

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Prevalencia de Epstein-Barr Virus y *Helicobacter pylori* como agentes causantes de adenocarcinoma gástrico en el INEN, Lima - Perú**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

Adrián Rodrigo Chumpitaz Aguirre

Lima, Perú

2018

## *Dedicatoria*

Este trabajo de tesis se lo dedico especialmente a mi madre Rosio, ella con todo el esfuerzo y trabajo, logro darme una mejor vida e instrumentos para poder desempeñarme en este mundo.

A ella mi agradecimiento eterno por el apoyo incondicional y el cariño de toda una vida.

## *Agradecimientos*

En primera instancia, agradezco a las personas e instituciones que hicieron posible el desarrollo de esta tesis para optar por el grado de Licenciado en biología, Departamento de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. A mi asesora PhD. Carolina Belmar López, por la dedicación y esfuerzo que significó el trabajo desarrollado, a la Dra. Lidia Cruz por la paciencia y comprensión para la presentación y desarrollo de la tesis. Y a todos mis compañeros en el INEN.

En segunda instancia agradecer, el amor incondicional de mi Madre, Rosio Aguirre, ya que sin ella no estaría en el lugar en el que me encuentro hoy, a mi familia por el soporte brindado durante todos estos años. Y a Fabiola porque siempre me brindó su apoyo incondicional, sin importar las adversidades. Finalmente agradecer a mis hermanos del alma, José Antonio, Donnie, Julio y Mauricio por su ayuda y apoyo de toda la vida.

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>4</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>6</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>10</b>
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	12
1.2 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN .....	12
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
2.1 OBJETIVO GENERAL .....	13
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO .....	13
<b>III. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>14</b>
3.1 CÁNCER GÁSTRICO.....	14
3.2 HELICOBACTER PYLORI.....	15
3.3 FACTORES DE COLONIZACIÓN .....	16
3.4 FACTORES DE VIRULENCIA.....	16
3.5 VIRUS EPSTEIN-BARR .....	18
<b>IV. ANTECEDENTES</b> .....	<b>21</b>
4.1 CÁNCER GÁSTRICO.....	21
4.2 HELICOBACTER PYLORI .....	22
4.3 VIRUS DE EPSTEIN-BARR .....	25
4.4 RELACIÓN ENTRE <i>H. PYLORI</i> , Y VIRUS EPSTEIN-BARR Y CÁNCER GÁSTRICO. ....	28
<b>V. MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>29</b>
5.1 LUGAR DE EJECUCIÓN .....	29
5.2 TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	29
5.3 FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATO .....	29
5.4 CONSENTIMIENTO INFORMADO Y ENCUESTA.....	30
5.5 POBLACIÓN .....	30

5.6	CRITERIO DE INCLUSIÓN .....	30
5.7	CRITERIO DE EXCLUSIÓN .....	31
5.8	ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE DATOS. ....	31
5.9	VARIABLES .....	32
5.10	OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.....	33
5.11	MUESTREO.....	35
	5.11.1 <i>Obtención de la muestra de Adenocarcinoma Gástrico.</i> ....	35
5.12	PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS.....	36
	5.12.1 <i>Extracción de ADN de la muestra tumoral.</i> ....	36
	5.12.2 <i>Cuantificación de ácidos nucleicos.</i> ....	37
	5.12.3 <i>PCR cuantitativa o a tiempo real (qPCR) mediante uso de SYBRgreen.</i> ....	38
	5.12.4 <i>PCR cuantitativa o a tiempo real (qPCR) mediante sondas TaqMan</i> ....	41
<b>VI.</b>	<b>ASPECTO ÉTICO .....</b>	<b>44</b>
	6.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	44
<b>VII.</b>	<b>FINANCIAMIENTO .....</b>	<b>45</b>
<b>VIII.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
	8.1 RESULTADOS SOCIODEMOGRÁFICOS.....	46
	8.2 RESULTADOS PATOLÓGICOS.....	50
	8.3 DETERMINACIÓN DE <i>H.PYLORI</i> Y <i>VEB</i> .....	52
<b>IX.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>56</b>
<b>X.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>63</b>
<b>XI.</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>64</b>
<b>XII.</b>	<b>REFERENCIAS CITADAS.....</b>	<b>65</b>
<b>XIII.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>72</b>

# ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA N°1:</b> CEBADORES (SENTIDO Y ANTI SENTIDO) UTILIZADOS PARA LA DETECCIÓN DE <i>H. PYLORI</i> Y SUS TEMPERATURAS DE AMPLIFICACIÓN.....	39
<b>TABLA N°2:</b> CONDICIONES EMPLEADAS PARA LA DETECCIÓN DE <i>H. PYLORI</i> MEDIANTE QPCR.....	40
<b>TABLA N°3:</b> CONDICIONES EMPLEADAS PARA LA DETECCIÓN DEL VEB MEDIANTE QPCR.....	42
<b>TABLA N°4:</b> VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO.....	46
<b>TABLA N°5:</b> DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA, TANTO A NIVEL NACIONAL COMO SU DISTRIBUCIÓN A NIVEL DE LIMA METROPOLITANA.....	47
<b>TABLA N°6:</b> PERÍODO DE HABITACIÓN DE VIVIENDA ACTUAL, Y TIPOS DE CONSUMO DE AGUA DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO.....	49
<b>TABLA N°7:</b> VARIABLES CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN.....	51
<b>TABLA N°8:</b> RESULTADOS DE LA PRUEBA DE QPCR.....	53
<b>TABLA N°9:</b> DIVISIÓN EN SUBGRUPOS DEPENDIENDO DE LAS CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS A LA PRESENCIA/AUSENCIA DE VEB Y <i>H. PYLORI</i> .....	54
<b>TABLA N°10:</b> PORCENTAJE DE CASOS QUE COMPONEN LAS CATEGORÍAS ESTABLECIDAS EN LA TABLA N°10.....	55

## RESUMEN

El Presente estudio tuvo como finalidad evaluar la presencia de los patógenos HP y VEB asociado a CG (VEBaCG), para lograr de terminar la prevalencia y definir las características de los pacientes peruanos diagnosticados con CG.

Las muestras de cáncer gástrico (150 pacientes) fueron colectadas prospectivamente de pacientes sometidos a gastroscopias o resecciones quirúrgicas, los cuales no fueron sometidos a ningún tipo de tratamiento previo, entre los años 2015 hasta el 2017. Se tomaron muestras de tejido tumoral (T), tejido proximal sano (P) y tejido distal sano (D) las muestras fueron evaluadas para la presencia de HP y VEB por medio del método de PCR cuantitativa (qPCR). A su vez se analizaron las variables clínico patológicas las cuales incluían; edad, género, tipo de tumor, estado de nódulos linfáticos y estadio patológico. Se evaluó mediante la estimación de curvas de sobrevivida (OS) Kaplan-Meier. Finalmente, el  $p \leq 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

Es así que total de 150 pacientes fueron estudiados y la edad media del grupo fue de 65 años, con predominancia de varones (51.3%). El subtipo de cáncer predominante fue; subtipo histológico intestinal-mixto con un 72.5% de los casos estudiados. El estadio clínico más frecuente fue el III-IV (74.6%). Los pacientes HP positivos fueron determinados por la presencia de por lo menos uno de los dos genes constitutivos ureA/hspA y en cuanto a los pacientes positivos para el VEB estos se dividieron en grupos de alta carga viral ( $>100$ copias/ $\mu$ l) y baja carga viral ( $<100$ copias/ $\mu$ l). La prevalencia de HP fue de un 87.3% ( $n=131/150$ ) y del VEB fue un 10% ( $n=15/150$ ) de la población.

Nuestros resultados demuestran una presencia significativa de HP en pacientes peruanos con cáncer gástrico. El cáncer gástrico asociado al VEB tuvo una incidencia similar a los reportes previos a nivel mundial. Estos resultados indican

que el método de qPCR es efectivo para la evaluación de HP y VEB a partir de tejidos de CG.

Palabras Clave: Cáncer Gástrico. Adenocarcinoma, *Helicobacter pylori*. Virus Epstein-Barr. qPCR. Sybrgreen. TaqMan.



## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate HP and EBV-associated GC (EBVaGC), to assess the prevalence rate and to define the characteristics of Peruvian patients.

**METHODS:** GC samples (150 patients) were prospectively collected from patients who underwent gastroscopy or surgical resection with no preoperative treatment at INEN between 2015 and 2017. Tumor tissue (T), proximal healthy tissue (P) and distal healthy tissue (D) samples were assessed for HP and EBV by quantitative PCR (qPCR) using specific primers. EBV and HP status were analyzed along with clinicopathologic parameters including age, gender, tumor type, lymph node status, and pathologic stage of the tumor. Kaplan-Meier estimation curves of overall survival (OS) were applied. P-values of  $\leq 0.05$  were considered statistically significant.

Thus a total of 150 patients were studied. The patients had a mean age of 65, and were predominately males (51.3%). The Intestinal-mixed histological subtype rate was 72.5% among the cases. The most frequent clinical stage was III-IV (74.6%). HP positive patients were determined by at least one ureA/hspA gene result and EBV positive patients were divided in high viral load ( $>100$ copy/ $\mu$ l) and low viral load ( $<100$ copy/ $\mu$ l) groups. The results found HP in 87.3% (n=131/150) and EBV in 10% (n=15/150) of the population.

Our results show a significant presence of *HP* in Peruvian gastric cancer patients. The obtained EBV-associated GC incidence was similar to the incidence rates reported worldwide. The findings suggest that qPCR is an effective method to evaluate HP and EBV from CG samples.

**Keywords:** Gastric cancer, Adenocarcinoma, Helicobacter pylori. Epstein - Barr virus. qPCR. Sybrgreen. TaqMan.

# I. INTRODUCCIÓN

En la población mundial, el cáncer gástrico (CG) es la quinta neoplasia de mayor incidencia y la tercera causa de mortalidad. Registrándose aproximadamente 950 mil casos nuevos de CG y la muerte de alrededor de 720 mil personas cada año. (Stewart. B & Wild, C. 2014). La base de datos de cáncer del Instituto de Enfermedades Neoplásicas (INEN) estableció que durante el período 2010-2012, el CG representó el 7.9% de todas las neoplasias malignas con 4821 nuevos casos. Dando lugar a 3437 muertes. Lo cual lo ubica como la primera causa de muerte por cáncer. (Payet, E. y col., 2016).

Según la clasificación de Lauren, existen dos subtipos de adenocarcinomas, siendo el primero de ellos de tipo intestinal (IT) estructuralmente parecido al cáncer de colon y el tipo difuso (DT) sólo hallado en el cáncer de estómago. Dentro de los subtipos de adenocarcinomas también se evidencia que el tipo difuso es más común en personas jóvenes, así como en mujeres, consistiendo en células neoplásicas infiltradas individualmente, este subtipo de CG no produce estructuras glandulares. (Lauren, P., 1993) El adenocarcinoma de tipo intestinal es el más frecuente de los dos, siendo precedido siempre por gastritis crónica y metaplasia intestinal finalmente derivando en displasia y adenocarcinoma. (Polk, D., Peek, M., 2014)

Ha sido ampliamente documentado que el desarrollo de diversas patologías gástricas está estrechamente relacionado a infecciones por bacterias y/o virus. En el 2002 se estimó que el 17.8 % de casos nuevos de cáncer fueron causados por infecciones virales (12.1%) y bacterianas (5.6%). La mayor proporción de estos casos se da en países de bajos ingresos, y se estima que si estas infecciones se trataran de manera oportuna se podría reducir los casos de cáncer hasta en un 26% en países pobres y hasta en un 8% en países desarrollados según datos del IARC (*International Agency for Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. A Review of*

*Carcinogen—Part B: Biological Agents. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2011.*

En 1994 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, IARC logro identificar once agentes biológicos definidos como carcinogenos del grupo 1 entre los cuales se encuentran tanto el Virus Epstein-Barr (VEB) como la bacteria *Helicobacter pylori* (*H.pylori*).

La infección por estos agentes biológicos incrementa el riesgo de incidencia de CG, es así como en el año 1993 se identificó la posible relación causal del VEB con CG, detectándose la presencia de ADN vírico en el 77.8 % de los casos estudiados. (Oda, K. y col 1993).

Es así que el presente proyecto tiene como fin el poder establecer las prevalencias de *H. pylori* y VEB en pacientes que sufren de CG del tipo adenocarcinoma gástrico, también se buscó el generar información acerca de la distribución estadística de las infecciones del VEB y *H.pylori* mediante el uso de la técnica de qPCR para la detección de genes específicos, en pacientes diagnosticados con cáncer gástrico, durante los años 2016-2017 en el Instituto de Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN). La importancia de esta investigación radica en la necesidad de poder establecer las prevalencias de estos patógenos en poblaciones peruanas, ya que son considerados como posibles carcinogénicos por la Organización Mundial de la Salud. Por este motivo, se buscó analizar la relación que existe entre el cáncer gástrico, *H.pylori*, VEB y las variables epidemiológicas obtenidas mediante el uso de historias clínicas y encuestas que se realizaron a los pacientes. Para el desarrollo de este proyecto, se buscó lograr la participación de investigadores de diferentes campos como; oncólogos tanto clínicos como patólogos oncólogos y biólogos del INEN.

## **1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Es así que frente a la poca cantidad de datos y estadísticas generados en el Perú en relación al cáncer gástrico y su relación con VEB y *H. pylori*. Y siendo el cáncer gástrico la segunda neoplasia más común, y la primera causa de muerte asociada a cáncer. Se deriva la pregunta ¿Cuál es la relación de estos patógenos, el CG y existen diferencias en el desarrollo y prognosis frente a estos? Es así que múltiples mecanismos se han asociado de forma independiente al proceso de la carcinogénesis gástrica. Sin embargo, en la mayoría de los casos, consiste en un proceso multifactorial y a menudo se asocia con infecciones por virus y bacterias. Dos agentes infecciosos son asociados con el proceso de carcinogénesis gástrica: *VEB* y *H. pylori*, de los cuales, no se conoce con exactitud su prevalencia en la población de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico en el INEN.

## **1.2 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

El cáncer gástrico en el Perú es la primera causa de muerte por cáncer en Lima Metropolitana, siendo que el riesgo de desarrollar la enfermedad se relaciona a factores diversos tanto dietéticos, tabaquismo e infecciones por *H.pylori* y el virus de Epstein-Barr. Adicionalmente poblaciones sin agua potable o de mala calidad tienden a tener un mayor riesgo de desarrollo de esta enfermedad. (Pilco, P. y col.2006)

Los patógenos *H. pylori* y el VEB han sido reconocidos como agentes carcinogénicos pertenecientes al grupo 1 (Agentes carcinogénicos en humanos) por la Organización Mundial de la Salud, los cuales presentan una evolución de la enfermedad distintiva. Por esta razón es necesario que se realicen investigaciones en esta área que permitan entender a mayor profundidad la relación entre las infecciones causadas por estos patógenos y el desarrollo del CG, permitiendo lograr una mejor prevención, pronóstico de la enfermedad y tratamientos específicos e individualizados.

## II. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar la prevalencia de los agentes infecciosos biológicos Virus de Epstein-Barr y de *H.pylori* por en pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico en el Instituto Nacional de enfermedades Neoplásicas (INEN).

### 2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Detectar un grupo de genes específicos de *H. pylori* mediante reacción de la cadena polimerasa en tiempo real (qPCR).
- Detectar el gen BNFR1 específico del VEB mediante reacción de la cadena polimerasa en tiempo real (qPCR).
- Determinar la incidencia de CG asociado a *H. pylori* y VEB.
- Describir las variables clínicas y epidemiológicas asociadas a *H. pylori* y VEB en pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico en el INEN.
- Analizar la sobrevida en pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma gástrico asociado a *H. pylori* y VEB.

## III. MARCO TEÓRICO

### 3.1 Cáncer gástrico

El CG, es una enfermedad compleja, para la cual se han propuesto diversos mecanismos de origen molecular, entre ellos, se ha propuesto que este se origina a partir de células madre derivadas de la médula ósea, o que se origina en las células de la mucosa del epitelio gástrico y en el cual influyen factores genéticos así como ambientales o de la dieta; factores extrínsecos, que son capaces de generar alteraciones genéticas y epigenéticas, es así que la evolución de un tejido normal hacia la malignidad implica varias etapas donde la primera de estas transformaciones es la displasia (alteración del tamaño, forma y organización de las células) la cual sin tratamiento puede derivar hacia la evolución de un carcinoma (Barboza y col., 1996 y Medina, H. 2010).

El CG es una enfermedad de varios pasos y multifactorial que generalmente involucra la progresión desde una mucosa normal por causa de la gastritis crónica (inflamación crónica de la mucosa gástrica), a una gastritis atrófica (pérdida de glándulas gástricas), y metaplasia intestinal (substitución del epitelio gástrico por epitelio intestinal) displasia (neoplasia intraepitelial) para finalizar en un carcinoma. Esta secuencia se conoce como la cascada multipasos de la carcinogénesis gástrica de Correa. (OMS).

La progresión del proceso carcinogénico es atribuida a diversos mecanismos, siendo los más importantes; inflamación crónica, proliferación celular excesiva y disminución de la secreción ácida. Sin embargo, no sólo puede ser explicado con variables independientes debido a que existe una marcada variación individual y ambientales (Lee y col., 2007). En el registro de cáncer de Lima Metropolitana: Incidencia y mortalidad 2010-2012, la ex -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 *H. pylori* (Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades del Ministerio de Salud del Perú, 2016).

### **3.2 Helicobacter pylori**

*H. pylori* es un bacilo Gram negativo, curvado y microaerófilo que se encuentra en la mucosa gástrica del estómago humano. En cuanto a sus características metabólicas se observa que estas no fermentan ni oxidan azúcares con excepción de la glucosa, son incapaces de hidrolizar gelatina, almidón caseína y tirosina, son rojo de metilo negativo y Voges-Proskauer negativos.

En cuanto a su morfología esta es, espiral y bajo condiciones óptimas desarrolla una forma de “S” con 1 a 3 giros. Aunque su desarrollo *in vitro* es menos espiral. Presenta unas dimensiones promedio de 0.5 a 1  $\mu\text{m}$  de ancho y de 3  $\mu\text{m}$  de largo. (Weeks y col., 2000). Tiene de 2 a 6 flagelos monopolares, los cuales son fundamentales para su movilidad, y los cuales están adaptados al medio ácido permitiéndole navegar a través de la mucosa gástrica, los cuales se encuentran protegidos dentro de una estructura lipídica, igual que la membrana externa, la cual aparentemente tiene por finalidad la de protegerlos de las secreciones ácidas del estómago. Existe gran variedad genética entre cepas de *H. pylori*, lo que le confiere diferencias en su potencial patogénico y carcinogénico. La mayoría de las cepas de *H. pylori*, expresan factores de colonización que afectan diferentes rutas de señalización del huésped. Además, cuenta con un número de adhesinas que permiten su adherencia al epitelio gástrico. Y aunque el proceso por el cual se da la adhesión no está totalmente dilucidado, esta es esencial para asegurar la colonización y supervivencia de la bacteria en el estómago (Wroblewski, Peek y col., 2013).

### **3.3 Factores de colonización**

*H. pylori* secreta un coctel de enzimas para asegurar su supervivencia, y dentro de estas la más abundante de todas es la ureasa, la cual representa aproximadamente un 5% del total de enzimas producidas. (Hu y Mobley, 1990). La principal función de esta enzima es la de neutralizar el ácido clorhídrico del estómago, ya que esta convierte urea gástrica en amonio, generando un ambiente que promueve su desarrollo y mantención a través del tiempo (Alarcón, Barquero, y *col.*, 2004). La ureasa se ubica en el citosol de la bacteria y en su superficie, aunque se estima que esta última podría 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 a ureG (Mobley, 1996). Otra de las enzimas importantes para el desarrollo bacteriano son las proteínas “hsp” (proteínas de choque térmico), las cuales se encuentran en la membrana de la bacteria, y participan como medios para el reconocimiento y adherencia bacteriana. Estas enzimas y su expresión son sensibles a la acidez del estómago, por lo que se considera que el rol de esas es vital en la interacción bacteriana con las células epiteliales gástricas (Ortiz y Coria, 2015).

### **3.4 Factores de virulencia**

*H. pylori* induce la formación de vacuolas en una gran variedad de células eucariotas mediante la secreción de la enzima denominada citotoxina vacuolizante (vacA). 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. Esta proteína es una de las principales toxinas de *H. pylori* y uno de los factores de virulencia asociados a los casos de enfermedades gástricas severas. Al interactuar con células epiteliales induce a la formación de vacuolas lo cual altera las funciones que ocurren en la vía endocítica, ya que facilita la liberación de hidrolasas al medio extracelular, lo que a su vez afecta la integridad del epitelio gástrico y la degradación de ligandos exógenos. Otra de sus funciones es la de unirse a la



membrana de las mitocondrias, afectando su polaridad y promoviendo la liberación del citocromo c, desencadenando una cascada pro-apoptótica de la caspasa III. (Leunk y col. 1988; Cover y col. 1992).

La citotoxina vacuolizante es codificada por el gen asociado a la vacuolización (*vacA*), el análisis de esta proteína indica que posee una señal amino terminal corta, la cual es clivada para permitir su paso a través de la membrana citoplasmática y una carboxiterminal de 45kDa que actúa como poro. Todas las cepas estudiadas de *H. pylori* presentan en su genoma el gen *vacA*; aunque se encuentran variaciones en la secuencia relacionada con su secreción alelos s1 y s2 los cuales se encuentran en el extremo 5' del gen y los alelos m1 y m2 en la región media del gen (Olaya, 2008).

Estudios realizados indican que la frecuencia de las úlceras pépticas está relacionado con la presencia de la variante s1 en los pacientes. (Somodevilla, 2012), De la misma forma cuando se evaluó el daño epitelial causado por infecciones de *H. pylori*, se encontró que este se correlaciona a la presencia de la variante m1 (Atherton, Peek y col., 1997) aunque ambas variantes presentan dificultades al interactuar con la línea celular Hela (derivado de una biopsia de tejido tumoral cervico-uterino de la paciente Henrietta Lacks), indicando que probablemente las distintas variantes de la toxina presenten diferentes dominios de unión (Cover, Tummuru y col., 1994)

El hallazgo del gen *cagA* se dio debido a la falta de congruencia entre la citotoxicidad y la presencia del gen *vacA*, y por lo tanto a su toxigenicidad. Una característica importante de esta enzima es que esta solo se encuentra en cepas aisladas de casos sintomáticos de infección bacteriana. En los países en vía de desarrollo la proporción de *cagA* positivos es mayor cuando se le compara a la proporción encontrada en países desarrollados (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 (y *col.* 1994).

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

### **3.5 Virus Epstein-Barr**

El VEB fue aislado en 1964, siendo así el primer virus causante de tumores en humanos, esto se logró a partir de la detección del virus en una línea celular derivada de un linfoma de Burkitt. El VEB es un herpes virus humano clasificado dentro de la subfamilia gammaherpesvirus y es el prototipo del género *Lymphocryptovirus*. Siguiendo la nomenclatura tradicional adoptada para los herpesvirus humanos, la designación formal de VEB es Herpes virus Humano 4 (HVH-4). (Beltramino, M. y col 2005)

El VEB se encuentra clasificado como un ADN virus de doble cadena lineal, con una proteína central en forma de toroide que se encuentra envuelta por el material genético el cual tiene una extensión de 172 kb las cuales codifican 85 genes. El material genético se encuentra recubierto por una capsíde proteica y una envoltura vírica. Entre ambas estructuras se encuentra una membrana intermedia conocida como el tegumento, compuesto por aproximadamente 162 capsómeros. Esta envoltura presenta diversas glicoproteínas encargadas de regular y permitir el tropismo celular, el reconocimiento de los receptores y del hospedero. (Odumade, o. y col, 2011)

Los genes de VEB se dividen en dos grupos principales: genes líticos y genes latentes. A su vez estos se dividen en genes inmediatos y genes tardíos (IARC MONOGRAPHS – 100B)

Una vez que el virus logra ingresar al núcleo, el ADN debe enfrentar diversos factores antivirales intrínsecos. Entre los más importantes se encuentran los cuerpos nucleares PML o CN-PML (proteína leucemia promielocítica) también

referido como dominio nuclear 10 (ND10). Los CN-PML son agregados nucleoplasmáticos cuya composición principal se da por la PML, Sp100 (Proteína asociada a Cuerpo nuclear LMP) Daxx (Chaperona H3.3, encargada de la formación de la Heterocromatina) y ATRX (Proteína encargada de la formación del complejo Daxx-ATRX) (Huang, H. 2016 y K. Tsai, 20014). El tamaño y abundancia de estos agregados son inducidos por la acción de interferones y la sobreexpresión de estos es capaz de inducir la represión viral. El VEB debe contrarrestar este factor y una de las primeras medidas que toma está relacionada con las proteínas de tegumento, las cuales son ensambladas y enviadas junto con el virión infectivo. Estas proteínas se posicionan estratégicamente para contrarrestar las defensas intrínsecas y dar apoyo en las etapas tempranas de la infección.

De las proteínas tegumentarias, la más importante y abundante de todas es la proteína BNRF1, codificada por el gen homónimo. Siendo esta esencial para el establecimiento de la infección latente, aunque su función es principalmente desconocida.

VEB establece una infección latente preferentemente en los linfocitos B pero también es capaz de infectar a las células epiteliales. La infección primaria es una de las principales causas de la mononucleosis Infecciosa (IM); mientras que la infección latente está asociada a diferentes enfermedades como carcinomas nasofaríngeos, linfoma de Burkitt's y linfoma de Hodgkin. Más allá de eso también es responsable de la mayoría de enfermedades linfoproliferativas asociadas con SIDA e inmunosupresión que sigue al trasplante de órganos

La asociación entre el VEB y cáncer gástrico fue reportada inicialmente en 1990 por Burke y col. y desde entonces varios estudios reportaron que los casos de cáncer gástrico relacionado con el VEB componen aproximadamente el 10% del total de casos de CG a nivel mundial (Ushiku T y col. 2007). Se debe tomar en cuenta también que la distribución de los casos tiene una fuerte influencia regional, variando desde el 6.4% en China hasta el 19.5% en Alemania (Faghihloo, E. y col. 2014) y ha sido sugerido que los casos de CG relacionado

con VEB son una entidad clínico-patológica diferente a los casos clásicos, ya que ocurre a una edad más temprana, presenta una histopatología diferente y una localización más proximal. En estos tumores, el genoma del VEB está presente en casi todas las células y estas son monoclonales, sugiriendo que la infección toma lugar en una célula precursora del tumor. En estas células el virus se encuentra en un estado latente correspondiente a un intermedio entre los programas de latencia I y II, presentándose las proteínas EBNA-1, EBERs, BARF-0 Y LMP-2A en adición a esto, también se puede encontrar genes líticos como BARF-1 y BHRF-1. (IARC MONOGRAPHS – 100B) (Hausen, A. y col. 2000)

Se han detectado en humanos dos grupos principales de VEB: VEB-1 y VEB-2 (también conocidos como tipo A y B) los cuales difieren en los genes que codifican los antígenos nucleares (EBNA-2, EBNA-3A/3, EBNA-3B/4 y EBNA3C/6). VEB-2 es menos eficiente inmortalizando a las células B en cultivos *in vitro*, mientras que el VEB-1 presenta una menor viabilidad de la línea celular linfoblastoide.

## IV. ANTECEDENTES

### 4.1 Cáncer Gástrico

La primera descripción de CG es atribuida al alemán M. Verse que en el año 1903 publica "*Die Histogenese der Schleimhautcarcinome*", aunque el primero en emplear el término fue el francés Bayle en 1833 denominándolo "*Cáncer gástrico en su primera etapa*". La incidencia de CG varía notablemente de acuerdo a la región geográfica, y la mortandad asociada a este tipo de cáncer.

De esta manera en Asia se encuentran 3/4 de los casos mundiales de CG mientras que solamente China representa 2/5 del total de casos. En el caso de América Latina y el Caribe, estos representan el 6.4 % de los casos totales de CG a nivel mundial (aproximadamente 960 mil casos nuevos en el año 2012). (World cancer report, 2014. Steward. B & Wild. C). En el Perú, el CG es el de mayor incidencia entre hombres y es el tercero mayor entre mujeres. Por el lado de Lima según estadísticas del año 2012, el CG es el segundo de mayor frecuencia entre hombres y el tercero entre mujeres. Representando así el 7.9% de todas neoplasias (Registro de cáncer de Lima Metropolitana, Payet, M. 2016)

Aproximadamente el 90% de casos de CG son pertenecen a la variante adenocarcinomas.(Espejo & Navarrete, 2003) Este se 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; y factores extrínsecos, que son capaces de generar mutaciones genéticas, siendo reconocidas como lesiones pre malignas, entre ellas, la displasia, los adenomas y más comúnmente la gastritis (Barboza y col., 1996). A pesar de esto, el CG es altamente heterogéneo en cuanto a sus patrones de crecimiento, diferenciación celular, histogénesis y patogenia molecular. Actualmente la Organización Mundial de la Salud (WHO) reconoce cinco tipos de CG: (i) tubular,

(ii) papilar, (iii) mucinosos poco cohesionados; y (iv) mixtos. (Lordick, f. y col. 2014)

Según la clasificación de Lauren (1965) existen dos grupos principales de CG, siendo estos el (i) tipo intestinal y (ii) tipo difuso (de la clasificación de Lauren el cáncer de tipo intestinal y tipo difuso se corresponden aproximadamente a los tipos tubular y papilar respectivamente). Ambos con características patológicas y moleculares diferentes. El adenocarcinoma de tipo intestinal tiene una mayor prevalencia en pacientes de edad avanzada con historial de gastritis crónica, seguido por una progresión de metaplasia intestinal, displasia y finalmente CG. Por otro lado, el CG de tipo difuso es más común en personas jóvenes y su patogenia no se ha esclarecido del todo. (Lauren. P, 1993)

Debido a que el diagnóstico de la enfermedad, generalmente es realizado en estadios tardíos, la cirugía es el único tratamiento curativo del CG. El pronóstico de esta enfermedad está afectado por dos factores principales: (i) la profundidad de la penetración del cáncer primario en las paredes estomacales y (ii) 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).

## **4.2 Helicobacter pylori.**

*H. pylori* fue descubierto a inicios del año 1980 y reportado a la comunidad científica por Marshall y Warren en el año 1983. (Ramirez, A., Sanchez, 2008). Originalmente fue denominado como 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).

*H. pylori* es un bacilo Gram-negativo con forma de S o curvada 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 2.4 a 4µm de largo y de 0.5 a 1.0 µm de ancho. *H. pylori*, presenta una gran actividad de la enzima ureasa lo que le permite crear un ambiente alcalino dentro del estómago permitiéndole al organismo sobrevivir las acidas condiciones del estómago (Brown, L., 2000). Presenta 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 *H. pylori*, lo que le confiere diferencias en su potencial patogénico y carcinogénico. La mayoría de las cepas de *H. 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, permitiéndole desplegar los factores de virulencia. (Wroblewski, Peek y col., 2013).

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. Actualmente se estima que el 60% de la población mundial está infectada por *H. pylori* (Cave., 1997). Un reporte realizado en el pueblo joven Pampas del distrito de San Juan de Miraflores en Lima (Perú), indica una prevalencia de *H. pylori* en más del 80% de esta población de nivel socioeconómico bajo durante el período 2000-2002 (Soto y col., 2003).

El Consenso Latinoamericano sobre infección por *H. 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 a nivel mundial demuestran que la prevalencia de *H. pylori* es muy heterogénea tanto a nivel socioeconómico como etario. Así la prevalencia de la infección tiende a ser mayor en América central, América del sur ( $\approx$  20 años de edad: prevalencia del 30 % en Argentina hasta 70 % en México;  $\approx$  60 años: desde 70 % en Chile hasta 90 % in México) y Asia (en 1998 la prevalencia fue de 50% en  $\approx$ 20 años y 70 % a los  $\approx$  60 años). Y menor en países de Norteamérica y Europa. (Peleteiro, B. y col., 2014).

La infección de *H. pylori* tiende a agruparse en clústeres familiares, aunque, si la causa de esto es debido a la exposición conjunta a la misma fuente, o se da entre personas se desconoce. (Malaty, H., y col 2002). A pesar de la alta incidencia de la infección por *H. 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 *H. pylori* (Ramirez y col., 2005).

La erradicación de la infección de *H. pylori* es posible, disminuyendo de forma significativa el riesgo de desarrollar CG 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., 1989). 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.



### 4.3 Virus de Epstein-Barr

El VEB ha evolucionado junto con los humanos durante millones de años y esta asociación lo ha llevado a estar extremadamente adaptado a su hospedero, lo que lo convierte en uno de los parásitos humanos más efectivos (Macswen, K. Crawford, D. 2003).

En los años finales de la década de los 50' Denis Burkitt, describió un tipo común de cáncer en Uganda, debido a la distribución del Linfoma de Burkitt se hizo evidente que un virus podía ser el responsable de esta enfermedad. En el año 1964 Epstein, Achong y Barr, identificaron partículas parecidas al virus herpes en un cultivo celular derivado de una biopsia del Linfoma de Burkitt. (Young, L. S., Murray, G. 2003)

El VEB es un herpes virus humano de amplia distribución mundial, este se aloja principalmente en los linfocitos B, aunque también es capaz de infectar linfocitos T y células epiteliales. La exposición a este virus se da generalmente en los primeros años de vida y produce durante la vida del individuo una infección latente asintomática, así, afectando a más del 90% de los adultos en el mundo, los cuales mantienen una baja carga viral en los linfocitos B de memoria ( $1-50 \times 10^6$  células) (Hassan, R. y col., 2006).

Como todos los herpes virus, el VEB existe en un balance dinámico entre la fase lítica y la fase latente. Al ingresar al núcleo, los virus enfrentan varias resistencias antivirales que restringen la expresión y replicación de genes virales. Una prominente estructura antiviral involucrada es el cuerpo nuclear PML (CN-PML), la cual es susceptible a la acción de interferones llevando así a su sobreexpresión y a la represión de la infección viral. El programa de expresión genética asociado a la immortalización de las células B se denomina latencia. Existen 3 programas de latencia (Latencia I, II y III) cada uno caracterizado por un diferente tipo de expresión proteica. Inicialmente el virus entrara en la fase III (linfocitos B inmaduros) el cual se caracteriza por la presencia de los seis antígenos nucleares (EBNAs) y 3 proteínas de membrana (LMPs) junto con ARN

no codificantes (EBERs y miRNAs) esta fase permite la sobrevivencia del virus dentro de las células infectadas en forma de episoma la presencia de las proteínas virales induce el cambio de linfocito B inmaduro a blasto proliferativo (conocido como activación de células B). eventualmente el virus restringe la expresión proteica lo cual hace que este ingrese en la fase de latencia II la cual induce el cambio de la célula B a linfocito B de memoria. Finalmente, el VEB ingresa en la fase de latencia I donde solo la proteína EBNA-1 y el ARN no codificante EBER son expresados. (Amon, W & Farrell, P. 2004)

La fase lítica del VEB es la que permite la creación y multiplicación del virus, dando origen a viriones infectivos. La forma en la que se el VEB ingresa a esta fase, no está del todo dilucidada, aunque modelos in vitro demostraron que la reactivación se da cuando los receptores del Linfocito B son activados. Sobre esta base es que se cree que la reactivación viral in vivo se da cuando los linfocitos B reaccionan a infecciones no relacionadas. (Amon, W & Farrell, P. 2004) (Odumade, O. y col. 2011)

Los herpes virus, incluido el VEB desarrollaron muchas medidas para combatir esta respuesta. Por parte de la célula infectada entre ellas se tienen a las proteínas del tegumento, las cuales se despliegan junto a los viriones infectivos y se posicionan de manera estratégica para contrarrestar las defensas antivirales, en las etapas tempranas de la infección. La más abundante de estas proteínas es la proteína de tegumento BNFR1, la cual es esencial para el establecimiento de la infección, a pesar de su importancia su función es mayormente desconocida. En estudios se demostró que VEB mutantes, carentes del gen BNFR1 si bien pueden reactivarse luego de la fase de latencia, y producir partículas virales normales, presentan cargas virales 20 veces menores que los VEB productores de esta proteína tegumentaria

El VEB se encuentra relacionado a varios tipos de tumores malignos, como el linfoma de Burkitt y Carcinoma Nasofaríngeo. En el año 1992 Shibata y Weiss, reportaron la presencia del virus en el 16 % de adenocarcinomas gástricos. Estudios subsecuentes demostraron que la presencia de este virus, varia en

proporción de país en país desde un 2% hasta 16% (Yoshiwara, E. y col. 2005). Las células del epitelio gástrico infectadas por VEB expresan genes virales de latencia como LMP1, LMP2A, EBNA1, EBER y BART que pueden producir metilación de promotores oncogénicos. Así mismo, las células del huésped inducen densas metilaciones para silenciar la mayoría de genes virales. Diferentes trabajos han descrito un alto grado de metilación, clasificándose como un fenotipo metilador de islas CpG (Matusaka, y col. 2014). Los linfocitos CD8+ juegan un rol activo en eliminar directamente las células tumorales y su presencia se asocia a un pronóstico favorable (Hu, M. y col. 2014 y Lee, HE. Y col. 2008). Los tumores gástricos asociados a infección con VEB, tienen una infiltración masiva por células T citotóxicas CD8+ (Kijima Y, y col. 2001, y Saiki, Y. y col. 1996). Strong y col., encontraron que las muestras con mayores niveles de transcritos de VEB, se asociaban con una mayor infiltración de células inmunes y expresión de genes relacionados a respuesta asociada a IFN- $\gamma$  (Strong, MJ. y col. 2013). Estudios recientes describen la presencia de subtipos de linfocitos intratumorales y su asociación con otras variables. Ma y col., encontraron asociación entre FoxP3+ y un pronóstico favorable (Ma, GF. y col., 2014). A diferencia del linfoma de Burkitt y del carcinoma nasofaríngeo, que son endémicos en África y el sudeste asiático, los casos de CG relacionados a VEB, se considera una enfermedad no endémica, distribuida alrededor de todo el mundo, aunque con diferencias regionales (Takada, K. 2000)

Histológicamente los adenocarcinomas gástricos relacionados al Virus Epstein-Barr. (VEBaCG) se caracterizan por ser uniformes, lo cual sugiere que derivan de una única célula infectada por VEB, con una marcada infiltración intra o peritumoral de células inmunes, en este estudio se clasificó a VEBaCG dentro de tres subtipos histológicos dependiendo de la respuesta celular inmune: (1) linfopitelioma-like carcinoma (LELC); (2) carcinoma with Chronn's disease like lymphoid reaction (CLR); y (3) adenocarcinoma convencional. (Cho, J. y col 2016)

#### **4.4 Relación entre *H. pylori*, y Virus Epstein-Barr y Cáncer Gástrico.**

La mayoría de los pacientes infectados por *H. pylori*, desarrollan lesiones no neoplásicas. Alrededor de 10% de los individuos infectados desarrollan úlceras peptídicas, sólo el 1-3% desarrollan adenocarcinoma gástrico y <0.1% desarrollan linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT) (Peek, y col., 2006). La relación entre la bacteria, gastritis crónica y CG ha sido ampliamente descrita en diversos estudios a nivel mundial. En 1975 se asoció la presencia de *H. pylori* con la inflamación de la mucosa gástrica y posteriormente en 1985 con la úlcera péptica, estableciendo de este modo una relación causal entre *H. Pylori* y las lesiones de la mucosa gástrica (Milne y col., 1995), con un riesgo para llegar a causar CG del 75%. Esto hace vital su detección temprana con la finalidad de dar tratamiento (Wroblewski y col., 2010).

Las infecciones por *H. pylori* llevan a menudo a una inflamación crónica, lo cual es un factor de riesgo conocido. El CG generalmente se inicia con un proceso inflamatorio asociado a la infección de *H. pylori*. Más recientemente el VEB también fue relacionado con CG aunque su relación con el proceso inflamatorio sigue pobremente estudiado. (Cardenas-Mongragon, M. y col. 2013). Una posible relación que se encontró en reportes de casos describe como las infecciones agudas pueden causar gastritis severas que a veces simulan linfomas. También se demostró que en pacientes con gastritis atrófica, se puede detectar ADN vírico en el 65.7% de los casos y existe una fuerte correlación entre la detección de VEB, la severidad de la inflamación y la atrofia de la mucosa. (Buzás, G. & Konderák J. 2015)

Aproximadamente el 10% de los casos de CG están infectados con VEB, siendo la prognosis de estos casos poco comprendida. El linfopitelioma parecido al carcinoma (LELC) es un subtipo especial de CG donde más del 90% de los casos son positivos para infección de VEB.

## V. MATERIALES Y METODOS

### 5.1 Lugar de Ejecución

El desarrollo de la investigación se llevó a cabo en el Departamento de Investigación y el Laboratorio de Biología Molecular de Banco de Tejidos Tumoraes del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) durante el año 2017.

### 5.2 Tipo y Diseño de la Investigación.

La presente investigación se realizó en laboratorio, buscando encontrar un vínculo estadístico entre las infecciones de los patógenos *H. pylori*, y VEB 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.

### 5.3 Ficha de Recolección de dato.

Se elaboró un formato de ficha de recolección de datos de los pacientes, donde además se incluyeron variables clínicas, patológicas y aquellas que resultaran relevantes para la realización del presente estudio, como lugar de nacimiento, lugar de residencia, edad, y antecedentes de enfermedad gástrica (ANEXOS N°2 y N°3). Cada paciente fue entrevistado personalmente durante su período de hospitalización.

## **5.4 Consentimiento Informado y Encuesta.**

El proyecto de investigación fue aprobado por el comité revisor de proyectos del INEN. Una vez aprobado (Código INEN15-10) el proyecto, junto con el consentimiento informado, fueron sometidos al Comité de Ética del INEN para su aprobación. De igual modo se elaboraron las encuestas que sirvieron para la recolección de información sobre domicilio actual, hábitos alimenticios y condiciones preexistentes de la enfermedad. (ANEXO N°1)

El procedimiento para incluir a un paciente en el estudio fue el siguiente: en primer lugar, al paciente se le entregó el consentimiento informado previo a su procedimiento quirúrgico, contando con la presencia de un familiar como testigo, es en este momento que se resolvieron las dudas y preguntas que este pudiera presentar. Es en este momento en el que se presentó una breve encuesta de aproximadamente 10 minutos de duración en el cual se recolectó la información del paciente.

## **5.5 Población**

Se seleccionó un grupo de 150 pacientes nuevos con diagnóstico de adenocarcinoma gástrico atendidos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas desde el mes de diciembre del 2016 hasta octubre 2017.

## **5.6 Criterio de inclusión.**

Se incluyeron en el estudio a pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico los cuales fueron sometidos a cirugía para resección del tumor. En el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) en el período comprendido entre diciembre del 2016 y octubre del 2017.

## **5.7 Criterio de exclusión**

Se excluyeron del estudio a pacientes con diagnóstico de neoplasias diferentes a adenocarcinoma gástrico, pacientes menores a 18 años, pacientes con historial de 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).

## **5.8 Análisis y procesamiento de datos.**

Se elaboró una base de datos con pacientes con diagnóstico de CG atendidos en el INEN, tras el inicio del proyecto. En la base de datos se incluyeron las variables clínicas, patológicas y todas aquellas necesarias para la realización del estudio. La base de datos se elaboró en programa Excel.

Los resultados obtenidos se incorporaron a una segunda base de datos, donde se relacionaron con las variables recogidas de cada paciente. Estas variables están relacionadas con un orden numérico en otra base de datos custodiada por el director del trabajo y que se destruirá una vez terminado el estudio. Para el análisis estadístico se utilizará el programa informático STATA 14.

El análisis de los datos incluyó:

- a) Descripción de la distribución y frecuencia de cada una de las variables.
- b) Estudio de la asociación de variables cualitativas dicotómicas mediante el test Chi-Cuadrado o exacta de Fisher.
- c) La comparación de las medias se realizará mediante el test t-student, previa comparación de supuestos.
- d) Finalmente se evaluará la relación entre la prevalencia de *H. pylori* y VEB, el desarrollo de CG y las variables clínico-patológicas mediante el modelo de regresión logística.

e) Toda evaluación estadística se realizará a un nivel de significación de 5% o nivel de confiabilidad de 95%.

## **5.9 Variables**

Las variables del presente estudio fueron obtenidas a partir de encuestas y revisión de las historias clínicas de cada paciente (anexo N°2). Se organizaron 7 variables obtenidas de las encuestas: procedencia, sexo, edad, lugar de abastecimiento de agua, tipo de consumo de agua, antecedentes de enfermedad gástrica e indicios de familiares con enfermedades gástricas. Por otro lado, se obtuvieron 13 variables clínicas obtenidas del historial hospitalario de cada paciente



## 5.10 Operacionalización de las variables

La definición operacional de las variables se define en el siguiente cuadro

Variable	Tipo Variable de	Escala de medición	Definición operacional	Registro
Genes constitutivos <i>H. pylori</i>	Cuantitativa Discreta	De razón	Genes constitutivos: Ureasa y Proteína de Shock Térmico (hspA)	Concentración ng/ml
Genes de virulencia <i>H. pylori</i>	Cuantitativa Discreta	De razón	Genes de virulencia: Gen A asociado a citotoxina y Gen de proteína vacuolizante	Concentración ng/ml
Gen asociado a VEB	Cuantitativa Discreta	De razón	Gen de la capsíde viral (RNFL1)	Concentración #copias ADN Vírico/ml
Estadio clínico de cáncer gástrico	Cualitativa Discreta	Ordinal	Tamaño y extensión del cáncer	I, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC, IV
Edad	Cuantitativa Discreta	De razón	Edad en años que tiene el paciente al momento del diagnóstico.	Va entre 18 a 90
Fecha diagnóstica de	Cuantitativa Discreta	De intervalo	En qué día, mes y año fue diagnosticado con cáncer de mama durante consulta con el oncólogo.	Día, mes y año
Subtipo histológico (Lauren)	Cualitativa	Nominal	El patrón histológico del cáncer gástrico	Intestinal, Difuso o Mixto
Grado histológico	Cualitativa	Ordinal		Bien diferenciado

			La descripción de un tumor que se basa en la forma como se ven las células y el tejido de un tumor al microscopio.	Medianamente diferenciado  Pobrementemente diferenciado
Lugar exacto del cáncer	Cualitativa	Nominal	Lugar donde se desarrolla inicialmente el cáncer	Antro, Cuerpo gástrico, Curvatura menor, Curvatura mayor, Fondo, Otros.
Fecha de cirugía	Cuantitativa Discreta	De intervalo	En qué día, mes y año se realizó la cirugía.	Día, mes y año
Tipo de cirugía	Cualitativa	Nominal	Cirugía realizada en la paciente.	Gastrectomía radical y parcial
Número de ganglios comprometidos	Cuantitativa Discreta	De razón	Número de ganglios linfáticos comprometidos encontrados en la cirugía.	Va de 0 a > 10
Grado de Miller y Payne (tumor y ganglios)	Cualitativa	Ordinal	Respuesta patológica del tumor y/o los ganglios al tratamiento.	Va de 1-5 (tumor) y de A-D (ganglio)
Infiltración linfovascular	Cualitativa, Dicotómica	Nominal	La afectación del espacio linfovascular.	Si  No
Fallecimiento	Cualitativa, Dicotómica	Nominal	Si la paciente ha fallecido o no, para el posterior análisis de sobrevida.	Si  No
Fecha de última visita o fallecimiento	Cuantitativa Discreta	De intervalo	En qué día, mes y año fue la última consulta o murió la paciente.	Día, mes y año

## **5.11 Muestreo**

### **5.11.1 Obtención de la muestra de Adenocarcinoma Gástrico.**

Las muestras fueron obtenidas partir de cirugías realizadas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas a pacientes que acuden con diagnóstico de adenocarcinoma gástrico.

El procedimiento para la toma de muestra se realizó de la siguiente manera: 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. El personal encargado del laboratorio llevó a sala de congelación 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. Los tubos se transportaron en nitrógeno líquido a fin de mantener las muestras en óptimas condiciones. Se registró el ingreso de cada muestra y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la 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, seguidos por un número el cual corresponde a la codificación interna asignada por el Banco de Tejidos Tumoraes del Departamento de Patología (ANEXO N° 4).

## **5.12 Procedimientos y análisis de datos**

### **5.12.1 Extracción de ADN de la muestra tumoral.**

Para la extracción del ADN genómico, las muestras fueron procesadas en homogeneizadores de plástico, libres de DNAasa y ARNasa. Se emplearon un total de 20mg de tejido conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , cortándolo en pequeñas piezas con la ayuda de bisturí estéril.

La digestión del tejido se realizó añadiendo 180  $\mu\text{L}$  de solución de digestión y 20  $\mu\text{L}$  de proteinasa K. La muestra fue homogenizada mediante el uso de un agitador vortex (Labnet International, Inc.), seguido de esto, las muestras fueron incubadas a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas, agitando cada 30 minutos para asegurar una digestión completa. Una vez obtenido el lisado, se procedió a continuar el protocolo de extracción con el kit comercial GeneJET Genomic DNA (Thermo Scientific, EE.UU).

Al lisado obtenido en la fase anterior, se agregó 20  $\mu\text{L}$  de una solución de ARNasa A y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posterior a esto se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de solución de lisis y 200  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto, esta solución fue finalmente homogenizada en vortex durante 15 segundos. Para la etapa de lavados se transfirió el contenido a una columna de purificación insertada en un tubo colector, se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de solución de lavado y esta columna fue centrifugada a 8000g durante 1 minuto, el colector fue descargado y remplazado por uno nuevo. Nuevamente a la columna se le agregaron 500  $\mu\text{L}$  de solución de lavado II, esta vez la muestra fue centrifugada a máxima velocidad durante 3 minutos, al cabo de los cuales el tubo colector, fue descargado y remplazado por uno nuevo.

Finalmente, la columna fue acoplada a un tubo nuevo y rotulado. Esta vez se añadió 45  $\mu\text{L}$  de solución de elución a la columna, y se dejó incubar durante 2 minutos, al finalizar el período de incubación, esta fue centrifugada 1 minuto a 8000g. Esta última etapa se repitió dos veces, para obtener el volumen final de 90  $\mu\text{L}$ . Las muestras obtenidas mediante este proceso fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la cuantificación y análisis.

### **5.12.2 Cuantificación de ácidos nucleicos.**

Para determinar la concentración y pureza de ADN que fue obtenido en las extracciones, se realizó la lectura fluorométrica mediante el fluorómetro Qubit (v2.0 Invitrogen by Life Technologies, EE.UU) a las longitudes de onda 260 y 280nm. La relación de las absorbancias obtenidas a 260nm y 280nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) da idea del grado de pureza de la preparación. Para ADN, con la relación  $A_{260}/A_{280} \approx 2.0$  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 $\mu\text{L}$ : 1 $\mu\text{L}$ . La preparación de los estándares para la calibración del equipo se realizó usando los reactivos *dsDNA HS Standard #1* y *dsDNA HS Standard #2*, provistos por el kit de cuantificación. Se preparó un tubo para cada estándar, conteniendo 190 $\mu\text{L}$  de solución de trabajo y 10 $\mu\text{L}$  del estándar. El equipo se estandarizo cada vez que se realizó una nueva lectura.

Las muestras fueron preparadas para la lectura colocando 199 $\mu\text{L}$  de solución de trabajo más 1 $\mu\text{L}$  de muestra de ADN. Finalmente se procedió a la lectura en el fluorómetro, obteniendo la cuantificación en  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ó  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . Para cuantificar los cebadores se siguió el mismo procedimiento, pero empleándose el reactivo Qubit de hebra simple (del inglés, *Single-Stranded -HS-*) *ssDNA Assay kit (Life Technologies)*.

### **5.12.3 PCR cuantitativa o a tiempo real (qPCR) mediante uso de SYBRgreen.**

Para las reacciones fue empleada la mezcla comercial FastStart Essential DNA Green Master (ROCHE). Las reacciones de PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) se realizaron en el Termociclador LightCycler® 96 Instrument (ROCHE®). Cada mezcla de reacción contuvo 2X FastStart Essential DNA Green Master (ROCHE) la cual fue estandarizada para trabajar con una concentración de 100mM del cebador sentido, 100mM del cebador anti sentido, 2µL 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 ( $T_m$ ) de cada uno de los cebadores.

Se emplearon cinco pares de cebadores específicos para *H. pylori* pertenecientes a 4 grupos de genes, 2 constitutivos y 2 de virulencia. Los genes de factores de colonización fueron:

**TABLA N°1:** Cebadores (sentido y anti sentido) utilizados para la detección de *H. pylori* y sus temperaturas de amplificación.

<b>Grupo</b>	<b>Gen</b>	<b>Cebador</b>	<b>Secuencia 5´-3´</b>	<b>Tm</b>
<b>Colonización</b>	<b>hspA</b>	<b>hspA R</b>	GCTATCTGAAAATTTGATTTCTTTTGC	62-59
		<b>hspA F</b>	TGCGCTATAGTTGTGTGCGC	
	<b>urea</b>	<b>ureA R</b>	TTGTCTGCTTGCTATCAACC	55-58
		<b>ureA F</b>	GAGAATGAGATGAAACTCACCC	
<b>Virulencia</b>	<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	

La tabla muestra los genes con sus respectivos cebadores y los segmentos de las secuencias sentido y anti sentido utilizadas para detectar a *H. pylori*. Además de la Temperatura de fusión (Tm, del inglés Melting temperatura) de cada cebador.

Las condiciones de reacción se dividieron en cuatro etapas programadas en el termociclador.

**TABLA N°2:** Condiciones empleadas para la detección de H.pylori mediante qPCR

<b>H. pylori programas</b>	<b>Temp (°C)</b>	<b>Tiempo (seg)</b>
Pre incubación	95	600
3 pasos de amplificación (45 ciclos)	95	15
	*	<b>15</b>
	72	20
Melting (1 ciclo)	95	10
	65	60
	97	1
Cooling (1 Ciclo)	40	30

*\*variable dependiente del primer usado.*

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 ( $T_m$  (50mN 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 negativo, 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 de la cepa 706557 de *H.pylori* de ATCC.

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

Los resultados de la PCR fueron visualizados en el Software LightCycler® 96 Instrument Manager versión SW 1.1 de 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. Los resultados de las muestras procesadas en el PCR en tiempo real se transfirieron y organizaron en hojas de cálculo de 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 nano gramos (ng) y luego se transformaron a pico gramos (pg.). Los datos se clasificaron por gen, por paciente y por tipo de muestra.

#### **5.12.4 PCR cuantitativa o a tiempo real (qPCR) mediante sondas TaqMan**

Las reacciones de qPCR mediante sondas TAQMAN se realizaron mediante la mezcla comercial Genesig Advanced kit. (Primerdesing Ltd.). Las reacciones se estandarizaron para trabajar con una de una concentración de 50ng/μl de ADN.

Las condiciones de reacción se dividieron en 2 etapas programadas en el termociclador.

**TABLA N°3** Condiciones empleadas para la detección del VEB mediante qPCR

<b>VEB programa</b>	<b>Temp (°C)</b>	<b>Tiempo (seg)</b>
(1) Pre incubación	95	120
(2) 2 pasos de amplificación (50 ciclos)	95	10
	<b>60</b>	<b>60</b>

La detección de la señal se realizó al finalizar el paso de hibridación elongación de la reacción, basándose en el principio TAQMAN el cual consiste en sondas de hidrólisis para incrementar la especificidad de la PCR cuantitativa. Esto se logra por la actividad de la exonucleasa 5' - 3' de la taq polimerasa en escindir una sonda marcada ya hibridada a una secuencia blanco. Esta escisión permite la emisión de fluorescencia permitiendo obtener de manera cuantitativa la acumulación del producto. Todas las reacciones incluyeron un control negativo, donde la muestra se sustituyó por agua. Para garantizar la funcionabilidad de los cebadores se realizaron pruebas de estandarización (Anexo N°5). Como control positivo se empleó ADN genómico de VEB provisto en el kit comercial.

Las curvas estándar para cada pareja de cebadores se realizaron empleando el control positivo de ADNg VEB. Para ello se realizaron 06 diluciones sucesivas del control positivo partiendo de una concentración inicial de 25ng de molde de DNA. Se prepararon las reacciones de qPCR con el molde de ADN de cada dilución por duplicado. Los resultados de la PCR fueron visualizados en el Software LightCycler® 96 Instrument Manager versión SW 1.1 de 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 06 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). Los resultados de las muestras procesadas en el PCR en tiempo real se transfirieron y organizaron en hojas de cálculo de Excel. Se despejó la ecuación para el gen obtenido a partir de 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 número de copias por  $\mu\text{L}$ . Los datos se clasificaron, por paciente y por tipo de muestra.

## VI. ASPECTO ÉTICO

### 6.1 Consideraciones éticas.

- **Consentimiento Informado;** los pacientes y en caso de necesario también sus familiares, serán informados en forma clara y precisa sobre el estudio del que serán partícipes, así como de los riesgos y beneficios de la donación voluntaria de una muestra de tejido. (Anexo N° 4)
- **Voluntariedad;** para respetar la autonomía de los participantes, enfatizaremos que la participación será completamente voluntaria. Ellos pueden retirarse del estudio en cualquier momento, esta decisión no estará condicionada a la atención médica que se le brindará.

## VII. FINANCIAMIENTO

Financiado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, en el marco del proyecto “Círculo para la Investigación de Agentes Infecciosos Endémicos causantes de Cáncer en el Perú” con código Proyecto de financiamiento: 204-2015 – FONDECYT otorgado al Departamento de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) mediante la convocatoria: “Círculos de investigación y tecnología” 2015 – I.

## VIII. RESULTADOS

### 8.1 Resultados Sociodemográficos

**TABLA N°4:** Variables sociodemográficas de la población en estudio

<b>Variables Sociodemográficas</b>	<b>Casos=150</b>	<b>Porcentajes</b>
<b>Sexo</b>		
Hombre	77	51.3%
Mujer	73	48.7%
<b>Edad</b>		
Mediana (rango) años	65 (27-89)	
Hasta 65 años	74	49.3%
Mayor a 65 años	76	50.7%

Variables sociodemográficas de la población estudiada

El presente estudio incluyó un total de 150 pacientes (n=150) con diagnóstico de adenocarcinoma gástrico, los cuales fueron sometidos a procedimientos quirúrgicos para la resección de los tumores en el período comprendido entre el 04/2015 al 09/2016

Como se puede observar en la Tabla N° 4 del total de los casos, el 48.7% (n=73) fueron mujeres y el 51.3% (n=77) hombres. La edad media de la población del estudio es de 65 años (rango de 27-89). Siendo que los participantes del estudio se dividieron en pacientes hasta 65 años de edad 49.3 % y mayores de 65 años, 50.7%. En este caso no se observa una diferencia estadísticamente significativa cuando se comparan a ambos grupos etarios.

Del total de pacientes que se incluyeron en el estudio el 56% de estos procede de la provincia de Lima y el 44% procede del resto del país, siendo las regiones

con mayor representación dentro del estudio, las regiones de Cajamarca (6%), Huánuco (6%) y Junín (5.3%). Cuando se observaron los resultados en la región de Lima, la mayor incidencia de casos de adenocarcinoma gástrico tratados en el INEN, se dieron en el sector de Lima Sur (20.7%) siendo mucho mayor que el resto de regiones y donde se evidencia que las siguientes en porcentajes son, Lima Centro, (10.7%); Lima Norte (9.3%); Lima Este (7.3%); y Callao (4%).

**TABLA N°5:** Distribución geográfica de la población estudiada, tanto a nivel nacional como su distribución a nivel de lima metropolitana

<b>Variables Sociodemográficas</b>	<b>Casos=150</b>	<b>Porcentajes</b>
Lima	84	56.0%
Cajamarca	9	6.0%
Huánuco	9	6.0%
Junín	8	5.3%
Ancash	6	4.0%
Ica	5	3.3%
Piura	5	3.3%
San Martín	5	3.3%
La Libertad	4	2.7%
Lambayeque	3	2.0%
Apurímac	2	1.3%
Ayacucho	2	1.3%
Huancavelica	2	1.3%
Loreto	2	1.3%
Arequipa	1	0.7%
Madre de Dios	1	0.7%
Ucayali	1	0.7%
Extranjero	1	0.7%
<b>Distrito Lima Procedencia</b>		
San Juan de Lurigancho	10	6.7%
Callao	6	4.0%
Lima Provincias	6	4.0%
El Agustino	5	3.3%
Chorrillos	4	2.7%
Puente Piedra	4	2.7%
Villa el Salvador	4	2.7%
Villa María del Triunfo	4	2.7%
Cercado	3	2.0%
Comas	3	2.0%

Lurín	3	2.0%
Pachacamac	3	2.0%
Rímac	3	2.0%
San Juan de Miraflores	3	2.0%
San Martín de Porres	3	2.0%
Santa Anita	3	2.0%
Independencia	2	1.3%
Los Olivos	2	1.3%
San Borja	2	1.3%
San Isidro	2	1.3%
Santiago de Surco	2	1.3%
Ate	1	0.7%
Chaclacayo	1	0.7%
La Molina	1	0.7%
La Victoria	1	0.7%
Miraflores	1	0.7%
Pueblo Libre	1	0.7%
San Miguel	1	0.7%
Provincia	66	44.0%
<b>Sector Lima procedencia</b>		
Lima SUR	31	20.7%
Lima CENTRO	16	10.7%
Lima NORTE	14	9.3%
Lima ESTE	11	7.3%
CALLAO	6	4.0%
Provincia	72	48.0%

Lugar de procedencia de los pacientes que componen la población estudiada

Cuando se analizó la distribución geográfica de la población estudiada se obtuvieron los datos que componen la tabla N°5, en la cual se observa que el 85.3% de la población declaró haber permanecido en el lugar actual de vivienda por 10 años a más, mientras que el 5.3 % de estos declaró haber residido en el mismo lugar por 5-10 años y el 6.7% declaró que el tiempo de residencia fue menor a 5 años.

En la tabla N°6 se observa el tipo de abastecimiento de agua potable y su forma de consumo se encontró que el 76.7% de los pacientes respondieron que tienen acceso a agua potable, mientras que el 23.3% indicó que tienen acceso a otros



tipos de aguas para consumo (pozo, cisterna, río y otros). En el caso de la forma en la que los pacientes consumieron el agua el 75.3% indicó que esta fue previamente hervida. Mientras que el 24.7% restante indicó otros tipos de consumo (agua filtrada, agua sin filtrar, agua cruda y agua embotellada).

**TABLA N°6:** Período de habitación de vivienda actual, y tipos de consumo de agua de la población en estudio

<b>Variables Sociodemográficas</b>	<b>Casos=150</b>	<b>Porcentajes</b>
<b>Antigüedad procedencia</b>		
< 5 años	10	6.7%
5-10 años	8	5.3%
>10 años	128	85.3%
NSR	4	2.7%
<b>Abastecimiento de agua</b>		
Potable	115	76.7%
Pozo	16	10.7%
Cisterna	6	4.0%
Río	6	4.0%
Otros	3	2.0%
NSR	4	2.7%
<b>Forma de consumo de agua</b>		
Agua hervida	113	75.3%
Agua doméstica c/filtro	12	8.0%
Agua doméstica s/filtro	9	6.0%
Agua cruda	6	4.0%
Embotellada	6	4.0%
NSR	4	2.7%

Variabes socioeconómicas de la población

Se encontró que la mayoría (50%) de los pacientes reportó no haber presentado síntomas previos al diagnóstico de la enfermedad. El 28.7% indicó solo haber padecido de gastritis, un 9.3% Plicatura gástrica pilórica (PGP), un 7.3% úlceras y un 3% otros tipos de antecedentes gastrointestinales.

## **8.2 Resultados Patológicos**

El tipo de cirugías a las que se sometió a los pacientes fue mayormente una gastrectomía subtotal distal radical, la cual fue realizada al 62.5% de la población de estudio, seguido de gastrectomía total (27.3%), gastrectomía total radical (5.3%) y gastrectomía subtotal (4.7%). Estos datos se encuentran resumidos en la tabla N° 7

Cuando se evaluó los diferentes subtipos histológicos se evidenció que la mayoría caen dentro de la clasificación de adenocarcinoma tipo intestinal (29.3%), mientras que los tipos mixto, difuso indiferenciado y otros varían entre el 16.7% y el 0.7%, respectivamente. Cuando se evaluó según la clasificación recomendada por la OMS se evidenció que los tipos predominantes de subtipos histológicos pertenecen a los tipos tubular y pobremente cohesivo con un 42.7% y 32.7% respectivamente, sumando entre ambos más del 70% de los casos. Se evaluó el grado histológico de la población de estudio, mediante el cual se indica que tan diferentes son las células neoplásicas frente a las células de la mucosa gástrica de la que se originaron, indicando que tan agresivo es el CG. El grado histológico predominante fue G3 con 34% de los casos, mientras que los grados G1 y G2 representan el 12.7%; y 26.7%, respectivamente. Se encontró que el 68.7 % de los pacientes presentaron invasión vascular y linfática.

**TABLA N°7: Variables clínicas de la población.**

<b>Variables clínicas</b>	<b>Casos=150</b>	<b>Porcentajes</b>
<b>Tipo cirugía</b>		
Gastrectomía subtotal	7	4.70%
Gastrectomía subtotal distal radical	94	62.70%
Gastrectomía total	41	27.30%
Gastrectomía total radical	8	5.30%
<b>Antecedentes gastrointestinales del paciente</b>		
No	75	50.00%
Solo gastritis	43	28.70%
PGP	14	9.30%
Úlceras	11	7.30%
Otros	3	2.00%
NSR	4	2.70%
<b>Subtipo histológico</b>		
NSR	25	16.70%
Intestinal	52	34.70%
Mixto	16	10.70%
Difuso	45	30.00%
Otro	11	7.30%
Indiferenciado	1	0.70%
<b>Subtipo histológico WHO</b>		
Adenocarcinoma tubular	64	42.70%
Adenocarcinoma pobremente cohesivo (incluye células de anillo y otras variantes)	49	32.70%
Adenocarcinoma mixto	23	15.30%
Adenocarcinoma mucinoso	7	4.70%
Otros	7	4.70%
<b>Invasión Vascular Sanguínea y Linfática</b>		
Sí	103	68.70%
No	41	27.30%
Indeterminado	5	3.30%
NSR	1	0.70%

Variables histopatológicas de la población estudiada

### **8.3 Determinación de *H.pylori* y VEB**

La prevalencia de *H.pylori* fue determinada en la población de estudio, mediante análisis de los genes *ureA/hspA* por qPCR (Anexo N°6), siendo un resultado positivo cuando ambos o al menos uno de los dos genes fuera positivo. Un resultado negativo en ambos genes, indicaba la ausencia completa del patógeno en los tejidos analizados (Tabla N°8). Según los resultados obtenidos, en el 87.3% (n=131/150) de la población estudiada se detectó *H. pylori*. Cuando se evaluaron las concentraciones del gen *ureA* en las muestras estudiadas se observó que esta fue menor a medida que se aproximaba a la región tumoral, así se tiene que en la región de tejido sano distal al tumor, el 62.8% de los casos dieron positivo con una concentración promedio de 703.58 pg. y una desviación estándar de  $\pm 245.47$ pg, en la región de tejido sano proximal al tumor, el 59% de los casos dieron positivo con una concentración promedio de 539.69 pg. y una desviación estándar de  $\pm 121.32$ pg (Anexo N°7 y 8). Finalmente la región tumoral, donde la concentración fue menor, solo el 49.7% de los casos dieron positivo con una concentración promedio de 296.32 pg. y una desviación estándar de  $\pm 164.98$ pg.

De la misma forma se evaluaron las concentraciones del gen *hspA*, y al igual que en el caso del gen *ureA*, la concentración fue decreciendo a medida que se acercaba a la región tumoral, así se tiene que en la región de tejido sano distal al tumor el 73.8% de los casos dieron positivo con una concentración promedio de 42.77 pg. y una desviación estándar de  $\pm 10.17$ pg, en la región de tejido sano proximal al tumor el 71% de los casos dieron positivo con una concentración promedio de 31.9pg y una desviación estándar de  $\pm 8.64$ pg. Finalmente la región tumoral, donde la concentración fue menor, el 70.5% de los casos dieron positivo con una concentración promedio de 4.6pg y una desviación estándar de  $\pm 1.33$ pg

La prevalencia de VEB fue determinada mediante la detección del gen *RFNL1* por qPCR (Anexo N° 9 y 10). Se definió un rango de detección para determinar la población positiva, siendo las concentraciones  $<10$  copias/ul consideradas resultados negativos (tabla N° 8). Los casos positivos representaron el 10% de la población total ( $p<.003$ ) (n=15/150), definiendo a su vez dos grupos de

positivos: baja carga viral <100 copias/μl; y alta carga viral >100 copias/μl. Así se determinó que los casos de alta carga viral (>100copias/μl) representaron el 40% del total de casos positivos (n=6/15). (ANEXO N° 10)

La carga viral en las muestras de tejido tumoral fue mayores que en los tejidos proximales y distales dándose esta condición en el 53% de los pacientes con resultados positivos mostrando una mayor carga viral (13.02 ± 1396 copias/μL).

**TABLA N°8:** Resultados de la prueba de qPCR

<b>Prevalencia <i>H. pylori</i></b>	<b>Casos=150</b>	<b>Porcentajes</b>
Negativo	19	12.7%
Positivo	131	87.3%
<b>Prevalencia VEB</b>	<b>Casos=150</b>	<b>Porcentajes</b>
Negativo	135	90.0%
Positivo	15	10.0%

Tabla resumen de resultados de la detección de los patógenos en la población estudiada

Cuando se evaluó el porcentaje de coinfección por ambos patógenos fue en la población estudiada se descubrió que el 7.3% (n=11/150) de los casos dieron positivos para ambos patógenos (*H. pylori* + VEB +).

La determinación de las concentraciones de ADN de ambos patógenos permitió definir cuatro grupos en la población estudiada (tabla N° 9): *H. pylori* + VEB + (n=11/150), *H. pylori* + VEB - (n=120/150), *H. pylori* - VEB + (n=4/150) y *H. pylori* - VEB - (n=15/150).

**TABLA N°9:** División en subgrupos dependiendo de las características relacionadas a la presencia/ausencia de VEB y *H. pylori*

Grupos Evaluados	Edad Media	Estadio III y IV	Grado Histológico II	Subtipo Histológico Intestinal - Mixto
<i>H. pylori</i> + VEB +	67	75%	50%	66.6
<i>H. pylori</i> + VEB -	66	69.50%	28.80%	56.6
<i>H. pylori</i> - VEB +	67	72.70%	50%	100
<i>H. pylori</i> - VEB -	66	62.10%	43.30%	62.1

Para estos grupos se determinaron las edades medias (67, 66, 67,66) siendo que para este parámetro no existe diferencia significativa entre las edades de los pacientes y los grupos seleccionados previamente.

Cuando se evalúa el estadio clínico, se evidencia que los estadios III y IV fueron los más frecuentes (75%, 69.5%, 72.7% y 62.1%), observándose también que tuvo un mayor grado de incidencia en los grupos positivos para VEB independientemente del resultado presentado para *H. pylori*. De la misma forma cuando se evaluaron los grados histológicos el más frecuente dentro de los grupos evaluados el más frecuente fue el GII (50%, 28.8%, 50% y 43.3%) donde nuevamente, este tuvo una mayor prevalencia dentro de los grupos positivos para VEB independientemente del resultado para *H. pylori*.

Finalmente el último parámetro evaluado fue el de subtipo histológico intestinal-mixto el cual mostro una prevalencia mayor dentro de los grupos VEB positivos (66.6%, 56.6%, 100% y 62.1%), respetivamente.

Finalmente, se analizó la posible influencia de la presencia de los patógenos y su relación con la tasa de sobrevida de los pacientes para lo que se usó el estimado de la tasa de sobrevida a un año y un seguimiento posterior a 24 meses.

Los resultados de la evaluación de la sobrevida indican, que los pacientes de los grupos VEB + tienen una sobrevida menor frente a los grupos VEB - (38.3% vs

72.3%)  $p=0.033$ , cuando se realizó el seguimiento posterior la tendencia siguió mostrándose igual, ya que la sobrevida en los grupos VEB + (*H. pylori* + VEB + y *H. pylori* – VEB+) fue menor que en los grupos donde el resultado para la detección del VEB fue negativa. [45.5% (*H. pylori*+ VEB+) y 25% (*H. pylori*- VEB+)] frente a [73.1% (*H. pylori*+ VEB-) y 61.5% (*H. pylori*- VEB-)].

**TABLA N°10:** Porcentaje de casos que componen las categorías establecidas en la tabla N°10

Grupos <i>H. pylori</i> y VEB	Casos=150	Porcentajes
<i>H. pylori</i> (+) VEB(+)	11	7.3%
<i>H. pylori</i> (+) VEB(-)	120	80%
<i>H. pylori</i> (-) VEB(+)	4	2.7%
<i>H. pylori</i> (-) VEB(-)	15	10%

Tabla resumen de los subgrupos que componen la población de estudio

## IX. DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizó la prevalencia de la bacteria *Helicobacter pylori* y del Virus Epstein-Barr en una población de 150 pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma gástrico (CG) en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas del Perú (INEN) durante los años 2015 y 2017

A pesar de que el gold standard para la detección de infecciones por *H. pylori* es el método de tinción HE (Tinción hematoxilina – eosina), estudios como el realizado por He, Q. y col. “*Real-Time Quantitative PCR for Detection of Helicobacter pylori*”, donde se evaluaron 100 biopsias tomadas a pacientes del centro médico de asuntos para veteranos a las cuales se les realizó análisis de detección de *H. pylori* por medio de qPCR. Lograron demostrar que la técnica de qPCR puede ser usada con un alto grado de confiabilidad para la detección de *H. pylori* en muestras de tejido congelado o fresco. Cabe indicar que en el estudio mencionado se refiere a que la metodología que mejores resultados dio cuando se buscó extraer y aislar el material genético fue el de proteínas k- fenol, el rendimiento y calidad de material genético no fue mucho mayor a los obtenidos mediante el uso de kits comerciales. Este estudio valida los resultados obtenidos mediante qPCR en el presente trabajo, demostrando que esta técnica es eficiente al momento de detectar la presencia de *H. pylori* a partir de tejidos congelados. (He, Q. y col 2002)

Los resultados del presente estudio son similares con las prevalencias reportadas previamente para *H.pylori* (Reporte del Consenso mundial de Kyoto, 2005) y con la documentación en países en vías de desarrollo (Reporte de la prevalencia de *H.pylori* en los países en desarrollo de la OMS, 2010), los cuales afirman que más del 50% de la población está infectado por *H. pylori*. Por otro lado, las evidencias apuntan a que las prevalencias registradas en el presente estudio se encuentran en concordancia con las registradas en estudios previos, en las que se estima que el total de casos de CG asociado a VEB son



aproximadamente entre el 2-18% (Uozaki, H. Fukuyama, M. 2008) de los casos totales, mientras que otros estudios estiman que aproximadamente entre el 10-16% de los casos de CG están influenciados por el VEB (Shibata, D. 1992).

Cuando se compara la prevalencia del 87.3% encontrada en este estudio con los datos que se obtuvieron en el estudio "*Comparación de la prevalencia de la infección de estómago por H. pylori en el Perú en población japonesa y peruana de Ramos, A. y col.*" en el que se evaluaron las prevalencias de la infección de *H.pylori* en dos poblaciones diferentes (206 personas de origen japonés y 168 peruanos), usando criterios de selección de la población diferentes al usado en el presente estudio como: ausencia de enfermedades gastrointestinales, ausencia de úlceras, dispepsia o CG y presentándose en ambos casos un promedio de edad similar (54.6 años vs 65% en el presente) y una distribución de sexo donde el 75 % de estas fueron mujeres y el 25% hombres. Los resultados indicaron que el promedio de tasa de infección por parte de este patógeno fue de aproximadamente 54%. A diferencia del presente estudio con un promedio de infección más acorde con la literatura a nivel mundial. Las diferencias de tasas de infección entre ambos estudios se podrían deber a las diferencias entre las poblaciones, donde en el estudio mencionado líneas arriba solo se incluyen pacientes sanos a diferencia del presente estudio, en el cual la población está conformada por pacientes portadores de CG (Ramos, A y col. 2005)

En Lima el último registro acerca de la relación de *H.pylori* y cáncer de estómago se realizó en el período de los años 2010-2012 por el Ministerio de Salud, no se mencionan tasas de prevalencia para esta relación, sin embargo se menciona a la bacteria como un factor de riesgo importante.

En el Perú, la prevalencia de la infección en el estómago por *H.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 col. en el 2008 y Ramírez-Ramos y col. en los años 2003 y 2006. En el 2002 un estudio realizado por Ramírez y col. en el

Hospital Peruano-japonés, detectó la presencia del gen ureasa en el 47.8% de los pacientes peruanos estudiados.

En otros países como en Taiwán, en estudios de seguimiento realizado por Hsu y col. en 2007, determinaron que al finalizar el período de tiempo evaluado (años), el 1.3% (n =1,225) de los pacientes infectados desarrollaron CG. De la misma forma en otro estudio en la población japonesa durante el 2010, Umura y col. observaron que el 2.9% (n = 1202) de los pacientes infectados desarrollaron cáncer gástrico al finalizar el estudio (años). En nuestro país, no se han establecido datos certeros sobre infecciones de *H.pylori* en pacientes con neoplasias gástricas ni se han llevado a cabo este tipo de estudios prospectivos. Siendo este un tema crucial ya que en trabajos como "*Estudio de la prueba de la ureasa o test de aliento (TA) y correlación con biopsia gástrica para la detección de H.pylori (Hp) en pacientes dispépticos del Hospital Nacional Cayetano Heredia – Lima*" (Aguilar, C. y col. 2007) se evaluaron a un total de 31 pacientes de los cuales el 84 % fueron mujeres y el 16 % hombres. En este estudio solo se tomó en cuenta pacientes con síntomas de enfermedades gastrológicas como dispepsia. Usando como metodología para la detección de *H. pylori* pruebas como Test del aliento, se determinó que el 75% de los pacientes fueron positivos, y a pesar de lo pequeño de la población evaluada, estos resultados son más cercanos a la proporción del presente estudio, y a aunque la detección por prueba de aliento no es una prueba confirmatoria, esta logró una sensibilidad del 96.6% lo que demuestra una buena correlación tanto con el método de histopatología, como con el de qPCR usado como métodos de confirmación. Y si se toma en cuenta que prevalencia que encontramos en nuestra población muestral fue de 87%, es de crucial importancia el desarrollo de estudios de evaluaciones prospectivas, para poder determinar la tasa de desarrollo de CG en poblaciones infectadas con *H.pylori* ya que esta constituye un gran factor de riesgo para la salud pública.

A pesar de la alta incidencia de la infección por *H. 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 llevado a cabo por Ramírez y col. 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 *H. pylori*. El 87% de personas entrevistadas en nuestro estudio tienen un consumo diario de agua potable (proveniente de la Atarjea. por lo que es probable la relación fuente de agua – infección como insinúa Ramírez en su estudio. Cabe añadir que el 76.7% de los pacientes entrevistados afirmaron que antes de consumir el agua potable, la hirvieron y solo el 4% la consumió periódicamente de forma directa.

Cuando se comparan los datos obtenidos en trabajos previos desarrollados en el Perú con trabajos realizados en países diferentes con una población similar a la nuestra, como es el caso de "*H.pylori in Hispanics: Comparison With Blacks and Whites of Similar Age and Socioeconomic Class*", de Malaty, HM. Y col. en el año 1992 en el cual la detección de *H. pylori* se da mediante la técnica de PCR convencional para la detección del gen ureaC, además de pruebas confirmatorias histológicas y microbiológicas. En este, se evaluaron a 108 pacientes de entre 19 a 75 años de ascendencia hispánica, en la cual los criterios de selección de la población fueron similar a estudios nacionales previos, es decir no se tomó en cuenta a las personas que presentaban problemas gastrointestinales, de los cuales el 68% fueron mujeres y el 32% hombres, en esta la frecuencia de *H. pylori* fue de un 55.6%.

Cuando se estratifico la población dependiendo de la procedencia de estos (Originarios de Estados Unidos, o inmigrantes), se encontró que la prevalencia en segundo grupo fue mayor, aunque no estadísticamente significativa. Como en todos los estudios contrastados, donde se eliminaron a pacientes con antecedentes gástricos, las tasas de infección fueron menores a las reportadas y aceptadas mundialmente. Estas diferencias podrían ser explicadas en parte a lo pequeño de algunas poblaciones estudiadas, o a que los grupos donde

teóricamente, la prevalencia de *H. pylori* es mucho mayor que la media. (Malaty, HM. Y col, 1992)

Finalmente en el estudio "*H.pylori infection and the development of gastric cancer*" (Emura, N. y col. 2002) se evaluó a la población de estudio durante 3 años (1526 pacientes de origen japonés) los cuales fueron seleccionados entre personas con enfermedades como gastritis activa, úlceras y pólipos hiperplásicos gástricos. (Las personas que sufren de CG, gastrectomías totales o parciales fueron excluidas). Y en donde el 56% fueron hombres y el 44% mujeres. Con un método de detección histopatológico. El porcentaje de la población estudiada que presentó infección por *H.pylori* fue del 82% y al igual que en el presente estudio no se evidenciaron diferencias significativas entre los diferentes grupos etarios y de género. A diferencia de los estudios anteriores, en este se tomó una población representativa, por lo que los resultados se encuentran en concordancia tanto con los valores internacionalmente aceptados, como con el presente estudio.

Al comparar la prevalencia de VEB en pacientes con CG del presente estudio, la cual se situó en un 10%, con datos obtenidos en un estudio realizado previamente en el Hospital Nacional Cayetano Heredia, en Lima (Perú), en el cual indican una prevalencia de VEB en el 3.9% (n= 254) de los casos analizados en el año 2005, por Yoshiwara y col. en el año 2005, se evidencia que los porcentajes de prevalencia descritos en el presente trabajo son mayores que en este, lo cual podría deberse a la fuente de procedencia de las muestras, dado que mientras el estudio de Yoshiwara y col., fue producto de muestras de endoscopias gástricas, el presente trabajo se realizó a partir de muestras provenientes de pacientes con diagnóstico de cáncer. Otra causa de esta diferencia, sería la forma de detección del patógeno, mientras que Yoshiwara y col. usan la técnica de hibridación *in situ*, en el presente estudio se utilizó la técnica qPCR, mediante el principio de TAQMAN. (Yoshiwara y col. 2005). De esta forma los valores reportados en el presente estudio tienen una mayor coherencia con los valores promedios mundiales los cuales indican que la

prevalencia a nivel mundial se encuentra entre un 2 y 16% (Murphy, G. y col). Con un promedio del 10 % (Nishikawa, J. y col.)

También es importante remarcar que la infección del VEB en pacientes con CG en el presente estudio frente a lo reportado en poblaciones alrededor del mundo con estudios como el de Ryan y col., el cual encontró que las poblaciones adultas presentan un 83% de prevalencia y 30% en juveniles, (Thompson MP, 2004).

En el presente estudio se encontró que la tasa de supervivencia de los pacientes con CG disminuye cuando estos dieron resultados positivos para la infección por el VEB, es así que la supervivencia media al año de la población que dio positivo para infección por VEB fue de un 38% frente al 72% en los casos negativos para la infección por VEB. Y estos resultados son diferentes a los reportados en estudios previos, en los cuales vinculan esta infección a una mejor prognosis de la enfermedad, donde no encontraron diferencias significativas entre los grupos VEB + y los grupos controles como lo reportado por Van Beek, J. y col. adicionalmente encontraron que el tiempo que los pacientes permanecían libres de la enfermedad era significativamente mayor que a las personas que dieron resultados negativos para el VEB, esto podría deberse a que a las diferencias poblacionales, donde estos estudios se realizan en poblaciones donde el CG se da en menores proporciones que en la peruana.

Existen pocos estudios realizados sobre la coinfección de poblaciones humanas por *H. pylori* y VEB, En el año 2014 Souza, C. y col., evaluaron la prevalencia por *H. pylori* y VEB en 226 pacientes, la detección de VEB fue dada mediante la técnica EBER-ISH, mientras que la detección de *H. pylori* fue por qPCR de el gen CagA, logrando determinar que la infección de *H. pylori* fue dependiente de la edad y del estado clínico-patológico de la población, es así que en el grupo <18 años la prevalencia de *H.pylori* fue del 58.5%; <18 años 69.2%; y pacientes con diagnóstico de CG 88%. Este último siendo un resultado similar al nuestro. Cuando evaluaron la prevalencia de VEB en los mismos grupos encontraron que estas siguieron el mismo patrón que *H. pylori*, es decir en pacientes menores a 18 años la prevalencia fue 3,8% la menor de todas, en pacientes con 18 años a más, de 5.1% y en pacientes diagnosticados con CG fue del 9.6% valor similar

al reportado en el presente estudio. Finalmente se indica que no se encontró asociación estadísticamente significativa entre las infecciones de *H.pylori* y VEB. La relación entre estos patógenos ha sido estudiada y mientras la relación entre la bacteria, gastritis crónica y cáncer gástrico ha sido ampliamente descrita en diversos estudios a nivel mundial, el caso de la presencia de VEB en el epitelio gástrico se encuentra en fases iniciales de investigación y entendimiento.

Motivo por el cual actualmente no se tienen consensos sobre la influencia del virus y la prognosis de esta enfermedad. Así desde 1975 se asoció la presencia de *H.pylori* con la inflamación de la mucosa gástrica y posteriormente en 1985 con la ulcera péptica, estableciendo de este modo una relación causal entre *H.pylori* y las lesiones de la mucosa gástrica por Milne y col. (1995), con un riesgo para llegar a causar cáncer gástrico del 75%.

Mientras que el caso de VEB desde los años 90 se busca establecer el rol que cumple este virus dentro de la cascada de reacciones que dan lugar al CG con resultados alentadores, aunque dispares entre sí, como lo demuestran los resultados de este estudio el cual indica una menor supervivencia de pacientes VEB + frente a estudios que indican lo contrario.

## X. CONCLUSIONES

No existe diferencia significativa entre las sobrevidas observada entre los diferentes grupos etarios evaluados dentro del presente estudio.

Los hombres registraron una ligera mayoría en cuanto a ocurrencia de adenocarcinoma gástrico, además que la sobrevida entre ambos grupos varió significativamente y existió una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.003$ ).

La procedencia de los pacientes, los cuales en su mayoría son habitantes de las periferias de Lima (Cono Norte, Sur y Este), indica que esta enfermedad está fuertemente relacionada a los índices de salubridad y hábitos de poblaciones económicamente menos favorecidas.

No se encontró asociación entre la presencia de *H.pylori* como agente relacionado al CG con la sobrevida de los pacientes de la población de estudio, siendo que si bien la presencia de esta influye mucho en el desarrollo de la enfermedad, no así tanto en el desenlace de la misma , evidenciándose que los pacientes tienen mayor esperanza de vida.

La presencia del Virus de Epstein-Barr, como agente asociado al CG influye fuertemente en la sobrevida de los pacientes diagnosticados independientemente de *H. pylori*.

El virus de Epstein-Barr, está relacionado a una menor sobrevida a un año en los pacientes que dieron positivo para esta infección

La técnica de detección de *H. pylori* mediante qPCR tiene un nivel de concordancia del 72.97% con la evaluación por HE dando valides al estudio realizado ( $p=0.001$ )

## XI. RECOMENDACIONES

- Obtener más datos acerca de la prevalencia de *H.pylori* VEB en pacientes con adenocarcinoma gástrico en el Perú.
- Explorar en la detección de otros genes propios de la bacteria *Helicobacter pylori* y del VEB, 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 data con estudios realizados en otros países de similares condiciones a Perú.
- Estudiar las diferencias en cuanto a la progresión y evolución del CGaVEB, lo cual permitirá entender mejor y desarrollar terapias más adecuadas para esta variante de cáncer gástrico



## XII. REFERENCIAS CITADAS

- Atherton J. (1997) The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. Gut.;40:701-703.
- Atherton J. (2006). The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease.
- Atherton J., Peek R., Tham K., Cover T., Blaser M. (1997). Gastroenterology.; 112:92-99.
- Barboza Besada, E. (1996). Cáncer de estómago; radiología. Prensa Medica Argentina, 38(39), 2496–2503.
- Blaser M. (1996). Role of *vacA* and the *cagA* locus of *Helicobacter pylori* in human disease. Aliment Pharmacol Ther; 10 (suppl, 1):73-7.
- Brown, L. (2000). *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. Epidemiol Rev. 2000;22(2):283-97.
- Buzás, G. M., & Konderák, J. (2016). Co-infection with *Helicobacter pylori* and Epstein–Barr virus in benign upper digestive diseases: An endoscopic and serologic pilot study. United European Gastroenterology Journal,4(3), 388-394. doi:10.1177/2050640615610265
- Cárdenas-Mondragón, M. G., y col (2013). Epstein Barr Virus and *Helicobacter pylori* Co-Infection Are Positively Associated with Severe Gastritis in Pediatric Patients. PLoS ONE,8(4). doi:10.1371/journal.pone.0062850
- Carmolingo-Ponce M., Perez-Perez G., y col (2011) *Helicobacter pylori* genotyping from American indigenous groups shows novel Amerindian *vacA* and *cagA* alleles and Asian, African and European admixtures. Plos one 6(11): e27212
- Cave D. How is *Helicobacter pylori* transmitted? Gastroenterology. (1997); 11(Suppl 6): S9-14.

- Cover T., Cao P, Murthy U., Sipple M., Blasser M. (1992). Serum neutralizing antibody response to the vacuolating cytotoxin of H pylori. *J Clin Invest* 1992; 90:913-8
- 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.
- Cho, J., Kang, M., & Kim, K. (2016). Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma and Specific Features of the Accompanying Immune Response. *Journal of Gastric Cancer*, 16(1), 1. doi:10.5230/jgc.2016.16.1.1
- Faghihloo E, Saremi MR, Mahabadi M, Akbari H, Saberfar E. Epstein-Barr virus associated gastric cancer in Iran. *Arch Iran Med*. 2014; 17(11):763 – 770.
- Fekri, M. S., Bajgani, S. M., Rasti, A., Yazdani, R., & Mollaie, H. R. (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). doi:10.5812/jjm.14551
- Goodwin C. S., McConnell W., McCulloch R. K., McCullough C., Hill R., Bronsdon M. A., Kasper G. (1989). Cellular fatty acid composition of *Campylobacter pylori* from primates and ferrets compared with those of other campylobacters. *J. Clin. Microbiol.* ;27:938–943.
- Hassan, R., White, L., Stefanoff, C., Oliveira, D. D., Felisbino, F. E., Klumb, C., Zalcborg, I. R. (2006). Epstein-barr virus (EBV) detection and typing by PCR: a contribution to diagnostic screening of EBV-positive Burkitt's lymphoma. *Diagnostic Pathology*,1(1), 17. doi:10.1186/1746-1596-1-17
- He, Q., Wang, J., Osato, M., & Lachman, L. B. (2002). Real-Time Quantitative PCR for Detection of *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(10), 3720-3728. doi:10.1128/jcm.40.10.3720-3728.2002
- Hsu PI, Lai KH, Hsu PN. (2007). *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric malignancy. *Am J Gastroenterol*, 102: 725–730.
- Hu L., Mobley H. (1990). Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1990; 58:992-8.

- Hu M, Li K, Maskey N, Xu Z, Peng C, Wang B, et al. Decreased intratumoral Foxp3 Tregs and increased dendritic cell density by neoadjuvant chemotherapy associated with favorable prognosis in advanced gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(8):4685-94.
- HU, L. T., & MOBLEY, H. L. (1990). Purification and N-Terminal Analysis of Urease from *Helicobacter pylori*. *INFECTION AND IMMUNITY*,58, 992-998.
- Huang, H., Deng, Z., Vladimirova, O., Wiedmer, A., Lu, F., Lieberman, P. M., & Patel, D. J. (2016). Structural basis underlying viral hijacking of a histone chaperone complex. *Nature Communications*, 7, 12707. doi:10.1038/ncomms12707
- IARC. (2012). Epstein-barr virus. A review of human Carcinogens, volumen 100B
- Kijima Y, Hokita S, Takao S, Baba M, Natsugoe S, Yoshinaka H, et al. Epstein-Barr virus involvement is mainly restricted to lymphoepithelial type of gastric carcinoma among various epithelial neoplasms. *Journal of medical virology.* 2001;64(4):513-8.
- Lauren, P. A. (1993). The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*,64(31), 8-8.
- Letley D, Rhead J, Twells R, Dove B, Atherton J. (2003) Determinants of Non-toxicity in the Gastric Pathogen *Helicobacter pylori*. *J boil chem.*; 278:26734-26741
- Lee HE, Chae SW, Lee YJ, Kim MA, Lee HS, Lee BL, et al. Prognostic implications of type and density of tumour-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. *Br J Cancer.* 2008;99(10):1704-11.
- Lordick, F., Allum, W., Carneiro, F., Mitry, E., Taberero, J., Tan, P., Cervantes, A. (2014). Unmet needs and challenges in gastric cancer: The way forward. *Cancer Treatment Reviews*, 40(6), 692-700. doi:10.1016/j.ctrv.2014.03.002
- 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

- Ma GF, Miao Q, Liu YM, Gao H, Lian JJ, Wang YN, et al. High FoxP3 expression in tumour cells predicts better survival in gastric cancer and its role in tumour microenvironment. *Br J Cancer*. 2014;110(6):1552-60.
- Macsween, K. F., & Crawford, D. H. (2003). Epstein-Barr virus—recent advances. *The Lancet Infectious Diseases*,3(3), 131-140. doi:10.1016/s1473-3099(03)00543-7
- Malaty, H. M., El-Kasabany, A., Graham, D. Y., Miller, C. C., Reddy, S. G., Srinivasan, S. R., Berenson, G. S. (2002). Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: a follow-up study from infancy to adulthood. *The Lancet*,359(9310), 931-935. doi:10.1016/s0140-6736(02)08025-x
- Matsusaka K, Funata S, Fukayama M, Kaneda A. DNA methylation in gastric cancer, related to *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus. *World J Gastroenterol*. 2014;20(14):3916-26.
- Mendoza, D., Herrera, P., Gilman, R. H., Lanfranco, J., Tapia, M., Bussalleu, A., Ramírez-Ramos, A. (2008). Variation in the prevalence of gastric cancer in Perú. *International Journal of Cancer*,123(2), 414-420. doi:10.1002/ijc.23420
- 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.
- Mobley H. (1996). The Role of *Helicobacter pylori* urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. *Aliment Pharmacol Ther*; 10 (suppl.):57-64.
- Murphy, G., Pfeiffer, R., Camargo, M. C., & Rabkin, C. S. (2009). Meta-analysis Shows That Prevalence of Epstein–Barr Virus-Positive Gastric Cancer Differs Based on Sex and Anatomic Location. *Gastroenterology*, 137(3), 824-833. doi:10.1053/j.gastro.2009.05.001
- Nishikawa, J., Yoshiyama, H., Iizasa, H., Kanehiro, Y., Nakamura, M., Nishimura, J. Sakaida, I. (2014). Epstein-Barr Virus in Gastric Carcinoma. *Cancers*, 6(4), 2259-2274. doi:10.3390/cancers6042259

- Oda, K., Tamaru, J., Mikata, A., Nunomura, M., & Saitoh, N. (1993). Association of Epstein-Barr Virus with Gastric Carcinoma with Lymphoid Stroma. *American journal of Pathology*, 143(4), 1063-1071.
- Ortiz M., Coria V., (2015). Gastritis por *Helicobacter pylori*. Laboratorio de Bacteriología Experimental, Departamento de Microbiología y Parasitología del Instituto Nacional de Pediatría de México.
- 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
- Peleteiro, B., Bastos, A., Ferro, A., & Lunet, N. (2014). Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection Worldwide: A Systematic Review of Studies with National Coverage. *Digestive Diseases and Sciences*, 59(8), 1698-1709. doi:10.1007/s10620-014-3063-0
- Payet, M. (2016). Registro de Cancer de Lima Metropolitana. Incidencia y Mortalidad 2010 -2012, Volumen 5
- Peek R.M., Crabtree J.E., (2006) *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. *The journal of Pathology*, 208(2), 233-48.
- Polk, B. D., & Peek, R. M. (2010). *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. *Nature Reviews*, 10, 403-414.
- Ramirez, A., Sanchez, (2008) R. *Helicobacter pylori* y Cáncer Gástrico. *Rev Gastroenterol Perú*; 28: 258-266
- Ramirez, A., y col., (2005). Comparación de la prevalencia de la infección del estómago por *Helicobacter pylori* en el Perú en población japonesa y peruana. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana*; 35:219-224
- Ruiz Marquillo, Pablo (2002). Prevalencia de la Infección por *Helicobacter pylori* en el Policlínico Peruano Japonés. Tesis Digitales UNMSM. Unidad de Postgrado UNMSM.
- 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.

- Shibata, D. & Lawrence, M. (1992) Epstein-Barr Virus-associated Gastric Adenocarcinoma. *Am. Journal of Pathology*. Vol . 140, 769-774.
- Saiki Y, Ohtani H, Naito Y, Miyazawa M, Nagura H. Immunophenotypic characterization of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: massive infiltration by proliferating CD8+ T-lymphocytes. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1996;75(1):67-76.
- Soto, G., y col (2003). *Helicobacter pylori* Reinfection Is Common in Peruvian Adults after Antibiotic Eradication Therapy. *The Journal of Infectious Diseases* 2003; 188:1263–79
- Stewart. B & Wild, C. (2014) World Cancer report, International Agency for research on cancer (IARC)
- Stolte M, Edt S. (1989). Lymphoid follicles in the antral mucosa: immune response to *Campylobacter pylori*. *J Clin Pathol*; 42:1269-71.
- Strong MJ, Xu G, Coco J, Baribault C, Vinay DS, Lacey MR, et al. Differences in gastric carcinoma microenvironment stratify according to EBV infection intensity: implications for possible immune adjuvant therapy. *PLoS Pathog*. 2013; 9(5):e1003341.
- Takada, K. (2000). Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Molecular Pathology*, 53(5), 255-261. doi:10.1136/mp.53.5.255
- Telford, J. L., P. Ghiara y col., (1994). Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J. Exp. Med*. 179:1653–1658.
- Thompson MP: Epstein - Barr virus and Cancer. *Clin Cancer Res* 2004 10:803–821.
- Tsai, K., Chan, L., Gibeault, R., Conn, K., Dheekollu, J., Domsic, J., Lieberman, P. M. (2014). Viral Reprogramming of the Daxx Histone H3.3 Chaperone during Early Epstein-Barr Virus Infection. *Journal of Virology*, 88(24), 14350-14363. doi:10.1128/jvi.01895-14
- Truong, C. D., Feng, W., Li, W., Khoury, T., Li, Q., Alrawi, S., Tan, D. (2009). Characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: A study of 235 cases at a comprehensive cancer center in U.S.A. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 28(1), 14. doi:10.1186/1756-9966-28-14

- Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S. (2001). *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med*, 345: 784–789.
- Ushiku T, Chong JM, Uozaki H, Hino R, Chang MS, Sudo M, Rani BR, Sakuma K, Nagai H, Fukayama M. p73 gene promoter methylation in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Int J Cancer*. 2007;120:60–66
- Vandamme P., Pot B., Kersters K. (1991). Differentiation of campylobacters and Campylobacter-like organisms by numerical analysis of one-dimensional electrophoretic protein patterns. *Syst. Appl. Microbiol.*;14:57–66.
- Van Beek J, Zur Hausen A, Klein Kranenbarg E *et al.* EBV-positive gastric adenocarcinomas: a distinct clinicopathologic entity with a low frequency of lymph node involvement. *J. Clin. Oncol.* 2004; **22**: 664–70.
- 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
- Wroblewski L.E, Peek, R.M (2013). *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis: mechanisms. *Gastroenterology Clinics of North America*, 42(2), 285-98.
- Wroblewski, L. E., Peek, R. M., & Wilson, K. T. (2010). *Helicobacter pylori* and gastric cancer: Factor that modelate disease risk. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(4), 713-39.
- Young, L. S., & Murray, P. G. (2003). Epstein–Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene*, 22(33), 5108-5121. doi:10.1038/sj.onc.1206556
- Yoshiwara, E, Koriyama, C, Akiba, S, Itoh, T, Minakami, Y. (2005) Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma in Lima, Peru. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*.

# XIII. ANEXOS

## ANEXO 1.

### **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 en 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 *ureA* 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> <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.

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS															
<b>DATOS PERSONALES:</b>	N° HISTORIA CLÍNICA <input style="width: 80%;" type="text"/>														
1. Nombre Completo: _____ _____															
2. Lugar de nacimiento: _____															
3. Fecha de nacimiento: <input style="width: 80px;" type="text"/> 4. Sexo <input style="width: 40px;" type="text"/>															
5. Lugar de domicilio: _____ (Departamento) _____ (Provincia) _____															
6. Teléfono: _____															
7. Tiempo de permanencia en el lugar: <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> &lt; 5 años <input style="width: 80px;" type="text"/></li> <li><input type="radio"/> 5-10 años <input style="width: 80px;" type="text"/></li> <li><input type="radio"/> &gt;10 años <input style="width: 80px;" type="text"/></li> </ul> 8. Tipo de abastecimiento de agua <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Potable <input style="width: 80px;" type="text"/></li> <li><input type="radio"/> Cisterna <input style="width: 80px;" type="text"/></li> <li><input type="radio"/> Pozo <input style="width: 80px;" type="text"/></li> <li><input type="radio"/> Otros <input style="width: 80px;" type="text"/></li> </ul> 9. Agua de consumo: <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="radio"/> Embotellada <input style="width: 80px;" type="text"/></li> <li><input type="radio"/> Agua hervida <input style="width: 80px;" type="text"/></li> <li><input type="radio"/> Agua domestica c/ filtro <input style="width: 80px;" type="text"/></li> </ul>	10. Antecedentes: <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th colspan="2">Personales</th> </tr> <tr> <th>Si</th> <th>No</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: left;">Gastritis</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: left;">Úlceras</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: left;">Problemas gástricos permanente</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Personales		Si	No	Gastritis			Úlceras			Problemas gástricos permanente		
	Personales														
	Si	No													
Gastritis															
Úlceras															
Problemas gástricos permanente															

ANEXO 3.

## FICHA DE RECOLECCION DE DATOS

**DATOS PERSONALES:**

Nº 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

10.

Antecedentes:

Gastritis

Úlceras

Problemas

s

gástricos

Permanentes

(PGP)

10. Numero de familiares en primer grado del paciente

Nombre y apellido	Cáncer gástrico	Gastritis	Úlceras	PGP

ANEXO 4.

### 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 lo 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.

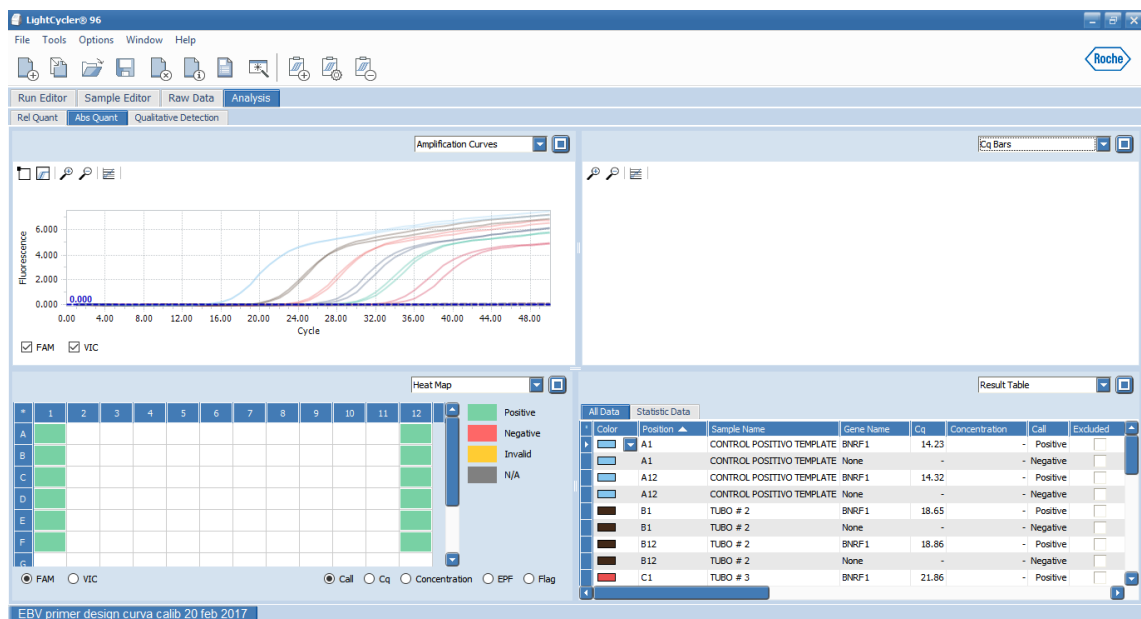
---

Nombre del Participante  
(en letras de imprenta)

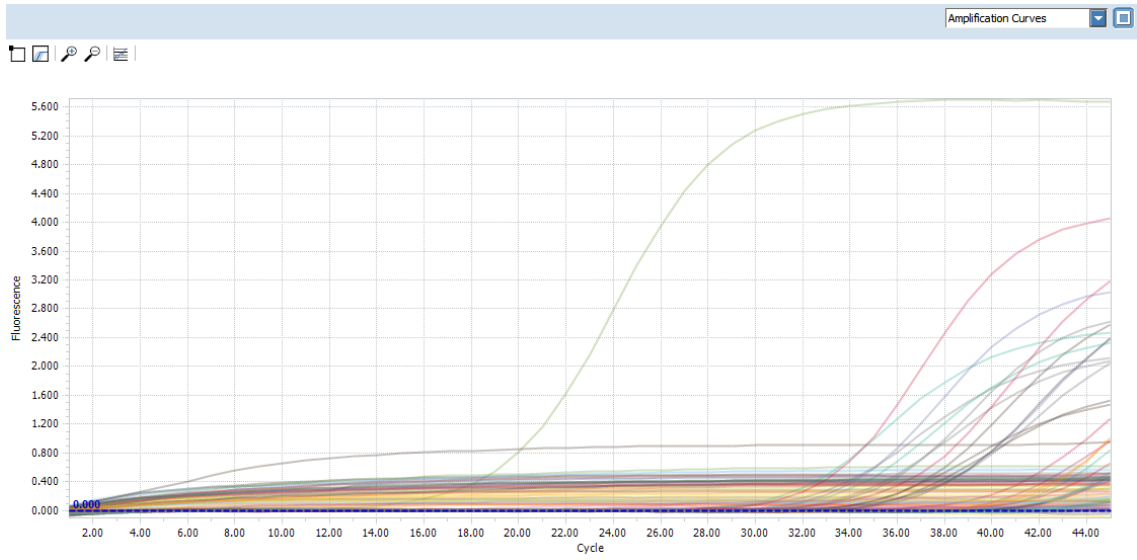
Firma del Participante

Fecha

ANEXO 5: Resultados de la curva de calibración primer del gen RNF11 VEB



## ANEXO 6: Curvas de fluorescencia experimentos qPCR *H. pylori*



## ANEXO 7: Datos obtenidos a partir de qPCR *H. pylori*

All Data											Statistic Data	
Color	Position	Sample	Gene Name	Condition Name	Cq	Cq Mean	Cq Error	Excluded	Dye	Slope	EPF	
D9	ZIC-3523	ureA	DISTAL	-	-	-	-	<input type="checkbox"/>	SYBR Green I	0.05	0.48	
D8	ZIC-3523	ureA	PROXIMAL	-	-	-	-	<input type="checkbox"/>	SYBR Green I	0.03	0.14	
D7	ZIC-3523	ureA	TUMOR	-	-	-	-	<input type="checkbox"/>	SYBR Green I	0.00	0.00	
C9	ZIC-3523	ureA	DISTAL	-	-	-	-	<input type="checkbox"/>	SYBR Green I	0.05	0.44	
C8	ZIC-3523	ureA	PROXIMAL	-	-	-	-	<input type="checkbox"/>	SYBR Green I	0.03	0.26	
C7	ZIC-3523	ureA	TUMOR	-	-	-	-	<input type="checkbox"/>	SYBR Green I	0.02	0.17	
B12	THE-3501	ureA	DISTAL	-	-	-	-	<input type="checkbox"/>	SYBR Green I	0.00	0.01	
B11	THE-3501	ureA	PROXIMAL	-	-	-	-	<input type="checkbox"/>	SYBR Green I	0.04	0.38	
B10	THE-3501	ureA	TUMOR	-	-	-	-	<input type="checkbox"/>	SYBR Green I	0.05	0.44	
A12	THE-3501	ureA	DISTAL	-	-	-	-	<input type="checkbox"/>	SYBR Green I	0.00	-0.04	
A11	THE-3501	ureA	PROXIMAL	-	-	-	-	<input type="checkbox"/>	SYBR Green I	0.02	0.36	
A10	THE-3501	ureA	TUMOR	-	-	-	-	<input type="checkbox"/>	SYBR Green I	0.03	0.41	
D3	TCR-3512	ureA	DISTAL	-	-	-	-	<input type="checkbox"/>	SYBR Green I	0.02	0.13	
D2	TCR-3512	ureA	PROXIMAL	35.70	36.01	0.44	<input type="checkbox"/>	SYBR Green I	0.22	1.47		
D1	TCR-3512	ureA	TUMOR	-	-	-	-	<input type="checkbox"/>	SYBR Green I	0.07	0.42	
C3	TCR-3512	ureA	DISTAL	-	-	-	-	<input type="checkbox"/>	SYBR Green I	0.03	0.13	
C2	TCR-3512	ureA	PROXIMAL	36.32	36.01	0.44	<input type="checkbox"/>	SYBR Green I	0.23	1.53		
C1	TCR-3512	ureA	TUMOR	-	-	-	-	<input type="checkbox"/>	SYBR Green I	0.04	0.38	
B9	TBO-3489	ureA	DISTAL	-	-	-	-	<input type="checkbox"/>	SYBR Green I	0.06	0.15	
B8	TBO-3489	ureA	PROXIMAL	34.76	33.15	2.28	<input type="checkbox"/>	SYBR Green I	0.71	3.20		
B7	TBO-3489	ureA	TUMOR	36.51	34.66	2.62	<input type="checkbox"/>	SYBR Green I	0.51	2.40		
A9	TBO-3489	ureA	DISTAL	-	-	-	-	<input type="checkbox"/>	SYBR Green I	0.04	0.11	
A8	TBO-3489	ureA	PROXIMAL	31.53	33.15	2.28	<input type="checkbox"/>	SYBR Green I	0.87	4.06		
A7	TBO-3489	ureA	TUMOR	32.80	34.66	2.62	<input type="checkbox"/>	SYBR Green I	0.55	3.04		
F3	SRM-3538	ureA	DISTAL	-	-	-	-	<input type="checkbox"/>	SYBR Green I	0.01	0.09	

## ANEXO 8: Resultados en base a colores indicando Positivo/negativo para gen ureA

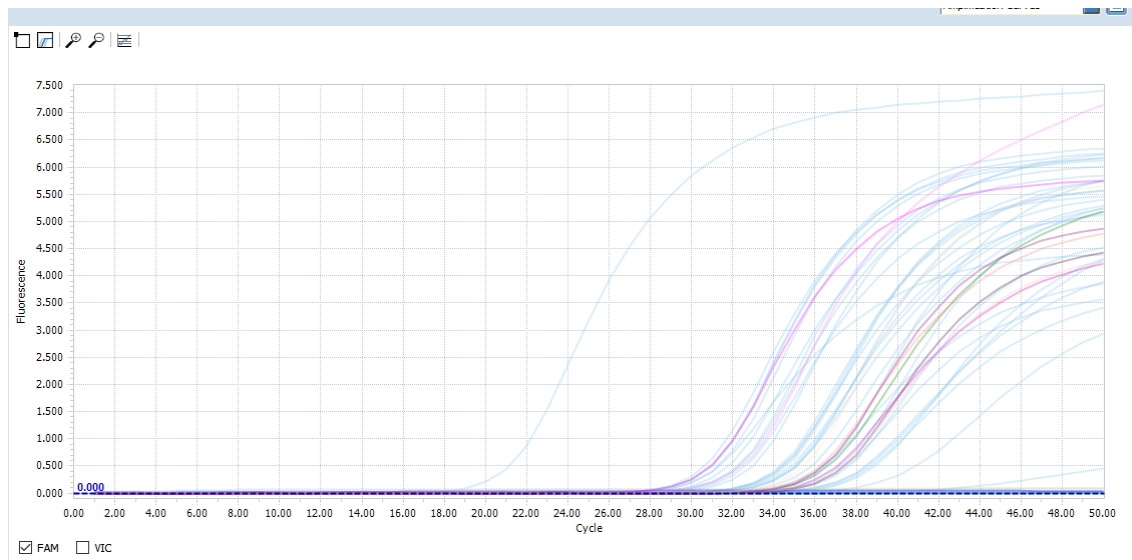
Rel Quant Tm Calling Heat Map

*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	JJR-3415 ureA TUMOR	JJR-3415 ureA PROXIMAL	JJR-3415 ureA DISTAL	GZS-3433 ureA TUMOR	GZS-3433 ureA PROXIMAL	GZS-3433 ureA DISTAL	TBO-3489 ureA TUMOR	TBO-3489 ureA PROXIMAL	TBO-3489 ureA DISTAL	THE-3501 ureA TUMOR	THE-3501 ureA PROXIMAL	THE-3501 ureA DISTAL
B	JJR-3415 ureA TUMOR	JJR-3415 ureA PROXIMAL	JJR-3415 ureA DISTAL	GZS-3433 ureA TUMOR	GZS-3433 ureA PROXIMAL	GZS-3433 ureA DISTAL	TBO-3489 ureA TUMOR	TBO-3489 ureA PROXIMAL	TBO-3489 ureA DISTAL	THE-3501 ureA TUMOR	THE-3501 ureA PROXIMAL	THE-3501 ureA DISTAL
C	TCR-3512 ureA TUMOR	TCR-3512 ureA PROXIMAL	TCR-3512 ureA DISTAL	PCA-3518 ureA TUMOR	PCA-3518 ureA PROXIMAL	PCA-3518 ureA DISTAL	ZIC-3523 ureA TUMOR	ZIC-3523 ureA PROXIMAL	ZIC-3523 ureA DISTAL	ENE-3524 ureA TUMOR	ENE-3524 ureA PROXIMAL	ENE-3524 ureA DISTAL
D	TCR-3512 ureA TUMOR	TCR-3512 ureA PROXIMAL	TCR-3512 ureA DISTAL	PCA-3518 ureA TUMOR	PCA-3518 ureA PROXIMAL	PCA-3518 ureA DISTAL	ZIC-3523 ureA TUMOR	ZIC-3523 ureA PROXIMAL	ZIC-3523 ureA DISTAL	ENE-3524 ureA TUMOR	ENE-3524 ureA PROXIMAL	ENE-3524 ureA DISTAL
E	SRM-3538 ureA TUMOR	SRM-3538 ureA PROXIMAL	SRM-3538 ureA DISTAL	DDP-3548 ureA TUMOR	DDP-3548 ureA PROXIMAL	DDP-3548 ureA DISTAL	LGM-3549 ureA TUMOR	LGM-3549 ureA PROXIMAL	LGM-3549 ureA DISTAL	JBV-3551 ureA TUMOR	JBV-3551 ureA PROXIMAL	JBV-3551 ureA DISTAL
F	SRM-3538 ureA TUMOR	SRM-3538 ureA PROXIMAL	SRM-3538 ureA DISTAL	DDP-3548 ureA TUMOR	DDP-3548 ureA PROXIMAL	DDP-3548 ureA DISTAL	LGM-3549 ureA TUMOR	LGM-3549 ureA PROXIMAL	LGM-3549 ureA DISTAL	JBV-3551 ureA TUMOR	JBV-3551 ureA PROXIMAL	JBV-3551 ureA DISTAL
G	GMI-3552 ureA TUMOR	GMI-3552 ureA PROXIMAL	GMI-3552 ureA DISTAL	FPF-3580 ureA TUMOR	FPF-3580 ureA PROXIMAL	FPF-3580 ureA DISTAL	PPE-3622 ureA TUMOR	PPE-3622 ureA PROXIMAL	PPE-3622 ureA DISTAL			H2O ureA DISTAL
H	GMI-3552 ureA TUMOR	GMI-3552 ureA PROXIMAL	GMI-3552 ureA DISTAL	FPF-3580 ureA TUMOR	FPF-3580 ureA PROXIMAL	FPF-3580 ureA DISTAL	PPE-3622 ureA TUMOR	PPE-3622 ureA PROXIMAL	PPE-3622 ureA DISTAL			ATCC ureA DISTAL

Sample Name  
 Gene Name  
 Condition Name

SYBR Green I  
 Call  Cq  EPP  Flag

## ANEXO 9: Curvas experimentos detección RNFL1 VEB





### ANEXO 10: Resultados en base a colores indicando Positivo/negativo para gen RNFL1

*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EMG-1774 EBV ENDOSCOPIA	EBP-1780 EBV ENDOSCOPIA	BPS-1799 EBV ENDOSCOPIA	MEH-1800 EBV ENDOSCOPIA	JSD-1854 EBV ENDOSCOPIA	GBR-1855 EBV ENDOSCOPIA	PMS-1856 EBV ENDOSCOPIA	EHA-1856 EBV ENDOSCOPIA	FGB-1864 EBV ENDOSCOPIA	SCL-1884 EBV ENDOSCOPIA	VCR-1885 EBV ENDOSCOPIA	VVS-1931 EBV ENDOSCOPIA
B	MTH-1935 EBV ENDOSCOPIA	MRS-1940 EBV ENDOSCOPIA	MCN-1944 EBV ENDOSCOPIA	PEN-1945 EBV ENDOSCOPIA	MDF-1954 EBV ENDOSCOPIA	JTM-1999 EBV ENDOSCOPIA	JBR-2000 EBV ENDOSCOPIA	JBB-2003 EBV ENDOSCOPIA	JVL-2004 EBV ENDOSCOPIA	JMJ-2008 EBV ENDOSCOPIA	AAI-2016 EBV ENDOSCOPIA	AMP-2017 EBV ENDOSCOPIA
C	OG-2018 EBV ENDOSCOPIA	CQR-2013 EBV ENDOSCOPIA	EJC-2044 EBV ENDOSCOPIA	EJB-2045 EBV ENDOSCOPIA	DAB-2065 EBV ENDOSCOPIA	RZX-2057 EBV ENDOSCOPIA	BBL-2058 EBV ENDOSCOPIA	CCL-2074 EBV ENDOSCOPIA	EPP-2087 EBV ENDOSCOPIA	FMJ-2099 EBV ENDOSCOPIA	RCC-2137 EBV ENDOSCOPIA	ECV-2138 EBV ENDOSCOPIA
D	RMS-2154 EBV ENDOSCOPIA	CBH-2158 EBV ENDOSCOPIA	CRQ-2043 EBV ENDOSCOPIA	JSA-2159 EBV ENDOSCOPIA	RRNA-2160 EBV ENDOSCOPIA	SQR-2163 EBV ENDOSCOPIA	DSG-2164 EBV ENDOSCOPIA	MZL-2177 EBV ENDOSCOPIA	CRV-2180 EBV ENDOSCOPIA	FGY-2209 EBV ENDOSCOPIA	MZR-2210 EBV ENDOSCOPIA	ERM-2378 EBV ENDOSCOPIA
E	EGG-2379 EBV ENDOSCOPIA	DHR-2404 EBV ENDOSCOPIA										
F												
G												C+ EBV EBV ENDOSCOPIA
H												H2O EBV ENDOSCOPIA

### ANEXO 11: Datos obtenidos a partir de qPCR VEB

Color	Position	Sample Name	Gene Name	Cq	Concentration	Call	Cq Mean	Cq Error	Dye	Slope	EPF	Failure	Notes	Sample Prep Notes
A1		EMG-1774	EBV	34.40	-	Positive	34.40	0.00	FAM	0.51	4.26	None		
A2		EBP-1780	EBV	32.65	-	Positive	32.65	0.00	FAM	0.73	5.66	None		
A3		BPS-1799	EBV	33.29	-	Positive	33.29	0.00	FAM	0.56	4.78	None		
A4		MEH-1800	EBV	34.49	-	Positive	34.49	0.00	FAM	0.56	4.43	None		
A5		JSD-1854	EBV	33.51	-	Positive	33.51	0.00	FAM	0.62	4.87	None		
A6		GBR-1855	EBV	34.10	-	Positive	34.10	0.00	FAM	0.48	4.22	None		
A7		PMS-1856	EBV	28.08	-	Positive	28.08	0.00	FAM	0.72	5.74	None		
A8		EHA-1856	EBV	29.11	-	Positive	29.11	0.00	FAM	0.80	7.14	None		
A9		FGB-1864	EBV	-	-	Negative	-	-	FAM	0.00	0.04	None		
A10		SCL-1884	EBV	33.63	-	Positive	33.63	0.00	FAM	0.58	5.17	None		
A11		VCR-1885	EBV	28.14	-	Positive	28.14	0.00	FAM	0.78	6.33	None		
A12		VVS-1931	EBV	-	-	Negative	-	-	FAM	0.00	0.08	None		
B1		MTH-1935	EBV	40.94	-	Positive	40.94	0.00	FAM	0.06	0.45	None		
B2		MRS-1940	EBV	27.85	-	Positive	27.85	0.00	FAM	0.76	6.14	None		
B3		MCN-1944	EBV	28.11	-	Positive	28.11	0.00	FAM	0.77	6.24	None		
B4		PEN-1945	EBV	36.89	-	Positive	36.89	0.00	FAM	0.33	2.94	None		
B5		MDF-1954	EBV	-	-	Negative	-	-	FAM	0.00	0.03	None		
B6		JTM-1999	EBV	35.44	-	Positive	35.44	0.00	FAM	0.38	3.41	None		
B7		JBR-2000	EBV	34.53	-	Positive	34.53	0.00	FAM	0.55	4.52	None		
B8		JBB-2003	EBV	29.35	-	Positive	29.35	0.00	FAM	0.75	6.01	None		
B9		JVL-2004	EBV	-	-	Negative	-	-	FAM	0.01	0.03	None		
B10		JMJ-2008	EBV	-	-	Negative	-	-	FAM	0.00	-0.01	None		
B11		AAI-2016	EBV	-	-	Negative	-	-	FAM	0.01	0.09	None		