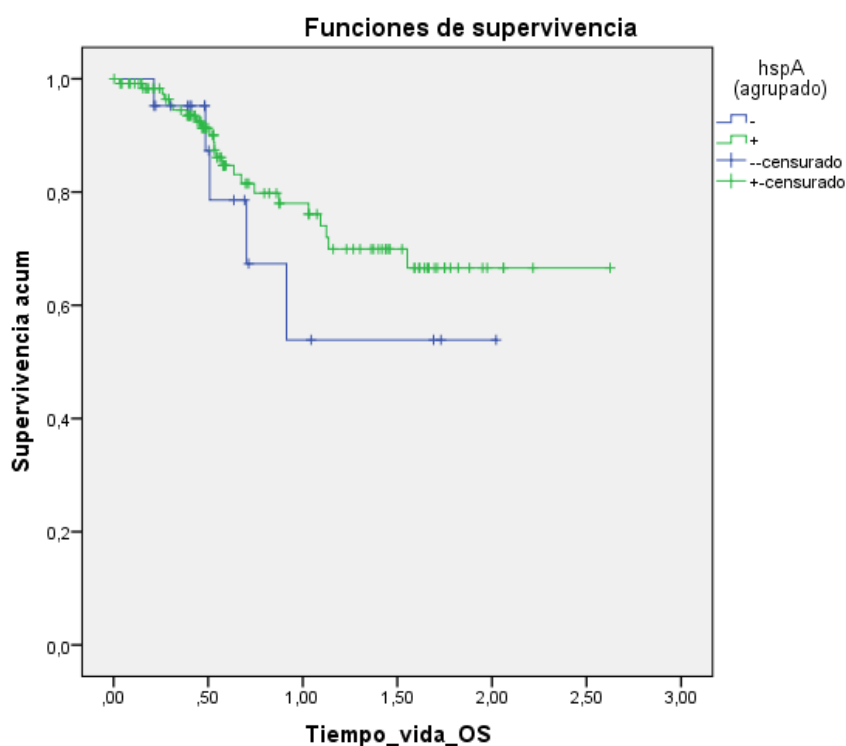
El análisis de la sobrevida de los pacientes positivos a los factores de virulencia dio como resultado que el 81.3% de los casos proteína de shock térmico (hspA) positivos con una sobrevida media de 2 años. Los grupos hspA positivo y negativo no presentaron una correlación con la tasa de sobrevida (Tablas 42, 43 y Figura 10)

| hspA (agrupado) | Nº total | Nº de eventos | Censurado |            |
|-----------------|----------|---------------|-----------|------------|
|                 |          |               | Nº        | Porcentaje |
| -               | 21       | 5             | 16        | 76.2%      |
| +               | 123      | 23            | 100       | 81.3%      |
| <b>Global</b>   | 144      | 28            | 116       | 80.6%      |

**Tabla 40.** Resumen de las estadísticas de supervivencia de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico, sometidos a cirugía y positivos a *Helicobacter pylori* (hspA positivo y negativo) en INEN durante el periodo 2015-2016.

| hspA (agrupado) | Media <sup>a</sup> |              |                               |                 |
|-----------------|--------------------|--------------|-------------------------------|-----------------|
|                 | Estimación         | Error típico | Intervalo de confianza al 95% |                 |
|                 |                    |              | Límite inferior               | Límite superior |
| -               | 1.385              | .222         | .950                          | 1.819           |
| +               | 2.000              | .112         | 1.781                         | 2.219           |
| <b>Global</b>   | 1.964              | .106         | 1.756                         | 2.172           |

**Tabla 41.** Media de la supervivencia de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico, sometidos a cirugía y positivos a *Helicobacter pylori* (hspA positivo y negativo) en INEN durante el periodo 2015-2016.



**Figura 10.** Curva de supervivencia de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico, sometidos a cirugía y *Helicobacter pylori* positivos (hspA positivo y negativo) en INEN durante el periodo 2015-2016.

## 6.6. Significancia estadística.

Las diferencias significativas entre las muestras de tejido (tumoral, sano próximo al tumor y sano distal al tumor) en relación a las concentraciones de los genes constitutivos ureA y hspA son menores que  $\alpha = 0.05$ . (Tabla 42)

|                 | Muestra                   |                           |                           | P            |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------|
|                 | Tumoral                   | Sano próximo al tumor     | Sano distal al tumor      |              |
| <b>Urea</b>     | n=54                      | n=74                      | n=79                      |              |
| Mediana / Rango | 4.893 / [0.270-338.660]   | 11.560 / [0.316-2123.341] | 23.293 / [0.146-1032.561] | <b>0.001</b> |
| <b>hspA</b>     | n=93                      | n=94                      | n=104                     |              |
| Mediana / Rango | 0.480 / [0.005-10781.313] | 2.885 / [0.004-23475.451] | 3.375 / [0.004-10325.929] | <b>0.003</b> |

**Tabla 42.** Diferencias entre muestras en relación a las concentraciones de los genes de factores de colonización ureA y hspA.

Las diferencias significativas entre las muestras de tejido (tumoral, sano próximo al tumor y sano distal al tumor) en relación a las concentraciones de los genes de virulencia vacAm, cagA y vacAs son menores que  $\alpha = 0.05$  (Tabla 43).

|                 | Muestra                   |                            |                            | P               |
|-----------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------|
|                 | Tumoral                   | Sano próximo al tumor      | Sano distal al tumor       |                 |
| <b>vacAm</b>    | n=98                      | n=102                      | n=106                      |                 |
| Mediana / Rango | 0.179 / [0.00002-705.775] | 1.461 / [0.00002-2067.394] | 1.352 / [0.00005-3728.305] | <b>0.017</b>    |
| <b>CagA</b>     | n=106                     | n=114                      | n=113                      |                 |
| Mediana / Rango | 0.049 / [0.001-40.648]    | 0.219 / [0.0006-131.274]   | 0.720 / [0.0009-222.106]   | <b>0.004</b>    |
| <b>vacAs</b>    | n=104                     | n=110                      | n=104                      |                 |
| Mediana / Rango | 0.090 / [0.001-44.845]    | 0.381 / [0.003-276.053]    | 0.885 / [0.004-158.197]    | <b>&lt;0.05</b> |

**Tabla 43.** Diferencias entre muestras en relación a las concentraciones de los genes de virulencia vacAm, cagA y vacAs detectados en este estudio.

## VII. DISCUSION

En el presente estudio se analizó la prevalencia de la bacteria *Helicobacter pylori*, mediante la detección de 5 genes en una población de 144 pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas del Perú (INEN) durante los años 2015 y 2016.

Los resultados son coherentes con las prevalencias por infección estudiadas a nivel mundial (Reporte del Consenso mundial de Kyoto, 2005) y con la documentación en países en vías de desarrollo (Reporte de la prevalencia de *Helicobacter pylori* en los países en desarrollo de la OMS, 2010), los cuales afirman que más del 50% de la población está infectado por *Helicobacter pylori*. Rugge y colaboradores afirman que el cáncer gástrico es la 3ra causa de muerte más común relacionada a cáncer. Se han estimado 1 millón de nuevos casos en el 2008. Y dos de tres de estos fueron en Asia y Sudamérica (Rugge y col., 2009).

Según Fock, *Helicobacter pylori* es necesaria pero no suficiente causa para el desarrollo de cáncer gástrico. Por esta razón es importante detectar la infección temprana de la bacteria (Fock y col., 2008). En el 2010, la prevalencia mundial de la infección de *Helicobacter pylori* estuvo en rangos entre 7% y 87%. La prevalencia promedio en Europa fue de 30%. (Rupnow y col., 2010). Dos de tres de los casos de cáncer gástrico diagnosticados en el 2008 fueron en Asia y Sudamérica con mortalidad de 78% opuesto al 65% en países industrializados (Rugge y col., 2009). Los datos obtenidos en este estudio muestran que los pacientes con cáncer gástrico *Helicobacter pylori* positivos presentan la mayor tasa de mortalidad durante al año posterior a su cirugía (16%). En adición, Tolentino y Ojeda encontraron tasas de mortalidad de 10.3 por cada 100000 habitantes y que las cifras de sobrevida mejoran para pacientes



menores de 60 años, para mujeres y pacientes con adenocarcinoma de tipo intestinal. En el Perú mortalidad por cáncer gástrico se concentra en las regiones más pobres, donde es probable que las condiciones de vida faciliten la alta transmisibilidad de *Helicobacter pylori* (Tolentino y Ojeda 2011). La incidencia y mortalidad relacionada a cáncer gástrico ha decrecido mundialmente en los últimos años, sin embargo existen importantes diferencias entre regiones. Ferro y colaboradores, en su estudio predictivo de la incidencia de cáncer gástrico al 2015, afirman que es necesario el control de la infección *Helicobacter pylori* y otros factores, y el mejoramiento de las técnicas de diagnóstico para reducir las tasas de mortalidad e incidencia del cáncer gástrico (Ferro y col., 2011). Estudios de intervención completados en Colombia por Mera y colaboradores, en China por You y colaboradores y en Japon por Take y colaboradores, demuestran que la erradicación de *Helicobacter pylori* es la acción más eficiente para la prevención de cáncer gástrico. Sin embargo estas intervenciones son más efectivas en aquellos individuos en quienes no se ha presentado gastritis atrófica (Mera y col., 2005; You y col., 2006; Take y col., 2005).

Al comparar la prevalencia del 89.6% encontrada en este estudio y observada en la tabla 3 con los datos que se obtuvieron en el estudio realizado en el distrito de San Juan de Miraflores en Lima (Perú), que indican una prevalencia de *Helicobacter pylori* de 80% en la población estudiada durante el 2000 – 2002 por Soto y colaboradores (Soto y col. 2002), se puede confirmar la coherencia de datos. Cifras totalmente diferentes a las tasas de prevalencia mostradas en países desarrollados, como las de Estados Unidos que describen tasas de 17% en el estudio realizado por Everhart durante el 2000 (Everhart, 2000).

Un estudio realizado por Espejo y Navarrete en el Hospital Edgardo Rebagliati Martins de EsSalud de Lima entre 1963 y 2002 afirma que el cáncer gástrico se ha incrementado en 20% en el último quinquenio, aumentando exponencialmente (Espejo y Navarrete, 2004). En Lima el

último registro acerca de la relación de *Helicobacter pylori* y cáncer de estómago se realizó en el periodo de los años 2010-2012 por el Ministerio de Salud (Ministerio de Salud del Perú, 2013). No se mencionan tasas de prevalencia para esta relación, sin embargo se menciona a la bacteria como un factor de riesgo importante.

Según el Consenso Latinoamericano sobre infección por *Helicobacter pylori* celebrado en el año 2000, encontró recurrentemente que las prevalencias no varían con el sexo, asimismo no aumenta con la edad (Consenso Latinoamericano sobre la infección de *Helicobacter pylori*, 2000). Durante el 2002 en una investigación realizada en el Policlínico Peruano-Japonés de Lima, se encontró una prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* en un 40% de la muestra sin diferencias significativas en el predominio de la infección y su relación a los factores de: sexo, estrato socioeconómico y tiempo de enfermedad (Ruiz y col. 2002). En nuestro estudio la proporción de hombres y mujeres que fueron diagnosticados con adenocarcinoma gástrico fue de 51% y 49% respectivamente, cifras que no muestran una diferencia estadísticamente significativa.

En esta investigación la mayor parte de la población con adenocarcinoma gástrico positiva a la bacteria en Lima proviene de 3 distritos. En el distrito de San Juan de Lurigancho se observa la mayor prevalencia de *Helicobacter pylori* con 12.7%. Seguido a este se encuentra el distrito del Callao con 9.8% y la zona rural de Lima con 7.8% de la población infectada por la bacteria. Mientras tanto los distritos que mostraron menos prevalencia de la bacteria fueron La Molina (1%), Miraflores (1%) y San Miguel (1%). En el 2006, Pilco y colaboradores obtuvieron resultados en los cuales los distritos con más alta incidencia de cáncer gástrico fueron Puente Piedra, Lince, Villa El Salvador, El Agustino, Breña y Rímac. Los distritos con menos incidencia de esta enfermedad fueron San Isidro y Miraflores, observándose una relación de la prevalencia con nivel socioeconómico del distrito (Pilco y col., 2006).

Por otro lado las prevalencias de *Helicobacter pylori* según grupos de edad, visibles en las tablas estadísticas, mostraron que las personas entre 70 y 80 años son las más afectadas y la edad promedio de los infectados fue de 64 años. Los límites de edad de la población del presente estudio estuvieron entre los 27 y 89 años. En la investigación publicada por Espejo y Navarrete, el promedio de edad de personas afectadas por cáncer gástrico en Lima entre 1963 y 2002 fue de 64 años para los hombres y 58 años para mujeres, situándose los límites de edad estudiados entre 23 y 92 años (Espejo y Navarrete, 2004). En otra investigación Pilco y colaboradores concluyeron que la mayor incidencia y mortalidad de acuerdo al grupo estudiado se presentó entre los 55 y 74 años (Pilco y col., 2006). Además, Tolentino y Ojeda en el Perú entre el 2009 y 2010, también encontraron que la edad media de los pacientes afectados fue de 63.9 años y el 60% tenía más de 60 años de edad (Tolentino y Ojeda 2011).

En el Perú, la prevalencia de la infección del estómago por *Helicobacter pylori* ha disminuido en el curso de las últimas décadas, así como las enfermedades asociadas a ella (gastritis crónica activa, úlcera péptica y cáncer gástrico) en los datos descritos por Mendoza y colaboradores en el 2008 y Ramírez-Ramos y colaboradores en los años 2003 y 2006 (Mendoza y col. 2008; Ramírez-Ramos y col. 2003; Ramírez-Ramos y col. 2006). En este estudio los antecedentes de enfermedades gástricas conocidas por los pacientes con adenocarcinoma gástrico fueron de 29.4% para gastritis, 1.4% para úlceras y 7% para PGP; y al revisar el registro clínico se encontraron cifras de 30.8% para gastritis, 9.5% para úlceras y 8.9% para PGP.

En el 2004, datos obtenidos de pacientes con cáncer gástrico diagnosticados mediante análisis histológico entre 1963 y 2002 revelaron que en la mayoría de casos el tumor se ubicó en el antro estomacal (49%), seguido del cuerpo (37.3%) y fondo (12.3%) (Espejo y Navarrete, 2004). En este estudio, el 71.3% de los casos el tumor se ubicó en el

antro estomacal. Mientras que el 23.2% de los tumores estudiados se ubicaron en el cuerpo gástrico y el 1.8% en el fondo estomacal. Algunos estudios han señalado que el ambiente ácido generado por el accionar de *Helicobacter pylori* genera diagnósticos falsos-negativos, especialmente cuando la infección se desarrolla en el antro estomacal (Graham y col., 2003; Levine y col., 2004; Ozturk y col., 2009). Para Bronschein y colaboradores, *Helicobacter pylori* es un factor de riesgo confirmado de cáncer gástrico si la lesión originada por la bacteria se sitúa sobre el cardias (Bronschein y col., 2010).

En una investigación realizada en Perú entre los años 2009 y 2010 por Tolentino y Ojeda, encontraron que 33.6% de la población estudiada tenía adenocarcinoma de tipo intestinal, 18.7% tenía carcinoma de tipo difuso y 4,1% tenía linfoma gástrico primario (Tolentino y Ojeda 2011). Además Pilco y colaboradores encontraron en su estudio que en Lima el carcinoma más frecuente fue el de tipo intestinal en la clasificación de Lauren. Este tipo de carcinomas fueron bien a moderadamente diferenciados, apoyando la tesis que busca demostrar que la mayoría de los casos de cáncer gástrico tratados en Lima tienen un relación con *Helicobacter pylori* (Pilco y col., 2006). Los casos estudiados en esta investigación también presentaron una mayoría de subtipo histológico Intestinal con 41%, seguido de los subtipos difuso (19%) y mixto (15.2%). Otros subtipos representaron el 23.8% e indiferenciados el 1%.

El consenso Maasricht 3 del 2015 reporta que varios autores como Malfertheimer, Asaka y Fock han reunido información científica para reforzar la idea de que *Helicobacter pylori* es el factor de riesgo más común probado para cáncer gástrico no cardiaco (Malfertheimer y col., 2007; Asaka y col., 2009; Fock y col., 2008). Esta bacteria causa lesiones pre-neoplásicas y cáncer en modelos *in vivo*, demostrando el rol causal de la infección de *Helicobacter pylori* en la cascada principal de procesos del cáncer gástrico (Ohnishi y col., 2008).

Varios estudios evidencian ampliamente la eficiencia de la técnica de qPCR para la detección de material genético de bacterias en tejido fresco. Lerardi y colaboradores han demostrado que existe una alta sensibilidad de la técnica de qPCR en la detección de *Helicobacter pylori* (Lerardi y col., 2015). Reportes como el de Monno y colaboradores en el 2012, demuestran una excelente concordancia entre esta técnica y la histológica, la cual es actualmente el *gold standart* para el diagnóstico de *Helicobacter pylori* (Monno y col., 2012). Para Malfertheiner y colaboradores, el diagnóstico mediante qPCR es incluso más eficiente que técnicas como las histológica, pruebas de aliento de urea (UBT) y pruebas de antígenos (HSpA). Razón por la cual la técnica de qPCR podría ser una herramienta clave para refinar la detección de *Helicobacter pylori* en el futuro próximo (Malfertheiner y col., 2012). En una investigación realizada en Lima, Valdiviezo y colaboradores encontraron ADN específico de la bacteria en 55 de 71 biopsias gástricas negativas y en 94 de 106 biopsias gástricas positivas (Valdiviezo y col., 2014). En esta investigación se encontró que el 18.9% de los pacientes con adenocarcinoma gástrico estudiados presentó un diagnóstico de *Helicobacter pylori* positivo previo, mientras que la detección por qPCR encontró material genético específico de la bacteria en un 89.6% de casos.

En el 2002 un estudio realizado por Ramírez y colaboradores en el Hospital Peruano-Japonés, detectó la presencia del gen Ureasa en el 47.8% de los pacientes peruanos estudiados (Ramírez y col. 2002). En nuestro estudio el 65.3% de los pacientes fueron positivos a este gen de factor de colonización.

Varias investigaciones afirman que entre los factores pato-genéticos de *Helicobacter pylori* que incrementan el riesgo de cáncer gástrico, *cagA* y *vagA* son los más importantes (Figueiredo y col., 2002; Xia y col., 2009; Jung y col., 2009).

Mendoza y colaboradores en el 2008, obtuvieron que más del 90% de las cepas de *Helicobacter pylori* en Lima-Perú son cagA positivas, y que se ha relacionado a incremento de riesgo a desarrollar inflamación crónica y cáncer gástrico (Mendoza y col. 2008). Para Ohnishi y colaboradores, el factor carcinogénico más importante podría ser cagA. Este factor es inyectado por la bacteria en las células de la mucosa epitelial del hospedero. Recientemente, una expresión transgénica de cagA se ha mostrado en carcinomas en ausencia de una gastritis coexistente en ratones. Esto indica que carácter de cagA como un oncogen (Ohnishi y col., 2008). El 79.9% de los casos *Helicobacter pylori* positivos de este estudio, dio positivo al gen asociado a la citotoxina (cagA).

Por otro lado Franceschi y colaboradores encontraron que la presencia de regiones cagA están significativamente asociadas a eventos coronarios, y otras enfermedades relacionadas al corazón (Franceschi y col., 2009). Otros estudios han relacionado estas región del genoma de *Helicobacter pylori* con condiciones neuronales como alzheimer y parkinson idiopático (Palm y col., 2009; Kountouras y col., 2009).

Además, el gen de la proteína vacuolizante presentó prevalencias de 77.8% (vacAm) y 79.9% (vacAs). Varios estudios han relacionado los factores de virulencia de la bacteria y polimorfismos genéticos con gastritis y riesgos de enfermedad, particularmente úlceras pépticas y cáncer gástrico (Wroblewski y col., 2010; Snaith y col., 2008). En un estudio de Figueiredo y sus colaboradores se pudo observar que cuando la región vacAs1 está presente, el riesgo de desarrollar cáncer gástrico aumenta. Sin embargo aún no es posible definir un rol clínico para los factores de virulencia bacteria o polimorfismos genéticos en el tratamiento individual de los pacientes (Figueiredo y col., 2002).

Sin embargo también Chen y colaboradores han estudiado relaciones inversas en alguna comunidades, en las cuales una disminución de la frecuencia de infección de *Helicobacter pylori* se ha visto relacionada al

aumento de la prevalencia de algunas enfermedades como asma y obesidad (Chen y col., 2007).

En otros países como en Taiwán, un seguimiento realizado por Hsu y colaboradores en 2007, el cáncer gástrico se desarrolló en 1.3% de pacientes infectados por *Helicobacter pylori* (Hsu y col. 2007). En otro estudio en la población japonesa durante el 2010, Umura y colaboradores observaron que el 2.9% de los pacientes infectados desarrollaban cáncer gástrico (Umura y col. 2010). En nuestro país, no se han establecido datos certeros sobre infecciones de *Helicobacter pylori* en pacientes con neoplasias gástricas, sin embargo durante el 2002 en una investigación realizada en el Policlínico Peruano-Japonés de Lima por Ruiz, se encontró una prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* en un 40% de la muestra (Ruiz y col. 2002). La prevalencia que encontramos en nuestra población de estudio fue de 89.6%, sin embargo hay que aclarar que nuestra población abarca solo pacientes afectados por adenocarcinomas gástricos ingresados a cirugía.

La mayoría de las cepas de *Helicobacter pylori*, expresan factores de virulencia que afectan diferentes rutas de señalización del huésped. Además cuenta con un número de adhesinas que permiten su adherencia al epitelio gástrico. Esta adhesión es esencial para asegurar la prolongada persistencia de la bacteria en el estómago y para la inyección de CagA y otras proteínas en las celular epiteliales del huésped (Wroblewski y col. 2013). Con respecto a esta información, hemos encontrado altas tasas de virulencia correspondiente al gen *vacA*: 77.8% de los casos positivos a *Helicobacter pylori* fueron positivos a la región de amplificación *vacAm* y 79.9% a *vacAs*. De la misma manera la virulencia del gen *cagA* estuvo altamente presente: 79.9% de los infectados resultó positivo este cebador.

Al analizar la zona de extracción de la muestra se encontró una prevalencia ligeramente alta de la bacteria (por medio de identificación de los factores de colonización) en tejido sano distal al tumor (54.9% urea y 72.2% hspA). Al mismo tiempo las tasas de virulencia se encontraron

uniformemente distribuidas entre las muestras tumorales (91.8% *vacAm*, 93.9% *vacAs* y 95.9% *cagA*); proximales (89.1% *vacAm*; 95.3% *vacAs*; 96.9% *cagA*); y distales (90.4% *vacAm*; 95.9% *vacAs*; 95.9% *cagA*), no encontrándose diferencias estadísticamente significativas.

A pesar de la alta incidencia de la infección por *Helicobacter pylori*, los reservorios y vías de transmisión todavía no están claras, aunque se han sugerido múltiples rutas de transmisión. Aziz y colaboradores han mostrado evidencia que soporta que el agua es una vía de transmisión secundaria de la bacteria mediante dos grupos de estudio: (i) evidencia epidemiológica que muestra la asociación entre *Helicobacter pylori* y fuente de agua; y (ii) detección y/o aislamiento de *Helicobacter pylori* en fuentes de agua (Aziz y col., 2013). En países en vías de desarrollo, como el Perú, hay una elevada prevalencia de enfermedades infectocontagiosas producidas por microorganismos que son viabilizados por el agua de consumo humano. Estudios como el de Eichelberger y colaboradores en el 2015 confirman mediante análisis estadísticos que fuentes de agua bebible no tratadas y no cloradas, particularmente agua superficial ha sido asociada a altos riesgos de cáncer gástrico (Eichelberger y col., 2016). En un estudio llevado a cabo por Ramírez y colaboradores en el 2004 se demostró que el agua de la Atarjea, central de procesamiento desde donde se distribuye el agua a la ciudad de Lima, presentaba material genético de *Helicobacter pylori* (Ramírez y col. 2004). El 76.9% de personas entrevistadas en nuestro estudio tienen acceso a agua potable (proveniente de la Atarjea). De estos casos el 64% es *Helicobacter pylori ureA* positivo y el 80.9% es *Helicobacter pylori hspA* positivo. Sin embargo al someter muestras de agua de las viviendas de los pacientes a detección por qPCR se encontró que solo el 13.46% presentaba material genético de *Helicobacter pylori*. Por esta razón no se puede establecer una relación clara entre infección de esta bacteria y la fuente de agua consumida por la población estudiada.



Cabe añadir que el 74.8% de los pacientes entrevistados afirmaron que antes de consumir el agua potable, la hirvieron, el 9.1% posee un filtro en las salidas de agua y que el 9.8% la consumió periódicamente de forma directa. Además un menor porcentaje de la población (3.5%) afirma consumir agua embotellada.

La relación entre la bacteria, gastritis crónica y cáncer gástrico ha sido ampliamente descrita en diversos estudios a nivel mundial. En 1975 se asoció la presencia de *Helicobacter pylori* con la inflamación de la mucosa gástrica y posteriormente en 1985 con la úlcera péptica, estableciendo de este modo una relación causal entre *Helicobacter pylori* y las lesiones de la mucosa gástrica (Milne y col. 1995), con un riesgo para llegar a causar cáncer gástrico del 75%. La presente investigación indica que el 89.6% de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico presentan material genético de *Helicobacter pylori* en tejido gástrico, con casi tasas que van desde 89.1% hasta 96.5% de virulencia *cagA* y *vacA*. Asimismo se observaron cuadros de gastritis previamente diagnosticados en un 31.4% en la población estudiada. Para Wroblewski y colaboradores la relación entre *Helicobacter pylori* y formación de Adenocarcinoma gástrico hace vital su detección temprana con la finalidad de dar tratamiento (Wroblewski y col. 2010). En adición, estudios realizados en China, han demostrado que la detección molecular temprana de *Helicobacter pylori* previene 1 de 4 a 6 cánceres gástricos, representando una estrategia efectiva de costos (Yeh y col., 2009; Shin y col., 2009; Lee y col., 2007).

## VIII.CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la presente investigación podemos concluir que *Helicobacter pylori* fue altamente prevalente en pacientes peruanos diagnosticados con adenocarcinoma gástrico en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas del Perú (INEN) en el periodo 2015-2016, habiéndose detectado en el 89.6% de los casos.

En el 71.3% de los casos el tumor se ubicó en el antro estomacal y el 49.4% ya se encontraban en estadio IV. Mientras que el tipo de clasificación Bormann dominante en los casos positivos para la bacteria estudiada fue el tipo III con 57.2% de ocurrencia.

La mayoría de los pacientes estudiados afirman no haber presentado antecedentes previos a su diagnóstico neoplásico (51%), y sus registros clínicos lo avalan (50.3%). Cabe agregar que el 31.4% presentó como antecedente clínico cuadros de gastritis diagnosticados.

Del estudio de las variables epidemiológicas de esta investigación podemos concluir que la edad promedio de los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico de esta investigación fue de 64 años con un rango de 27 a 89 años. El intervalo de edad en donde se presentaron mayor número de pacientes fue el de 70 a 80 años. El mismo grupo tuvo la mayor prevalencia de infecciones por *Helicobacter pylori* (31.94%).

Las fuentes de abastecimiento de agua potable (76.9%) y consumo de agua hervida (74.8%) fueron las más frecuentes entre los pacientes estudiados.

Durante la amplificación de los genes de los factores de colonización de *Helicobacter pylori* se detectaron prevalencias de 63.5% para el gen de la ureasa (*ureA*) y 83.3% para el gen de la proteína de shock térmico (*hspA*). Además, se amplificaron genes de los factores de virulencia, detectando

la presencia de las regiones vacAs y vacAm del gen de la citotoxina vacuolizante en el 77.8% y 79.9% de los casos; y la región cagA del gen de la proteína asociada a la citotoxina en el 79.9% de los casos.

Del estudio de la mortalidad y sobrevida de los pacientes en los que se detectó *Helicobacter pylori* podemos concluir que la supervivencia media de los pacientes con adenocarcinoma gástrico, sometidos a cirugía que fallecieron fue de 2 años. Se registraron 28 fallecimientos y una tasa de sobrevida de 80.6% de estos pacientes.

De la distribución a nivel nacional concluimos que, la mayor parte de la población positiva a *Helicobacter pylori* que fue diagnosticada de adenocarcinoma gástrico proviene de la región Lima (22.4%). Además, el 14.2% y 8.2% provienen de las regiones Cajamarca y Ayacucho respectivamente, convirtiéndose en los lugares con la mayor cantidad de provenientes para este estudio. En contraste, la menor proporción de pacientes provinieron de las regiones Ucayali (0.5%), Cusco (1.1%), Amazonas (1.6%) y Loreto (1.6%). En Lima metropolitana se obtuvo que el 37% de los pacientes viven en Lima Sur, el 19% de Lima Centro, el 17% de Lima Este, el 16% de Lima Norte y el 11% en el Callao

La relación de la presencia de la bacteria *Helicobacter pylori* en los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico sometidos a cirugía en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

## IX. RECOMENDACIONES

- ✓ Obtener más datos acerca de la prevalencia de *Helicobacter pylori* en pacientes con adenocarcinoma gástrico en el Perú.
- ✓ Realizar estudios paralelos diseñando experimentos que tomen otras herramientas de detección de la bacteria.
- ✓ Explorar en la detección de otros genes propios de la bacteria *Helicobacter pylori*, tomando en cuenta el carácter virulento de estos.
- ✓ Realizar comparaciones entre la efectividad de detección de cebadores de diferentes secuencias para un mismo gen.
- ✓ Comparar datos con estudios realizados en otros países de similares condiciones a Perú.
- ✓ Realizar estudios de detección de genes de la bacteria *Helicobacter pylori* en fuentes de agua y alimentos.
- ✓ Estudiar la heredabilidad y predisposición genética a desarrollar lesiones neoplásicas al ser infectado por la bacteria *Helicobacter pylori*.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Atherton J. (2006). The pathogenesis of helicobacter pylori–induced gastro-duodenal diseases. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease.
2. Atherton J., Peek R., Tham K., Cover T., Blaser M. (1997). Gastroenterology.; 112:92-99.
3. Atherton J. (1997) The clinical relevance of strain types of Helicobacter pylori. Gut.;40:701-703.
4. American Cancer Society. (2014.). Cáncer de estómago ¿ Qué es el cáncer?. Ga: American Cancer society review.
5. Asaka M, Kato M, Takahashi S. (2009) Guidelines for the management of *Helicobacter pylori* infection in Japan: 2009 revised edition. Helicobacter 2010;15:1-20.
6. Asfeldt AM, Lochen ML, Straume B. (2004) Accuracy of a monoclonal antibodybased stool antigen test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Scand J Gastroenterol 2004;39:1073-7.
7. Aziz R., Khalifa M., Sharaf. (2013). Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: a review. Division of Molecular Medicine, Charité Medical School, Berlin, Germany.
8. Barboza Besada, E. (1996). Cancer de estómago; radiología. Prensa Medica Argentina, 38(39), 2496–2503.
9. Blaser M. (1996). Role of vacA and the cagA locus of Helicobacter pylori in human disease. Aliment Pharmacol Ther; 10 (suppl, 1):73-7.

10. Bornschein J, Selgrad M, Warnecke M. (2010) *H. pylori* infection is a key risk factor for proximal gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2010;55:3124-31.
11. Cave D. How is *Helicobacter pylori* transmitted? *Gastroenterology* 1997; 11(Suppl 6): S9-14.
12. Carmolina-Ponce M., Perez-Perez G., Gonzalez-Valencia G., Mendoza I., Peñaloza-Espinoza R., Ramos I., Kersulyte D., Reyes-Leon A., Romo C., Granados J., Muñoz L., Berg D., Torres J. (2011) *Helicobacter pylori* genotyping from american indigenous groups shows novel amerindian *vacA* and *cagA* alleles and asian, african and european admixture. *Plos One* 6(11): e27212.
13. Correa, P. (2004). Is gastric cancer preventable? *Gut*, 53(9), 1217–1219.
14. Cover T., Cao P, Murthy U., Sipple M., Blaser M. (1992). Serum neutralizing antibody response to the vacuolating cytotoxin of *H pylori*. *J Clin Invest* 1992; 90:913-8
15. Cover T., Tummuru M., Cao P., Thompson S., Blaser M. (1994). Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem*; 269:1056-73.
16. Chen Y, Blaser MJ. (2005) Inverse associations of *Helicobacter pylori* with asthma and allergy. *Arch Intern Med* 2007;167:821-7
17. Espejo H, Navarrete J. Cáncer Gástrico Temprano Estudio de 371 lesiones en 340 pacientes en el Hospital E. Rebagliati. Lima – Perú. *Rev Gastroenterol Perú* 2005, 25. 48-75.
18. Erzin Y, Altun S, Dobrucali A. (2005) Evaluation of two enzyme immunoassays for detecting *Helicobacter pylori* in stool specimens of dyspeptic patients after eradication therapy. *J Med Microbiol* 2005;54:863-6.

19. Eichelberger L., Murphy G., Etemadi A., Abnet C., Islami F., Shakeri R., Malekzadeh R. (2015). Risk of gastric cancer by water source: evidence from the golestan case-control study 2015.
20. Everhart JE (2000). Recent developments in the epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am*, 29: 559–578.
21. Ioannou GN, Weiss NS, Kearney DJ. (2005) Is *Helicobacter pylori* seropositivity related to body mass index in the United States? *Aliment Pharmacol Ther* 2005;21:765-72.
22. Fuccio L, Zagari RM, Eusebi LH. (2009) Meta-analysis: can *Helicobacter pylori* eradication treatment reduce the risk for gastric cancer? *Ann Intern Med* 2009;151:121-8.
23. Ferro A., Peleiteiro B., Malvezzi M., Bosetti C., Bertuccio P., Levi F., Negri E., La Vecchia C., Lunet N. (2012). Worldwide trends in gastric cancer mortality (1980–2011), with predictions to 2015, and incidence by subtype.
24. Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P. (2002) *Helicobacter pylori* and interleukin1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1680-7.
25. Franceschi F, Niccoli G, Ferrante G. (2009) CagA antigen of *Helicobacter pylori* and coronary instability: insight from a clinico-pathological study and a meta-analysis of 4241 cases. *Atherosclerosis* 2009;202:535-42.
26. Fock KM, Talley N, Moayyedi P. (2008) Asia-Pacific consensus guidelines on gastric cancer prevention. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:351-65.
27. Gasbarini G, Pretrolani S, Bonvicini F, Gatto MR, Tonelli A. (1995) A population based study of *Helicobacter pylori* infection in a

European country: The San Marino study. Relations with gastrointestinal diseases. *Gut*, Vol136, 838-844.

28. Graham DY, Opekun AR, Hammoud F. (2003) Studies regarding the mechanism of false negative urea breath tests with proton pump inhibitors. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1005-9.
29. Goodwin C. S., McConnell W., McCulloch R. K., McCullough C., Hill R., Bronsdon M. A., Kasper G. Cellular fatty acid composition of *Campylobacter pylori* from primates and ferrets compared with those of other campylobacters. *J. Clin. Microbiol.* 1989;27:938–943.
30. Hsu PI, Lai KH, Hsu PN. (2007). *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric malignancy. *Am J Gastroenterol*, 102: 725–730.
31. Hu L., Mobley H. (1990). Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1990; 58:992-8.
32. Jung SW, Sugimoto M, Graham DY. (2009) *homb* status of *Helicobacter pylori* as a novel marker to distinguish gastric cancer from duodenal ulcer. *J Clin Microbiol* 2009;47:3241-5.
33. Lerardi E., Giorgio F., Losurdo G., Sorrentino C., Principi M., Di Leo A. (2015). Detection of *Helicobacter pylori* DNA sequences in gastric biopsy samples to refine the diagnosis and therapy.
34. Lee, Y.-C., Liou, J.-M., Wu, M.-S., Wu, C.-Y., & Lin, J.-T. (2008). Eradication of *helicobacter pylori* to prevent gastroduodenal diseases: hitting more than one bird with the same stone. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 1(2), 111–120.
35. Letley D, Rhead J, Twells R, Dove B, Atherton J.(2003) Determinants of Non-toxicity in the Gastric Pathogen *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem.*;278:26734-26741.



36. Levine A, Shevah O, Shabat-Sehayek V. (2004) Masking of <sup>13</sup>C urea breath test by proton pump inhibitors is dependent on type of medication: comparison between omeprazole, pantoprazole, lansoprazole and esomeprazole. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20:117-22.
37. Leunk R., Johnson P., David B., Kraft W., Morgan D. (1988). Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol*; 26:93-9
38. Lee YC, Lin JT, Wu HM.(2007) Cost-effectiveness analysis between primary and secondary preventive strategies for gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*;16:875-85.
39. Milne, R., Logan, R. P., Harwood, D., Misiewicz, J. J., & Forman, D. (1995). *Helicobacter pylori* and upper gastrointestinal disease: a survey of gastroenterologists in the United Kingdom. *Gut*, 37(3), 314–318.
40. Ministerio De Salud Del Perú. (2013). Análisis de la situación del cáncer en el Perú.
41. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C. (2007) Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut* 2007;56:772-81.
42. Morales O, Sánchez J. Algunos aspectos epidemiológicos de cáncer de estómago. *Acta cancerológica* 1996; 26(1): 19-24.
43. Mobley H. (1996). The Role of *Helicobacter pylori* urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. *Aliment Pharmacol Ther*; 10 (suppl.):57-64.
44. Machado AM, Figueiredo C, Seruca R. (2010) *Helicobacter pylori* infection generates genetic instability in gastric cells. *Biochim Biophys Acta* 2010;1806:58-65.

45. Machado AM, Figueiredo C, Touati E. (2009) *Helicobacter pylori* infection induces genetic instability of nuclear and mitochondrial DNA in gastric cells. Clin Cancer Res 2009;15:2995-3002.
46. Muhsen K, Cohen D.(2008) *Helicobacter pylori* infection and iron stores: a systematic review and meta-analysis. Helicobacter 2008;13:323-40.
47. Mendoza D, Herrera P, Gilman R.H, Lanfranco J, Tapia M, Bussalleu A, Tenorio J.H, Guillén- Rodríguez C.E, Arróspide M.T, Piscocoya A, Rosas-Aguirre A, Watanabe-Yamamoto J, Ferrufino J.C, Scavino Y, Ramírez-Ramos A. (2008). Variation in the prevalence of gastric cancer in Perú. Int J Cancer. 123(2): 414-20.
48. Oh, J.-K., & Weiderpass, E. (2014). Infection and Cancer: Global Distribution and Burden of Diseases. Annals of Global Health, 80(5), 384–392.
49. Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S. (2008) Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105:1003-8.
50. Ozturk E, Yesilova Z, Ilgan S. (2009) Performance of acidified 14C-urea capsule breath test during pantoprazole and ranitidine treatment. J Gastroenterol Hepatol 2009;24:1248-51.
51. Ortiz M., Coria V., (2015). Gastritis por *Helicobacter pylori*. Laboratorio de Bacteriología Experimental, Departamento de Microbiología y Parasitología del Instituto Nacional de Pediatría de Mexico.
52. Pan Z., Berg D., Hulst W., Su W., Raudonikiene A, Xiao S. (1998). Prevalence of vacuolating cytotoxin production and distribution of

distinct *vacA* alleles in *Helicobacter pylori* from China. *J Infect Dis.*;178:220-226

53. Peek R.M., Crabtree J.E., (2006) *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. *The journal of Pathology*, 208(2), 233-48.
54. Piña-Oviedo, S., & Ortiz-Hidalgo, C. (2007). Linfoma de células B de la zona marginal extraganglionar del tejido linfoide asociado a mucosas (linfoma MALT). Evolución histórica y conceptos actuales. *Gaceta Medica de Mexico*, 143(3), 237–244.
55. Pellicano R, Franceschi F, Saracco G. (2009) *Helicobacters* and extragastric diseases. *Helicobacter* 2009;14(Suppl 1):58-68.
56. Qu XH, Huang XL, Xiong P. (2010) Does *Helicobacter pylori* infection play a role in iron deficiency anemia? A meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2010;16:886-96.
57. Rokkas T, Pistiolas D, Sechopoulos P. (2007). Relationship between *Helicobacter pylori* infection and esophageal neoplasia: a meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 5: 1413–1417, 1417, e1–e2.
58. Ramírez, A., Daniel, R., Requena, M., Leey, J., José, C., Del, E., & El, E. N. (2002). Redalyc. Estudio del *Helicobacter pylori* en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 19, 209–214.
59. Ruiz Marquillo, Pablo (2002). Prevalencia de la Infección por *Helicobacter Pylori* en el Policlínico Peruano Japonés. Tesis Digitales UNMSM. Unidad de Postgrado UNMSM.
60. Rupnow MF, Chang AH, Shachter RD. (2009) Cost-effectiveness of a potential prophylactic *Helicobacter pylori* vaccine in the United States. *J Infect Dis* ;200:1311-17.

61. Ramírez-Ramos A, Watanabe-Yamamoto J, Takano-Morón J. (2006). Decrease in prevalence of peptic ulcer and gastric adenocarcinoma at the Policlínico Peruano Japonés, Lima, Perú, between the years 1985 and 2002. Analysis of 31,446 patients. *Acta Gastroenterol Latinoam*, 36(3):66-73.
62. Ramírez-Ramos A., Chinga A. Erick, Mendoza R. Daniel, Leey C. Julio, Segovia C. María C., Otoyá C. (2003). Variación de la prevalencia del H. Pylori en el Perú. Período (1985- 2002), en una población de nivel socioeconómico medio y alto. *Revista De Gastroenterología Del Perú*. 23:92-98.
63. Sheh A, Lee CW, Masumura K. (2010) Mutagenic potency of *Helicobacter pylori* in the gastric mucosa of mice is determined by sex and duration of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:15217-22.
64. Snaith A, El-Omar E.(2008) *Helicobacter pylori*: host genetics and disease outcomes. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2008;4:577-85.
65. Samareh M., Hashemi S., Rasti A., Reza H. (2015). Detection of *Helicobacter pylori* in bronchoalveolar lavage of patients with chronic obstructive pulmonary disease by real time polymerase chain reaction. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(1);e14551.
66. Somodevilla, A. (2012). Factores de virulencia, aspectos inmunológicos y patrones de sensibilidad en aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori*. Tesis doctoral de la Universidad Complutense de Madrid.
67. Shin DW, Yun YH, Choi IJ. (2009) Cost-effectiveness of eradication of *Helicobacter pylori* in gastric cancer survivors after endoscopic resection of early gastric cancer. *Helicobacter* 2009;14:536-44.

68. Sitas F, Forman D, Newell DG. Geographic association of *Helicobacter pylori* antibody prevalence and gastric cancer mortality in rural China. *Int J Cancer* 1990; 46:608-11.
69. Stolte M, Edt S. Lymphoid follicles in the antral mucosa: immune response to *Campylobacter pylori*. *J Clin Pathol* 1989;42:1269-71.
70. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* Infection. *N Engl J Med*. 2002;347(15):1175-86.
71. Soto, G., Bautista, C. T., Roth, D. E., Gilman, R. H., Velapatin, B., Ogura, M. Taylor, D. N. (2003). *Helicobacter pylori* Reinfection Is Common in Peruvian Adults after Antibiotic Eradication Therapy, 21205.
72. Tolentino C., Ojeda D., (2011). Sobrevida de pacientes con cáncer gástrico en el Perú, 2009-2010.
73. Take S, Mizuno M, Ishiki K. (2005) The effect of eradicating *Helicobacter pylori* on the development of gastric cancer in patients with peptic ulcer disease. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1037-42.
74. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S. (2001). *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med*, 345: 784–789.
75. Vandamme P., Pot B., Kersters K. Differentiation of *Campylobacters* and *Campylobacter*-like organisms by numerical analysis of one-dimensional electrophoretic protein patterns. *Syst. Appl. Microbiol.* 1991;14:57–66.
76. Valdivieso M., Xi C., Bussalleu A., Novoa L., Osorio S., Sexton S., Boehnke K., Crowley j., Goodman G., Baker L. (2014). Clinical, Epidemiologic and Genomic Studies of *Helicobacter pylori*: The role of contaminated water. Department of Internal Medicine and School of Public Health of the University of Michigan, Universidad Peruana

Cayetano Heredia, Division General of Environmental Health of the Ministry of Health of Perú and SWOG.

77. Yeh JM, Kuntz KM, Ezzati M. (2009) Exploring the cost-effectiveness of *Helicobacter pylori* screening to prevent gastric cancer in China in anticipation of clinical trial results. *Int J Cancer* 2009;124:157-66.
78. You WC, Brown LM, Zhang L. (2006) Randomized double-blind factorial trial of three treatments to reduce the prevalence of precancerous gastric lesions. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:974-83.
79. Wroblewski, L. E., Peek, R. M., & Wilson, K. T. (2010). *Helicobacter pylori* and gastric cancer: Factor that modulate disease risk. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(4), 713-39.
80. Weeks D.L, Eskandari S., Scott D.R., Sachs G. (2000). AH-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science (New York, NY.)* 482-5.
81. Wroblewski L.E, Peek, R.M (2013). *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis: mechanisms. *Gastroenterology Clinics of North America*, 42(2), 285-98.
82. Xia Y, Yamaoka Y, Zhu Q. (2009) A comprehensive sequence and disease correlation analyses for the C-terminal region of CagA protein of *Helicobacter pylori*. *PLoS One* 2009;4:-7736.

# XI. ANEXOS

*Anexo 1. Consentimiento informado para la toma de muestra.*

## **CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN OBTENIDAS EN EL CURSO DE PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS O QUIRÚRGICOS**

**Título del Proyecto: “ESTUDIO GENÓMICO, EPIDEMIOLOGICO Y CLÍNICO EVALUANDO LA RELACIÓN ENTRE EL CÁNCER GÁSTRICO Y HELICOBACTER PYLORI: ROL DEL AGUA DE CONSUMO HUMANO COMO VÍA DE TRANSMISIÓN”**

**Investigador Principal: Dr. Carlos Castañeda Altamirano, MD, MSc**

### **1.- INTRODUCCIÓN**

A usted se le está invitando a participar en un estudio que involucra la donación voluntaria de muestras biológicas con fines de investigación. Este documento lo ayudará a comprender por qué se está realizando la investigación, y lo ayudará a decidir si desea participar o no. El mismo, puede contener algunas palabras que usted probablemente no entenderá. Por favor, solicite a uno de los integrantes del equipo de investigación que le explique cualquiera de las palabras o información que usted no comprenda con claridad. Se le entregará una copia en caso acepte participar en el estudio.

### **2.- IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO**

Durante la intervención quirúrgica o prueba diagnóstica (biopsia) a la que va a ser sometido se podrán tomar muestras de tumor. El procedimiento que se le propone consiste en donar voluntariamente cualquier muestra

biológica sobrante de la intervención o prueba a la que va a ser sometido, sin que ello suponga ningún riesgo añadido para su salud ni comprometa el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad. Dichas muestras biológicas podrán ser utilizadas este proyecto de investigación.

### **3.- OBJETIVO**

La finalidad de esta investigación es evaluar la presencia de la bacteria *Helicobacter pylori* en muestras tumorales de pacientes con cáncer gástrico mediante detección del gen *ureC* por qPCR.

### **4.- BENEFICIOS PARA USTED/SOCIEDAD**

Usted no recibirá ninguna compensación económica ni otros beneficios materiales por donar sus muestras. Sin embargo, usted estará haciendo una libre y generosa donación para la investigación que podrá ser beneficiosa para futuras generaciones. El estudio de su resultado podrá generar nuevas pruebas clínicas o tratamientos que contribuirán a mejor manejo de la enfermedad neoplásica.

Debe saber que será prioritario el uso diagnóstico de la muestra que dona y que se garantizará un remanente de las muestras para este fin.

### **5.- DERECHO DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO**

La decisión de donar sus muestras es totalmente voluntaria. Usted puede negarse a donarlas e incluso puede revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe en el Instituto.

Si revoca el consentimiento que ahora presta, la parte de las muestras que no se hayan utilizado en la investigación, podrá decidir que sean destruidas o anonimizadas. Tales efectos no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo antes de la revocación de su consentimiento.



## **6.- RIESGOS**

El procedimiento que se le propone no supone ningún riesgo añadido para su salud ni compromete el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad, puesto que se trata de muestra sobrante de la intervención.

## **7.- PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES Y CONFIDENCIALIDAD**

Los datos personales y clínico-patológicos obtenidos de su historia clínica serán incorporados y tratados en una base de datos según la codificación designada por el investigador principal, Esto prevendrá que la persona que trabaje con su muestra conozca la identidad del paciente.

Los resultados individuales serán anónimos y no serán mostrados (sin su consentimiento) a nadie fuera del proyecto de investigación.

## **8.- ¿QUIÉN PUEDE RESPONDER MIS PREGUNTAS ACERCA DEL ESTUDIO?**

Si tiene preguntas o preocupaciones sobre este estudio, por favor comuníquese con el Investigador Principal del proyecto Dr. Carlos Castañeda Altamirano, teléfono 201-6500 anexo 3000 o 3040; o enviar sus preguntas al correo electrónico: [investigación@inen.sld.pe](mailto:investigación@inen.sld.pe)

Si tiene preguntas sobre sus derechos o los aspectos éticos relacionado a este estudio, usted también puede llamar al Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas, al teléfono 201-6500 anexo 3001; o enviar sus preguntas al correo electrónico: [comité\\_etica@inen.sld.pe](mailto:comité_etica@inen.sld.pe).

He leído este formulario y he tenido la oportunidad de hacer preguntas. Consiento en participar en esta investigación.

|                                 |
|---------------------------------|
| <b>Nombre del participante:</b> |
| <b>Firma</b> _____              |
| <b>Fecha:</b>                   |
| <b>Código Asignado:</b>         |

|  |
|--|
| <b>Nombre del acompañante:</b><br><br><i>(Rellenar solo en caso de incapacidad del paciente)</i> |
| <b>Firma</b> _____   |
| <b>Fecha:</b>  |

|                                 |
|---------------------------------|
| <b>Nombre del Investigador:</b> |
| <b>Firma</b> _____              |
| <b>Fecha:</b>                   |

Anexo 2. Consentimiento informado para la encuesta.

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

La presente investigación es conducida por la Dr. Carlos A. Castañeda Altamirano, La meta de este estudio es **determinar la presencia de Helicobacter pylori en el agua de consumo humano en los domicilios de los pacientes registrados en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas.**

Si usted accede a participar en este estudio, se le pedirá responder preguntas de la encuesta a continuación, durante un tiempo aproximadamente 10 minutos de su tiempo.

La participación en este estudio es estrictamente voluntaria. La información que se recoja será confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera de los de esta investigación.

Si tiene alguna duda sobre este proyecto, puede hacer preguntas en cualquier momento consultando en el Departamento de Investigación. Igualmente, puede retirarse del proyecto en cualquier momento sin que eso le perjudique en ninguna forma. Si alguna de las preguntas de la encuesta le parecen incómodas, tiene usted el derecho de hacérselo saber al investigador o de no responderlas.

Desde ya le agradecemos su participación.

Acepto participar voluntariamente en esta investigación.

-----  
Nombre del Participante  
(en letras de imprenta)

-----  
Firma del Participante

-----  
Fecha

**FICHA DE RECOLECCION DE DATOS**

**DATOS PERSONALES:**

N° HISTORIA CLÍNICA

1.Nombre Completo: \_\_\_\_\_

2. Lugar de nacimiento: \_\_\_\_\_

3. Fecha de nacimiento:  4. Sexo:

5. Lugar de domicilio: \_\_\_\_\_

(Departamento) \_\_\_\_\_ (Provincia) \_\_\_\_\_

6. Teléfono: \_\_\_\_\_

7. Tiempo de permanencia en el lugar:

< 5 años

5-10 años

>10 años

8. Tipo de abastecimiento de agua

Potable

Cisterna

Pozo

Otros

9. Agua de consumo:

Embotellada

Agua hervida

Agua de

domestica c/ filtro

10. Antecedentes:

Gastritis   
Úlceras   
Problemas  
gástricos   
Permanentes (PGP)

10. Numero de familiares en primer grado del paciente

| Nombre y apellido | Cáncer Gástrico | Gastritis | Úlceras | PGP |
|-------------------|-----------------|-----------|---------|-----|
|                   |                 |           |         |     |
|                   |                 |           |         |     |
|                   |                 |           |         |     |
|                   |                 |           |         |     |
|                   |                 |           |         |     |

### Anexo 3. Aprobación del comité de ética.



Ministerio  
de Salud

Instituto Nacional de Enfermedades  
Neoplásicas



"AÑO DE LA DIVERSIFICACIÓN PRODUCTIVA Y DEL FORTALECIMIENTO DE LA EDUCACIÓN"

Surquillo, 16 de Enero del 2015

CARTA N° 010 -2015-CRP-DI-DICON/INEN

Doctor  
Carlos Castañeda Altamirano  
Investigador Principal  
Presente.


De nuestra consideración:

Es grato dirigirme a usted para saludarlo cordialmente e informarle que el Comité Revisor de Protocolos del Departamento de Investigación del INEN, ha revisado y aprueba el trabajo de Investigación titulado "ESTUDIO GENOMICO, EPIDEMIOLOGIA Y CLINICA EVALUANDO LA RELACION ENTRE EL CANCER GASTRICO Y HELICOBACTER PYLORI: ROL DE AGUA DE CONSUMO HUMANO COMO VIA DE TRANSMISION" INEN 15-10.

De acuerdo con las normas deberá presentar un informe sobre los avances del dicho proyecto, así como las conclusiones del mismo a esta Oficina.

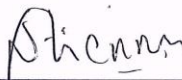
Esperando la respuesta para la respectiva aprobación, quedamos de Usted.

Atentamente,

  
Vázquez Chávez Jule  
Presidente de Comité

  
Sandro Casavilca Zambrano  
Miembro de Comité

  
Margá López Contreras  
Miembro de Comité

  
José Carlos Gutiérrez Lazarte  
Miembro de Comité

  
Odórico Belsuzán Padilla  
Miembro de Comité

## Anexo 4. Renovación de la aprobación del comité de ética.



PERÚ

Ministerio de  
Salud

Instituto Nacional de  
Enfermedades Neoplásicas



### “AÑO DE LA CONSOLIDACIÓN DEL MAR DE GRAU”

Surquillo, 04 de marzo del 2016

CARTA N° 109 – 2016 –CIE/INEN

M.C.  
CARLOS CASTAÑEDA ALTAMIRANO  
Investigador Principal

Presente.-

**REF.: PROYECTO: “ESTUDIO GENÓMICO, EPIDEMIOLÓGICO Y CLÍNICO EVALUANDO LA RELACION ENTRE EL CANCER GÁSTRICO Y HELICOBACTER PYLORI: ROL DEL AGUA DE CONSUMO HUMANO COMO VÍA DE TRANSMISIÓN” INEN 15-10**

**ASUNTO: RENOVACIÓN DE PROYECTO**

Tengo a bien dirigirme a usted para informarle que el Comité Institucional de Ética en Investigación del INEN, **APRUEBA** la Renovación del **PROYECTO: “ESTUDIO GENÓMICO, EPIDEMIOLÓGICO Y CLÍNICO EVALUANDO LA RELACION ENTRE EL CANCER GÁSTRICO Y HELICOBACTER PYLORI: ROL DEL AGUA DE CONSUMO HUMANO COMO VÍA DE TRANSMISIÓN” INEN 15-10**

La renovación del protocolo se otorga desde febrero del año 2016 hasta febrero del año 2017.

El Comité Institucional de Ética en Investigación, deja constancia que la documentación presentada a seguir se encuentra vigente:

- Estudio de investigación ESTUDIO GENÓMICO, EPIDEMIOLÓGICO Y CLÍNICO EVALUANDO LA RELACION ENTRE EL CANCER GÁSTRICO Y HELICOBACTER PYLORI: ROL DEL AGUA DE CONSUMO HUMANO COMO VÍA DE TRANSMISIÓN.
- Consentimiento Informado para la donación voluntaria de muestras biológicas al proyecto de investigación obtenidas en el curso de procedimientos diagnósticos o quirúrgicos.

Atentamente,

  
Dr. ARISTIDES JUVENAL SÁNCHEZ UCHÓN  
Presidente  
Comité Institucional de Ética en Investigación  
Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas

c. c. : Archivo  
M.TITO

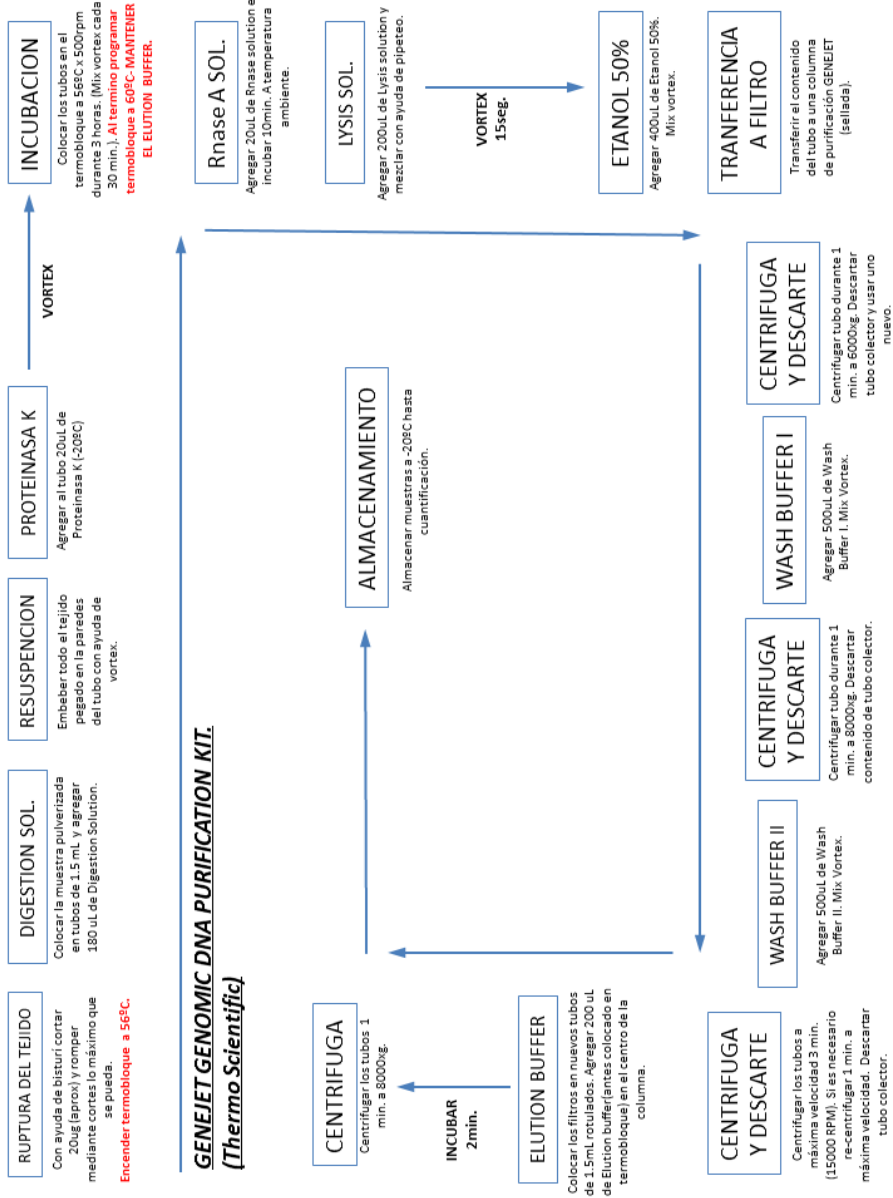
Anexo 5. Registro de tomas de muestra.

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN  
MUESTRAS ALMACENADAS EN BANCO DE TEJIDOS TUMORALES

Datos Clínicos Patológicos

- Nº de Registro del Banco de Tejidos Tumorales: \_\_\_\_\_
- Nombre Paciente: \_\_\_\_\_
- H.C.: \_\_\_\_\_ Dpto.: \_\_\_\_\_
- Fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_
- Género: M \_\_\_\_\_ F \_\_\_\_\_
- Procedencia: \_\_\_\_\_
- Intervención realizada: \_\_\_\_\_ MD encargado: \_\_\_\_\_
- Fecha de recepción de la muestra: \_\_\_\_\_
- Tiempo seguimiento de la muestra
  - Hora interrupción circulación del órgano: \_\_\_\_\_
  - Hora extracción pieza quirúrgica: \_\_\_\_\_
  - Hora recepción en Patología: \_\_\_\_\_
  - Toma de muestra: \_\_\_\_\_
  - Hora congelación: \_\_\_\_\_
- Isquemia Caliente: \_\_\_\_\_ · Isquemia Fría: \_\_\_\_\_
- Tejido Tumoral:
  - Congelador \_\_\_\_\_ Piso \_\_\_\_\_ Rack \_\_\_\_\_ Caja \_\_\_\_\_ Nº Viales \_\_\_\_\_ Posiciones \_\_\_\_\_
  - Congelador \_\_\_\_\_ Piso \_\_\_\_\_ Rack \_\_\_\_\_ Caja \_\_\_\_\_ Nº Viales \_\_\_\_\_ Posiciones \_\_\_\_\_
- Tejido Normal:
  - Congelador \_\_\_\_\_ Piso \_\_\_\_\_ Rack \_\_\_\_\_ Caja \_\_\_\_\_ Nº Viales \_\_\_\_\_ Posiciones \_\_\_\_\_
  - Congelador \_\_\_\_\_ Piso \_\_\_\_\_ Rack \_\_\_\_\_ Caja \_\_\_\_\_ Nº Viales \_\_\_\_\_ Posiciones \_\_\_\_\_
- Consentimiento Informado: Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_
- Tipo de muestra (biopsia, pieza quirúrgica, material de autopsia, sangre, médula ósea, otros...): \_\_\_\_\_
- Órgano: \_\_\_\_\_
- Tipo de tejido (normal/tumoral): \_\_\_\_\_
- Diagnóstico patológico completo: \_\_\_\_\_

## Anexo 6. Resumen del protocolo de extracción de ADN.

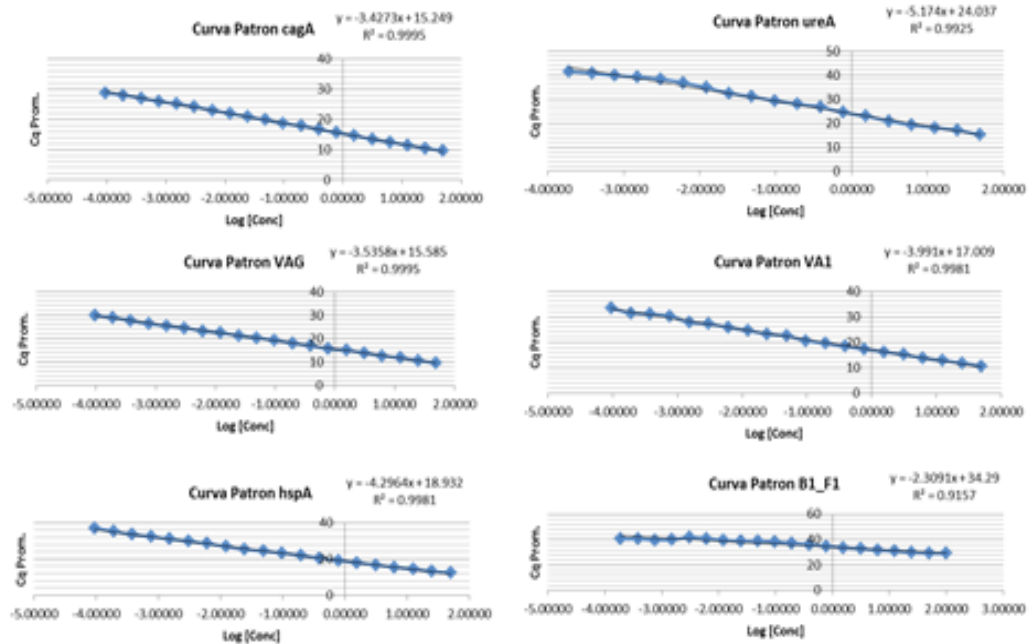


### **GENEJET GENOMIC DNA PURIFICATION KIT.** *(Thermo Scientific)*



## Anexo 7. Curvas estándar.

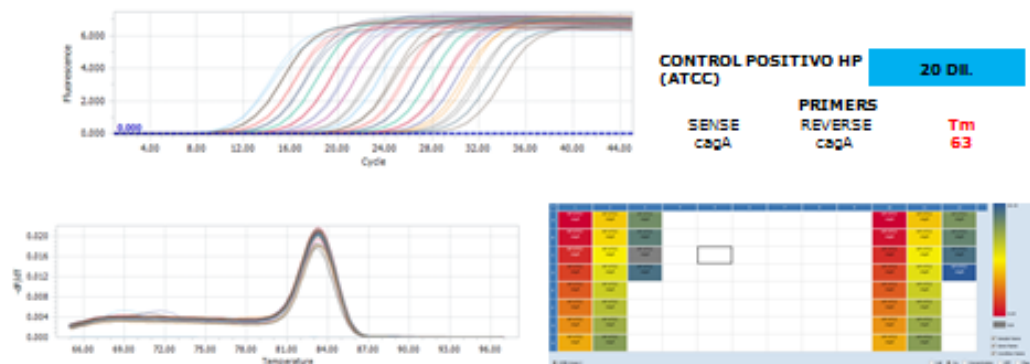
### OBTENCION DE CURVAS ESTANDAR



Se han estandarizado el funcionamiento de 6 primers. Uno constitutivo para *H. pylori* (*ureA* codificante del gen de la Ureasa) y cinco de virulencia.

### CURVAS ESTANDAR

#### Primer *cagA*



Cada primer se ha estandarizado en el Termociclador Real Time Lightcycler 96 (ROCHE) en presencia de un control positivo de *H. pylori* (ATCC) diluido 20 veces para comprobador su funcionamiento.

Se han obtenido Curvas de fluorescencia, Curvas melting, y graficas de Ciclos de cuantificación (Cq).

## Anexo 8. Cuantificación de los genes detectados.

| CONSTITUTIVOS |             |             |             |         |             |             |             |  |
|---------------|-------------|-------------|-------------|---------|-------------|-------------|-------------|--|
| [Urea] (pg)   |             |             | [hspA] (pg) |         |             |             |             |  |
| CASO          | TUMOR       | PROXIMAL    | DISTAL      | CASO    | TUMOR       | PROXIMAL    | DISTAL      |  |
| MV51706       | 4.39956111  | 608.0224262 | 2.86989663  | MV51706 | 3.395909824 | 24.73466448 | 0.104526257 |  |
| LOL1707       | 0           | 0           | 0           | LOL1707 | 0.025463684 | 0.016189929 | 0.014121894 |  |
| SCV1709       | 0           | 5.607169938 | 0           | SCV1709 | 0.034468841 | 0.894131043 | 0           |  |
| YEJ1710       | 0           | 0           | 0           | YEJ1710 | 0.017127107 | 0.047925845 | 0           |  |
| MBT1713       | 0           | 0           | 0           | MBT1713 | 0           | 0           | 0           |  |
| LSL1715       | 0           | 0           | 0           | LSL1715 | 0           | 0           | 0           |  |
| ETS1716       | 11.30187155 | 18.15462338 | 0           | ETS1716 | 2.211840201 | 2.868394979 | 0.003678603 |  |
| FRC1717       | 0           | 0           | 2.579173033 | FRC1717 | 0           | 0           | 0.314436402 |  |
| LOF1719       | 0           | 0           | 0           | LOF1719 | 0           | 0.006286891 | 0           |  |
| EAS1720       | 0           | 0.866880085 | 14.37203814 | EAS1720 | 0           | 0           | 0.04214141  |  |
| TNT1728       | 0           | 0           | 0           | TNT1728 | 0           | 0           | 0           |  |
| FMH1730       | 0           | 0           | 0           | FMH1730 | 0           | 0           | 0           |  |
| MOD1731       | 0           | 2.744977874 | 92.34299217 | MOD1731 | 0           | 0.051109324 | 13.10671077 |  |
| TCS1734       | 0           | 0           | 18.56311893 | TCS1734 | 0.020114531 | 0           | 0           |  |
| FCD1735       | 86.57234943 | 535.5949705 | 1032.561035 | FCD1735 | 0           | 145.0076559 | 318.8143387 |  |
| ENB1736       | 0           | 0.794823289 | 21.64364982 | ENB1736 | 0.016808837 | 0.072992945 | 2.785079127 |  |
| RVS1740       | 0           | 0           | 0           | RVS1740 | 0           | 0           | 0           |  |
| AVF1743       | 0           | 8.022862313 | 31.17562939 | AVF1743 | 0           | 1.181497302 | 3.125211645 |  |
| RNV1745       | 42.00576051 | 697.9664661 | 2.450495798 | RNV1745 | 6.582730988 | 66.48678199 | 0.17911921  |  |
| EJH1746       | 0.368869567 | 68.07869308 | 2.087734652 | EJH1746 | 0.028042503 | 6.222530617 | 0.099604195 |  |
| JGA1748       | 0           | 0.77732598  | 0.314263659 | JGA1748 | 0           | 0.556435418 | 0           |  |
| GCR1749       | 0.575634597 | 18.64591447 | 102.0682355 | GCR1749 | 0.066458282 | 0           | 22.76299003 |  |
| APC1750       | 0           | 0           | 32.52192665 | APC1750 | 0           | 0.035978821 | 4.902210502 |  |
| POA1751       | 59.43778556 | 3.309130956 | 3.102338735 | POA1751 | 103.7338043 | 7.210645055 | 8.288766368 |  |
| OCT1752       | 0.650574828 | 0.732006407 | 79.90792852 | OCT1752 | 1.308144757 | 0           | 145.7868868 |  |
| JCC1753       | 0.528962417 | 36.83774213 | 4.661599759 | JCC1753 | 0.204252157 | 7.019989584 | 0.617734136 |  |
| TCA1754       | 1.112224611 | 0.519629566 | 39.2932311  | TCA1754 | 0.062318752 | 0.085724861 | 16.9064098  |  |
| WMR1757       | 0           | 0           | 2.455954589 | WMR1757 | 0.007831855 | 0.003748256 | 0.680294785 |  |
| MAV1758       | 2.277003729 | 0.56296732  | 36.75586377 | MAV1758 | 0.238597024 | 0.058908733 | 7.710246151 |  |
| MTL1762       | 0           | 0.440739983 | 0.145522462 | MTL1762 | 0           | 0.049491995 | 0.014661744 |  |
| PCC1763       | 0           | 103.6705014 | 44.40870509 | PCC1763 | 0.130212935 | 138.9218927 | 64.72881601 |  |
| AJV1766       | 0           | 0           | 0           | AJV1766 | 0.126092411 | 0           | 0.021383237 |  |
| VTP1767       | 0           | 0           | 0           | VTP1767 | 0           | 0           | 0.051109324 |  |
| ECC1768       | 0           | 0.504813592 | 1.054385958 | ECC1768 | 0.023060104 | 0.035499979 | 0.034840289 |  |
| JVV1772       | 11.53048832 | 533.2167083 | 24.62521193 | JVV1772 | 1.696449793 | 139.6684205 | 3.167366062 |  |
| QVS1773       | 0.646246412 | 3.569197212 | 0.338961797 | QVS1773 | 0.031131756 | 0.621053668 | 0.009652466 |  |
| MQS1777       | 0           | 0           | 0           | MQS1777 | 0           | 0.007383492 | 0.004607222 |  |
| CSD1779       | 0           | 0           | 23.29274751 | CSD1779 | 0.009297059 | 0           | 3.582873291 |  |
| MCC1792       | 0           | 11.86890118 | 0           | MCC1792 | 0.085266661 | 4.747082461 | 0.017311674 |  |
| FGT1795       | 0           | 0           | 0           | FGT1795 | 0.007188266 | 0           | 0.015181497 |  |
| MDF1796       | 1.790588323 | 0           | 0           | MDF1796 | 0.355685375 | 0.046409255 | 0.022631617 |  |
| EAC1797       | 44.21151215 | 4.661599759 | 0           | EAC1797 | 42.04665933 | 7.249393063 | 0           |  |
| JHC1808       | 0           | 0           | 0           | JHC1808 | 0.007188266 | 0.00635464  | 0.013313434 |  |
| GFC1809       | 0           | 0           | 2.732789041 | GFC1809 | 0.029985473 | 0.016763855 | 2.057463275 |  |
| TVM1810       | 0           | 0           | 2.197363047 | TVM1810 | 0.005647878 | 0.006776748 | 0.425071392 |  |
| AED1811       | 0           | 0           | 609.3768736 | AED1811 | 0           | 0.046161198 | 85.30322675 |  |
| DSV1812       | 15.39840864 | 16.53482835 | 0.629218815 | DSV1812 | 1.848338422 | 0.068630046 | 0           |  |
| EZR1813       | 0.270135078 | 168.3929586 | 4.0075942   | EZR1813 | 0.032235362 | 30.89573417 | 5.819329078 |  |
| JRA1814       | 8.907354639 | 0.657853375 | 0.973218335 | JRA1814 | 1.728571571 | 0           | 0.132678479 |  |
| MBR1816       | 36.10735457 | 229.9406587 | 233.0311579 | MBR1816 | 10.69171995 | 71.28418746 | 41.37608388 |  |
| EBC1817       | 0           | 0           | 0.458751098 | EBC1817 | 0           | 0.00635464  | 0.101490171 |  |
| FBC1820       | 338.6602352 | 0           | 23.39663822 | FBC1820 | 52.09939704 | 0.124748085 | 0           |  |
| EEC1821       | 0.287500994 | 1.022045968 | 0.964594544 | EEC1821 | 0.026366636 | 0.148483643 | 0.091910404 |  |
| MSC1823       | 2.407260001 | 14.02452909 | 54.86220891 | MSC1823 | 0.008625021 | 4.063763312 | 16.19687206 |  |
| CMR1828       | 0           | 0           | 0           | CMR1828 | 0.010293633 | 0           | 0           |  |
| BZS1829       | 64.10903083 | 0           | 87.93136114 | BZS1829 | 9.055118622 | 20.3945883  | 40.28202141 |  |
| JAR1832       | 0           | 0           | 0           | JAR1832 | 0.03626922  | 0           | 0           |  |
| GCC1833       | 0           | 0           | 0           | GCC1833 | 0           | 0           | 0           |  |
| MSA1837       | 0           | 6.774623982 | 0           | MSA1837 | 0.023246267 | 3.058928416 | 0.023122016 |  |
| RCA1839       | 0           | 0           | 0           | RCA1839 | 0           | 0           | 0           |  |
| JME1843       | 0           | 0           | 0           | JME1843 | 0           | 0           | 0.004390272 |  |
| RQP1844       | 0           | 0           | 0           | RQP1844 | 0           | 0           | 0           |  |
| RAV1845       | 0           | 3.16509353  | 15.57068405 | RAV1845 | 0           | 0.950972084 | 1.499711841 |  |
| AZR1846       | 12.24446174 | 42.76020853 | 73.26582263 | AZR1846 | 3.332804157 | 15.39287053 | 0           |  |
| PRR1847       | 0           | 0           | 0           | PRR1847 | 0           | 0           | 0.829498782 |  |
| CIC1848       | 28.0175048  | 8.848092064 | 14.05577051 | CIC1848 | 0.024005923 | 2.448932517 | 14.78642352 |  |
| RMC1849       | 0           | 0           | 0           | RMC1849 | 0.017781841 | 0.008978766 | 0           |  |
| JAA1850       | 0.932930403 | 6.422325422 | 66.58056968 | JAA1850 | 0.167064538 | 2.468698839 | 8.048009556 |  |
| MNV1853       | 0.389970795 | 0           | 0           | MNV1853 | 0.083234883 | 0           | 0           |  |
| IAQ1858       | 17.40308366 | 15.22803931 | 0           | IAQ1858 | 0           | 0           | 1.590781936 |  |
| EMT1859       | 0           | 9.14840089  | 3.346153086 | EMT1859 | 0.048183385 | 1.548720335 | 1.101982871 |  |
| JCN1862       | 2.370054907 | 36.10735457 | 32.01928824 | JCN1862 | 0.790438313 | 8.675088295 | 2.290248949 |  |
| BCC1864       | 0           | 0           | 0           | BCC1864 | 0           | 0           | 0           |  |
| PGL1868       | 7.194111982 | 27.46199743 | 24.40700531 | PGL1868 | 0.040807865 | 3.640944339 | 2.70418328  |  |
| RRM1877       | 0           | 0           | 0           | RRM1877 | 0           | 0           | 0           |  |
| JGR1878       | 0           | 10.17960585 | 0           | JGR1878 | 0.006153551 | 0.433695204 | 0.021052027 |  |
| AEG1879       | 0           | 0           | 0           | AEG1879 | 0           | 0           | 0           |  |
| ESC1903       | 6.30901188  | 40.35656432 | 126.9389488 | ESC1903 | 0.230428438 | 1.848338422 | 11.86955426 |  |
| MRP1906       | 4.133814513 | 23.03503452 | 4.429028403 | MRP1906 | 0.200994448 | 1.714731283 | 0.237321723 |  |
| LSD1909       | 0           | 4.133814513 | 19.66874162 | LSD1909 | 0           | 0.041803993 | 0.06557379  |  |
| PMB1911       | 10.69032994 | 340.1707333 | 176.8414529 | PMB1911 | 1.203886607 | 11.93333796 | 32.4224844  |  |
| CTV1913       | 0.615372377 | 0           | 0           | CTV1913 | 0.046533783 | 0.008978266 | 0.031383033 |  |
| SCV1915       | 0           | 0           | 0           | SCV1915 | 0.015386272 | 0.019064904 | 0           |  |
| LRJ1916       | 17.59778711 | 13.80777481 | 377.6733591 | LRJ1916 | 0.122429911 | 0.130212935 | 15.81092456 |  |
| MLV1917       | 0           | 0           | 0           | MLV1917 | 0           | 0           | 0           |  |
| MNR1924       | 0           | 0           | 0           | MNR1924 | 0           | 0           | 0           |  |
| AVB1925       | 0           | 0           | 0           | AVB1925 | 0           | 0           | 0           |  |
| PDM1926       | 0           | 0           | 2.192479021 | PDM1926 | 0           | 0           | 0.181049457 |  |
| PGC1930       | 0           | 0           | 0           | PGC1930 | 0           | 0           | 0           |  |
| AMC1928       | 0           | 0           | 0           | AMC1928 | 0.005156052 | 0           | 0           |  |
| ACD1927       | 0           | 0           | 0           | ACD1927 | 0           | 0           | 0           |  |
| APD1932       | 0           | 0           | 0           | APD1932 | 0           | 0           | 0           |  |
| FBG1936       | 0           | 23.71109887 | 1.552916298 | FBG1936 | 0.026793705 | 0           | 0.682120194 |  |
| FGT1937       | 70.86077135 | 593.3207329 | 410.0832706 | FGT1937 | 0.733301481 | 0           | 42.49976769 |  |
| LED1942       | 0           | 0           | 0           | LED1942 | 0.03456133  | 0.130562331 | 0.01559381  |  |
| MBT1946       | 0           | 0           | 0           | MBT1946 | 0           | 0           | 0           |  |
| VDR1947       | 0           | 0           | 3.413839812 | VDR1947 | 0           | 7.751678877 | 0.416608517 |  |
| JJC1948       | 0           | 2123.340845 | 377.6733591 | JJC1948 | 0           | 180.1589732 | 21.00469394 |  |
| LRM1952       | 0.84969232  | 0           | 0           | LRM1952 | 0.013101093 | 0           | 0           |  |
| JMC1953       | 13.0897336  | 39.91005578 | 10.955222   | JMC1953 | 0.087348036 | 3.125211645 | 0.948427206 |  |
| DCN1955       | 0           | 0           | 0           | DCN1955 | 0.029270963 | 0           | 0.014121894 |  |
| JGC1956       | 13.35451563 | 19.62502438 | 22.93274948 | JGC1956 | 3.749863463 | 1.287280572 | 1.544575834 |  |

| CASO     | [VAG] (pg)  |             |             |  | CASO     | [capA] (pg) |             |             |  | VIRULENTOS |             |              |              | CASO     | [B1-F1] (pg) |              |             |  |
|----------|-------------|-------------|-------------|--|----------|-------------|-------------|-------------|--|------------|-------------|--------------|--------------|----------|--------------|--------------|-------------|--|
|          | TUMOR       | PROXIMAL    | DISTAL      |  |          | TUMOR       | PROXIMAL    | DISTAL      |  | TUMOR      | PROXIMAL    | DISTAL       |              |          | TUMOR        | PROXIMAL     | DISTAL      |  |
|          | [pg]        | [pg]        | [pg]        |  |          | [pg]        | [pg]        | [pg]        |  | [pg]       | [pg]        | [pg]         |              |          | [pg]         | [pg]         | [pg]        |  |
| MV51706  | 1.432948414 | 71.7773502  | 0.134330512 |  | MV51706  | 1.334370364 | 0.269118143 | 98.7484828  |  | MV51706    | 1.65383282  | 0.352355217  | 17.56004199  | MV51706  | 79.83065204  | 0            | 187.2594784 |  |
| LOL1707  | 0.007310766 | 0.008060948 | 0.00832774  |  | LOL1707  | 0.029403871 | 0.040555809 | 0.027963043 |  | LOL1707    | 0.05613041  | 0.062235271  | 0.049983004  | LOL1707  | 0.38676364   | 0            | 0           |  |
| SCV1709  | 0.039232156 | 0.76687042  | 0.000844131 |  | SCV1709  | 0.037801144 | 0.772973821 | 0.00538128  |  | SCV1709    | 0.091340101 | 0.897209806  | 0.005437567  | SCV1709  | 0            | 0            | 0           |  |
| YE1710   | 0.007879295 | 0.113407323 | 0.00411343  |  | YE1710   | 0.015770136 | 0.008864042 | 0.007422226 |  | YE1710     | 0.030520408 | 0.028315031  | 0.013766145  | YE1710   | 0            | 0            | 0           |  |
| ETS1716  | 1.396103767 | 3.00227223  | 0.001389211 |  | ETS1716  | 2.487971812 | 5.044072656 | 0.003148749 |  | ETS1716    | 1.915955276 | 3.839853967  | 0.007151917  | ETS1716  | 0            | 0            | 0           |  |
| FRCl1717 | 0           | 0.000236316 | 0.214687173 |  | FRCl1717 | 0.008746073 | 0.003288886 | 0.413181668 |  | FRCl1717   | 0.010257105 | 0.002613296  | 0.300660012  | FRCl1717 | 2.03336E+16  | 0            | 0           |  |
| LOF1719  | 0.000271832 | 0.00080128  | 0.000328336 |  | LOF1719  | 0.005990224 | 0.007752556 | 0.005870932 |  | LOF1719    | 0.010466333 | 0.012480055  | 0            | LOF1719  | 0            | 0            | 9.53833E+16 |  |
| EAS1720  | 0.000190618 | 0.050084139 | 1.15961438  |  | EAS1720  | 0.023810042 | 0.176463242 | 2.991124816 |  | EAS1720    | 0.021097428 | 0.220812703  | 2.685129102  | EAS1720  | 0            | 0            | 0           |  |
| MOD1731  | 0           | 0           | 0           |  | MOD1731  | 0.008893782 | 0.354181697 | 13.7318289  |  | MOD1731    | 0.012994392 | 0.330688195  | 18.337601008 | MOD1731  | 0            | 0            | 0           |  |
| TCS1734  | 0.003938062 | 0.00194277  | 10.61466867 |  | TCS1734  | 0.014358353 | 0.004582066 | 18.4390903  |  | TCS1734    | 0.013413341 | 0.024724901  | 0            | TCS1734  | 0            | 0            | 2.88005E+15 |  |
| FCD1735  | 0.09574311  | 6.470862305 | 15.99867225 |  | FCD1735  | 16.12696558 | 97.7611754  | 222.1064417 |  | FCD1735    | 0           | 60.71029459  | 2.732008742  | FCD1735  | 0            | 0            | 0           |  |
| ENB1736  | 4.87138E-05 | 0.000463676 | 0.04981577  |  | ENB1736  | 0.017033069 | 0.10605815  | 5.375515388 |  | ENB1736    | 0.045444291 | 0.080917619  | 2.462524763  | ENB1736  | 0            | 0            | 0           |  |
| AVF1743  | 0           | 0           | 0           |  | AVF1743  | 0           | 0.883795288 | 2.95143857  |  | AVF1743    | 0           | 0.813388768  | 2.434273274  | AVF1743  | 0            | 0            | 9.22404E+12 |  |
| RNV1745  | 0.203126355 | 7.3950404   | 0.033884989 |  | RNV1745  | 4.382128339 | 55.87793131 | 0           |  | RNV1745    | 4.436533453 | 46.96360896  | 0.159387965  | RNV1745  | 0            | 0            | 0           |  |
| EJH1746  | 0.000100693 | 0.011163409 | 5.5827E-05  |  | EJH1746  | 0.140049955 | 3.35206266  | 0.16582899  |  | EJH1746    | 0.032333052 | 5.198292184  | 0.138378112  | EJH1746  | 0            | 0            | 0           |  |
| JGA1748  | 0           | 0.00025081  | 0           |  | JGA1748  | 0.002384516 | 0.043365715 | 0.0026901   |  | JGA1748    | 0.014374893 | 0.130997752  | 0.033087904  | JGA1748  | 0            | 16.10993072  | 0.336345272 |  |
| GCR1749  | 0.000124833 | 0.034553496 | 0.260158739 |  | GCR1749  | 0.045906686 | 1.750269209 | 11.26944975 |  | GCR1749    | 0.104905146 | 1.634859106  | 18.02293878  | GCR1749  | 0.570574007  | 0.188627589  | 0.079220038 |  |
| APC1750  | 0           | 0.000107819 | 0.048164929 |  | APC1750  | 0           | 0.011094171 | 3.185411276 |  | APC1750    | 0.050272211 | 0.435307161  | 6.825999997  | APC1750  | 0.656057139  | 71373.33822  | 7.345349333 |  |
| POA1751  | 3.150971551 | 0.104882379 | 0.146198008 |  | POA1751  | 40.64828657 | 4.382128339 | 4.209485556 |  | POA1751    | 0           | 6.636878354  | 4.53918832   | POA1751  | 0            | 0.39848051   | 0.83110535  |  |
| OCT1752  | 0.000780677 | 0           | 1.648303431 |  | OCT1752  | 1.515499016 | 35.55128864 | 114.8129009 |  | OCT1752    | 1.803334002 | 31.99901111  | 158.1968927  | OCT1752  | 980.2539856  | 92038.31216  | 14016423.72 |  |
| JCC1753  | 0.002770505 | 0.351023567 | 0.024547697 |  | JCC1753  | 0.144820013 | 5.806007263 | 0.88676029  |  | JCC1753    | 0.169831224 | 6.288495148  | 0.815738556  | JCC1753  | 7.779526871  | 0.276908853  | 1.205351892 |  |
| TCA1754  | 0.000350204 | 5.0885E-05  | 0.059517939 |  | TCA1754  | 0.085308114 | 0.029700826 | 10.82546705 |  | TCA1754    | 0.112750185 | 0.07485434   | 21.0609436   | TCA1754  | 0.679358614  | 0.276908853  | 2.870014058 |  |
| WMR1757  | 0.000182123 | 0.000107819 | 0.041330236 |  | WMR1757  | 0.005970084 | 0.008206809 | 0.113786874 |  | WMR1757    | 0.013608212 | 0.026269013  | 0.097324796  | WMR1757  | 0            | 0.379099863  | 0.112868979 |  |
| MAV1758  | 0.001071887 | 0.006334935 | 0.010781872 |  | MAV1758  | 0.197087211 | 0.031231196 | 2.620495036 |  | MAV1758    | 0.187873791 | 0.085971062  | 4.247793222  | MAV1758  | 0            | 1.129701399  | 0.21801899  |  |
| MTL1762  | 0.001072879 | 0.107818716 | 0.002995965 |  | MTL1762  | 0.007909935 | 0.019606007 | 0.017929677 |  | MTL1762    | 0.015947995 | 0.049125325  | 0.035975017  | MTL1762  | 0            | 0.274161299  | 0.238438547 |  |
| PCC1763  | 1.078187163 | 128.5619664 | 10.78187163 |  | PCC1763  | 0.05301843  | 27.46917221 | 0.118178891 |  | PCC1763    | 0.121883067 | 102.3346128  | 38.37639224  | PCC1763  | 0.066203751  | 1.146727944  | 1.022486169 |  |
| AVJ1766  | 0.055947393 | 107.8187163 | 0.00954816  |  | AVJ1766  | 0.045906686 | 0.006303977 | 0.021678905 |  | AVJ1766    | 0.160310202 | 0.032147046  | 0.051893026  | AVJ1766  | 0            | 0            | 0.841800067 |  |
| VTP1767  | 0           | 1078.187163 | 0.017493318 |  | VTP1767  | 0           | 0.003516756 | 0.044935405 |  | VTP1767    | 0           | 0            | 0.076161222  | VTP1767  | 0            | 0            | 1.501028853 |  |
| ECCL1768 | 10781.87163 | 0.006498455 | 107818.7163 |  | ECCL1768 | 0.01767235  | 0.022498735 | 0.062846545 |  | ECCL1768   | 0.041437078 | 0.06574158   | 0.053566097  | ECCL1768 | 0.542823355  | 0.394526694  | 0           |  |
| JVV1772  | 1.02132371  | 1078187.163 | 2.10423964  |  | JVV1772  | 0.92451904  | 80.23072976 | 2.350260625 |  | JVV1772    | 1.159831477 | 103.52227964 | 3.066160174  | JVV1772  | 0            | 0.7321114947 | 0           |  |
| QVS1773  | 10781871.63 | 0.23180385  | 1078187.163 |  | QVS1773  | 0.038958031 | 0.295379156 | 0.009446492 |  | QVS1773    | 0.081385818 | 0.792542939  | 0.091693972  | QVS1773  | 0            | 0            | 10.18314338 |  |
| MOS1777  | 0.001031311 | 0.001537658 | 0.005208285 |  | MOS1777  | 0.007732446 | 0.006535116 | 0.00488315  |  | MOS1777    | 0.073995959 | 0.046639687  | 0.063872211  | MOS1777  | 0            | 0            | 0           |  |
| CGD1779  | 0.003847467 | 0.001789067 | 8.787963187 |  | CGD1779  | 0.01294225  | 0.009289604 | 14.29500964 |  | CGD1779    | 0.010468184 | 0.056583989  | 15.87455568  | CGD1779  | 0            | 0            | 0           |  |
| MCC1792  | 0.14667482  | 0.941479214 | 0.002871535 |  | MCC1792  | 0.246672931 | 2.463096564 | 0.011628802 |  | MCC1792    | 0.378705121 | 3.343331219  | 0.056747454  | MCC1792  | 0            | 0            | 0           |  |
| FGT1795  | 0.004756645 | 0.00177348  | 0.006212373 |  | FGT1795  | 0.006826017 | 0.008429692 | 0.01433703  |  | FGT1795    | 0.051149913 | 0.024867962  | 0.076661089  | FGT1795  | 0            | 0            | 0           |  |
| MDP1796  | 0.15654461  | 0.013051907 | 0.006376324 |  | MDP1796  | 0.33012468  | 0.032079382 | 0.016775905 |  | MDP1796    | 0.728987979 | 0.126906199  | 0.08845432   | MDP1796  | 10.23404223  | 0            | 0           |  |
| EAC1797  | 21.03143667 | 7.913884009 | 0.00089274  |  | EAC1797  | 18.1328552  | 4.861607991 | 0.007605944 |  | EAC1797    | 0.440752338 | 11.86224461  | 0            | EAC1797  | 0            | 0            | 0           |  |
| JHC1808  | 0.002198566 | 2.45861E-05 | 0.022850746 |  | JHC1808  | 0.005990114 | 0.008891782 | 0           |  | JHC1808    | 0.082806732 | 0.085971062  | 0            | JHC1808  | 0.097674134  | 0.074619523  | 0           |  |
| GFC1809  | 0.01805717  | 0.008008624 | 2.253888995 |  | GFC1809  | 0.021389993 | 0.01614426  | 1.20680254  |  | GFC1809    | 0.067470746 | 0.083045952  | 4.247793222  | GFC1809  | 0            | 0            | 0           |  |
| TVM1810  | 2.6939E-05  | 0.001297394 | 0.118696688 |  | TVM1810  | 0.012022838 | 0.013700588 | 0.386409324 |  | TVM1810    | 0.025669724 | 0.058240051  | 0.75461404   | TVM1810  | 0.131734739  | 0            | 0           |  |
| AED1811  | 0.00151843  | 0.00266574  | 27.46791694 |  | AED1811  | 0.006918087 | 0.023970081 | 43.9129503  |  | AED1811    | 0.011314117 | 0.083285862  | 45.89220369  | AED1811  | 0            | 0            | 0           |  |
| DSV1812  | 1.237643984 | 0.794833334 | 0           |  | DSV1812  | 1.681313824 | 1.915936044 | 0.846137495 |  | DSV1812    | 5.603172287 | 3.066160174  | 0            | DSV1812  | 0            | 0            | 0           |  |
| EZR1813  | 0.005043763 | 10.20791763 | 19.13638209 |  | EZR1813  | 0.026415267 | 8.914061847 | 86.5599141  |  | EZR1813    | 0.071891497 | 28.26606459  | 99.71194348  | EZR1813  | 0            | 0            | 0           |  |
| JRA1814  | 0.478273648 | 0           | 0.044255183 |  | JRA1814  | 0.178062079 | 0.001775779 | 0.09687532  |  | JRA1814    | 1.803334002 | 0.009515936  | 0.23698976   | JRA1814  | 0            | 0            | 0           |  |
| MBR1816  | 15.335921   | 39.42680793 | 22.88946943 |  | MBR1816  | 18.56303144 | 34.9834447  | 23.94400244 |  | MBR1816    | 35.19488732 | 74.08072497  | 56.8129177   | MBR1816  | 0            | 0            | 0           |  |
| EBCL1817 | 0.001608433 | 0.00652327  | 0.017269795 |  | EBCL1817 | 0.024131196 | 0.029700826 | 0.031758646 |  | EBCL1817   | 0.057571888 | 0.05325794   | 0.044155207  | EBCL1817 | 0            | 0            | 0           |  |
| FBC1820  | 0.007395008 | 0.050906208 | 1.776485335 |  | FBC1820  | 24.10534481 | 0.05823161  | 2.021416314 |  | FBC1820    | 44.84524095 | 0.14408105   | 4.93525898   | FBC1820  | 521805.9011  | 0            | 113.7889537 |  |
| EEC1821  | 0.019104008 | 0.041735941 | 0.060102178 |  | EEC1821  | 0.029502525 | 0.088509877 | 0.110407892 |  | EEC1821    | 0.135611859 | 0.251420625  | 0.285446637  | EEC1821  | 0            | 0            | 0           |  |
| MSC1823  | 0.094504198 | 3.486534161 | 14.94127612 |  | MSC1823  | 0.420159712 | 2.88304248  | 7.242457472 |  | MSC1823    | 0.820485816 | 5.335020052  | 16.81736652  | MSC1823  | 0            | 0            | 0           |  |
| CMR1828  | 0.002012033 | 0.000415755 | 0.001785067 |  | CMR1828  | 0.027315033 | 0.010100992 | 0.042720589 |  | CMR1828    | 0.039454015 | 0.012808311  | 0            | CMR1828  | 0            | 0            | 0           |  |
| BZS1829  | 4.552380854 | 18.76615033 | 20.3162     |  |          |             |             |             |  |            |             |              |              |          |              |              |             |  |

Anexo 9. Información de los cebadores usados en el estudio.

| GEN           | PRIMER | SEC. (tubo)                | Peso (µg) (tubo) | MW (MW) | OD (tubo) | µmole (tubo) | H2O dil. (µL) (nmole*10) | Cuantificación (µg/mL) (qbit) | M (µM) (((Cuant./1000)/(MW)*10 <sup>6</sup> ) | Vol. 10µM - 500µL (µL) (10 <sup>5</sup> 50/M) | H2O   | Tm (1M Na+) | Tm (50mM Na+) |
|---------------|--------|----------------------------|------------------|---------|-----------|--------------|--------------------------|-------------------------------|---|---|-------|-------------|---------------|
| <i>vacA m</i> | VAG R  | GCGTCMAAATAATCCAAAGG       | 308.05           | 6135    | 11.87     | 50.21        | 502.1                    | 1140                          | 185.82  | 26.9  | 473.1 | 79          | 57            |
|               | VAG F  | CAATCTGTCCCAATCAAGCGAG     | 348.44           | 6400.2  | 12.84     | 54.46        | 544.6                    | 1330                          | 207.81  | 24.1  | 475.9 | 82          | 61            |
| <i>3'cagA</i> | CAGT R | GTAATTGTCTAGTTTCGC         | 195.42           | 5496.6  | 6.74      | 35.54        | 355.4                    | 2410                          | 438.45  | 11.4  | 488.6 | 67          | 45            |
|               | CAGT F | ACCCTAGTCGTAATGGGTTA       | 303.09           | 6462.2  | 10.91     | 46.93        | 469.3                    | 932                           | 144.22  | 34.7  | 465.3 | 79          | 58            |
| <i>CagA</i>   | CagA R | TCTAATCTGTTTGTCTCCCA       | 261.25           | 6284.2  | 8.44      | 41.54        | 415.4                    | 1210                          | 192.55  | 26.0  | 474.0 | 83          | 62            |
|               | CagA F | CTCAATGGGAAGGCGACCT        | 226.42           | 5789.8  | 7.89      | 39.14        | 391.4                    | 833                           | 143.87  | 34.8  | 465.2 | 85          | 64            |
| <i>vacA s</i> | VAl R  | CTGCTTGAATGGCCAAAC         | 219.08           | 5773.8  | 7.79      | 37.94        | 379.4                    | 1770                          | 306.56  | 16.3  | 483.7 | 84          | 63            |
|               | VAl F  | ATGGAAATACACAACACAC        | 226.88           | 6410.2  | 9.3       | 35.35        | 353.5                    | 722                           | 112.63  | 44.4  | 455.6 | 74          | 52            |
| <i>ureA</i>   | ureA R | TTGTCTGGTGTCTATCAACC       | 194.63           | 6339.2  | 6.43      | 30.73        | 307.3                    | 1620                          | 255.55  | 19.6  | 480.4 | 77          | 55            |
|               | ureA F | GAGAAATGAGATGAAACTCACCC    | 176.67           | 6762.4  | 6.83      | 26.11        | 261.1                    | 5620                          | 831.07  | 6.0   | 494.0 | 79          | 58            |
| <i>5'cagA</i> | F1     | GATAACAGCGAAGCTTTTGGAG     | 342.63           | 7128.6  | 12.87     | 48.12        | 481.2                    | 3160                          | 443.28  | 11.3  | 488.7 | 83          | 61            |
|               | B1     | CTGCAAAAGATGTTGGCAG        | 273.56           | 6495.2  | 10.39     | 42.17        | 421.7                    | 2810                          | 432.63  | 11.6  | 488.4 | 82          | 61            |
| <i>hspA</i>   | hspA R | GCTATCTGAAAATTGATTTCTTTTGC | 244.84           | 8246.4  | 8.6       | 29.66        | 296.6                    | 2040                          | 247.38  | 20.2  | 479.8 | 83          | 62            |
|               | hspA F | TGCGCTATAGTTGTGTGC         | 200.44           | 5826.8  | 6.75      | 34.41        | 344.1                    | 1120                          | 192.22  | 26.0  | 474.0 | 80          | 59            |

# Anexo 10. Curvas patrón.

|              | Concentración | Concentración | Cq 1     | Cq 2  | media Cq | Slope 1 | Slope 2 | media Sloj | EPF 1 | EPF 2 | [C]   |
|--------------|---------------|---------------|----------|-------|----------|---------|---------|------------|-------|-------|-------|
| STOCK 50mg   | 5.00E-01      | 50.00000      | 169837   | 9.64  | 9.65     | 2.78    | 3.41    |            | 6.26  | 6.67  | 1.63  |
| DIL 1/2      | 2.50E-01      | 25.00000      | 139794   | 10.33 | 10.36    | 4.04    | 3.95    | 3.995      | 6.77  | 6.66  | 1.42  |
| DIL 1/4      | 1.25E-01      | 12.50000      | 109691   | 11.39 | 11.52    | 11.65   | 4.3     | 3.94       | 6.89  | 6.47  | 1.10  |
| DIL 1/8      | 6.25E-02      | 6.25000       | 79568    | 12.37 | 12.42    | 12.42   | 4.8     | 3.59       | 7.18  | 6.53  | 0.82  |
| DIL 1/16     | 3.12E-02      | 3.12500       | 49485    | 13.38 | 13.42    | 13.4    | 4.56    | 4.82       | 4.95  | 7.05  | 0.54  |
| DIL 1/32     | 1.56E-02      | 1.56250       | 19382    | 14.48 | 14.55    | 14.55   | 4.65    | 4.46       | 4.55  | 7.15  | 6.89  |
| DIL 1/64     | 7.81E-03      | 0.78125       | -0.10721 | 15.52 | 15.66    | 15.6    | 5.15    | 4.19       | 4.67  | 7.36  | 6.9   |
| DIL 1/128    | 3.91E-03      | 0.39063       | -0.40824 | 16.65 | 16.61    | 16.63   | 4.83    | 4.22       | 4.55  | 7.22  | -0.40 |
| DIL 1/256    | 1.95E-03      | 0.19531       | -0.70927 | 17.9  | 17.7     | 17.8    | 4.31    | 4.09       | 4.2   | 7.05  | -0.74 |
| DIL 1/512    | 9.77E-04      | 0.09766       | -1.01030 | 18.55 | 18.61    | 18.58   | 4.56    | 4.22       | 4.39  | 7.1   | 6.94  |
| DIL 1/1024   | 4.88E-04      | 0.04883       | -1.31133 | 19.17 | 19.63    | 19.65   | 4.75    | 4.49       | 4.06  | 7.19  | 6.48  |
| DIL 1/2048   | 2.44E-04      | 0.02441       | -1.61236 | 20.88 | 20.74    | 20.81   | 4.65    | 4.49       | 4.57  | 7.12  | 7.08  |
| DIL 1/4096   | 1.22E-04      | 0.01221       | -1.91339 | 21.88 | 21.88    | 21.88   | 4.11    | 4.7        | 4.405 | 6.91  | 7.16  |
| DIL 1/8192   | 6.10E-05      | 0.00610       | -2.21442 | 22.91 | 22.96    | 22.96   | 4.27    | 4.14       | 4.205 | 6.96  | -2.24 |
| DIL 1/16384  | 3.05E-05      | 0.00305       | -2.51545 | 24.02 | 24.16    | 24.1    | 4.64    | 4.1        | 4.37  | 7.05  | 6.8   |
| DIL 1/32768  | 1.52E-05      | 0.00152       | -2.81648 | 25.09 | 25.08    | 25.085  | 4.58    | 4.55       | 4.565 | 7.05  | -2.58 |
| DIL 1/65536  | 7.62E-06      | 0.00076       | -3.11751 | 26.13 | 25.7     | 25.915  | 4.9     | 3.97       | 4.435 | 7.26  | 6.88  |
| DIL 1/131072 | 3.81E-06      | 0.00038       | -3.41854 | 27.14 | 26.74    | 26.94   | 4.72    | 3.98       | 4.35  | 7.17  | -3.40 |
| DIL 1/262144 | 1.91E-06      | 0.00019       | -3.71957 | 27.98 | 27.98    | 27.98   | 3.78    | 3.78       | 3.78  | 6.65  | -3.70 |
| DIL 1/524288 | 9.54E-07      | 0.00010       | -4.02060 | 28.43 | 28.71    | 28.71   | 3.8     | 3.51       | 3.655 | 6.65  | -3.92 |

