

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE MEDICINA

**“INTERACCIÓN DE LOS FACTORES DE VIRULENCIA DE
HELICOBACTER PYLORI Y OTROS FACTORES AMBIENTALES
CON EL SISTEMA HLA DEL HUÉSPED EN EL PROCESO DE
CARCINOGENÉISIS GÁSTRICO”**

TESIS DOCTORAL

M^a TERESA SORIA SAN TEODORO

Zaragoza, 2003

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE MEDICINA

“Interacción de los factores de virulencia de Helicobacter pylori y otros factores ambientales con el sistema HLA del huésped en el proceso de carcinogénesis gástrico”

MEMORIA PRESENTADA POR
M^a TERESA SORIA SAN TEODORO
PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN MEDICINA

Directores: Dr. E. Bajador
Dr. R. Uribarrena

Zaragoza, Septiembre 2003

Los Doctores Eduardo Bajador y Rafael Uribarrena, del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Universitario "Miguel Servet" de Zaragoza

Hacen constar:

Como Director y Codirector, que la tesis doctoral titulada **"Interacción de los factores de virulencia de Helicobacter pylori y otros factores ambientales con el sistema HLA del huésped en el proceso de carcinogénesis gástrico"** presentada por María Teresa Soria San Teodoro para optar al grado de Doctora, representa una gran aportación al tema y reúne los méritos suficientes para ser presentada y defendida delante del Tribunal correspondiente

Y para que conste firmamos la presente en Zaragoza, 15 de Agosto de 2003

Dr. Rafael Uribarrena

Dr. Eduardo Bajador

A mis padres.
Por toda una vida dedicada a sus hijos.

A Javier.
Doy gracias cada día por haberte encontrado.

AGRADECIMIENTOS

A Eduardo Bajador y Rafael Uribarrena por sus valiosos consejos y en especial por haber confiado en mí para realizar este trabajo.

A Ángel Lanas por facilitarme los medios para la realización de este trabajo

A todo el personal de la UMI, y especialmente a Elena Piazuelo por su ayuda en el laboratorio.

A Carmen Yus del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Miguel Servet de Zaragoza por la realización de todo el estudio histológico.

A Fernando Gomollón y a las enfermeras de Endoscopia del Hospital Miguel Servet, sin su ayuda este trabajo no habría sido posible.

A Pepa Sierra y a Ignasi Elizalde por su inestimable ayuda en el estudio estadístico.

A mis compañeros del Servicio de Digestivo del Hospital Miguel Servet, quienes con su labor diaria son el mejor ejemplo para los que nos dedicamos a la medicina.

A las enfermeras, auxiliares y secretaria de Digestivo del Hospital Miguel Servet por su cariño y por tantas conversaciones alrededor de un café.

A los pacientes, y muy en especial a Marce, a quien la enfermedad puso en mi camino y de los que tanto he aprendido.

A Angels Ginès por su amistad, ejemplo profesional, y compañía en los momentos difíciles.

A mi familia y mis amigos de los que siempre he recibido un apoyo incondicional.

A todos ellos, mi gratitud para siempre.

- JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS..... Pág 1-3

- INTRODUCCIÓN..... Pág 4-66
- 1. CONSIDERACIONES GENERALES RESPECTO AL CÁNCER GÁSTRICO

- 2. TIPOS HISTOPATOLÓGICOS DE CÁNCER GÁSTRICO
 - 2.1 ADENOCARCINOMA DE TIPO INTESTINAL
 - 2.2 ADENOCARCINOMA DE TIPO DIFUSO

- 3. SUSTRATO ANATOMOPATOLÓGICO. DE LA GASTRITIS AL CÁNCER:
SECUENCIA DE CORREA
 - 3.1 GASTRITIS
 - 3.2 GASTRITIS CRÓNICA
 - 3.3 GASTRITIS CRÓNICA CON METAPLASIA INTESTINAL
 - 3.4 DISPLASIA

- 4. ETIOPATOGENIA DEL CÁNCER GÁSTRICO
 - 4.1 FACTORES AMBIENTALES
 - 4.1.1 HELICOBACTER PYLORI
 - 4.1.1.1 Aspectos microbiológicos de Helicobacter pylori
 - 4.1.1.1.1 Microbiología de H. Pylori y estructura de su pared
 - 4.1.1.1.2 Características del genoma
 - 4.1.1.1.3 Factores de virulencia y patogenicidad de H. Pylori
 - 4.1.1.2 Factores de colonización de la mucosa gástrica
 - 4.1.1.2.1 Flagelos
 - 4.1.1.2.2 Quimiotáxis
 - 4.1.1.2.3 Adhesinas

4.1.1.2.4 Enzimas de Helicobacter pylori

4.1.1.2.4.1 Ureasa

4.1.1.2.4.2 Catalasa

4.1.1.2.4.3 Proteasas y lipasas

4.1.1.3 Factores relacionados con el daño tisular

4.1.1.3.1 VacA

4.1.1.3.2 Isla de patogenicidad CagA

4.1.1.3.3 Relación entre VaAa, CagA y enfermedad gastroduodenal

4.1.1.3.4 Otros factores que pueden influir en la colonización

4.1.1.4 Ligazón funcional de los factores de virulencia

4.1.1.5 Papel de la respuesta inflamatoria en la patogenia de las lesiones asociadas a Helicobacter pylori

4.1.1.5.1 Respuesta inflamatoria local

4.1.1.5.2 Respuesta inmunitaria

4.1.1.5.2.1 Inmunidad específica

4.1.1.5.2.2 Respuesta humoral

4.1.1.5.2.3 Autoinmunidad

4.1.1.6 Respuesta de la mucosa gástrica a la infección por Helicobacter pylori

4.1.1.6.1 Hiperproliferación celular asociada a Helicobacter pylori

4.1.1.6.2 Apoptosis celular

4.1.1.6.2.1 Helicobacter pylori y la apoptosis celular en el epitelio gástrico

4.1.1.6.3 Daño del DNA celular

4.2 FACTORES DEL HUÉSPED

4.2.1 SISTEMA HLA

4.2.1.1 Estructura del sistema HLA

4.2.1.2 Reconocimiento inmunológico

4.2.1.3 Relación del sistema HLA y determinadas enfermedades

- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... Pág 67-69
 1. OBJETIVOS CONCRETOS
 2. HIPÓTESIS

- MÉTODOS..... Pág 70-88
 1. DISEÑO

 2. PACIENTES
 - 2.1 PACIENTES EXTERNOS
 - 2.2 PACIENTES CASOS

 3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

 4. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

 5. MÉTODOS
 - 5.1 CONSENTIMIENTO INFORMADO, HISTORIA CLÍNICA Y EXPLORACIÓN FÍSICA
 - 5.2 DETERMINACIONES SANGUÍNEAS
 - 5.3 CUESTIONARIO
 - 5.4 GASTROSCOPIA Y BIOPSIAS
 - 5.5 ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO DE LA MUCOSA GÁSTRICA
 - 5.6 EXTRACCIÓN DE ADN
 - 5.6.1 Extracción de DNA genómico a partir de sangre
 - 5.6.2 Extracción del DNA a partir de mucosa gástrica
 - 5.7 TIPAJE DEL HLA-DQ
 - 5.8 TIPAJE DE LAS CEPAS DE HELICOBACTER PYLORI INFECTANTE
 - 5.8.1 Gen CagA
 - 5.8.2 Gen VacA
 - 5.8.2.1 Región s del gen VacA
 - 5.8.2.2 Región m del gen VacA
 - 5.9 ESTUDIO ESTADÍSTICO
 6. MATERIALES

- ESTUDIO 1..... Pág 89-128

1. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA MUESTRA

- 1.1 DESCRIPCIÓN POR GRUPOS DE EDAD Y SEXO
- 1.2 ESTUDIO HISTOLÓGICO
- 1.3 TIPAJE DE LAS CEPAS DE HELICOBACTER PYLORI INFECTANTE
- 1.4 TIPAJE DEL DNA GENÓMICO DE LOS PACIENTES
- 1.5 CONSUMO DE ALCOHOL, TABACO Y SAL
- 1.6 GRUPO SANGUINEO

2. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES SEGÚN HISTOLOGÍA

- 2.1 GASTRITIS CRÓNICA SIN ATROFIA
 - 2.1.1 DESCRIPCIÓN POR GRUPOS DE EDAD Y SEXO
 - 2.1.2 TIPAJE DE LAS CEPAS DE HELICOBACTER PYLORI INFECTANTE
 - 2.1.3 TIPAJE DEL DNA GENÓMICO DE LOS PACIENTES
 - 2.1.4 CONSUMO DE ALCOHOL, TABACO Y SAL
 - 2.1.5 GRUPO SANGUÍNEO
- 2.2 GASTRITIS CRÓNICA ATRÓFICA
 - 2.2.1 DESCRIPCIÓN POR GRUPO DE EDAD Y SEXO
 - 2.2.2 TIPAJE DE LAS CEPAS DE HELICOBACTER PYLORI INFECTANTE
 - 2.2.3 TIPAJE DEL DNA GENÓMICO DE LOS PACIENTES
 - 2.2.4 CONSUMO DE ALCOHOL, TABACO Y SAL
 - 2.2.5 GRUPO SANGUÍNEO
- 2.3 GASTRITIS CRÓNICA CON METAPLASIA INTESTINAL
 - 2.3.1 DESCRIPCIÓN POR GRUPOS DE EDAD Y SEXO
 - 2.3.2 TIPAJE DE LAS CEPAS DE HELICOBACTER PYLORI INFECTANTE
 - 2.3.3 TIPAJE DEL DNA GENÓMICO DE LOS PACIENTES
 - 2.3.4 CONSUMO DE ALCOHOL, TABACO Y SAL
 - 2.3.5 GRUPO SANGUÍNEO
- 2.4 DISPLASIA
- 2.5 CUADRO RESUMEN DE CARACTERÍSTICAS

3. COMPARACIÓN ENTRE PACIENTES CON GASTRITIS CRÓNICA SIN METAPLASIA INTESTINAL Y CON METAPLASIA INTESTINAL

- 3.1 INFLUENCIA DEL SEXO, LA EDAD Y EL GRUPO SANGUÍNEO
- 3.2 INFLUENCIA DEL HELICOBACTER PYLORI
- 3.3 TIPAJE DEL DNA GENÓMICO DE LOS PACIENTES
- 3.4 CONSUMO DE ALCOHOL, TABACO Y SAL
- 3.5 ANALISIS MULTIVARIANTE

- ESTUDIO 2..... Pág 129-156

1. DESCRIPCIÓN GENERAL

- 1.1 DESCRIPCIÓN POR GRUPO DE EDAD Y SEXO
- 1.2 ESTUDIO HISTOLÓGICO
- 1.3 TIPAJE DE LAS CEPAS DE HELICOBACTER PYLORI INFECTANTE
- 1.4 TIPAJE DEL DNA GENÓMICO DE LOS PACIENTES
- 1.5 CONSUMO DE ALCOHOL, TABACO Y SAL
- 1.6 GRUPO SANGUINEO
- 1.7 CUADRO RESUMEN CARACTERÍSTICAS

2. COMPARACIÓN ENTRE PACIENTES CON PROGRESIÓN HISTOLÓGICA Y PACIENTES SIN PROGRESIÓN HISTOLÓGICA DESDE 1994

- 2.1 INFLUENCIA DEL SEXO, LA EDAD Y EL GRUPO SANGUINEO
- 2.2 INFLUENCIA DE HELICOBACTER PYLORI
- 2.3 TIPAJE DEL DNA GENÓMICO DE LOS PACIENTES
- 2.4 CONSUMO DE ALCOHOL, TABACO Y SAL
- 2.5 ESTUDIO MULTIVARIANTE

3 COMPARACIÓN ENTRE PACIENTES CON PROGRESIÓN A GASTRITIS CRÓNICA CON METAPLASIA INTESTINAL Y SIN PROGRESIÓN

- 3.1 INFLUENCIA DEL SEXO, LA EDAD Y EL GRUPO SANGUINEO
- 3.2 TIPAJE DE LAS CEPAS DE HELICOBACTER PYLORI INFECTANTE
- 3.3 TIPAJE DEL DNA GENÓMICO DE LOS PACIENTES
- 3.4 CONSUMO DE ALCOHOL, TABACO Y SAL
- 3.5 ANALISIS MULTIVARIANTE

- DISCUSIÓN..... Pág 157-199
 1. MECANISMO DE CARCINOGENESIS SOBRE LA GASTRITIS
 2. ESTUDIO 1
 - 2.1 INFECCIÓN POR HELICOBACTER PYLORI: EL ESPECTRO DE LESIONES
 - 2.1.1 GEN CAGA
 - 2.1.2 GEN VACA
 - 2.1.3 COMBINACIONES DE GENES VACA
 - 2.2 FORMAS DE GASTRITIS CRÓNICA E INFLUENCIA DE OTROS FACTORES
 - 2.2.1 INFLUENCIA DE DETERMINADOS FACTORES AMBIENTALES Y DE ESTILO DE VIDA: CONSUMO DE ALCOHOL, TABACO Y SAL
 - 2.2.2 TIPO DE LESIONES DEL DNA GENÓMICO DE LOS PACIENTES
 - 2.3 METAPLASIA INTESTINAL
 - 2.4 DISPLASIA
 3. ESTUDIO 2
 - 3.1 INFLUENCIA DE HELICOBACTER PYLORI EN LA PROGRESIÓN DE LAS LESIONES GÁSTRICAS
 - 3.2 INFLUENCIA DEL DNA GENÓMICO DE LOS PACIENTES
 - 3.3 INFLUENCIA DE DETERMINADOS FACTORES AMBIENTALES Y DE ESTILO DE VIDA EN LA PROGRESIÓN DE LAS LESIONES PRENEOPLÁSICAS
 4. POSIBLES LIMITACIONES Y SEGOS DE LOS ESTUDIOS
 - 4.1 DEBIDOS AL CUESTIONARIO DIETÉTICO EMPLEADO
 - 4.2 DEBIDO AL TAMAÑO DE LAS MUESTRAS
 - 4.3 DEBIDO A LA METODOLOGÍA DEL ESTUDIO
 - 4.4 DEBIDO A LAS VARIABLES NO RECOGIDAS
 - 4.5 DEBIDOS A LA POBLACIÓN INCLUIDA
- CONCLUSIONES..... Pág 200-203
- BIBLIOGRAFÍA..... Pág 204-240
- ANEXOS

A pesar de que la incidencia del cáncer gástrico muestra una tendencia decreciente en los últimos años, esta neoplasia sigue siendo una de las más frecuentes en los países occidentales. El tipo histológico más frecuente dentro del cáncer gástrico es el adenocarcinoma, dentro del cual se engloban entidades muy diferentes. El tipo intestinal es la forma más frecuente en las zonas geográficas con una mayor tasa de enfermedad y su desarrollo se ha relacionado fundamentalmente con factores ambientales. Por el contrario, el cáncer gástrico de tipo difuso se presenta en zonas con una menor prevalencia y su aparición se ha relacionado con factores genéticos.

Distintos estudios epidemiológicos han demostrado que la gastritis crónica precede en la evolución al carcinoma gástrico de tipo intestinal, determinando también una secuencia de cambios histológicos progresivos que ocurren desde la mucosa normal a este tipo de neoplasia.

En general, el modelo de carcinogénesis gástrica más ampliamente aceptado sugiere que la mucosa normal desarrolla primero una gastritis crónica no atrófica, que evoluciona posteriormente a gastritis crónica atrófica y finalmente a metaplasia intestinal y displasia que preceden a la aparición del adenocarcinoma. En esta secuencia parece que el desarrollo de atrofia es el punto fundamental en el proceso de la carcinogenesis.

Distintos estudios epidemiológicos han demostrado una asociación positiva entre la infección por *Helicobacter pylori*, la atrofia progresiva de la mucosa gástrica y la aparición del cáncer gástrico. Estas observaciones epidemiológicas han llevado a la

Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) a reconocer a *Helicobacter pylori* como una agente cancerígeno para el ser humano, y en la actualidad se considera que la infección por esta bacteria tiene un papel fundamental en la aparición de las lesiones histológicas que preceden al cáncer gástrico.

Sin embargo, los mecanismos responsables del proceso de carcinogénesis gástrica son desconocidos y posiblemente multifactoriales. En este sentido, se sabe que aunque todos los pacientes infectados por *Helicobacter pylori* desarrollan una gastritis crónica, tan sólo una parte de ellos se verán afectados por un carcinoma gástrico. Probablemente, esto se deba a la modulación del proceso inflamatorio por una serie de factores ambientales o dependientes de la virulencia de la bacteria, así como del desarrollo de diferentes respuestas inflamatorias dependientes del huésped.

Por tanto, el cáncer gástrico sería la consecuencia de un proceso inflamatorio iniciado por un agente infeccioso (*Helicobacter pylori*), y de la interacción de factores dependientes del huésped y de distintos factores ambientales, entre los que destaca la dieta.

1. CONSIDERACIONES GENERALES RESPECTO AL CÁNCER GÁSTRICO

Las estimaciones más recientes indican que actualmente esta neoplasia es el segundo tipo de cáncer más frecuente después del de pulmón. Aunque se ha observado una disminución progresiva en la incidencia de cáncer gástrico en la mayor parte de los países industrializados en las últimas décadas (Haenszel W, 1975), en muchas áreas la mortalidad por este tumor sigue siendo todavía muy elevada. En este sentido hay que tener en cuenta que a pesar de la disminución de su incidencia y del descenso de las tasas de mortalidad por esta neoplasia, el número absoluto de nuevos casos diagnosticados crece cada año, debido principalmente al aumento y al envejecimiento de la población, especialmente en los países desarrollados.

La incidencia de cáncer gástrico se caracteriza por presentar una elevada variabilidad según el área geográfica considerada (Parkin DM, 1992). Existen áreas en las que la incidencia es muy elevada como Costa Rica, Chile, Ecuador o Japón donde la mortalidad por este tumor supera los 80 casos por 100.000 habitantes y año, mientras que en otros países como Australia, Estados Unidos o Canadá presentan tasas inferiores a 10 casos por 100.000 habitantes (Whelan SL, 1993. Doll R, 1978. Miller AB, 1983. Miller AB, 1982. Wynder EL, 1976). En el hemisferio norte se ha descrito también una tendencia hacia un gradiente norte-sur en la incidencia describiéndose mayores tasas de incidencia en las zonas meridionales. En general, en los países de Europa occidental las tasas de mortalidad por esta enfermedad se encuentran entre estos dos extremos.

Sin embargo, los datos sobre la incidencia de estos tumores no pueden considerarse de forma global ya que se han observado variaciones muy notables a nivel regional dentro de un mismo país e incluso a nivel comarcal (Webb PM, 1995).

Estas diferencias en la distribución geográfica han permitido postular la importancia de ciertos factores ambientales en el desarrollo de este tumor.

En este sentido se han realizado distintos estudios epidemiológicos sobre el efecto de los movimientos migratorios de poblaciones desde zonas de bajo riesgo a otras de un riesgo elevado. En estos estudios se ha podido demostrar que la incidencia de cáncer gástrico se adapta en la segunda o tercera generación a la incidencia de la población nativa (Haenszel W, 1972 y 1961). Se ha observado también que estos cambios no llegan a afectar a la población que emigra en la edad adulta a estas zonas. Esta influencia de la migración en la incidencia del cáncer gástrico viene a sugerir que la exposición a ciertos agentes etiológicos a una edad temprana desempeña un papel muy importante en el desarrollo de esta enfermedad (Correa P, 1985).

La mayoría de los estudios epidemiológicos han demostrado que las tasas más elevadas de cáncer gástrico se encuentran en las clases sociales de menor nivel socio-económico (Howson CP, 1986) lo que apoya la hipótesis de que los factores exógenos, sobre todo nutricionales, desempeñan un importante papel en su etiopatogenia.

A pesar de la disminución progresiva en la incidencia de cáncer gástrico en los países industrializados en los últimos años, se ha descrito un aumento progresivo en la tasa de los tumores de la zona cardial lo que sugiere que las neoplasias de esta localización tienen un comportamiento biológico diferente (Blot W, 1991. Kabat G, 1993. Clark G, 1994).

2. TIPOS HISTOPATOLÓGICOS DE CÁNCER GÁSTRICO

La mayor parte de los tumores primarios del estomago se generan a partir del epitelio gástrico aunque también pueden encontrarse otros que se forman a partir del músculo, el tejido adiposo y las células linfoides del estómago.

Dentro de las neoplasias gástricas, la variedad más frecuente es el adenocarcinoma que representa más del 90% del total.

Dentro del adenocarcinoma se distinguen dos entidades histopatológicas bien diferenciadas, denominadas cáncer gástrico de tipo intestinal o expansivo y el tipo difuso o infiltrativo. Además de las diferencias histológicas que caracterizan a estos tumores, se ha observado que ambos tipos presentan varias diferencias no sólo en cuanto a su comportamiento biológico y sino también desde el punto de vista epidemiológico (Lauren P, 1993).

2.1 ADENOCARCINOMA DE TIPO INTESTINAL

El cáncer tipo intestinal se origina con frecuencia a partir de la mucosa antral y suele presentarse como lesiones ulceradas. Desde el punto de vista histológico presenta estructuras glandulares bien definidas, similares a las del adenocarcinoma colónico y que forman nódulos de crecimiento expansivo caracterizados por su cohesión celular. Generalmente en el vértice apical, las células contienen una vacuola de mucina, que posteriormente se deposita en la luz glandular. Esta variedad histológica es más frecuente en las áreas geográficas de mayor incidencia de cáncer gástrico (Muñoz N, 1968), aparece a una edad más avanzada, con una mayor frecuencia en varones y se asocia a determinados condicionantes que sugieren que existe un importante componente ambiental en su génesis

2.2 ADENOCARCINOMA DE TIPO DIFUSO

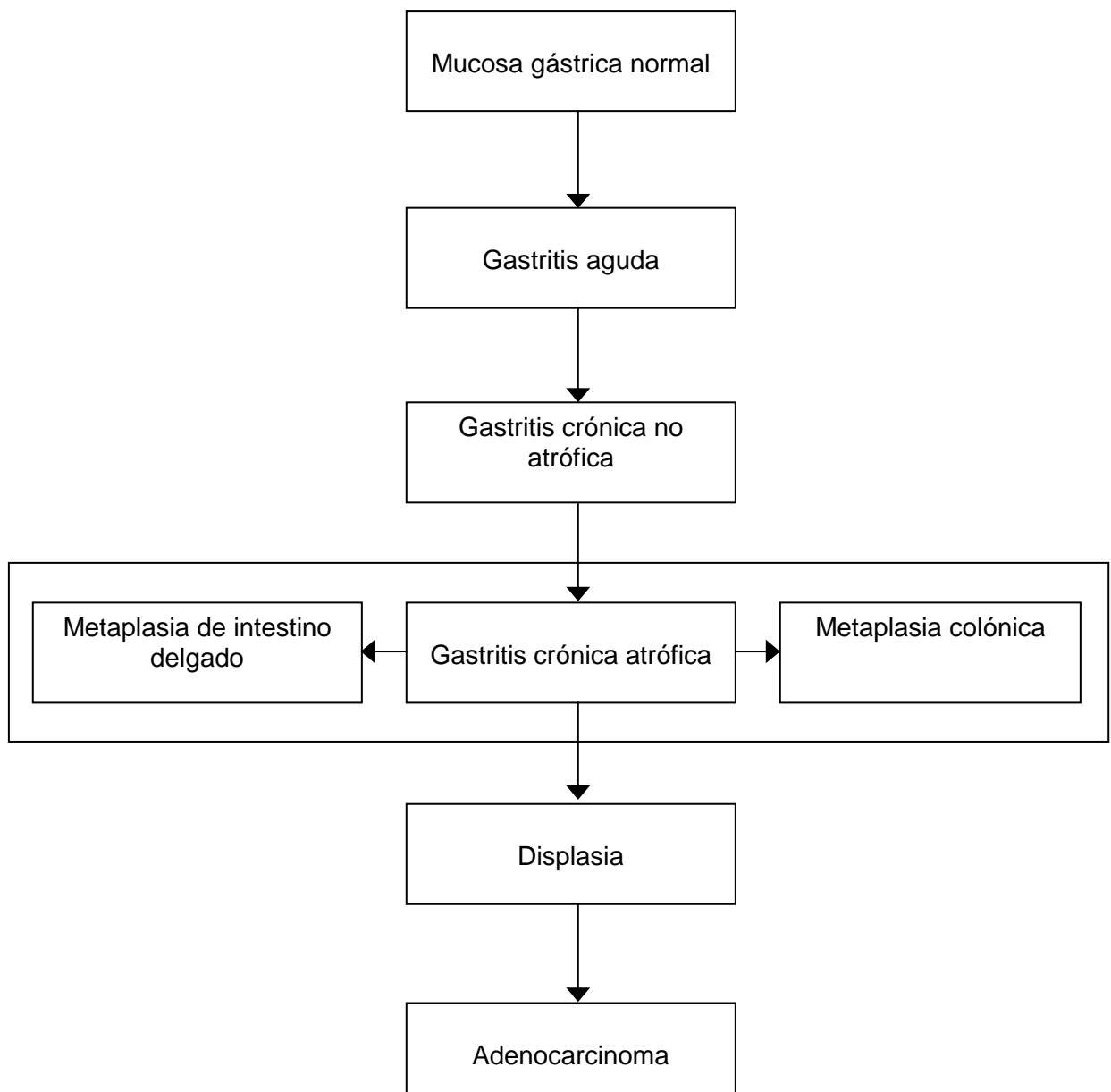
El carcinoma de tipo difuso puede desarrollarse en cualquier localización del estómago, aunque con preferencia a nivel del cardias, aparece a menudo en personas más jóvenes y en general se considera de peor pronóstico. En la génesis de este tipo histológico se sospecha que interviene un factor hereditario, ya que se asocia al grupo sanguíneo A y presenta una asociación familiar fuerte. Histológicamente el carcinoma tipo difuso se caracteriza por la presencia de cúmulos de células con escasa cohesión entre ellas, que presentan abundantes mucinas citoplasmáticas PAS positivas que rechazan el núcleo y que forman las características células en anillo de sello (Lauren PA, 1993).

3. SUSTRATO ANATOMOPATOLÓGICO. DE LA GASTRITIS AL CÁNCER:

SECUENCIA DE CORREA

Pelayo Correa propuso una hipótesis de carcinogénesis gástrica que actualmente es comúnmente aceptada y que sugiere que la variedad intestinal del adenocarcinoma gástrico es el resultado final de la progresión de unas lesiones histológicas previas consideradas como preneoplásicas.

Este proceso que se conoce como la secuencia de Correa (Correa P, 1988) queda esquematizado en la figura siguiente.



En este modelo, la gastritis crónica progresivamente evoluciona a atrofia y a metaplasia intestinal.

En algunos sujetos el epitelio metaplásico, bajo la influencia de alteraciones genómicas y fenotípicas, evoluciona a la displasia y posteriormente puede progresar a una neoplasia invasiva. Recientemente, el paradigma ha sido modificado al insertar a *Helicobacter pylori* al comienzo de la secuencia (Correa P, 1991 y 1992).

3.1. GASTRITIS

El término general de gastritis se ha utilizado de forma profusa, y en ocasiones erróneamente, para describir desde cuadros clínicos hasta alteraciones macroscópicas de la mucosa gástrica vistas por endoscopia. En sentido estricto este término sólo debería utilizarse para hacer referencia a las alteraciones anatomopatológicas ocurridas sobre la mucosa gástrica (Green LK, 1990). La mayoría de los autores, basándose en la clasificación de Whitehead (Whitehead R, 1972 y 1985), distinguen cinco categorías en función del grado de distorsión morfológica de la mucosa y de la hiperplasia foveolar: mucosa normal, gastritis superficial, gastritis crónica sin/con atrofia y metaplasia intestinal. La gastritis se considera “crónica” cuando existen células mononucleares en la lámina propia, fundamentalmente linfocitos y células plasmáticas y “activa” si existe un infiltrado de leucocitos polimorfonucleares.

3.2. GASTRITIS CRÓNICA

Los componentes básicos de la gastritis crónica son la degeneración epitelial, el infiltrado inflamatorio, la atrofia glandular y la metaplasia intestinal.

- La degeneración epitelial es un hallazgo constante en grado variable en la gastritis crónica.
- El infiltrado inflamatorio puede ser agudo o crónico y está constituido por neutrófilos o células plasmáticas y linfocitos, respectivamente. El grado de inflamación aguda determina el grado de actividad de la gastritis. En general, la intensidad de la inflamación se correlaciona de forma directa con la densidad de la colonización por *Helicobacter pylori* (Sobala GM, 1993. Bayerdörffer E, 1992). La presencia de folículos linfoides es característica de la gastritis asociada a *Helicobacter pylori* (Genta R, 1983).
- La atrofia glandular consiste en la pérdida de tejido glandular que produce un adelgazamiento de la mucosa gástrica. Esta pérdida debe referirse a glándulas “apropiadas”, es decir, a las propias de la mucosa de una determinada área del estómago (Owen DA, 1986). El lugar de las glándulas puede ser ocupado por fibrosis, o por otro tipo de glándulas “inapropiadas”, es decir, de un tipo que no debería estar en esa localización (Genta RM, 1995). En el antro, en la zona prepilórica las glándulas nativas son mucosas, mientras que en el cuerpo las glándulas son oxínticas. El cardias puede considerarse similar al antro, mientras que una mezcla de los dos tipos de glándulas se encuentran en la zona transicional.
- En la metaplasia intestinal se produce una sustitución del epitelio gástrico normal por células de tipo intestinal.

3.3. GASTRITIS CRÓNICA CON METAPLASIA INTESTINAL

En la metaplasia intestinal las células mucosas del epitelio normal se reemplazan por otras similares a las células del intestino, generalmente con un fenotipo de intestino delgado, y menos frecuentemente similar a las de intestino grueso. En dependencia del tipo celular existente y de la expresión de las distintas mucinas se distinguen tres tipos de metaplasia intestinal:

- **Metaplasia intestinal tipo I**

La metaplasia intestinal tipo I es la forma más frecuente de metaplasia y se relaciona con la de tipo intestino delgado o completa. Se caracteriza por la presencia de células columnares maduras no secretoras que muestran un borde en cepillo bien definido, por células caliciformes de vacuola única que secretan sialomucinas y por algunas células de Paneth.

- **Metaplasia intestinal tipo II**

En este tipo de metaplasia, las criptas presentan un grado intermedio de distorsión de la arquitectura y las glándulas son más irregulares con células columnares con distintos grados de maduración y que secretan mucinas neutras o pequeñas cantidades de sialomucinas.

- **Metaplasia intestinal tipo III**

La desestructuración de la arquitectura de las criptas y la presencia de células columnares con un mayor grado de desdiferenciación y atipia son características de esta forma de metaplasia. Los enterocitos absortivos típicos pierden el borde

en cepillo definido y son reemplazados por células columnares que secretan sulfomucinas y por células caliciformes que muestran grandes vacuolas de diferentes tamaños y que secretan tanto sulfomucinas como sialomucinas.

La metaplasia intestinal de tipo colónica o incompleta incluye los tipos II y III de metaplasia.

3.4. DISPLASIA

En los últimos años se han podido objetivar considerables diferencias en la prevalencia de la displasia epitelial gástrica que probablemente son un reflejo de las diferencias en los criterios morfológicos usados para su diagnóstico y gradación. A la hora de definir la displasia se tienen en cuenta criterios citológicos (atipia, estratificación y pérdida de la polaridad nuclear) y arquitecturales (ramificación, crecimiento papilar o adosado de las glándulas). La clasificación más empleada divide a las displasias en dependencia de las alteraciones citológicas y arquitecturales en displasias de bajo y alto grado. La displasia de alto grado se considera sinónimo de carcinoma in situ y es difícil encontrarla de forma aislada.

Desde 1998, siguiendo la clasificación de Padua se puede también estratificar a la displasia en 5 grupos:

1. Negativo para displasia. Este grupo incluye a la mucosa normal, a la hiperplasia reactiva foveolar y a la metaplasia intestinal.

2. Indefinido para displasia. En estos casos se observa un gradiente de maduración desde las capas más profundas de la mucosa que ayuda a distinguir los artefactos propios de un material de biopsia inadecuado (Torrado J, 2000. Haggitt RC, 1994. Levine DS, 1993).
3. Neoplasia no invasora. Incluye a la displasia de alto y bajo grado. Algunos autores, incluso en ausencia de invasión de la lámina propia consideran a las displasias de alto grado como carcinoma.
4. Sospechoso de cáncer gástrico invasor. Se considera una lesión irreversible y subsidiaria de resección aunque no se compruebe la existencia de invasión (Rugge M, 1994).
5. Carcinoma invasor. Se recomienda la resección quirúrgica siempre que sea posible.

4. ETIOPATOGENIA DEL CÁNCER GÁSTRICO

En un principio se pensó que los mayores determinantes del microambiente gástrico que favorecían la transformación de células neoplásicas eran de naturaleza dietética.

Algunas observaciones epidemiológicas posteriores, como las importantes variaciones geográficas en la incidencia de este tumor (Parkin DM, 1992), su tendencia temporal decreciente (Haenszel W, 1975), y las claras variaciones del riesgo en las poblaciones que emigran (Haenszel W, 1972), sugirieron la influencia de otros factores ambientales en el proceso de la carcinogénesis gástrica (Correa P, 1985).

Se observó también que las variaciones en la incidencia de cáncer gástrico se producen sobre todo a expensas de la forma intestinal ya que la fracción atribuible al subtipo difuso permanece más constante, lo que puede sugerir una mayor influencia de los factores ambientales en la génesis del cáncer gástrico de tipo intestinal.

Por otra parte, desde hacía décadas se conocía la existencia de una asociación clara y constante entre cáncer gástrico y gastritis (Siurala M, 1981). En un primer momento las investigaciones se centraron en la epidemiología de la gastritis y en su asociación con distintos factores ambientales y en especial con la dieta.

Posteriormente distintos estudios han confirmado que *Helicobacter pylori* es la causa principal de gastritis crónica (Hu PJ, 1994). En la mayoría de los pacientes, la gastritis crónica no provoca enfermedad clínica, lo que sugiere que la agresión de

Helicobacter pylori sobre la mucosa gástrica está modulada a su vez por otros factores etiológicos.

Por otra parte, las evidencias epidemiológicas que relacionan esta bacteria con el cáncer gástrico, aun siendo altamente sugestivas, resultan menos claras (Parsonnet J, 1991. Forman D, 1991. Nomura A, 1991).

4.1. FACTORES AMBIENTALES

La influencia de las migraciones en la incidencia del cáncer gástrico sugiere que la exposición a un agente etiológico de forma temprana en la vida puede ser responsable de esta enfermedad, aunque la naturaleza de este agente todavía no ha sido aclarada (Correa P, 1985. Haenszel W, 1961 y 1972).

Dado que el estómago es el primer punto de contacto prolongado con los alimentos, distintas sustancias de la dieta han sido incriminadas como potenciales carcinógenos. A pesar de la dificultad para la realización de estos estudios basados en el análisis retrospectivo de los hábitos dietéticos en edades tempranas, se ha sugerido una relación entre el consumo de determinados alimentos y el cáncer gástrico.

Distintos estudios sugieren una asociación aumentada entre esta enfermedad y una alimentación rica en sal y en alimentos ahumados, hidratos de carbono refinados, cereales, tubérculos y determinadas conservas (Li JY, 1989. Chen VW, 1990. Henderson BE, 1990). De forma opuesta, el consumo de vitamina C, de carotenos y de calcio parece ejercer un efecto protector en la génesis del cáncer gástrico (Blot WJ, 1993).

Por otra parte, la ingesta de leche entera, el consumo de verduras y frutas frescas, especialmente cítricos y el uso de frigoríficos parecen asociarse también de forma inversa con el cáncer gástrico (Steinmetz KA, 1991).

No se ha establecido una relación clara entre el consumo de alcohol o tabaco y un aumento del riesgo de adenocarcinoma gástrico (Chyou P, 1990. Nomura A, 1990. Kneller R, 1992). Si bien parece existir una relación establecida entre el benzopireno, el asbesto, el cloruro de vinilo y el cromo con el cáncer de estómago.

Otras sustancias que se han involucrado potencialmente en el desarrollo del cáncer gástrico son los nitratos y los nitritos, si bien esto no ha podido ser confirmado en todos los estudios (Beresford SAA, 1985). Los nitratos forman parte habitual de nuestra dieta y se encuentran fundamentalmente en las verduras, la carne curada y el agua.

Muchos compuestos nitrosos, algunos derivados de la nitrosación de alimentos como las habas y la col china, son mutágenos y carcinógenos potenciales (Wakabayashi K, 1985. Yang D, 1984).

Los nitratos de la dieta son convertidos a nitritos, los que posteriormente pueden ser nitrosados, es decir, combinados con aminas y amidas, para formar nitrosaminas y nitrosamidas. Los componentes nitrosos son conocidos carcinógenos gástricos en estudios experimentales en animales (Sugimura T, 1978), y aunque no se han establecido definitivamente como causa de cáncer gástrico en el hombre, existen evidencias circunstanciales que pueden apoyar esta hipótesis.

En este sentido se ha observado una alta concentración de nitratos en el suelo y en el agua de ciertas regiones con tasas elevadas de mortalidad por cáncer gástrico, aún cuando algunos estudios realizados en Gran Bretaña no lo han confirmado (Beresford SAA, 1985). Se ha comprobado un incremento de bacterias formadoras de nitritos en el tracto gastrointestinal de poblaciones con secreción reducida de ácido clorhídrico por el estomago, lo cual no es infrecuente en personas con cáncer gástrico o con predisposición a padecerlo (anemia perniciosa y gastritis atrófica) (Ruddell WSJ, 1978).

Se piensa que la reducción del ácido permite la colonización del estomago por bacterias catalizadoras de las reacciones de N-nitrogenación. La atrofia lleva a una disminución de la secreción de ácido clorhídrico y pepsina, con la consecuente elevación del pH gástrico y exceso de crecimiento de las bacterias anaeróbicas dentro del lumen gástrico. Muchas de estas bacterias tienen reductasas que convierten los nitratos en nitritos, con el potencial de generar compuestos de N-nitroso incluso con pH gástricos altos (Keefer LK, 1973).

Se ha confirmado también una elevación de las concentraciones de nitritos y nitrosaminas en pacientes sometidos a cirugía gástrica, circunstancia que también se ha relacionado con el cáncer gástrico (Schalg P, 1980).

Algunos estudios han demostrado una elevada concentración de nitritos en los sujetos con cáncer gástrico (Ruddell WSJ, 1976. Hall CN, 1986) respecto a los pacientes con úlcera y los controles. Dado que las bajas temperaturas inhiben la conversión de los nitratos en nitritos, la generalización del uso de los frigoríficos y la menor

utilización secundaria de productos químicos para la conservación de los alimentos podría justificar en parte la reciente disminución del carcinoma gástrico.

Otros estudios han establecido también una relación inversa entre el consumo de fibra y el riesgo de cáncer gástrico basada en la reducción de la concentración de nitritos en estomago derivada de su consumo (Lyon JL, 1983).

Los alimentos ricos en vitamina C, tales como los cítricos parecen tener un efecto protector en la génesis del cáncer gástrico. El ácido ascórbico, la forma reducida de la vitamina C, es un potente antioxidante de importancia potencial en la prevención del cáncer gástrico (Mirvish SS, 1986. Kyrtopoulos SA, 1987), si bien se sabe poco acerca de los factores que afectan su concentración.

Se ha comprobado en estudios caso control y en muestras amplias de población que la ingesta elevada de alimentos ricos en vitamina C se asocia con una reducción de la incidencia de cáncer gástrico (Haenszel W, 1972. Graham S, 1972. Bjelke E, 1979. Cuello C, 1976).

El ácido ascórbico tiene un potencial antioxidante bien conocido, lo cual podría tener un papel crucial anticarcinogénico previniendo la oxidación del DNA.

El ácido ascórbico es transportado activamente de la sangre al lumen gástrico (Sobala GM, 1989). Los mecanismos mediante los cuales tiene lugar esta transferencia, al igual que su función, son desconocidos.

Existen estudios recientes que sugieren que la vitamina C es secretada activamente en estómago por un mecanismo independiente de la secreción ácida, y se ha observado que este proceso se encuentra alterado en algunas patologías como la gastritis crónica.

Se ha comprobado también que los pacientes con hipoclorhidria tienen una reducción marcada en el total de vitamina C gástrica y en los niveles de ácido ascórbico.

Se ha observado también que los individuos infectados por *Helicobacter pylori* tienen menores concentraciones de ácido ascórbico en el jugo gástrico que los no infectados. Después del tratamiento efectivo de la infección, la concentración de ácido ascórbico en el jugo gástrico aumenta a niveles similares a individuos no infectados (Ruid B, 1994).

No se ha determinado todavía si los niveles bajos de ácido ascórbico en el jugo gástrico de los individuos infectados refleja una disminución de la secreción o un aumento de la oxidación de ácido ascórbico después de que alcanza el lumen gástrico.

El primer mecanismo está apoyado por el hecho de que los bajos niveles de ácido ascórbico en el jugo gástrico están relacionados con la extensión del daño a las células epiteliales (que se observa más claramente por la pérdida de mucus) causado por la infección por *Helicobacter pylori*. Esta asociación continúa siendo

importante en análisis con multivariables después de controlar otros factores que pueden producir el mismo efecto, como niveles de ácido ascórbico en el plasma, la atrofia de la mucosa, el grado y tipo de infiltrado inflamatorio, la existencia de úlcera péptica y el pH gástrico (Ruid B, 1994. Eood JC, 1994).

Un mecanismo basado en el aumento de la oxidación está apoyado por el hecho de que en el mismo análisis de multivariables el pH gástrico muestra un efecto independiente, reduciendo la concentración de ácido ascórbico en el lumen gástrico. Es posible que ambos mecanismos operen para disminuir la disponibilidad de ácido ascórbico en el lumen gástrico, interfiriendo así con su capacidad oxidante. Un ejemplo de este efecto está en el hecho de que el ácido ascórbico, pero no su forma oxidada, reacciona con el nitrito gástrico, bloqueando la capacidad de sintetizar compuestos nitrosos en el lumen gástrico.

Los nitratos pueden reaccionar con las aminas y amidas de la dieta para crear compuestos N-nitroso directamente a pH 4 (Mirvish SS, 1975) o catalizados por bacterias reductoras a pH alto (Calmels S, 1985). El ácido ascórbico se adapta mejor que otros antioxidantes a la formación de compuestos nitrosos ya que el pH óptimo al que reacciona es 4, aproximadamente el encontrado en el estómago postprandial (Mirvish SS, 1972).

4.1.1. HELICOBACTER PYLORI

En 1982, Warren y Marshall describieron la presencia en la mucosa gástrica de un tipo de bacteria curva y espirilar y basándose en sus características morfológicas la denominaron *Campilobacter pyloridis*.

Estudios posteriores determinaron diferencias importantes de este microorganismo con el género *Campilobacter*, lo que determinó la creación del nuevo género bacteriano llamado *Helicobacter*. Desde entonces, esta bacteria que parecía tener una elevada predilección por la capa de moco gástrica pasó a denominarse *Helicobacter pylori* (Goodwin CS, 1989).

En los últimos años, la determinación del papel etiológico y fisiopatológico de *Helicobacter pylori* en la enfermedad péptica gastroduodenal ha supuesto una revolución en el mundo de la gastroenterología.

Distintos estudios han demostrado que esta bacteria tiene una elevada prevalencia y se considera un patógeno reconocido que infecta de forma crónica a más del 50% de la población humana mundial.

Aunque distintos estudios han demostrado que *Helicobacter pylori* es sensible a varios antibióticos in vitro, ha sido necesario ensayar varias pautas antibióticas, asociadas a fármacos antisecretores para conseguir la erradicación de esta bacteria in vivo.

4.1.1.1. Aspectos microbiológicos de Helicobacter pylori

4.1.1.1.1. Microbiología de H. Pylori y estructura de su pared

Helicobacter pylori es un bacilo curvo gramnegativo, microaerófilo, catalasa y oxidasa positivo, de pequeño tamaño (3 x 0.5 micras aproximadamente), y que se caracteriza por su potente actividad ureasa. Helicobacter pylori fermenta la glucosa y otros hidratos de carbono como el fumarato para generar ATP, es decir, energía metabólica (Mendz GL, 1993). La mayoría de los bacilos son móviles ya que presentan varios flagelos polares cubiertos por una envoltura, con una estructura terminal en forma de bulbo.

En condiciones adversas, Helicobacter pylori adopta formas cocoides, que se consideran formas latentes de la bacteria, es decir, formas de resistencia a los agentes externos (Goodwin CS, 1993).

La pared celular de Helicobacter pylori consta de una membrana interna y una externa en la que se han descrito varias proteínas y porinas.

Por último, la pared presenta también un lipopolisacarido con actividad inmunológica débil y que induce la producción de algunas citoquinas proinflamatorias.

4.1.1.1.2. Características del genoma

Helicobacter pylori posee un pequeño genoma (1,6 -1,73 Mb), incluido en un solo cromosoma circular, que contiene un pequeño número de genes para su metabolismo, y tan solo cuatro sistemas de regulación, que le permiten vivir durante décadas en el estómago humano.

Se ha demostrado que este microorganismo tiene una gran diversidad genética, con una variación en su secuencia de nucleótidos del 3% al 5% y aunque las marcas genéticas de la bacteria se mantienen a lo largo de los años, la bacteria se encuentra en continua evolución.

La diversidad en muchos de sus locus es atribuible a sustituciones aparentemente aleatorias de nucleótidos (microdiversidad), pero en otras ocasiones proviene de deleciones, duplicaciones, transferencias horizontales o reagrupamientos cromosómicos (macrodiversidad), lo que supone un fenómeno novedoso dentro de las bacterias gramnegativas (Logan RP, 1996).

Existe una evidencia progresiva que indica que *Helicobacter pylori* tiene una estructura recombinacional (Suerbaum S, 1999), lo que determina que la cepa residente puede intercambiar material genético con otras cepas transitorias de la bacteria en el estómago. De esta manera, *Helicobacter pylori* podría adaptarse a los cambios en la ecología del estomago por medio de variaciones detectables a nivel genómico (Blaser MJ, 1997).

Sin embargo, esto no significa que el genoma del *Helicobacter pylori* sea inestable. Al contrario, se ha visto que su capacidad de recombinación tiende a eliminar las variaciones clonales o alélicas (Blaser MJ, 1999) con lo que las cepas mantienen sus caracteres durante meses o años.

4.1.1.1.3. Factores de virulencia y patogenicidad de *H. pylori*

Los estudios sobre los factores de virulencia bacteriana se han basado en determinar si existen ciertas cepas de *Helicobacter pylori* más virulentas que otras y si esto es así, relacionar estas con un papel patogénico lógico en el desarrollo de enfermedad.

4.1.1.2. Factores de colonización de la mucosa gástrica

4.1.1.2.1. Flagelos

Uno de los factores esenciales en la colonización de la mucosa gástrica es la movilidad de la bacteria. Los flagelos permiten a la bacteria desplazarse a través de la viscosidad del moco gástrico y así alcanzar la zona inferior de pH más neutro. En este sentido, se ha observado que en modelos experimentales de cerdos, las bacterias defectivas para los genes flagelares son incapaces de colonizar la mucosa gástrica (Eaton KA, 1989).

Helicobacter pylori tiene de cinco a siete flagelos unipolares cubiertos por una envoltura, formada por una doble capa de fosfolípidos, que la protege de la acidez del estómago y una terminación en forma de bulbo de la que se desconoce su función.

Estos flagelos están formados por dos subunidades poliméricas que se denominan flagelina principal (FlaA) y flagelina menor (FlaB). Se han descrito variaciones alélicas en los genes que codifican estas subunidades lo que podría comportar diferencias en la motilidad de las cepas de *Helicobacter pylori*, aunque no ha podido demostrarse que esta variabilidad posea relevancia clínica (Leying H, 1992. Suerbaum S, 1993).

En el genoma de *Helicobacter pylori* se han observado también otros genes relacionados con la formación, secreción y ensamblado de los flagelos, entre los que destaca el gen flgE, flgK y fliD (O'Toole PW 1994) que codifican proteínas de unión del flagelo a las células.

Otras proteínas relacionadas con la motilidad de la *Helicobacter pylori* son las proteínas MotA y MotB (Berry M, 1999) y la proteína codificada por el gen flbA.

4.1.1.2.2. Quimiotaxis

En los últimos años se ha postulado que la quimiotaxis puede tener un papel fundamental en la colonización de la mucosa gástrica por *Helicobacter pylori*. Recientemente se han descrito genes asociados con quimiotaxis que sugiere que el *Helicobacter pylori* puede reptar hacia estímulos positivos y evitar las sustancias tóxicas (Worku M, 1997. Yoshiyama H, 1997. Nakamura H, 1998).

Entre las distintas moléculas relacionadas con la quimiotaxis destaca la proteína activadora de neutrófilos (NAP) que es una proteína oligomérica compuesta de unas 10 a 12 copias de un polipéptido de 17k-D y que está relacionada con las proteínas transportadoras de hierro. Como su nombre indica, esta proteína tiene la capacidad de activar los neutrófilos y parece estar implicada en el reclutamiento de estas células hacia la mucosa gástrica, lo que contribuiría a la respuesta inflamatoria.

Es posible diferenciar dos tipos distintos de cepas de *Helicobacter pylori* según su comportamiento en base a la activación directa de los neutrófilos en cultivos. Uno de los grupos induciría una fuerte y rápida reacción oxidativa mientras que el otro presentaría una activación más lenta y suave.

4.1.1.2.3. Adhesinas

Una vez que *Helicobacter pylori* pasa la barrera de moco, un pequeño porcentaje de bacterias se unen íntimamente a la superficie de las células del epitelio gástrico (Hessey S, 1990. Lee A, 1993). Se ha visto que la unión de la bacteria al epitelio comporta modificaciones del número de microvilli y del citoesqueleto de la célula epitelial (Smoot DT, 1993).

La adhesión de *Helicobacter pylori* a las células del epitelio gástrico además de permitir una transferencia eficiente de toxinas bacterianas a la célula huésped, ayuda a la bacteria protegerse de la acción de los mecanismos defensivos locales inespecíficos, como el peristaltismo, la actividad ciliar, el turnover celular y la capa de moco.

Las moléculas bacterianas implicadas en la adhesión son diversas y no todas se conocen con precisión. La mayoría de ellas son glucoconjugados (glucolípidos o glucoproteínas), por lo que tienen una gran variabilidad isomérica. Dado que la colonización bacteria es muy específica para la mucosa gástrica todo parece indicar que existen también unos factores de adherencia específicos del epitelio (Saitoh T, 1991. Krivan HC, 1992).

En este sentido, se han descrito las proteínas Alp, que se encuentran dentro de la membrana externa de *Helicobacter pylori* y no están presentes en todas las cepas del microorganismo (Odenbreit S, 1999. Suerbaum S, 1999).

La adhesina mejor caracterizada en *Helicobacter pylori* es una proteína (BabA) que se une al antígeno b de Lewis que predomina en la superficie del epitelio gástrico. (Ilver D, 1998). A nivel experimental, se ha observado la unión de *Helicobacter pylori* in vitro a las células que expresan el antígeno Le^b, pero no a las que expresan otros antígenos (Wadström T, 1996).

Sin embargo, la contribución de este antígeno expresado en el epitelio gástrico en la adhesión de *Helicobacter pylori* sigue siendo un tema controvertido. Se ha observado que los liposacáridos de algunas cepas de *Helicobacter pylori* contienen estructuras idénticas a los antígenos fucosilados de los grupos sanguíneos de Lewis x y de Lewis y expresados en la mucosa gástrica, lo que podría suponer una tolerancia inmunológica a los patógenos o una inducción de autoanticuerpos que reconocen las células epiteliales, lo que se observa con frecuencia en pacientes con gastritis crónica activa (Appelmelk BJ, 1997).

Entre las observaciones que ponen de manifiesto la importancia patogénica de la adhesividad de *Helicobacter* destaca el hecho de que la intensidad de los fenómenos de adhesión de la bacteria al epitelio gástrico está relacionada con la gravedad de las lesiones histológicas (Caselli M, 1989. Noach LA, 1994).

4.1.1.2.4. Enzimas de *Helicobacter pylori*

4.1.1.2.4.1. Ureasa

Cuando *Helicobacter pylori* entra en el estómago se enfrenta a una gran cantidad de ácido. *Helicobacter pylori* no es acidofílico, es decir, no crece, ni siquiera sobrevive a pH bajo, por lo que debe protegerse del ácido. La hidrólisis de la urea proporciona a la bacteria amonio que neutraliza el ácido clorhídrico del estómago. El desarrollo de esta transitoria aclorhidria genera un microambiente neutro durante un tiempo que permite al *Helicobacter pylori* excavar a través del moco gástrico hasta un sitio más hospitalario.

La ureasa tiene un peso molecular de 540 kD y está formada por dos subunidades (UreA y UreB), unidas por dos iones de níquel, que se acoplan para formar un hexámero. Es uno de los pocos metaloenzimas que contienen níquel en la naturaleza y necesita este catión bivalente en un lugar específico para actuar.

La presencia de la enzima ureasa es esencial para la supervivencia de *Helicobacter pylori* y para la colonización de la mucosa gástrica. En estudios experimentales se ha comprobado que los mutantes desarrollados como ureasa-negativos son incapaces de colonizar la mucosa gástrica en modelos animales (Eaton KA, 1994).

También hay evidencias de que la ureasa tiene una capacidad quimiotáctica directa para los leucocitos lo que produce un aumento de la inflamación. En tinciones inmunocitoquímicas se ha observado que la ureasa entra en estrecha asociación con las células de las criptas donde atrae los leucocitos y provoca la inflamación. El reclutamiento de células inflamatorias produce secreción de citokinas y liberación de moléculas reactivas de oxígeno, que provocan un daño indirecto en el epitelio gástrico (Suzuki M, 1992).

Existen datos que sugieren que el amonio puede tener también un efecto citotóxico local, ya que la unión del amonio con el agua produce hidróxido de amonio que es un citotóxico directo. Además se ha propuesto que el amonio puede interferir con la retrodifusión de hidrogeniones a través de la mucosa, provocando citotoxicidad (Hazell SL, 1986). En este sentido, se ha comprobado que la adición de inhibidores de la ureasa a los cultivos celulares mejora la viabilidad de estos (Barere MR, 1988. Smoot DT, 1990).

También existen estudios que demuestran que el hidróxido de amonio impide el ciclo de progresión de las células epiteliales, causando un retraso en la progresión de las células desde la fase-S (turnover).

Se postula también que *Helicobacter pylori* podría utilizar el amonio resultante de su acción ureasa como fuente de nitrógeno para la síntesis de las proteínas necesarias para la adhesión bacteriana.

4.1.1.2.4.2. Catalasa

Esta enzima se encuentra en todas las cepas y es la responsable de la eliminación de los radicales libres de oxígeno, especialmente peróxido de hidrógeno, generados por los neutrófilos en la mucosa gástrica, lo que permite a la bacteria adaptarse mejor al ambiente.

4.1.1.2.4.3. Proteasas y lipasas

Estas enzimas favorecen la colonización de la bacteria al disminuir la viscosidad del moco gástrico y romper los lípidos de la mucosa.

4.1.1.3. Factores relacionados con el daño tisular

4.1.1.3.1. VacA

A pesar de que sólo un 50% de las cepas muestran una actividad citotóxica detectable, el gen VacA está presente en todas las cepas de *Helicobacter pylori*. La VacA forma parte de un complejo multimérico biológicamente activo, de aproximadamente 100kD y que contiene al menos dos partes variables (Leunk RD, 1988. Phadnis SH, 1994).

Estudios experimentales efectuados en animales de laboratorio indican que VacA desempeña un papel prominente en la inducción del daño epitelial causado por la infección. Esta citotoxina, que es activada por la exposición a un pH bajo, causa la degeneración vacuolar de las células diana al interferir con la fusión intracelular de membranas. Las vacuolas parecen ser un híbrido entre los lisosomas y los compartimentos endosómicos. Mas recientemente, se ha demostrado que esta toxina reduce también la resistencia transepitelial por pérdida de uniones estrechas.

Se han descrito unas zonas variables y otras conservadas en la estructura del gen *vacA*. Las zonas variables se encuentran especialmente en su región central (m1, m2, m1-like y m1-like-m2) y en la región que codifica el péptido señal (s1 y s2). En las cepas s1 se han identificado tres subtipos (Van Doorn LJ, 1998): s1a, s1b y s1c y dos en el tipo m2: m2a y m2b (Van Doorn LJ, 1998). La estructura final es la de un mosaico y es posible encontrar todas las combinaciones excepto s2/m1.

4.1.1.3.2. Isla de patogenicidad cagA

El gen *cagA* está presente en los países occidentales en sólo un 60-70% de las bacterias aisladas (Tummuru MK, 1993. Miehlike S, 2000) y su presencia se asocia con la expresión de actividad vacuolizante de la citotoxina.

El producto del gen *cagA* es una proteína de membrana externa hidrofílica, con un peso molecular de entre 120K y 130K (Covacci A, 1993. Tummuru MK, 1993). La variación en el tamaño de la proteína CagA depende de la presencia de un número variable de secuencias repetidas en la región 3' del gen (Covacci A, 1993. Maeda S, 1997). Yamaoka et al comprobaron que las cepas con más de tres regiones repetidas en la región 3' del gen *cagA* se asociaban con un mayor daño histológico y con una supervivencia disminuida en medio ácido (Karita M, 1998. Yamaoka Y, 1999).

Además del gen *cagA*, se ha estudiado también la expresión de otros genes situados por delante del gen *CagA*, como los genes *picA* y *picB* (Tummuru MKR, 1995).

En la actualidad se sabe que tanto el gen *cagA* como los genes *picA* y *picB* forman parte (Censini S, 1996) de un islote de patogenicidad que contiene más de 40 genes, algunos de los cuales presentan homología con translocasas, permeasas o proteínas flagelares de otras especies bacterianas.

La isla patogenética *cag* se divide en dos partes (Maeda S, 1999): la región superior llamada *cagII* que contienen al menos 14 genes y la región inferior llamada *cagI* que contiene 16 genes. El gen *cagA* se localiza en la parte mas inferior de la región *cagI*. En algunas cepas, entre las dos regiones se interpone un segmento llamado "insertion secuencia 605" (IS605). Este segmento es una secuencia móvil que en algunas cepas puede interrumpir, mutilar, o incluso eliminar partes de la isla (Censini S, 1996).

Se ha postulado que IS605 fue adquirido por *Helicobacter pylori* con posterioridad al islote de patogenicidad *cag*, y es un requisito previo para las deleciones del *cag* (Atherton JC, 1999).

Se ha observado que estos genes tienen un contenido guanina-citosina diferente a otros genes de *H. pylori* por lo que se sospecha que pueden haber sido adquiridos a partir de otras especies de bacterias. Seis de los genes de la isla patogénica *cag* son homólogos de genes presentes en otras bacterias como: *Bordetella pertussis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila*, *Rickettsia prowazekii*, y *Bnicella suis*.

Todavía no está claro que es lo que esta isla patogenética codifica en su totalidad, pero se ha sugerido que puede tratarse de un sistema de secreción para otras proteínas o de un mecanismo de interacción íntima con las células epiteliales. La isla patogenética *cag* se ha relacionado también con la remodelación de la superficie celular con formación de pedestales, la fosforilación de algunas proteínas del huésped, así como la activación de algunos factores de transcripción, y de algunos protooncogenes.

4.1.1.3.3. Relación entre VacA, CagA y enfermedad gastroduodenal

Los estudios iniciales revelaron que *cagA* se hallaba presente en prácticamente la totalidad de las cepas aisladas en pacientes afectados de enfermedad ulcerosa, mientras que este porcentaje era muy inferior en individuos con gastritis crónica.

Este hallazgo, asociado al hecho de que la expresión de *CagA* coincidía en la mayoría de casos (Atherton JC, 1997. Tomb JF, 1997) con la existencia de actividad vacuolizante (*VacA*), promovió la clasificación de las cepas de *H. pylori* en dos tipos (I y II), en función de la presencia o ausencia de ambos factores de patogenicidad.

Se ha comprobado que la existencia de atrofia es más frecuente con la infección de cepas que expresan la citotoxina *VacA* y que su expresión es estadísticamente mucho más común cuando el gen *cagA* está también presente.

Varios estudios han comunicado que el fenotipo de *Helicobacter pylori* que expresa *cagA* causa mayores grados de inflamación aguda y crónica que los de fenotipo

cagA-, en función de su distinta capacidad para producir citocinas. De hecho, en la mayoría de los estudios se ha observado que la prevalencia de úlcera duodenal y el riesgo de desarrollar cáncer gástrico son significativamente más elevados en los pacientes infectados por cepas CagA+. (Crabtree JE, 1991 y 1995. Huang J. 1995. Sharma SA, 1995. Blaser MJ. 1994).

En Hawai (Maeda S, 1999) se observó que los japoneses de la isla infectados por cepas cagA+ desarrollaban con más frecuencia adenocarcinoma gástrico que aquellos con cepas CagA-. En Holanda los pacientes con cepas cagA+ desarrollaban gastritis atrófica y metaplasia intestinal, consideradas como precursoras del adenocarcinoma gástrico, más rápidamente que los CagA- (Kuipers E, 1995).

En un estudio realizado por Parsonnet et al (Parsonnet J, 1997) se determinó por ELISA la existencia de un anticuerpo frente a la proteína CagA en suero. Los pacientes infectados por ambos fenotipos de *Helicobacter pylori* parecían tener un riesgo mayor para desarrollar cáncer difuso pero sólo las cepas cagA+ presentaban un riesgo de sufrir cáncer de tipo intestinal considerablemente aumentado. Esto sugiere que los mecanismos de carcinogénesis imputados a la bacteria difieren en los dos tipos de cáncer.

Entre las razones que pueden explicar esta variación se piensa en la distinta predilección de las cepas para producir gastritis atrófica. En este sentido, un estudio reciente muestra que la evolución a atrofia es más frecuente con la infección por cepas que expresan esta citotoxina (Kuipers E, 1995. Basso D, 1998).

No se conoce cuales son las moléculas diana de la isla patogenética cag, ni como las señales que produce son integradas para aumentar la virulencia.

En humanos, hay una fuerte correlación entre la infección por microorganismo cagA y la incidencia de ulcera péptica y cáncer. La mayoría de los estudios comprueban el aislamiento de una sola colonia en cada paciente. Estos estudios indican que el 60 al 70 % son cagA+ salvo en casos excepcionales en Corea y Japón donde llegan casi al 100%.

Sin embargo, se ha visto que casi todos los pacientes están coinfectados por cepas cagA+ y cagA- con idénticas marcas genéticas. Esto sugiere que, durante la estancia en el estomago, las cepas escinden la isla patogenética cag y generan cepas cagA- isogénicas.

Dependiendo de las condiciones del huésped, las cepas cagA- permanecen en minoría, desaparecen o crecen temporalmente. De esta forma, existiría un equilibrio dinámico entre ambas cepas modulado por el huésped, con periodos alternantes de enfermedad y remisión. Dentro del estomago existirían distintas áreas donde la densidad y las poblaciones bacterianas serían diferentes.

En experimentos con animales infectados con varias cepas se ha visto que una cepa usualmente domina la infección crónica. Se ha visto también que existe un tipo de cepa que domina en cada especie animal existiendo por tanto, una especificidad para el huésped que puede ser muy relevante en el desarrollo de enfermedad.

Probablemente infecciones múltiples transitorias suceden mas comúnmente de lo que se pensaba, incluso en países desarrollados, lo que implica que el huésped puede estar repetidamente expuesto a una variedad de cepas de *Helicobacter pylori*.

Como los factores individuales pueden variar de un individuo a otro, puede ser importante determinar que cepa predomina en la infección.

También esto podría tener muy importantes implicaciones para el desarrollo de vacunas (Logan RP, 1996).

4.1.1.3.4. Otros factores que pueden influir en la colonización

- **IceA:** Este potencial factor de virulencia se ha descrito recientemente y se induce por contacto con el gen A epitelial. Al igual que el gen *vacA*, *iceA* se encuentra siempre presente, aunque exhibe una notable variación. En estudios preliminares parece que el *iceA* de las cepas más ulcerogénicas es distinto del existente en otras cepas.

- **Proteína inhibidora de ácido:** que puede inactivar la bomba de protones.

- **Sistema de adquisición de Fe:** indudablemente posee un sistema para adquirir Fe (celosamente guardado por el huésped) imprescindible para la formación de citocromos.

- **Proteínas de choque térmico:** estas proteínas pueden explicar la capacidad para tolerar transitoriamente las extremas condiciones que sufre la bacteria en las etapas precoces de la colonización.

- **Hemolisina:** se ha relacionado con la actividad hemolítica de la bacteria.

- **Proteína de 33-35 kD:** se ha relacionado con el aumento de la producción de interleukina 8 (Yamaoka Y, 1998).

4.1.1.4. Ligazón funcional de los factores de virulencia

Se ha visto que los factores de virulencia se encuentran a menudo asociados unos con otros. Así, por ejemplo, las cepas vacA s1 son con frecuencia toxigénicas y tienden a ser cagA+. La razón por la cual los factores de virulencia se encuentran asociados es todavía desconocida, particularmente en aquellos que se encuentran distantes en el cromosoma bacteriano (Tomb JF, 1997).

Si bien la estructura de *Helicobacter pylori* no parece ser predominantemente monoclonal, una posible explicación es que los determinantes de virulencia sean marcadores clonales de la bacteria. La presencia de mosaicismo en particular implica recombinación genética in vivo, lo que significa que unas cepas adquieren DNA de otras, mezclando su carga genética, algo similar a lo que ocurre con la reproducción sexual en los animales.

Otra posibilidad es que exista una forma de ligazón funcional, de forma que las asociaciones que observamos serían expresión de una mejor adecuación de *Helicobacter pylori* para la supervivencia (Blaser MJ, 1997*).

Factores bacterianos	Tipo de lesión
Enzimas: <i>lipasas, proteasas, ureasa</i>	Disrupción de la capa de moco Daño en las membranas celulares
Factores de virulencia: <i>cagA, vacA, GIF</i>	Daño directo epitelial Inducen muerte celular y apoptosis
Adherencia	Puede aumentar la captación de toxinas dentro de las células epiteliales gástricas.

4.1.1.5. Papel de la respuesta inflamatoria en la patogenia de las lesiones asociadas a Helicobacter pylori

A pesar de que diversas sustancias liberadas por *Helicobacter pylori*, como la ureasa o la citotoxina vacuolizante, pueden lesionar de forma directa la mucosa gástrica, existen múltiples evidencias que otorgan a la respuesta inflamatoria desencadenada por el germen un papel preponderante en la inducción del daño epitelial asociado a la infección.

Cuando *Helicobacter pylori* entra en contacto con la mucosa gástrica induce un proceso inflamatorio por un doble mecanismo. La adhesión de *Helicobacter pylori* al epitelio gástrico, además de producir un daño directo sobre la mucosa, resulta clave en la inducción de la liberación de mediadores proinflamatorios (Evans DG, 1992. Crabtree JE, 1994. Logan RP, 1996*).

La intensidad de la respuesta inflamatoria y la gravedad de las lesiones asociadas a la infección es muy variable y no sólo depende de la cantidad de bacterias existente en la mucosa sino también de la distinta capacidad de las cepas de *Helicobacter pylori* para estimular la respuesta inflamatoria. En este sentido, se ha visto que las cepas CagA positivas (Peek RM, 1995) y las cepas VacA s1 (Atherton JC, 1997) inducen una respuesta inflamatoria más intensa.

Además, se ha observado que la llegada de los mediadores proinflamatorios liberados a las capas subyacentes de la pared desencadena una respuesta inmunitaria por parte del huésped que también resulta muy variable (Crabtree JE, 1996).

4.1.1.5.1. Respuesta inflamatoria local

En la actualidad se postula que la adhesión de *Helicobacter pylori* a las células epiteliales gástricas supondría uno de los estímulos más potentes para desencadenar la respuesta inflamatoria. La activación subsiguiente de la célula epitelial comporta la liberación de diversos factores entre los que destacan TNF-alfa, interferón, IL-1, IL-6 e IL-8, que actúan promoviendo el reclutamiento y la activación de los leucocitos polimorfonucleares, que son los responsables de la respuesta inflamatoria inicial inducida por la infección por *Helicobacter pylori*, (Crabtree JE, 1994*) así como de la aparición posterior de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos en el lugar de la infección (Peek RM, 1995. Noach LA, 1994*. Moss SF, 1994).

La respuesta inflamatoria inicial es estimulada por factores directamente producidos por *Helicobacter pylori*, como los lipopolisacáridos de la superficie bacteriana o la proteína soluble activadora de neutrófilos (HP-NAP) (Evans DJ, 1995), que favorecen la expresión de los leucocitos CD11b/CD 18 y la aparición de moléculas de adhesión intracelular tipo I (ICAM-I) que facilitan la adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales (Crabtree JE, 1994*).

Después de entrar en contacto con las células de la mucosa gástrica, los leucocitos polimorfonucleares inician su migración hacia la luz gástrica. Durante este proceso, algunos degeneran y mueren desintegrándose lo que produce “explosiones oxidativas” de óxido nítrico y radicales hidroxilo, que por su capacidad deaminante de aminoácidos son capaces de generar mutaciones de DNA que pueden inducir mutaciones de genes como el p53 (Nguyen T, 1992) en las células epiteliales activas en división.

La infiltración tisular por células inflamatorias es un proceso finamente regulado y supone la culminación de una serie de interacciones que se establecen entre la superficie endotelial venular y los leucocitos.

El proceso de infiltración tisular se inicia con un movimiento de rodamiento de los leucocitos a lo largo del endotelio venular, al que sigue una activación leucocitaria, su adhesión firme al endotelio y, finalmente su migración al espacio intersticial.

Los fenómenos de rodamiento leucocitario en la microcirculación gástrica inducidos por la infección por *Helicobacter pylori* han sido recientemente caracterizados en un modelo animal, habiéndose demostrado que la interacción inicial depende de las moléculas L- y P-selectina 14.

Estas mismas moléculas participan en uno de los eventos microvasculares más característicos de la infección por *Helicobacter pylori*, la formación de agregados plaquetarios, cuyo significado es todavía desconocido y que en animales de experimentación se asocia a un incremento en la expresión plaquetaria de la molécula de adhesión P-selectina.

Este aumento de la expresión de P-selectina ha sido corroborado en muestras de sangre de pacientes infectados por *Helicobacter pylori*, comprobándose su desaparición tras la erradicación de la infección. Experimentalmente se ha observado que a diferencia de lo que ocurre con otras bacterias, la activación leucocitaria inducida in vitro por extractos acuosos de *Helicobacter pylori* no induce

la liberación de L-selectina de la superficie leucocitaria, lo que crea las condiciones favorables para que los neutrófilos mantengan de forma más prolongada las interacciones de rodamiento con la superficie endotelial.

Tras los fenómenos de rodamiento, la adhesión firme de los leucocitos al endotelio vascular se asocia a fenómenos de degranulación mastocitaria y a un incremento en la permeabilidad vascular lo que pueden contribuir al daño tisular ocasionado por la infección.

La infiltración tisular por los neutrófilos activados comporta la generación de productos metabólicos con una marcada actividad tóxica tisular, entre los que destacan la mieloperoxidasa y los radicales libres de oxígeno, cuyos efectos deletéreos sobre la integridad de la mucosa gástrica se ven potenciados por la presencia de amonio. Además, los neutrófilos activados generan eicosanoides como el leucotrieno C4 que potencian y amplifican la respuesta inflamatoria.

En todos los casos de infección por *Helicobacter pylori* aparece un infiltrado inflamatorio crónico en el que se demuestra un marcado predominio de los linfocitos T, predominantemente Th-1.

La producción de óxido nítrico (NO) por parte de las células inflamatorias también se ha involucrado en el daño tisular producido por la infección por *Helicobacter pylori*, tras haberse comprobado un incremento en la actividad iNOS (óxido nítrico sintasa

inducible) y de la COX-2 en los pacientes con gastritis crónica asociada a *Helicobacter pylori* (Fu S, 1999).

La expresión de ambos genes es mas elevada en la mucosa gástrica infectada por *Helicobacter pylori* que en la no infectada, y también en el antro donde la bacteria se encuentra en una mayor densidad, lo que sugiere que el mismo *Helicobacter pylori* contribuye directamente a la inducción de estos genes.

4.1.1.5.2. Respuesta inmunitaria

4.1.1.5.2.1. Inmunidad específica

En la gastritis crónica presentan un infiltrado inflamatorio de linfocitos T y células plasmáticas, lo que traduce una respuesta inmunitaria celular y humoral por parte del huésped. En el caso de la infección *Helicobacter pylori*, se observa un predominio de células T cooperadoras tipo Th1 que contribuyen al daño de la mucosa, estimulan la producción de enzimas proinflamatorias y de autoanticuerpos (Ernst PB, 1997).

En estudios experimentales se ha comprobado que las células de la mucosa gástrica son capaces de secretar algunas moléculas como el asociado a la función linfoide (LFA-3) que facilitan el aumento de estas células Th1 para la presentación de antígenos (Fan XJ, 1994. Chavin KD, 1994).

Existen varios factores que contribuyen a la persistencia de la infección de *Helicobacter pylori* de forma crónica. Por una parte, la respuesta mediada por células Th1 es poco eficaz para la eliminación de la bacteria. Además, en la mucosa

gástrica infectada por *Helicobacter pylori* existe un aumento de IL-10, que es directamente proporcional a la intensidad de la gastritis, que actúa como un potente inhibidor de la fagocitosis y de la respuesta linfocitaria.

En general, la intensidad de la respuesta mediada por las células Th1 puede verse modulada en función de factores propios del huésped o de la cepa infectante.

4.1.1.5.2.Respuesta humoral

En los pacientes infectados por *Helicobacter pylori* se observa un aumento de distintas inmunoglobulinas (IgM, IgA e IgG).

En la fase aguda de la infección por *Helicobacter pylori* se produce una respuesta humoral de tipo IgM. Las inmunoglobulinas de tipo IgA producen un bloqueo de la adhesión y la motilidad de *Helicobacter pylori* en la mucosa gástrica y de forma secundaria neutralizan las toxinas bacterianas (Crabtree JE, 1996). En este sentido, se ha observado un aumento de las IgA en los pacientes con gastritis crónica (Crabtree JE, 1991). Paradójicamente, las bacterias que quedan recubiertas por las IgA pueden escapar de la fagocitosis, lo que aumentaría su supervivencia (Aceti A, 1991).

La respuesta IgG facilita la destrucción de *Helicobacter pylori* por un mecanismo de opsonización, la activación de los leucocitos polimorfonucleares y la liberación secundaria de mediadores proinflamatorios. Los pacientes con gastritis crónica

presentan un aumento de este tipo de Ig, y en particular de la subclase IgG1 (Valnes K, 1989. Rathbone BJ, 1986).

4.1.1.5.2.3.Autoinmunidad

Se ha postulado que los fenómenos de autoinmunidad pueden contribuir en el proceso inflamatorio de la mucosa gástrica infectada por *Helicobacter pylori*. En este sentido, se ha descrito una homología entre ciertos fragmentos proteicos de *Helicobacter pylori* y del huésped lo que podría inducir la producción de autoanticuerpos (Negrini R, 1991). Se ha comprobado que las cepas cagA + expresan el antígeno Lewis, lo que determinaría la producción de anticuerpos que reaccionan contra el epitelio gástrico (Applemelk BJ, 1996).

4.1.1.6. Respuesta de la mucosa gástrica a la infección por Helicobacter pylori

4.1.1.6.1. Hiperproliferación celular asociada a Helicobacter pylori

Se ha comprobado que la proliferación celular de la mucosa gástrica se incrementa en la gastritis crónica asociada a Helicobacter pylori pero no en las formas de gastritis crónica donde el organismo está ausente. Esto sugiere que la inflamación crónica aislada no está asociada a un aumento del recambio celular y que la presencia de Helicobacter pylori es una condición necesaria para que ocurra (Lynch DAF, 1995).

La infección por Helicobacter pylori se ha asociado con un aumento del índice de proliferación del epitelio gástrico (Abdel-Wahab M, 1997) que puede suponer una respuesta compensatoria directa a una pérdida celular acelerada.

Distintos estudios han demostrado un aumento de la expresión de distintos marcadores de proliferación celular como los organizadores nucleolares (NOR) y el antígeno de proliferación celular (PCNA) en la mucosa gástrica infectada por Helicobacter pylori. Los niveles de NOR en las células epiteliales de la mucosa gástrica se han correlacionado con un aumento del número de leucocitos polimorfonucleares, pero no está claro si su exceso está directamente provocado por los leucocitos o la bacteria (Correa P, 1994).

La hiperproliferación celular en el epitelio gástrico observado en la infección por *Helicobacter pylori* se ha relacionado también con un aumento de la actividad de los factores de crecimiento que presentan una expresión aumentada en la zona proliferativa del epitelio gástrico (Bechi P, 1996. Fan XG, 1996) y que pueden alterar la función del tejido linfático local (Iwanaga T, 1993. Croitoru K, 1993).

La hiperproliferación celular de la mucosa gástrica infectada por *Helicobacter pylori* se ha relacionado también con la conocida capacidad del amoníaco para estimular la duplicación celular (Tsuji M, 1992) que es liberado abundantemente en la vecindad de las células epiteliales gástricas por la potente acción ureasa de la bacteria (Brenes F, 1993. Tsujii M, 1992. Mulder JWR, 1995. Murakami M, 1995). Así mismo, se ha comprobado que las cepas *cagA+* de *Helicobacter pylori* están asociadas con un mayor grado de inflamación y con una mayor hiperproliferación celular.

También se han realizado estudios para analizar la actividad proliferativa del epitelio gástrico en los estadios progresivos de la infección por *Helicobacter pylori* y se ha comprobado un progresivo incremento de la proliferación epitelial desde la gastritis a la metaplasia intestinal (Panella C, 1996). El nivel más alto de PCNA se ha encontrado en los casos de metaplasia intestinal incompleta (Jass JR, 1979 y 1980. Rokkas T, 1991).

Se sabe que la hiperproliferación celular es una de las alteraciones más tempranas en el proceso de carcinogénesis. Por lo que se postula que una duplicación celular excesiva puede potenciar la acción de cualquier carcinógeno que ataque el DNA lo que aumenta la posibilidad de que se produzcan cualquier error en la duplicación

celular, que si se perpetúan pueden ser expresados en generaciones subsecuentes (Ames BN, 1990. Preston M, 1990).

En este sentido, se ha comprobado que las células en proliferación que se encuentran próximas a la luz son más susceptibles a los carcinógenos que aquellas que están situadas en la zona más profunda de las glándulas gástricas.

Por otra parte, se ha observado que los marcadores de hiperproliferación celular declinan significativamente en frecuencia después de la erradicación de la infección por *Helicobacter pylori* (Brenes F, 1993. Correa P, 1994).

Se ha visto que la proliferación celular vuelve a la normalidad cuatro semanas después de la triple terapia, independientemente del status *Helicobacter* del paciente. Aquellos en los que la erradicación de *Helicobacter pylori* se mantiene en el tiempo tienen una tasa de proliferación mucosa normal pero aquellos en los que no se consigue la erradicación, la proliferación celular con el tiempo vuelve a elevarse (Lynch DAF, 1995).

4.1.1.6.2. Apoptosis celular

La apoptosis se puede definir como la secuencia altamente característica de cambios morfológicos que llevan a la muerte no necrótica de la célula sin secuelas inflamatorias (Kerr JFR, 1972).

Actualmente el término se ha equiparado al concepto de muerte celular programada, aunque en algunos casos la morfología de la apoptosis se adquiere sin llegar a

activar la maquinaria celular para la muerte programada (Zakeri Z, 1995). La apoptosis, en contraste con la necrosis, afecta a células aisladas, en respuesta a la expresión de genes específicos celulares y puede ser considerada un tipo de suicidio celular.

Se ha visto que esta forma de muerte es una parte esencial del ciclo de recambio celular de muchos tejidos, incluyendo el tracto gastrointestinal. Es más, recientemente se ha visto que en el tracto gastrointestinal la pérdida casi total de las células ocurre debido a la muerte celular por apoptosis. Así, salvo inhibición por factores externos, se piensa que todas las células siguen un camino indefectible hacia la apoptosis.

Además de esta muerte al final de la vida celular, Potter y colaboradores determinaron otra posible ruta hacia la apoptosis como una forma altruista o de autodefensa en respuesta a un daño grave del DNA. La finalidad de esta muerte sería eliminar las células mutadas antes de que puedan proliferar y formar un clon neoplásico (Potter CS, 1992).

En la actualidad, se sabe muy poco sobre la contribución relativa de estas dos formas de apoptosis en la pérdida celular en el tracto gastrointestinal. No se conocen buenos marcadores para diferenciar estas dos rutas, aunque p53 probablemente está más relacionado con la muerte celular “altruista”.

Para conseguir la homeostasis en el tracto gastrointestinal debe existir un balance entre la tasa de proliferación celular y la pérdida celular por apoptosis.

Las alteraciones en el balance entre apoptosis y proliferación pueden llevar a enfermedades caracterizadas por alteraciones en el crecimiento tisular (Thompson CB, 1995). Así, por ejemplo, atrofia cuando la pérdida celular es excesiva, y neoplasia en el caso contrario.

4.1.1.6.2.1. Helicobacter pylori y la apoptosis celular en el epitelio gástrico

Ya que la infección por *Helicobacter pylori* puede producir situaciones clínicas muy diversas, en la actualidad se ha estudiado el efecto del microorganismo en el balance entre apoptosis y proliferación celular en el epitelio gástrico (Moss SF, 1996).

La apoptosis se induce a través de receptores específicos de la superficie celular (SC-1, Fas/APO-1/CD95) y es corregulado por moléculas intracelulares (bcl-2, p53), dependiendo el éxito del proceso de apoptosis de la expresión de estas señales.

En la gastritis por *Helicobacter pylori* donde hay un aumento de la proliferación celular y existe escasa o nula muerte celular no necrótica, se postula que el aumento de la proliferación celular se acompaña de un aumento de la muerte celular programada o apoptótica (Moss SF, 1996). Se ha observado que la inflamación crónica inducida por la bacteria conduce a la atrofia de la mucosa, a la metaplasia intestinal, y a un aumento de la proliferación celular.

Existen evidencias recientes de que la apoptosis está significativamente reducida en la metaplasia intestinal relacionada con *Helicobacter pylori* y con el tipo intestinal de cáncer gástrico (Unger Z, 2003. Xia HH, 2001).

Si genéticamente las células dañadas no son eliminadas la mutación de los genes que controlan el crecimiento celular pueden acumularse y transformarse en un tejido neoplásico. Sin embargo, los mecanismos por los cuales *Helicobacter pylori* contribuye al desarrollo del cáncer gástrico no están todavía determinados. Existen datos que indican que las células de los los carcinomas de tipo intestinal y difuso difieren en la expresión de los receptores SC-1 y Fas y en el gen p53 supresor de tumores (Vollmers HP, 1997). La diferencia en la expresión de estos receptores específicos y de las señales intracelulares podría explicar la patogénesis molecular distinta de los dos tipos de adenocarcinoma gástrico.

Distintos estudios han comprobado que el proto-oncogén bcl-2 es fundamental en el control de la apoptosis y se ha relacionado con la fase inicial del cáncer (Hockenberry DM, 1990. Reed JC, 1993). Se ha comprobado también que la expresión del gen bcl-2 no está alterada en los pacientes con gastritis crónica, a pesar de la infección por *Helicobacter pylori*, lo que indica que la apoptosis ocurre por un mecanismo independiente de la expresión del gen bcl-2 (Chen G, 1997) mientras que la expresión del gen bcl-2 está preservada en los cánceres gástricos tempranos y es indetectable en las formas avanzadas.

También se ha observado una distinta capacidad de las distintas cepas de *Helicobacter pylori* para inducir apoptosis. En este sentido, se ha comprobado que los sujetos infectados por cepas cagA+ tienen unos índices de apoptosis significativamente más bajas que los cagA- (Peck RM, 1997) y similar a las personas no infectadas (Rokkas T, 1999) ya que las cepas cagA+ son inductoras del factor nuclear kappa B supresor de la apoptosis (NF-KB).

Este hecho determina un desbalance en el epitelio gástrico ya que las cepas cagA+ promueven la proliferación sin producir un aumento de la apoptosis.

Se ha postulado también que el grado de apoptosis inducido en el estomago puede depender no sólo de *Helicobacter pylori* y sus productos, sino también de la respuesta inflamatoria asociada a la infección. Se ha comprobado que extractos solubles de la bacteria o altas dosis de su lipopolisacárido purificado pueden inducir la apoptosis (Piotrowski J, 1997).

En algunos cultivos se ha observado que la apoptosis es inhibida parcialmente por bloqueo en la expresión de los antígenos MHC de clase II, lo que sugiere un papel de estas moléculas en la inducción de este proceso (Fan X, 1998).

Se ha observado que la apoptosis mediada por *Helicobacter pylori* puede alterar la expresión de ciertos factores de crecimiento, tales como el factor P de crecimiento tumoral (TGF-P) o cambiar las concentraciones circulantes de los péptidos de regulación gástricos.

La inducción de apoptosis por *Helicobacter pylori* in vivo puede suponer un estímulo para la respuesta hiperproliferativa asociada o bien puede ser una respuesta a la hiperproliferación en un intento de reducir el crecimiento tisular.

4.1.1.6.3. Daño del DNA celular

El epifenómeno más frecuente en la alteración del DNA es la activación de oncogenes y/o la mutación de genes oncosupresores (Carneiro F, 1994. Levine AJ, 1991). El papel de estos genes ha sido estudiado en el proceso de carcinogénesis del colon (Mulder JWR, 1995. Starzynska T, 1992) y en menor medida en el estómago (Starzynska T, 1992. Tatsuta M, 1994). La inestabilidad genómica adquirida, que es típica de la expresión fenotípica de las lesiones precancerosas, generalmente precede a la expansión neoplásica clonal (Bishop JM, 1995. Levine DS, 1994). Por esta razón, la presencia de DNA aberrante se considera un indicador pronóstico de cáncer (Marrero JM, 1996. Ohyama S, 1990. Kitayama Y, 1995) de forma independiente (Flyger HL, 1995).

La aneuploidía se ha asociado de forma significativa con la expresión de c-Myc y/o p53, que también son usados como marcadores de inestabilidad genómica. En este sentido se ha observado que la mitad de los pacientes con aneuploidía y que expresan c-Myc, poseen una sobreexpresión del p53 (Nardone G, 1999). El oncogén c-Myc se ha implicado con la transformación y la progresión de las células mutadas (Vaux DI, 1988. Fanidi A, Nature 1992).

Se ha visto un aumento de la expresión de c-Myc en el adenocarcinoma gástrico y en las formas de gastritis asociadas a *Helicobacter pylori*. Sin embargo, la aneuploidía, la expresión de p53 y c-Myc no se detectan en ausencia de gastritis atrófica, lo que sugiere la necesidad de la presencia de la infección crónica por *Helicobacter pylori* y de gastritis crónica para que aparezca inestabilidad genómica (Mulder JWR, 1995. Starzynska T, 1992. Tatsuta M, 1994. Murakami M, 1995. Peek RM, 1997*).

4.2. FACTORES DEL HUÉSPED

4.2.1. SISTEMA HLA

El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) es el nombre genérico que fue usado primeramente para describir un grupo de genes, a los que originalmente se atribuyó un papel fundamental en la respuesta al injerto, y que posteriormente se denominó sistema HLA en humanos.

Los genes del sistema HLA controlan una gran variedad de funciones inmunes e influyen la susceptibilidad individual a muchas enfermedades, muchas de las cuales tienen un componente autoinmune (Klein J, 1986. Corzo D, 1995). Algunas investigaciones posteriores han relacionado algunos alelos del sistema HLA con la incidencia y progresión del cáncer.

Distintas enfermedades han sido asociadas con una frecuencia aumentada de ciertos genes y antígenos del sistema HLA, como por ejemplo, la enfermedad de Hodgkin (Amiel JL, 1967), el carcinoma de cérvix (Wank, R, 1991. Helland A, 1992) y la leucemia-linfoma asociadas al HTLV-1 (Uno H, 1988).

4.2.1.1. Estructura del sistema HLA

Los genes del sistema HLA están localizados en una región de 3600 Kb situada en el cromosoma 6 y el gen que codifica la B2-microglobulina, una proteína relacionada con este sistema, se encuentra en el cromosoma 15.

Los genes del sistema HLA se pueden subdividir en dos tipos fundamentalmente: los de la clase I (HLA-A, HLA-B y HLA-C) y los de la clase II (HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR). Existen también otros genes situados en la región de la clase I, tales como los loci HLA-E, HLA-F y HLA-G. También se pueden encontrar pseudogenes, que no codifican proteínas, en la región de la clase I y II. Entre los genes de la clase I y II existen otros muchos genes, algunos de los cuales poseen funciones relacionadas con la respuesta inmune. Un ejemplo de estos últimos serían los genes que codifican el factor de necrosis tumoral (TNF) A y B.

Entre DQ y DP se encuentran algunos loci que permiten la codificación de una nueva clase de transportador de proteínas (TPA), que son responsables de seleccionar los péptidos, de 8 a 9 aminoácidos para la clase I y de 12 a 25 para la clase II, a través del retículo endoplásmico hasta los lugares de la membrana donde el complejo HLA-péptido es reconocido por los linfocitos T.

4.2.1.2. Reconocimiento inmunológico

Los fragmentos peptídicos que serán transportados por el sistema HLA derivan de proteínas endógenas, tales como las oncoproteínas, o bien de proteínas exógenas, como por ejemplo los antígenos de los parásitos intracelulares.

La educación del timo durante la maduración del sistema inmune hace que los linfocitos T desarrollen una tolerancia, es decir, reconozcan como propios a los péptidos del propio organismo que son presentados por las moléculas del MHC.

Los antígenos HLA son las proteínas del sistema que se expresan en la superficie celular y están formadas por un heterodímero compuesto de una cadena alfa y una beta.

Las moléculas de clase I están compuestas por una cadena pesada asociada a la β 2-microglobulina. En general, estas moléculas de clase I son propias de las células nucleadas y de las plaquetas, presentando los antígenos a los linfocitos T CD8, principalmente de fenotipo citotóxico.

Las moléculas de clase II están también compuestas por dos cadenas, codificadas respectivamente por los genes A y B. Estas se encuentran en las células B, las células dendríticas, los linfocitos T activados, y los macrófagos. Las moléculas de clase II presentan los péptidos a los linfocitos T CD4, fundamentalmente con función "helper".

Para poder completar la presentación antigénica a las células T es necesaria la presencia de un péptido de unión, que sirve de nexo entre las moléculas de clase I y II (Brown JH, 1993).

Cada locus de las distintas regiones del sistema HLA está ocupado por un alelo. Cada alelo quedaría determinado por una secuencia distinta de la hebra de DNA. Los distintos alelos, que son por tanto versiones de un mismo gen, pueden ocupar un determinado locus lo que determinaría un rasgo fundamental del sistema MHC, es decir, su polimorfismo (Parham P, 1995. Bodmer JG, 1994). En algunos casos, se han descrito más de 100 variantes alélicas.

Los alelos HLA fueron inicialmente identificados por tipaje serológico quedando designados por una letra, para determinar el locus, seguida de un número, por ejemplo HLA-B27.

La aplicación de métodos de reacción en cadena de la polimerasa permitió establecer un mayor polimorfismo basado en la secuencia del DNA alélico, lo que permitió el desarrollo de una terminología más compleja, por ejemplo DQB1*0301.

Uno de los descubrimientos más recientes en este sentido, se basa en la importancia que tiene el péptido de unión, al que antes se hacía referencia, como pieza clave en el establecimiento de este polimorfismo molecular.

Este polimorfismo determina que los péptidos con características antigénicas serán presentados a las células T por medio de receptores específicos para ellas. De esta manera, las células T quedan activadas al reconocer el complejo HLA-péptido.

De este modo, el polimorfismo HLA determina la gran variedad de posibilidades de la respuesta inmune. Este polimorfismo, combinado con el papel fundamental de las moléculas HLA, particularmente las de clase II, en la regulación la respuesta inmune, son la base de la asociación entre los alelos HLA y determinadas enfermedades.

Un segundo rasgo muy importante que caracteriza al sistema HLA es el llamado desequilibrio de unión entre ciertos pares de alelos de diferentes loci (Thomson G, 1995). Esto determina que ciertas combinaciones de dos alelos ocurren con una mayor frecuencia de la esperada considerando a ambos por separado si se encuentran en desequilibrio de unión.

Un ejemplo clásico que ilustra este concepto es la unión entre los alelos A1 y B8 en personas de raza blanca. La frecuencia de A1 y B8 es de 0,17 y 0,11, respectivamente. Esto daría una frecuencia esperada de ocurrir ambos de 0,019 ($0,17 \times 0,11$).

La frecuencia observada es, sin embargo, cuatro veces más elevada. La diferencia entre la frecuencia observada y la esperada (0,069) quedaría explicada por este desequilibrio de ligazón. De esta manera, dos genes pasan de generación en generación en bloque, lo que mantiene un equilibrio en sus frecuencias que no se

conseguiría si el paso de ambos ocurriera de forma independiente en sucesivas generaciones. Este desequilibrio de unión puede deberse, por ejemplo, a un fuerte efecto en la selección de la especie, de una nueva mutación, de las migraciones o de la mezcla de dos poblaciones.

La asociación de un determinado alelo HLA con una enfermedad implica que la frecuencia del alelo es diferente en la población de pacientes que en la población control correspondiente. Así por ejemplo, la asociación de los alelos HLA-A3, -B7 y -B14 con la hemocromatosis es ya un clásico para los gastroenterólogos (Rigas B, 1995.).

4.2.1.3. Relación del sistema HLA y determinadas enfermedades

En los últimos años se ha investigado la asociación potencial de otras enfermedades tan importantes como el cáncer y los antígenos HLA.

Como fruto de estos estudios, en las dos últimas décadas, ha sido posible acumular una gran cantidad de información sobre el papel de los antígenos HLA en el cáncer.

La idea central en torno a la cual giran la mayor parte de los descubrimientos en este campo es la vigilancia inmunológica (Bodmer WF, 1993). En condiciones normales las células tumorales deberían ser reconocidas como extrañas por el sistema inmune y de esta forma serían eliminadas. El que las células neoplásicas sean capaces de sobrevivir y multiplicarse hasta al punto de matar al organismo huésped es una muestra de que las células tumorales escapan a la vigilancia inmune del organismo.

Determinar el mecanismo por el cual estas células son capaces de evitar la barrera inmunológica representa el problema crucial en la inmunología tumoral. Una explicación potencial para explicar este fallo en la vigilancia inmunológica es que las células tumorales supriman la expresión de los antígenos HLA. En ausencia de estas moléculas críticas, las proteínas asociadas al tumor no pueden ser presentadas a las células T y de esta forma, las células tumorales proliferaran de manera incontrolada para el sistema inmune. De hecho, hay algunas evidencias de que es esto lo que puede ocurrir en algunos tumores.

El caso mejor estudiado en el tracto gastrointestinal es el cáncer colónico (McDougall CJ, 1990. Tsioulis GJ, 1993). Los antígenos de clase II, incluyendo DQ7, que es la proteína producto del HLA-DQB1*0301, han sido implicados en la respuesta inmune a los adenocarcinomas gastrointestinales. Así, por ejemplo, se ha observado en los pacientes con carcinoma colorrectal que la respuesta inmune de las células T DQ7 restringidas a los péptidos K-ras mutados se ha asociado con un estadio de presentación más favorable (Fossum B, 1994). Algunas investigaciones han demostrado una presencia disminuida, y a menudo ausente, en los antígenos de clase I y II en el cáncer de colón.

Esta expresión disminuida de los antígenos HLA ha sido observada incluso en las etapas más tempranas del proceso neoplásico. Sin embargo, se ha comprobado que la expresión de estas moléculas no está completamente abolida, especialmente durante las fases iniciales del desarrollo tumoral, cuando la neoplasia inicial podría ser más fácil de eliminar.

Por tanto además de lo anterior, otras explicaciones alternativas o complementarias deben ser consideradas. Por ejemplo, las células de un determinado individuo pueden expresar el alelo o los alelos del HLA unidos a péptidos anormales del tumor, lo que conduciría a una respuesta inmune modificada al tumor. HLA-DQB1 parece controlar la susceptibilidad a una gran variedad de enfermedades crónicas infecciosas como la esquistosomiasis (Hirayama K, 1987), la lepra (Salgame P, 1991), la malaria (Riley EM, 1993) y hepatitis por virus B (Sera HM, 1993).

Lee et al (Lee JE, 1996) han demostrado de forma bastante convincente que el alelo HLA DQB1*0301 aparece con una mayor frecuencia en personas de raza blanca con cáncer gástrico que en el grupo control.

Los resultados de estos estudios mostraban dos tipos de especificidad. La primera fue que de varios alelos de clase II que fueron investigados, sólo el DQB1*0301 fue asociado al cáncer gástrico. La segunda demostraba que de los tres cánceres (gástrico, colónico y pancreático) sólo el cáncer de estomago se asoció con este alelo.

La asociación de un marcador genético con una enfermedad determinada implica que el marcador se encontraría en un desequilibrio de unión con un locus que predispone a la enfermedad o que el marcador por si solo influenciaría directamente la susceptibilidad al cáncer.

Tratando de determinar si este gen se encontraba en desequilibrio de unión con algún locus determinante de la enfermedad, los investigadores estudiaron la región próxima a DQB1 en el cromosoma 6.

Los loci HLA-DQA1 y TAP2 son los genes más próximos de función conocida al HLA DQB1 (Okada K, 1993). Cada uno de estos loci codifica un producto inmunológico distinto: HLA-DQB1 es altamente polimórfico y codifica la subunidad beta del HLA-DQ, HLA-DQA1 es menos polimorfo y codifica la subunidad alfa, y TPA2 es moderadamente polimórfico y codifica los antígenos que transportan los péptidos a través del retículo endoplásmico hacia las moléculas de clase I.

Los alelos HLA-DQA1 están en desequilibrio de ligazón con los alelos HLA-DQB1. No está tan claro que los alelos TPA2 puedan estar también en desequilibrio con los alelos HLA-DQB1. Los dos loci conocidos que podrían estar en desequilibrio de unión con DQB1 son el DQA1 y TAP y ninguno de ellos se ha asociado de forma directa con el cáncer de estómago, por lo que esta hipótesis quedaría desechada. Sin embargo, existe la posibilidad de que otro gen, todavía no identificado se encuentra en la vecindad de DQB1 y contribuyera en la patogénesis del cáncer gástrico.

Dada la complejidad del sistema inmune, el tratar de relacionar un rasgo genético con una determinada enfermedad no es una labor fácil. Ningún método puede considerarse el mejor para detectar de forma inequívoca la relación de una determinada región genética a una predisposición asociada a padecer una enfermedad. (Thomson G*, 1995)

En el cáncer gástrico, al igual que en otras enfermedades asociadas al HLA, el establecer una relación genética es una tarea compleja, ya que no se trata de una herencia mendeliana simple.

En todos estos estudios basados en análisis genéticos es muy importante controlar las posibles diferencias étnicas ya que la frecuencia de los alelos del HLA en los distintos grupos étnicos puede variar de forma dramática.

Intentando minimizar en lo posible estas variaciones, además de estos estudios que comparan una población paciente con unos controles adecuados, es posible realizar estudios en núcleos familiares lo que reduce notablemente los problemas étnicos de emparejamiento.

En uno de estos estudios se ha observado una asociación significativa entre una historia familiar de cáncer gástrico y el desarrollo de esta enfermedad con un riesgo relativo de entre 2 y 3 y un riesgo aumentado directamente proporcional al número de miembros de la familia afectados (Lee WJ, 2003). Es más, el número de miembros de la familia afectados parece influir también de forma significativa al desarrollo de esta enfermedad (Morita M, Cancer 1998).

Nakashima et al, al examinar el DNA del carcinoma gástrico por técnicas de reacción en cadena de la polimerasa, demostraron una inestabilidad microsatélite con mas frecuencia en los carcinomas múltiples que en los solitarios. Esta inestabilidad genética podría tener un papel fundamental en la predisposición a

desarrollar cáncer. De esta forma, se postula que ciertas anormalidades del cariotipo, los oncogenes, podrían pasar de generación en generación.

Una predisposición hereditaria al cáncer gástrico podría determinar el desarrollo de una hiperproliferación de la mucosa. Los pacientes con una historia familiar de cáncer gástrico poseen una proliferación mucosa aumentada comparados con los pacientes sin este antecedente (Meinig A, 1998). Se sabe que la hiperproliferación de la mucosa es el primer paso en el desarrollo del cáncer de colon, y aunque no existen por el momento suficientes datos para sustentar esta hipótesis, lo mismo podría ocurrir en la carcinogénesis gástrica.

La infección por *Helicobacter pylori* se asociado también con una proliferación aumentada de la mucosa gástrica. Sin embargo, esto parece suponer un factor de riesgo independiente en el desarrollo del cáncer gástrico.

Se han realizado también análisis de parejas de gemelos para intentar relacionar una predisposición para la enfermedad con una región HLA. En estos estudios se ha visto que existe una fuerte evidencia de la influencia genética en la adquisición de la infección por *Helicobacter pylori*. Así, al estudiar la infección por la bacteria en una muestra de varios gemelos suecos se demostró la existencia de una clara influencia genética en la susceptibilidad a la infección (57%), si bien el compartir un medio ambiente similar durante la infancia puede contribuir a esta tendencia familiar en la adquisición de *Helicobacter pylori* (Malaty H, 1994).

Por otra parte, hay que tener en cuenta que en este tipo de estudios es imposible separar totalmente los factores ambientales de las influencias genéticas.

También es muy importante destacar, que aunque más de la mitad de los pacientes con cáncer de estómago poseen el alelo DQB1*0301, la mayoría de los individuos con este alelo no desarrollan la enfermedad. De este modo, el potencial diagnóstico del tipaje del HLA en el screening del cáncer gástrico es en el mejor de los casos probablemente muy limitado.

Debido a las limitaciones inherentes de metodología, es necesario ser muy cuidadoso a la hora de establecer conclusiones y serán necesarios otros muchos estudios de confirmación antes de establecer una asociación inequívoca entre el cáncer gástrico y el sistema HLA.

Sin duda, todas estas cuestiones podrán ser respondidas más fácilmente cuando el proyecto del genoma humano haya llenado los huecos en nuestro conocimiento sobre la estructura más íntima de los cromosomas.

De todo esto se puede concluir que el cáncer de estómago es una enfermedad compleja y probablemente multifactorial en cuya patogénesis quedan todavía muchas cuestiones que resolver.

1. OBJETIVOS CONCRETOS

1. Realizar un estudio descriptivo de las lesiones histopatológicas de la mucosa gástrica de pacientes afectos de dispepsia funcional y establecer la posible relación con factores ambientales (*Helicobacter pylori*, determinados hábitos tóxicos, y dieta) y propios del huésped (HLA y grupo sanguíneo).

2. Investigar la evolución de las lesiones histopatológicas preneoplásicas gástricas durante un periodo de tiempo superior a 5 años en una cohorte de pacientes diagnosticados previamente de gastritis crónica, gastritis crónica con atrofia mucosa y gastritis crónica atrófica con o sin metaplasia intestinal en sus diversos grados.

3. Determinar si la evolución en el tiempo de las lesiones histopatológicas preneoplásicas de la mucosa gástrica está influenciada por:
 - La existencia de infección por *Helicobacter pylori* y por las propiedades de la cepa infectante (gen S, gen M, status CagA, VacA).
 - Los diferentes hábitos dietéticos o tóxicos, con especial interés en la ingesta de sal, tabaco y alcohol.
 - Los diferentes polimorfismos HLA que presente el paciente.

2. HIPÓTESIS

1. La progresión de las lesiones histopatológicas de la mucosa gástrica consideradas como preneoplásicas está condicionada por uno o varios de los siguientes factores:
 - La presencia de infección por una cepa de *Helicobacter pylori* más agresiva.
 - Una dieta rica en alimentos con alto contenido en sal.
 - Determinados hábitos como el consumo de alcohol y tabaco.
 - La expresión de determinados polimorfismos HLA con carácter protector o favorecedor en cuanto a la progresión de la lesión.

2. La influencia de los factores descritos en el punto anterior es diferente en los sucesivos estadios de las lesiones preneoplásicas (gastritis crónica, atrofia gástrica, metaplasia intestinal y sus grados) de la mucosa gástrica.

MÉTODOS

1. DISEÑO

Se trata de un estudio observacional constituido por:

- Estudio 1: Estudio descriptivo de las lesiones histopatológicas de la mucosa en relación con factores ambientales y propios del huésped en una población afecta de dispepsia funcional. Los integrantes de esta población del estudio 1 se denominan « *pacientes externos* ».
- Estudio 2: Estudio cohorte de una población seleccionada hace más de 5 años, denominados « *pacientes casos* », de los que se dispone de un estudio histopatológico completo de la mucosa gástrica y de información sobre hábitos dietéticos y tóxicos en el momento de inclusión.

Ambos estudios se han sometido a las normas internacionales y nacionales de carácter ético que regulan la realización de estudios clínicos y a la aprobación por el Comité de Ensayos Clínicos del Hospital Miguel Servet.

2. PACIENTES

2.1. PACIENTES EXTERNOS

En este grupo se incluyen 135 pacientes, varones y mujeres, seleccionados entre los enfermos atendidos en el centro de especialidades dependiente del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Miguel Servet (Ambulatorio Ramón y Cajal de Zaragoza), afectos de dispepsia funcional. Con el fin de unificar criterios diagnósticos, la dispepsia funcional ha sido caracterizada siguiendo los Criterios de Roma II (Talley NJ. 1999). Se define como dispepsia funcional al trastorno caracterizado por dolor o molestia epigástrica, distensión abdominal, que no mejora exclusivamente con la defecación ni se asocia a cambios en la frecuencia o consistencia de las deposiciones, en ausencia de enfermedades orgánicas que puedan explicar los síntomas, que cursa con una gastroscopia normal y que persiste al menos 12 semanas (no consecutivas) en los últimos 12 meses.

2.2. PACIENTES CASOS

En este grupo se incluyen 56 pacientes procedentes de una población diagnosticada de gastritis crónica (con o sin atrofia) y/o metaplasia intestinal (completa o incompleta) hace 5 años. De todos los pacientes incluidos se dispone de un estudio histopatológico de la mucosa gástrica realizado 5 años antes, así como de información sobre sus hábitos dietéticos y tóxicos en el momento de la obtención de esas biopsias.

3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Se incluyen aquellas personas que reuniendo los criterios para ser paciente externo o paciente caso, de ambos sexos, con edades comprendidas entre 18 y 90 años de edad y que aceptan libremente participar en el estudio.

4. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se excluyen todas aquellas personas que presentan una o varias de las siguientes condiciones:

- Mujeres embarazadas
- Pacientes con intervenciones gástricas previas
- Pacientes afectos de pólipos gástricos o cualquier tipo de cáncer
- Pacientes con alteración o disminución de sus facultades mentales
- Pacientes en tratamiento con inhibidores de la bomba de protones (IBP) durante los 3 meses anteriores al estudio
- Pacientes en tratamiento con bismuto durante un periodo superior a 30 días durante los 6 meses anteriores al estudio
- Pacientes en tratamiento con amoxicilina, claritromicina, tetraciclina o metranidazol durante un periodo igual o superior a 14 días durante los 6 meses anteriores al estudio
- Pacientes sometidos a tratamiento de erradicación de *Helicobacter pylori*
- Pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana o por los virus de la hepatitis B o C
- Pacientes en tratamiento con esteroides u otras drogas inmunosupresores
- Pacientes diagnosticados de cualquier enfermedad grave

5. MÉTODOS

5.1. Consentimiento informado, Historia clínica y Exploración física

Todos los pacientes candidatos a ser incluidos en ambos estudios han sido entrevistados con el fin de explicarles las características y fines del estudio. La autorización del paciente ha quedado reflejada en todos los casos en la correspondiente Hoja de consentimiento informado que ha sido firmada por el paciente y el médico entrevistador.

Así mismo, se ha realizado una historia clínica y una exploración física completa de cada paciente incluido.

5.2. Determinaciones sanguíneas

A todos los pacientes se les ha practicado una extracción sanguínea de 25 CC.

Del volumen de sangre extraído se han separado 20 CC para la determinación de:

- Hemograma completo
- VSG
- Estudio de coagulación
- Bioquímica incluyendo pruebas de función hepática
- Serología de hepatitis B y C
- Determinación de grupo sanguíneo

Los 5 CC de sangre restantes se han destinado para el aislamiento del DNA de los pacientes (tipaje HLA-DQ).

5.3 Cuestionario

A todos los pacientes se les ha entregado un cuestionario general previamente validado, con el objeto de conocer sus hábitos dietéticos actuales incidiendo fundamentalmente en el consumo de sal. En este cuestionario se recogen también otros datos referentes a la ingesta de alcohol y tabaco, así como datos epidemiológicos de interés como la profesión, nivel de instrucción, etc.

Se establecen 4 categorías respecto al consumo de alcohol:

- No bebe.
- Esporádico: Menos de 2-3 vinos ó 3-4 cervezas ó 1 licor al día.
- Moderado: 2-3 vinos ó 3-4 cervezas ó 1 licor al día.
- Severo: Más de 2-3 vinos ó 3-4 cervezas ó 1 licor al día.

Se establecen también 4 categorías respecto al hábito tabáquico:

- No fuma
- Menos de 10 cigarrillos al día
- De 10 a 20 cigarrillos al día
- Más de 20 cigarrillos al día

En los pacientes incluidos como « *pacientes caso* », este cuestionario se ha ampliado con el fin de conocer también si sus hábitos dietéticos se han modificado en los últimos 5 años.

5.4 Gastroscoopia y biopsias

Previo ayuno de 12 horas, se practica una gastroscopia a todos los pacientes donde se describe cualquier alteración patológica observada. En cada paciente se toman:

- 4 biopsias para estudio anatomopatológico: 2 muestras de la mucosa antral, aproximadamente a unos 3 cm. de píloro y 2 muestras de la mucosa de cuerpo gástrico (pared anterior y posterior).
- 2 biopsias de mucosa antral y de cuerpo gástrico para la extracción de DNA para el tipaje de las cepas de *Helicobacter pylori* infectante.
- Biopsias adicionales cuando se detectan alguna de las siguientes alteraciones:
 - ◆ Cambio de brillo, coloración (eritema, palidez, etc.) o patrón normal de la mucosa
 - ◆ Signos inflamatorios o exudados
 - ◆ Alteración del patrón normal de pliegues gástricos o de la distensibilidad con aire
 - ◆ Friabilidad o rigidez de la mucosa
 - ◆ Nódulos, pólipos o neoformaciones
 - ◆ Trama vascular submucosa visible o sufusiones hemorrágicas

5.5. Estudio anatomopatológico de la mucosa gástrica

Una vez realizado el estudio endoscópico, las biopsias de la mucosa gástrica se remiten al Servicio de Anatomía patológica del Hospital Miguel Servet donde fueron procesadas por una médico especialista (Dra. C.Yus) experta en patología gástrica de este servicio.

Las muestras obtenidas por endoscopia se fijan en una solución de formol tamponado al 10% y posteriormente embebidas en parafina. Posteriormente se realizan cortes de 4-6 μ de grosor y se llevan a cabo las siguientes tinciones:

- Tinción básica convencional con Hematoxilina- Eosina
- Azul Alcian-PAS para valoración de metaplasia intestinal y sus tipos
- Giemsa modificado para determinar la presencia o ausencia de *Helicobacter pylori*

El estudio anatomopatológico de las muestras gástricas se realiza de acuerdo con el sistema Sydney, que incluye los siguientes parámetros:

1. Inflamación:

- Intensidad y patrón del infiltrado (difuso panmucoso o superficial, presencia de folículos linfoides con centro germinal)
- Presencia de leucocitos polimorfonucleares en la lámina propia y/o en el epitelio glandular foveolar

2. Atrofia glandular: Disminución o pérdida del epitelio glandular

3. Metaplasia: Se consideran varios tipos:

- Metaplasia pilórica
- Metaplasia intestinal completa (tipo I= de tipo intestino delgado)
- Metaplasia intestinal incompleta (tipo II y III= tipo colónico)

4. Helicobacter pylori: Presencia o ausencia y densidad en el epitelio superficial y foveolar.

Todos estos parámetros se gradúan de acuerdo a la intensidad en tres grados (leve, moderada o grave) y siempre teniendo en cuenta su localización anatómica (cuerpo, antro cardias, antropilórica o transicional).

Además, en el caso de encontrarse presentes, se reflejan otros parámetros:

- Hiperplasia foveolar, reactiva o regenerativa, con o sin atipia arquitectural y/o citológica.
- Erosión del epitelio superficial.
- Material fibrino-leucocitario y/o tejido de granulación correspondiente a fondo de ulcera.
- Hiperplasia de células endocrinas: lineal, micronodular, adenomatoide.
- Displasia generalmente asociada a la metaplasia intestinal incompleta y estratificada como de bajo o alto grado.

5.6 Extracción de ADN

Con el fin de asegurar la confidencialidad, a cada paciente se le asigna un código formado por una letra y dos números que se ha mantenido durante todo el proceso de laboratorio y posteriormente en el procesamiento de los datos.

Se realizan 2 extracciones de ADN: una a partir de leucocitos de sangre periférica para posteriormente realizar el tipaje del HLA-DQ, y una segunda extracción de ADN a partir de biopsias de mucosa gástrica para realizar el tipaje de las cepas de *Helicobacter pylori*.

5.6.1. Extracción de ADN genómico a partir de sangre

Para ello se obtienen 6 ml de sangre periférica en tubos con EDTA de cada paciente o caso. Las sangres se procesan en las primeras 24 horas siguientes a la extracción para obtener el pellet de leucocitos del que se obtiene posteriormente el ADN.

A los 6 ml de sangre se añade buffer de lisis hemática frío (155 mM NH_4Cl , 10 mM NH_4HCO_3 , 0,1 mM EDTA, pH 7,4) hasta alcanzar un volumen de 20 ml. Se mezcla suavemente y se incuba durante 15 minutos en hielo. Posteriormente se centrifuga a 2800 rpm durante 15 minutos.

Tras la centrifugación, se desecha el sobrenadante obtenido, y al pellet celular obtenido se vuelve a añadir 5 ml de buffer de lisis hemática.

El pellet se resuspende mediante agitación con vortex, y se vuelve a incubar otros 15 minutos en hielo, tras los cuales se realiza una segunda centrifugación de 15

minutos a 2800 rpm. Se elimina el sobrenadante, y el pellet de leucocitos se almacena a -20°C hasta realizar la extracción de ADN.

La extracción de ADN se realiza según método estándar de digestión con proteinasa K y extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, v/v), seguido de precipitación con etanol.

El pellet de células blancas se resuspende en 5 ml de buffer TEN (10 mM TrisHCl pH 8,0, 25 mM EDTA, 100 mM NaCl) mediante agitación con vortex.

Se añaden 300 μl de SDS 10% y 50 μl de Proteinasa K (10 mg/ml) y se incuba a 37°C durante 24 horas con agitación suave. Una vez digerido el pellet de leucocitos, éste se transfiere a tubos de polipropileno (resistentes al fenol/cloroformo).

Se añaden 5 ml de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico saturado pH 8.0, y se mezcla bien durante 10 minutos. Posteriormente se centrifuga a 2800 rpm durante 15 minutos.

Tras la centrifugación se observan dos fases, se toma la fase superior (acuosa que contiene los ácidos nucleicos) y se transfiere a otro tubo, teniendo especial cuidado de no coger nada de la fase fenólica. A este sobrenadante se añaden 0,4 ml de acetato sódico 3M y 12 ml de etanol absoluto previamente enfriado.

Se mezcla suavemente hasta que precipita el ADN observándose una madeja filamentososa. El ADN se recoge con una pipeta Pasteur y se transfiere a un tubo eppendorf que contiene 1 ml de etanol 70%.

Posteriormente se centrifuga durante 5 minutos a 12000 rpm. Se decanta el etanol y se dejan secar los pellet durante 10-20 minutos con objeto de que se evapore todo el etanol. Finalmente el ADN se resuspende en 250 μ l de TE (10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA pH 8,0) y se almacena a 4°C.

5.6.2 Extracción del ADN a partir de mucosa gástrica

Las biopsias gástricas se conservan en tubos eppendorf en 500 μ l de buffer TENS (10 mM TrisHCl pH 8,0, EDTA 25 mM, 100 mM NaCl, 0,5% SDS) en congelador (<20°C) desde el momento de su recogida hasta el aislamiento del DNA.

A cada tubo se le asigna un código formado por una letra y dos números con el fin de asegurar la confidencialidad de los pacientes y que se mantiene durante el proceso de laboratorio y en el manejo posterior de los datos informáticos.

Una vez descongeladas las muestras, se añaden 40 μ l de proteinasa K 10 mg/ml. Las muestras se incuban en baño agitante a 37°C durante 24 horas. A la muestra digerida se añade el mismo volumen de fenol/cloroformo/ isoamiloalcohol (500 μ l).

Tras mezclar por agitación suave durante 10 minutos, centrifugamos 15 minutos a 12000 rpm. Se recoge la fase superior (acuosa) y se transfiere a un tubo eppendorf.

Se añade 1 ml de etanol absoluto previamente enfriado, y 40 µl de acetato sódico 3M. Se agita suavemente hasta que precipite el ADN, y posteriormente se deja durante 1 hora a <20°C para facilitar la precipitación. Se centrifuga durante 5 minutos a 12000 rpm.

Se decanta el sobrenadante y al pellet se añaden 500 µl de etanol 70%. Se agita por inversión para lavar bien el ADN y se centrifuga durante 3 minutos a 12000 rpm. Se decanta el etanol y se deja secar al aire durante 10 minutos. Por último se añaden 50 µl de TE para resuspender el ADN y éste se almacena en la nevera.

5.7. Tipaje del HLA-DQ

La tipificación de los alelos DQB1*0501, DQB1*0502, DQB1*0503, DQA1*0102 y DQA1*0301 se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos de secuencia (PCR-SSP).

Los cebadores utilizados fueron los descritos por Olerup et al (Olerup, 1993).

- Alelo DQB1*0501:
Cebador 5': B-5'01: 5'-CGGAGCGCGTGCGGGG-3'
Cebador 3': B-3'01:5'-GCTGTTCCAGTACTCGGCAA-3'

- Alelo DQB1*0502:
Cebador 5': B-5'02: 5'-TGCGGGGTGTGACCAGAC-3'
Cebador 3': B-3'02: 5'-TGTTCCAGTACTCGGCGCT-3'

- Alelo DQB1*0503:
Cebador 5': B-5'03: 5'-TGCGGGGTGTGACCAGAC-3'
Cebador 3': B-3'03: 5'-GCGGCGTCACCGCCCGA-3'

- Alelo DQA1*0102:
Cebador 5': A-5'03: 5'-CATGAATTTGATGGAGATGAGC-3'
Cebador 3': A-3'01: 5'-ATGATGTTCAAGTTGTGTTTTGC-3'
- Alelo DQA1*0301:
Cebador 5': A-5'05: 5'-TTCACCTCGTCAGCTGACCAT-3'
Cebador 3': A-3'03: 5'-CAAATTGCGGGTCAAATCTTCT-3'

Todas las reacciones de PCR se llevan a cabo en un volumen final de 25 μ l, que contiene 0,5 μ M de cada cebador, 0,1 mM de cada deoxinucleótido (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), buffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5-9, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂), 1 U de TaqDNA polimerasa y 1 μ l de ADN.

Los programas de PCR utilizados han sido:

- Para los alelos DQB1*0501, DQB1*0502 y DQB1*0503:
95°C 3 minutos/ 30 ciclos de 94°C 1 minuto/ 65°C 1 minuto/ 72°C 1 minuto/ extensión final de 10 minutos a 72°C.
- Para el alelo DQA1*0102:
95°C 7 minutos/ 30 ciclos de 94°C 1 minuto/ 60°C 1 minuto/ 72°C 1 minuto/ extensión final de 10 minutos a 72°C.
- Para el alelo DQA1*0301 el programa de PCR es:
95°C 7 minutos/ 30 ciclos de 94°C 1 minuto/ 59°C 1 minuto/ 72°C 1 minuto/ extensión final de 10 minutos a 72°C.

Los productos de amplificación se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en el caso del alelo DQB1*0501, DQA1*0102 y DQA1*0301, 2.5% para el alelo DQB1*0502 y 4% para el alelo DQB1*0503.

Posteriormente se procede a tinción con Bromuro de etidio, visualizándose una banda de 128 pares de bases en el caso del alelo DQB1*0501, 117 pares de bases el alelo DQB1*0502 y 87 pares de bases en el caso del alelo DQB1*0503. En el caso del alelo DQA1*0102 el fragmento amplificado es de 149 pares de bases y de 183 pares de bases el alelo DQA1*0301.

5.8. Tipaje de las cepas de Helicobacter pylori infectante

El tipaje de las cepas de Helicobacter pylori se realiza mediante la amplificación por PCR del DNA extraído de las biopsias gástricas que contiene tanto el ADN genómico del paciente como el de la bacteria en caso de estar presente en la mucosa gástrica. Este tipaje incluye la presencia/ausencia del gen cagA, así como las variantes genotípicas de las regiones s y m del gen vacA.

5.8.1. Gen cagA

Para la amplificación del gen cagA se utilizan los cebadores descritos por Lage et al (Lage AP, 1995).

La secuencia de los oligonucleótidos es:

CagA-1: 5'- AAT ACA CCA ACG CCT CCA AG -3'

CagA-2: 5'-TTG TTG CCG CTT TTG CTC TC -3'

La reacción se lleva a cabo en un volumen de 25 µl, que contiene 0,5 µM de cada cebador, 0,1 mM de cada deoxinucleótido (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), buffer (10 mM Tris-HCl pH 8,5-9, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂), 1 U de TaqDNA polimerasa y 1 µl de ADN.

Las condiciones de temperatura en la PCR son: desnaturalización inicial a 95°C 3 minutos/ 30 ciclos de 95°C 1 minuto/ 55°C 1 minuto/ 72°C 1 minuto/ extensión final de 10 minutos a 72°C.

En todas las PCR se incluye como control positivo una muestra con ADN que ya está tipada y amplificada para el gen *cagA*, y un control negativo que contiene agua en lugar de ADN.

A continuación el producto amplificado se somete a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y tinción con bromuro de etidio, visualizándose una banda de 400 pares de bases cuando el gen *cagA* está presente.

5.8.2 Gen *vacA*

Se analizan las variantes alélicas *s1*, *s2* y *m1*, *m2* del gen *vacA* descritas por Atherton et al (Atherton, 1995).

Las condiciones de temperatura para todas las PCR son: desnaturalización inicial a 95° C 3 minutos/ 30 ciclos de 95° C 1 minuto/ 53° C 1 minuto/ 72° C 1 minuto/ extensión final de 10 minutos a 72° C.

5.8.2.1, Región *s* del gen *vacA*

Para la amplificación de esta región del gen *vacA*, se utilizan los cebadores descritos por Atherton et al (Atherton, 1995).

La secuencia de los oligonucleótidos es:

VA1F: 5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3'

VA1R: 5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'

El producto de PCR se somete a electroforesis en gel de agarosa al 2.5% y tinción con bromuro de etidio, observándose una banda de 259 pares de bases cuando la cepa de *Helicobacter pylori* analizada presenta la variante alélica s1, o de 286 pares de bases en el caso del alelo s2.

5.8.2.2. Región m del gen vacA

Para el tipaje de la región m del gen vacA se realizan dos PCR distintas:

- Alelo m1:

VA3-F: 5'-GGTCAAAATGCGGTCATGG-3'

VA3-R: 5'-CCATTGGTACCTGTAGAAAC-3'

El producto de PCR se analiza mediante electroforesis en agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio, de manera que si la cepa de *Helicobacter pylori* presenta la variante m1 se observa una banda de 290 pares de bases, mientras que si es m2 no amplifica.

- Alelo m2

VA4-F: 5'-GGAGCCCCAGGAAACATTG-3'

VA4-R: 5'-CATAACTAGCGCCTTGAC-3'

En este caso, cuando la cepa infectante presenta el alelo m2 se observa una banda de 352 pares de bases cuando se analiza en un gel de agarosa al 2%, mientras que si es m1 no amplifica y no se observa ninguna banda.

5.9. Estudio estadístico

En primer lugar se ha realizado un análisis descriptivo, utilizando los estadísticos básicos de centralización y dispersión de las principales variables cuantitativas y la distribución de frecuencias para las variables cualitativas.

Para la comparación de proporciones se ha utilizado la prueba de χ^2 de Pearson y para la comparación de medias se ha utilizado la prueba t de Student-Fisher ya que se trataba de variables independientes binarias. En el análisis estadístico se ha considerado significativo un valor de $p < 0,05$.

Se han realizado análisis univariantes para evaluar las asociaciones entre diferentes factores de riesgo y las siguientes variables independientes: presencia o no de metaplasia, progresión o no de gastritis crónica a metaplasia y progresión o no de la primera histología a la segunda. La asociación se estudió mediante el cálculo de odds ratios y sus intervalos de confianza al 95%.

Como técnica multivariante de ajuste estadístico para controlar los fenómenos de confusión e interacción entre las variables, se ha utilizado el modelo de regresión logística. Se han obtenido por este método los odds ratios ajustados de los

principales de riesgo así como sus correspondientes intervalos de confianza al 95%.

El procesamiento estadístico de los datos se ha realizado mediante el programa informático SPSS 10.0.

6. MATERIALES

Acetato sódico (Merck, Darmstadt, Alemania)

Agarosa (Hispanlab, Madrid, España)

Bromuro de etidio (Sigma Chemical, St Louis, USA)

Fenol/ Cloroformo/Isoamiloalcohol (Invitrogen, Paisley, UK)

dNTPS (deoxinucleótidos) (RocheDiagnostics, Mannheim, Alemania)

Dodecil sulfato sódico (SDS) (Sigma Chemical, St Louis, USA)

EDTA (ácido etilendiaminotetracético) (Sigma Chemical, St Louis, USA)

Etanol (Merck Darmstadt, Alemania)

Cebadores *cagA* y *vacA* (RocheDiagnostics, Mannheim, Alemania)

Proteinasa K (Sigma; St. Louis, MO, USA)

Taq DNA polimerasa recombinante (RocheDiagnostics, Mannheim, Alemania)

Trizma Base (Sigma, St Louis, MO, USA)

ESTUDIO 1: ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LAS LESIONES HISTOPATOLÓGICAS DE LA MUCOSA EN RELACIÓN CON FACTORES AMBIENTALES EN UNA POBLACIÓN AFECTA DE DISPEPSIA FUNCIONAL.

1. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA MUESTRA

1.1 DESCRIPCIÓN POR GRUPOS DE EDAD Y SEXO

Aplicando los criterios de inclusión y exclusión referidos en el apartado de material y métodos, de septiembre de 1997 a diciembre de 1998, se han incluido finalmente 135 pacientes, de los cuales 64 (47,4%) son mujeres y 71 (52,6%) varones. La distribución de edad de los mismos se muestra en el gráfico 1.

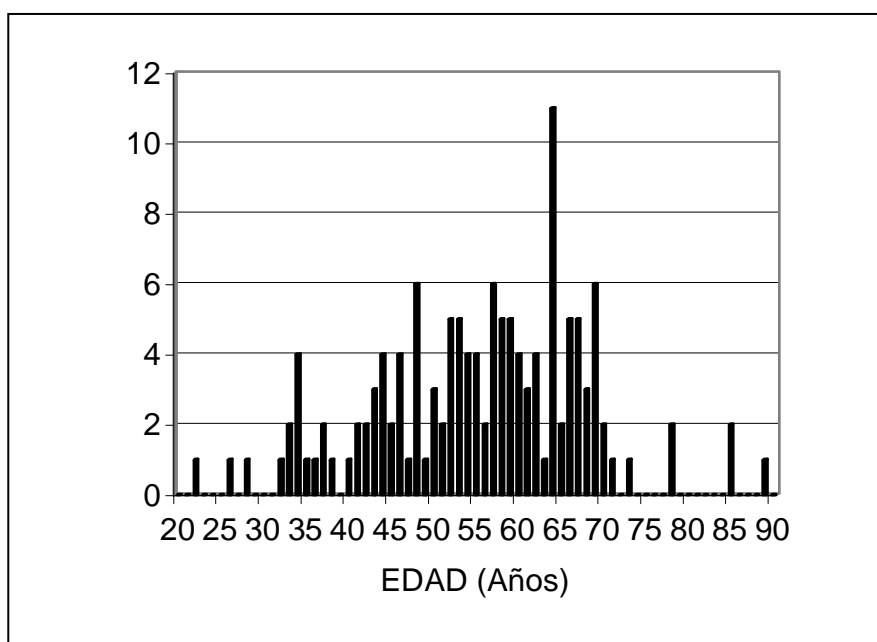


Gráfico 1

Como se puede observar en el gráfico, el rango de edad va desde 22 a 89 años, siendo la edad media de 55,3 años.

1.2. ESTUDIO HISTOLÓGICO

Los resultados del examen histológico de la mucosa gástrica realizado a todos los pacientes en el momento de la inclusión quedan recogidos en el gráfico 2.

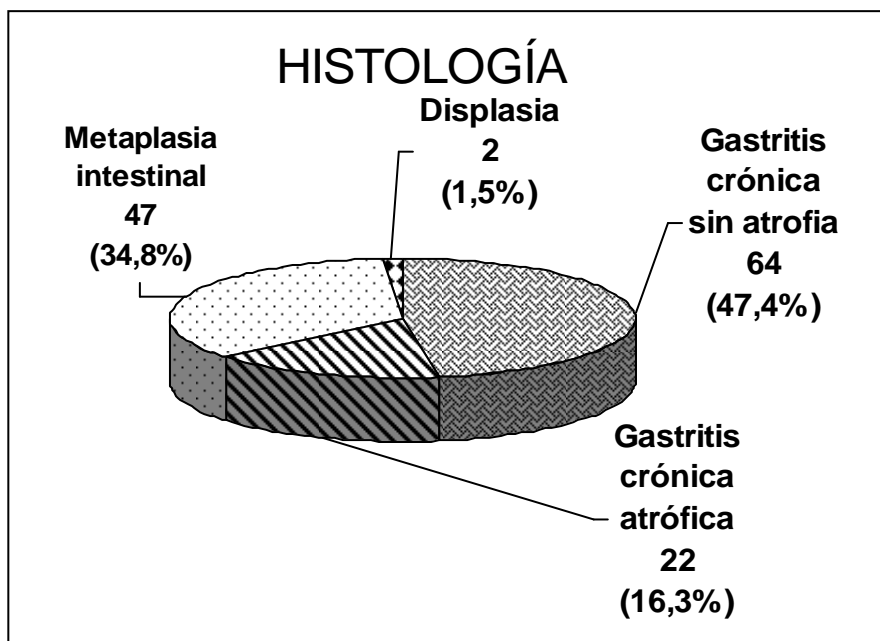


Gráfico 2

La forma histológica más frecuente es la gastritis crónica sin atrofia (n=64), seguida en frecuencia por la gastritis crónica con metaplasia intestinal (n=47) y la gastritis crónica atrófica sin metaplasia (n=22). En tan sólo 2 pacientes se observa displasia en la mucosa gástrica.

Una vez revisadas todas las biopsias se aprecia actividad inflamatoria, es decir, presencia de leucocitos polimorfonucleares en la mucosa gástrica en 114 pacientes (84,4%).

En el estudio histológico de las muestras se comprueba la presencia de *Helicobacter pylori* en 106 pacientes (78,5%).

Al estudiar el grupo de pacientes con metaplasia intestinal, se distribuyen en metaplasia intestinal completa (18 pacientes) y metaplasia intestinal incompleta (29 pacientes).

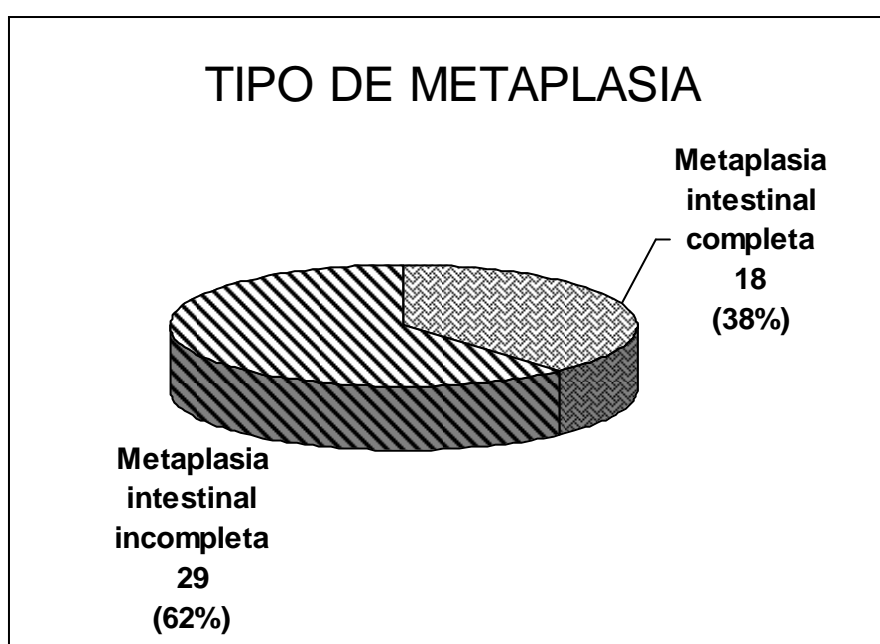


Gráfico 3

En cuanto a la distribución topográfica, la metaplasia intestinal se presenta de forma más frecuente en el antro, y en cuanto a la extensión principalmente en la forma focal, tal como queda recogido en los gráficos 4 y 5.

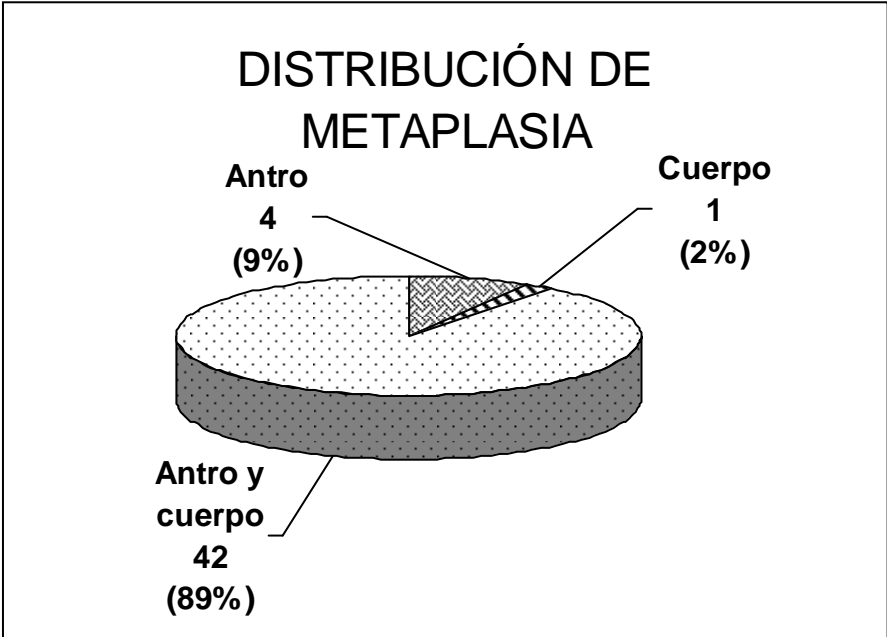


Gráfico 4

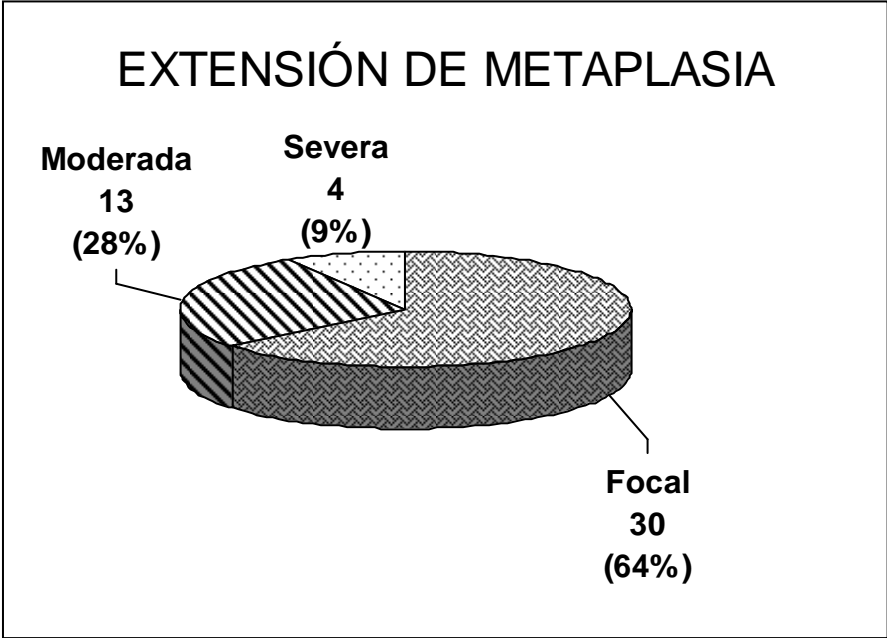


Gráfico 5

1.3 TIPAJE DE LAS CEPAS DE HELICOBACTER PYLORI INFECTANTE

Se realiza en todos los pacientes el tipaje de las cepas de *Helicobacter pylori* mediante la amplificación con PCR del DNA extraído de las biopsias gástricas, verificando la presencia de la bacteria en 106 pacientes (78,5%).

De estos 106 pacientes infectados por *Helicobacter pylori*, en 50 pacientes (47,2%) se comprueba la presencia del gen *cagA* en la cepa infectante, mientras que en 56 (52,8%) este gen resulta negativo.

El gen *vacA* es positivo en la forma s1 en 50 pacientes (47,2%) y en la s2 en 38 (35,8%), mientras que en 18 (17%) el resultado es no valorable. En 23 pacientes (21,7%) se comprueba la amplificación del gen *vacA* m1 y en 65 (61,3%) del gen *vacA* m2. Estos datos se muestran en el gráfico 6.

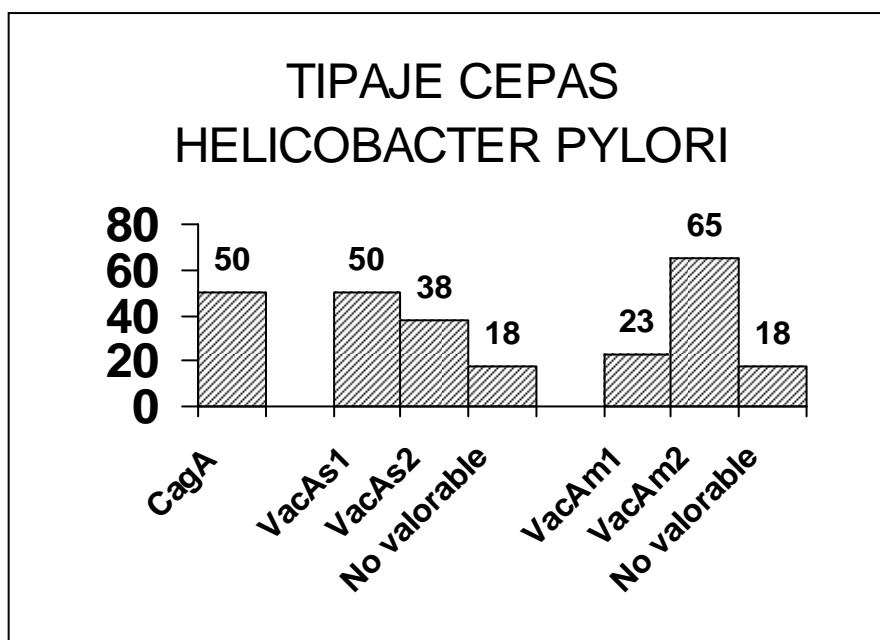


Gráfico 6

Además, al estudiar las distintas combinaciones de los genes de VacA, 23 pacientes (21,7%) presentan una cepa de *Helicobacter pylori* con la combinación s1m1, 27 pacientes (25,5%) con el tipo s1m2 y 38 (35,8%) con una cepa del tipo s2m2, tal como se observa en el gráfico 7.

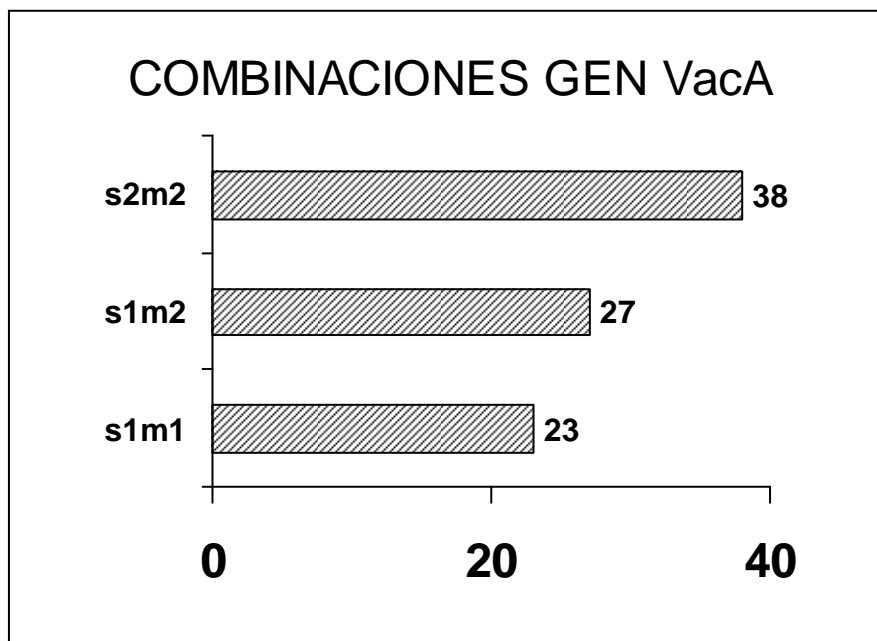


Gráfico 7

1.4 TIPAJE DEL DNA GENÓMICO DE LOS PACIENTES

De los 135 pacientes, 26 pacientes (19,3%) presentan el alelo HLA DQ B1*0501, 4 pacientes (3%) el HLA DQ B1*0502 y 14 (10,4%) el HLA DQ B1* 0503. Respecto al alelo HLA DQ A1*0102 se comprueba su positividad en 68 pacientes (50,4%) y en 24 pacientes (17,8%) para el alelo HLA DQ A1*0301, de acuerdo al gráfico 8.

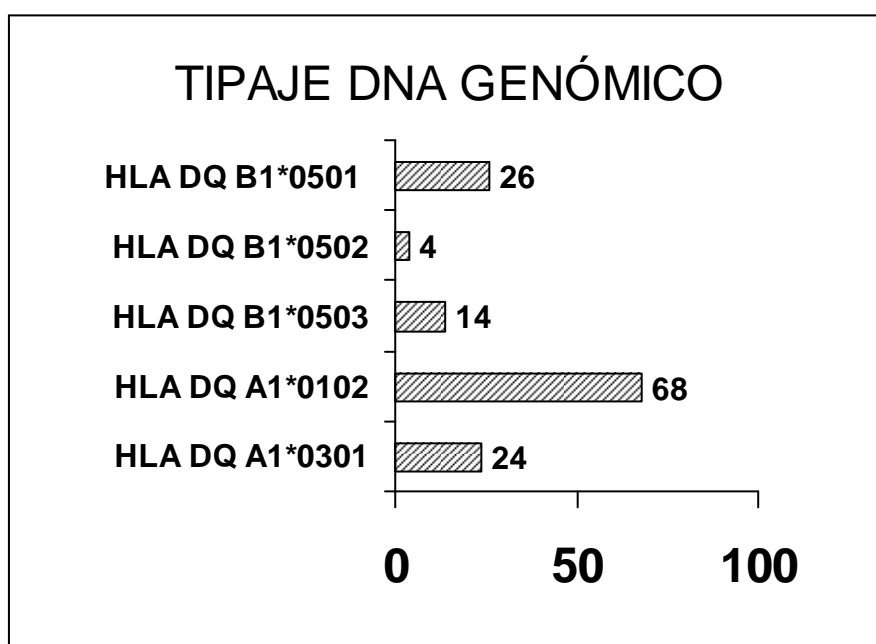


Gráfico 8

1.5 CONSUMO DE ALCOHOL, TABACO Y SAL

Los datos sobre este punto se extrapolaron de las respuestas dadas por los pacientes en el cuestionario de dieta. De los 135 pacientes incluidos, se obtuvieron sólo respuestas válidas en 127 pacientes, ya que en 8 casos el cuestionario no fue cumplimentado adecuadamente.

En cuanto al consumo de alcohol y tabaco, la mayoría de los pacientes se definen como no consumidores habituales de estas sustancias (tabaco 60,6% y alcohol 63,8%).

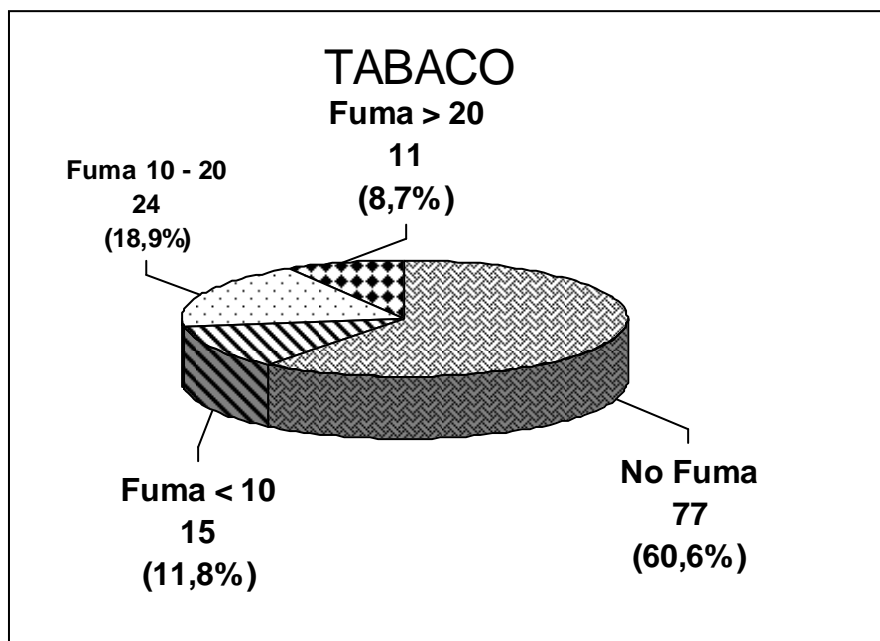


Gráfico 9

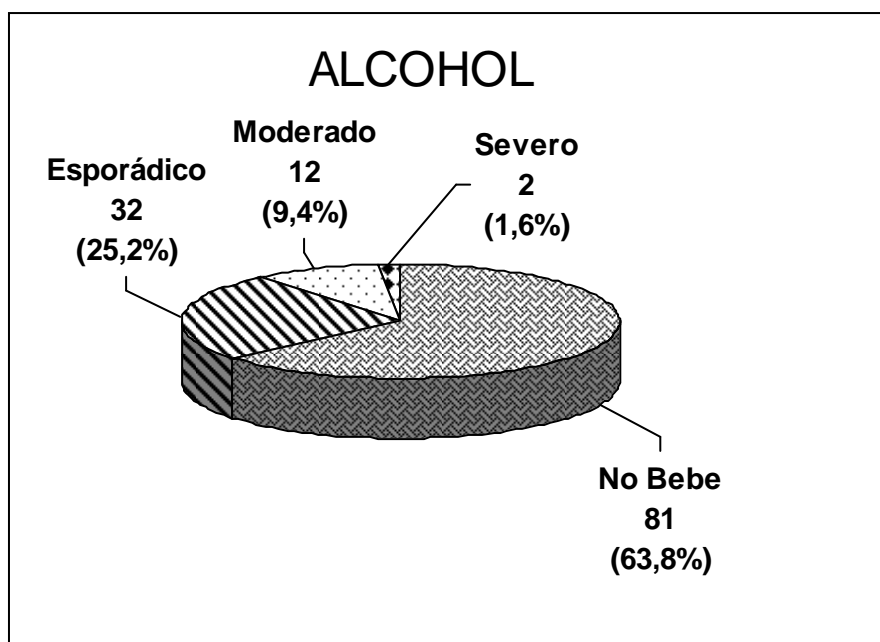


Gráfico 10

Con respecto al consumo de alimentos ricos en sal o un exceso de sal refinada, la mayoría también negaba su ingesta (81,9%).

1.6 GRUPO SANGUINEO

En cuanto al estudio del grupo sanguíneo, la mayoría de los pacientes presentaban el grupo O (50,4%) y el grupo sanguíneo A (41,1%), tal como queda reflejado en el gráfico 11.

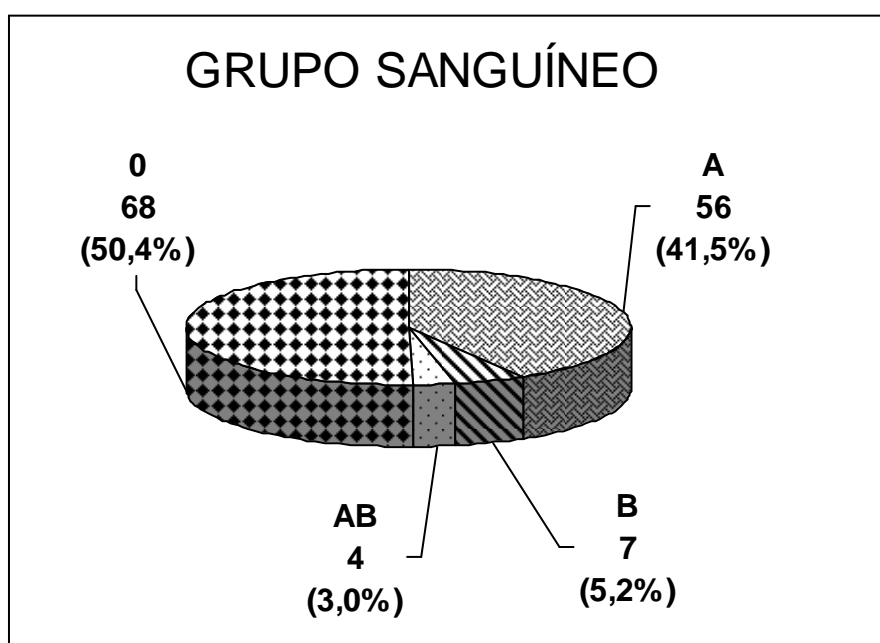


Gráfico 11

2. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES SEGÚN HISTOLOGÍA

2.1 GASTRITIS CRÓNICA SIN ATROFIA

2.1.1 DESCRIPCIÓN POR GRUPOS DE EDAD Y SEXO

Al estudiar los 64 pacientes con gastritis crónica sin atrofia, 37 (57,8%) son mujeres y 27 (42,2%) varones. La distribución de edad de los mismos se muestra en el gráfico 12, y la media es 51,98 años.

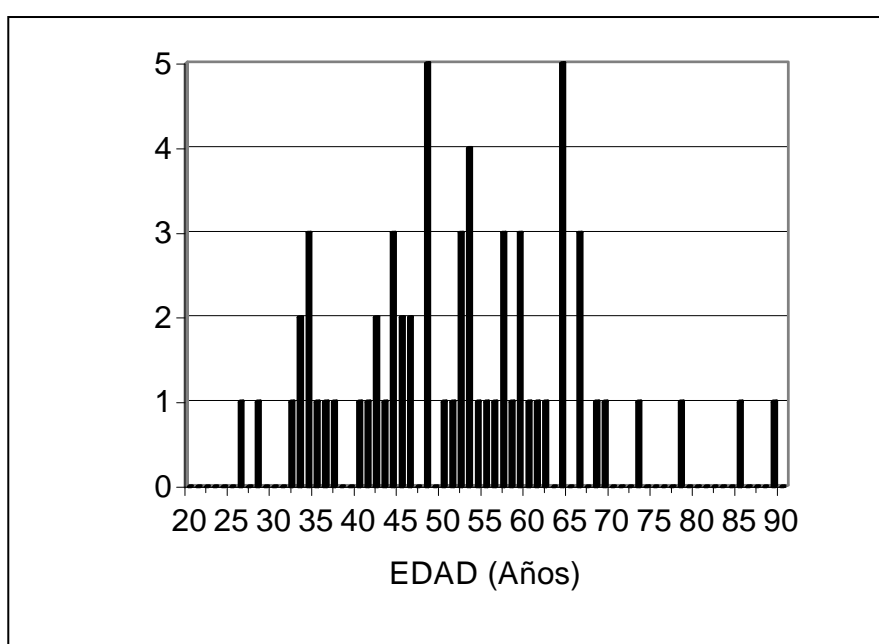


Gráfico 12

2.1.2. TIPAJE DE LAS CEPAS DE HELICOBACTER PYLORI INFECTANTE

En este grupo de pacientes con gastritis crónica sin atrofia, 52 (81,2%) están infectados por *Helicobacter pylori*, comprobado mediante amplificación con PCR del DNA extraído de las biopsias gástricas.

De estos 52 pacientes infectados por *Helicobacter pylori*, en 18 pacientes (34,6%) se comprueba la presencia del gen *cagA* en la cepa infectante.

El gen *vacA* es positivo en la forma s1 en 17 pacientes (32,7%) y en la s2 en 27 (51,9%). En 6 pacientes (11,5%) se comprueba la amplificación del gen *vacA* m1 y en 38 (73,1%) del gen *vacA* m2, como se muestra en el gráfico 13.

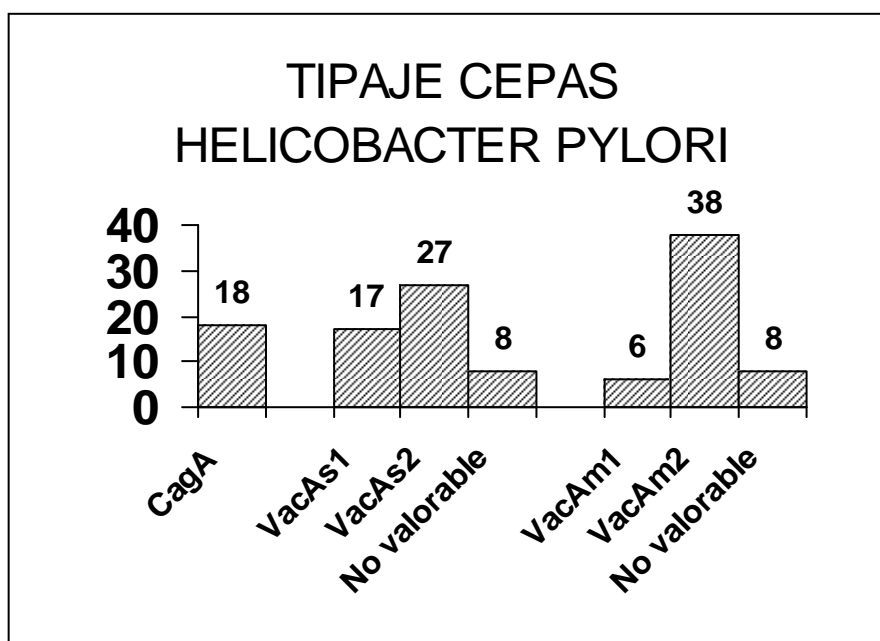


Gráfico 13

Además, al estudiar las distintas combinaciones de los genes de VacA, 6 pacientes (11,5%) presentan una cepa de *Helicobacter pylori* con la combinación s1m1, 11 pacientes (21,2%) con el tipo s1m2 y 27 (51,9%) con una cepa del tipo s2m2, tal como se observa en el gráfico 14.

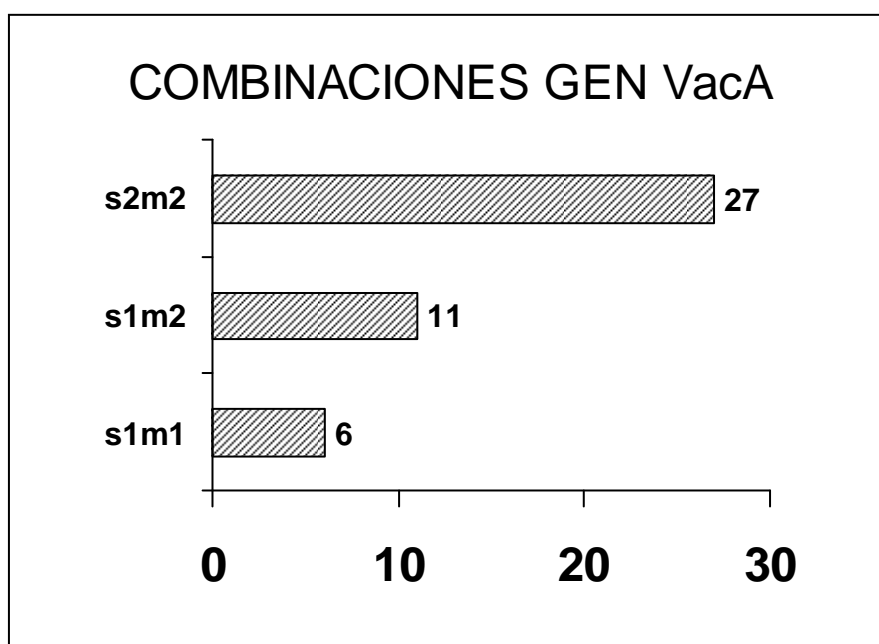


Gráfico 14

2.1.3 TIPAJE DEL DNA GENÓMICO DE LOS PACIENTES

De los 64 pacientes con gastritis crónica con atrofia, 14 pacientes (21,9%) presentan el alelo HLA DQ B1*0501, 3 pacientes (4,7%) el HLA DQ B1*0502 y 6 (9,4%) el HLA DQ B1* 0503. Respecto al alelo HLA DQ A1*0102 se comprobó su positividad en 29 pacientes (45,3%) y en 8 pacientes (12,5%) para el alelo HLA DQ A1*0301, de acuerdo al gráfico 15.

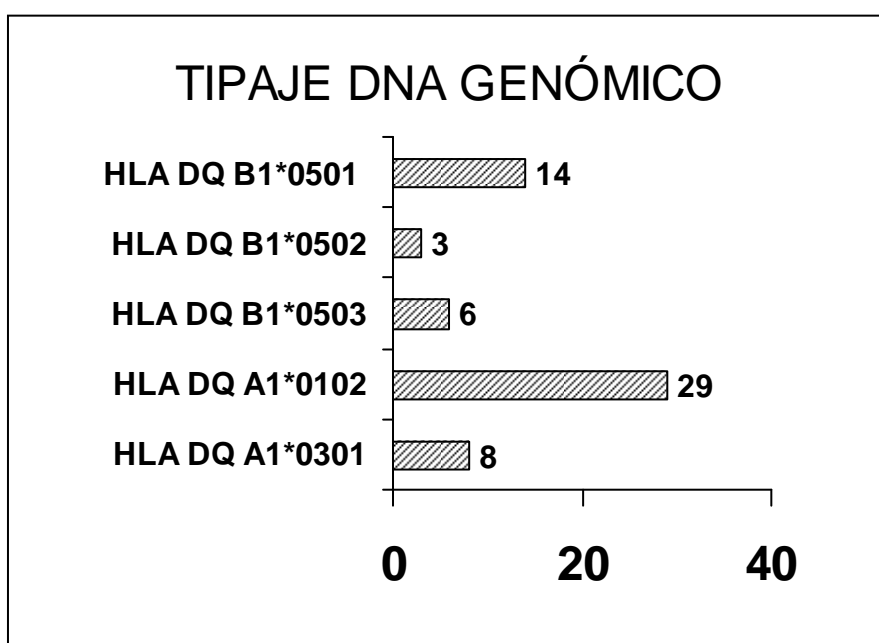


Gráfico 15

2.1.4. CONSUMO DE ALCOHOL, TABACO Y SAL

En 4 pacientes no se recibió la información relativa a este apartado. En cuanto al consumo de alcohol y tabaco, la mayoría de los pacientes se definen como no consumidores habituales de estas sustancias (tabaco 65% y alcohol 67%).

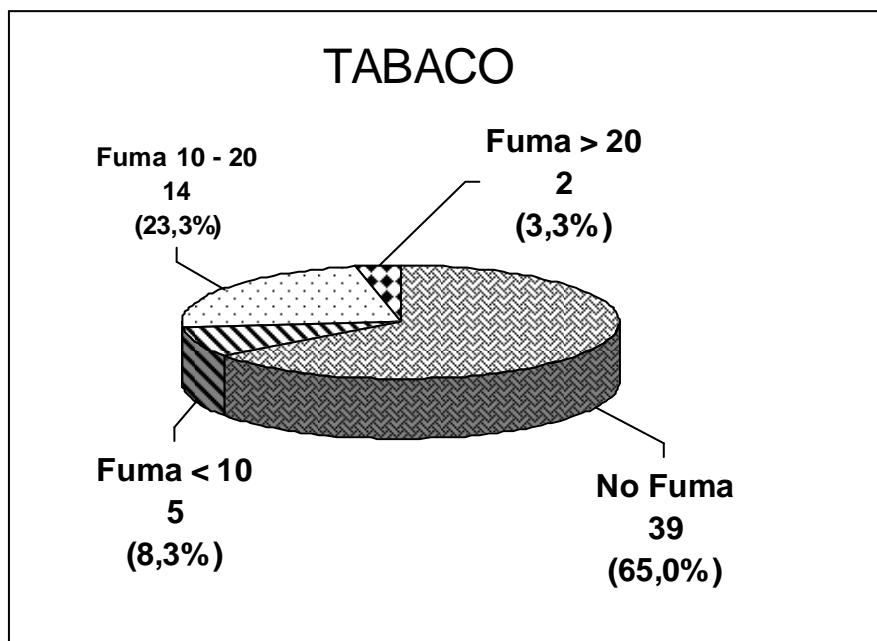


Gráfico 16

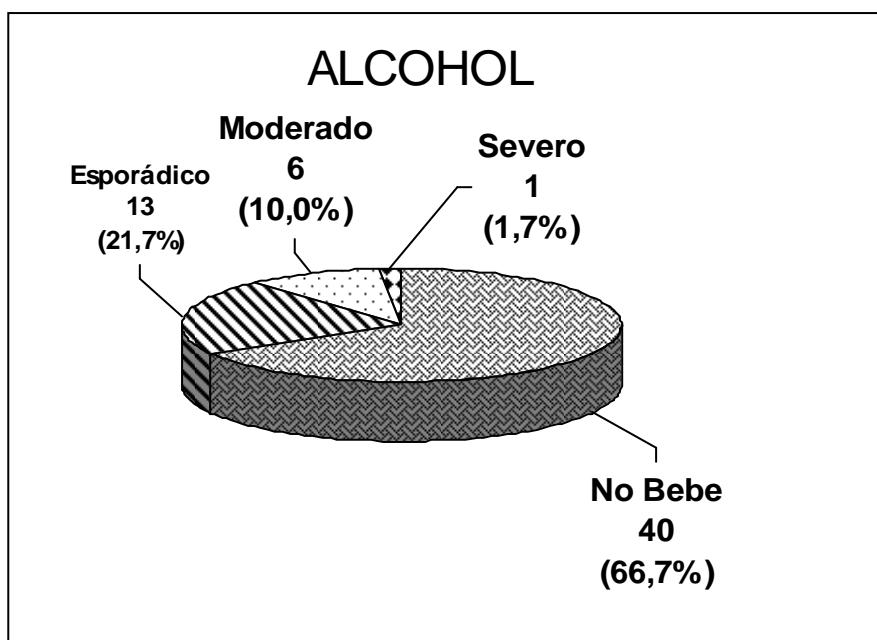


Gráfico 17

Los grupos concernientes al consumo de alcohol y tabaco se establecen con los mismos criterios que en el apartado anterior. Tan sólo 8 pacientes (13,3%) se declaran consumidores de alimentos ricos en sal o de un exceso de sal refinada.

2.1.5. GRUPO SANGUÍNEO

En cuanto al estudio del grupo sanguíneo, 32 pacientes presentan el grupo O (50%) y 27 pacientes el grupo sanguíneo A (42%) tal como queda reflejado en el gráfico 18.

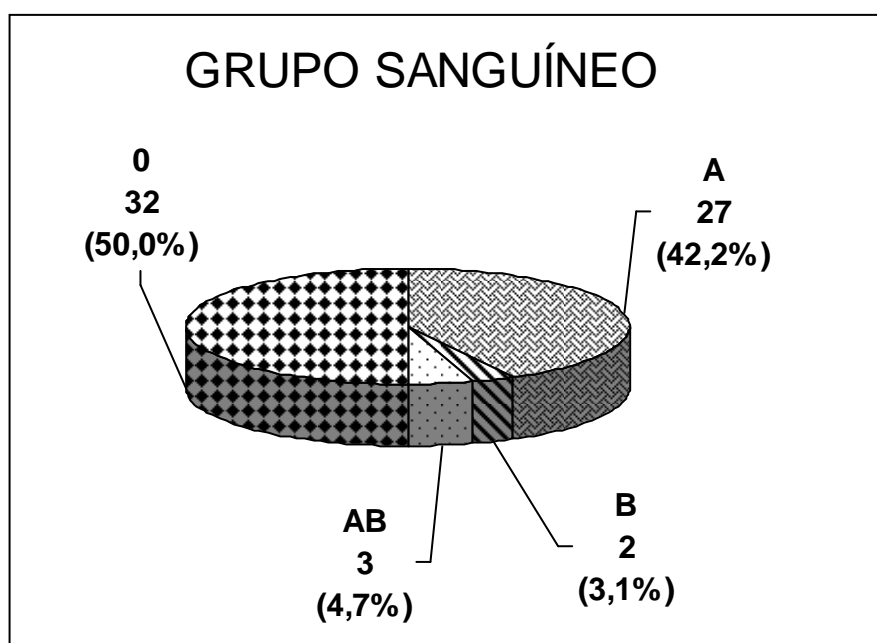


Gráfico 18

2.2 GASTRITIS CRÓNICA ATRÓFICA

2.2.1. DESCRIPCIÓN POR GRUPOS DE EDAD Y SEXO

Al estudiar los 22 pacientes con gastritis crónica atrófica, 8 (36,3%) son mujeres y 14 (63,7%) varones. La distribución de edad de los mismos se muestra en el gráfico siguiente, y la media es 57,5 años.

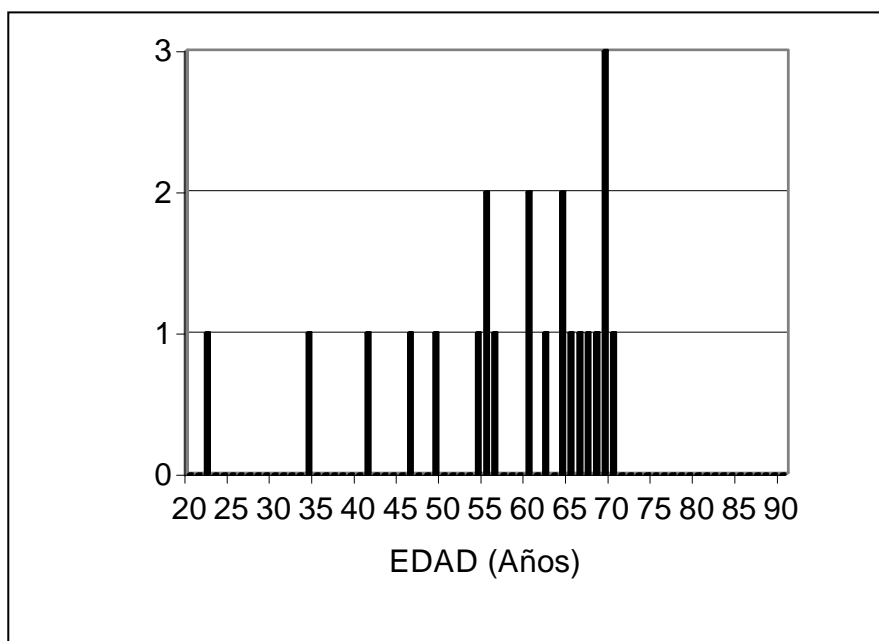


Gráfico 19

2.2.2. TIPAJE DE LAS CEPAS DE HELICOBACTER PYLORI INFECTANTE

En este grupo de pacientes con gastritis crónica sin atrofia 18 (81,8%) están infectados por *Helicobacter pylori*, de los cuales en 5 pacientes (27,8%) se comprueba la presencia del gen *cagA* en la cepa infectante.

El gen *vacA* es positivo en la forma s1 en 5 pacientes (27,8%), en la s2 en 9 (50%), en 4 pacientes (22,2%) la forma m1 y en 10 (55,6%) la m2.

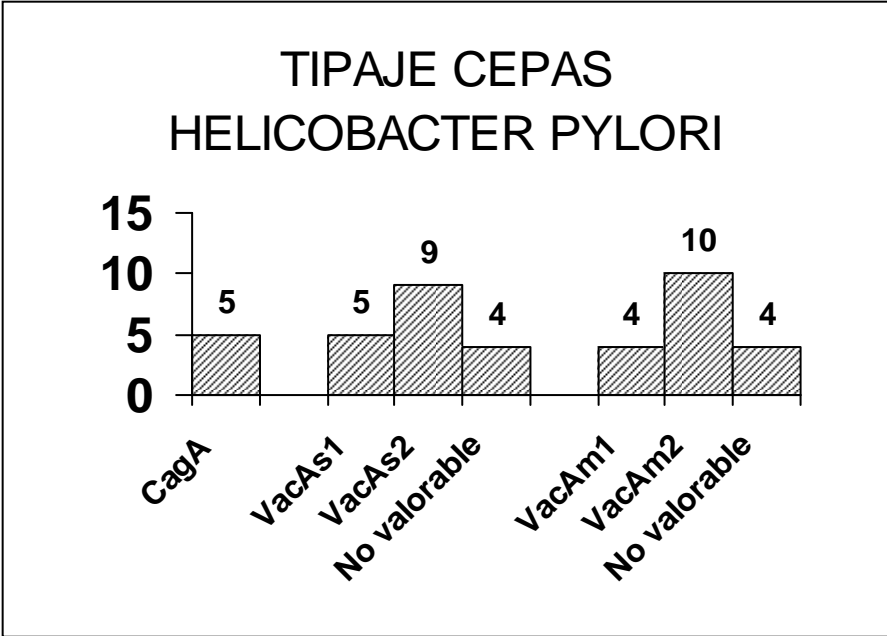


Gráfico 20

Además, al estudiar las distintas combinaciones de los genes de VacA, 4 pacientes (22,2%) presentan una cepa de Helicobacter pylori con la combinación s1m1, 1 paciente (5,6%) con el tipo s1m2 y 9 (50%) con una cepa del tipo s2m2, tal como se observa en el gráfico siguiente.

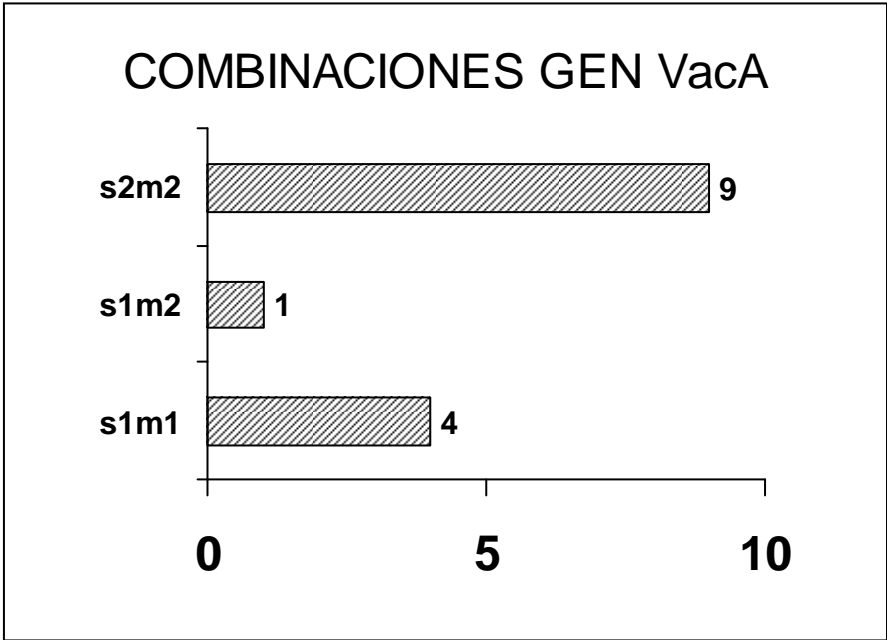


Gráfico 21

2.2.3. TIPAJE DEL DNA GENÓMICO DE LOS PACIENTES

De los 22 pacientes con gastritis crónica atrófica, 7 pacientes (31,8%) presentan el alelo HLA DQ B1*0501, ningún paciente el HLA DQ B1*0502 y 2 (9,1%) el HLA DQ B1* 0503. Respecto al alelo HLA DQ A1*0102 se comprueba su positividad en 14 pacientes (63,6%) y en 7 pacientes (31,8%) para el alelo HLA DQ A1*0301, de acuerdo al gráfico 22.

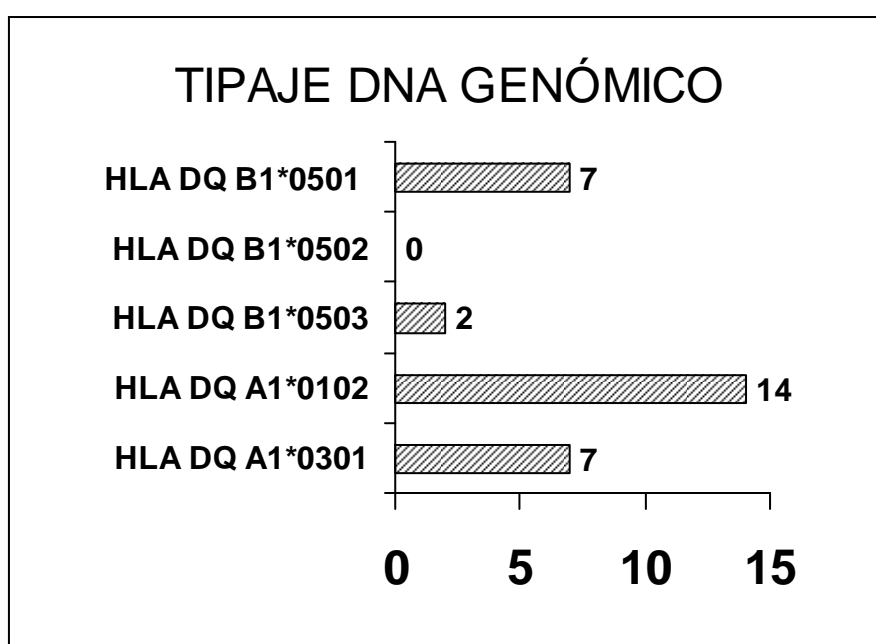


Gráfico 22

2.2.4. CONSUMO DE ALCOHOL, TABACO Y SAL

1 paciente no cumplimentó el cuestionario relativo a hábitos dietéticos y tóxicos. De nuevo, la mayoría de los pacientes se definen como no consumidores habituales de tabaco y alcohol (62% y 81%, respectivamente).

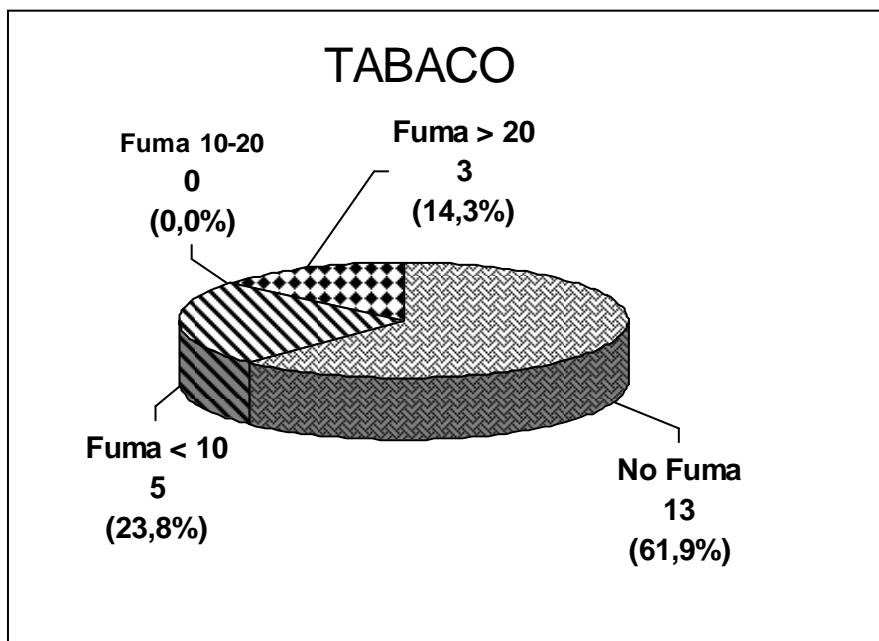


Gráfico 23

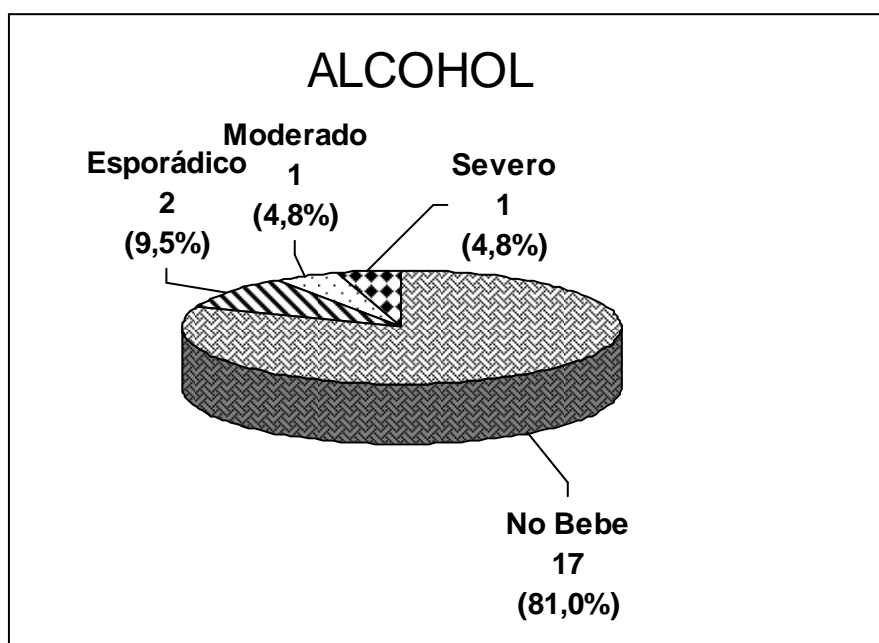


Gráfico 24

Tan sólo 6 pacientes (28,6%) se declaran consumidores de alimentos ricos en sal o de un exceso de sal refinada.

2.2.5. GRUPO SANGUÍNEO

En cuanto al estudio del grupo sanguíneo, 10 pacientes presentan el grupo O (46%) y 10 pacientes el grupo sanguíneo A (46%).

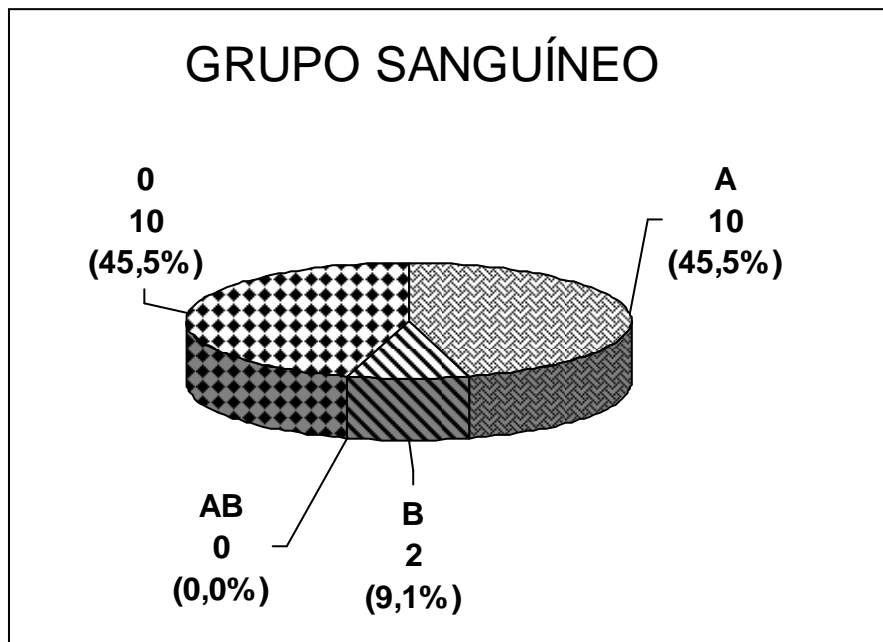


Gráfico 25

2.3 GASTRITIS CRÓNICA CON METAPLASIA INTESTINAL

2.3.1. DESCRIPCIÓN POR GRUPOS DE EDAD Y SEXO

Al estudiar los 47 pacientes con gastritis crónica con metaplasia intestinal 19 (40,4%) son mujeres y 28 (59,6%) varones. La distribución de edad de los mismos se muestra en el gráfico siguiente, y la media es 58,9 (37-85 años).

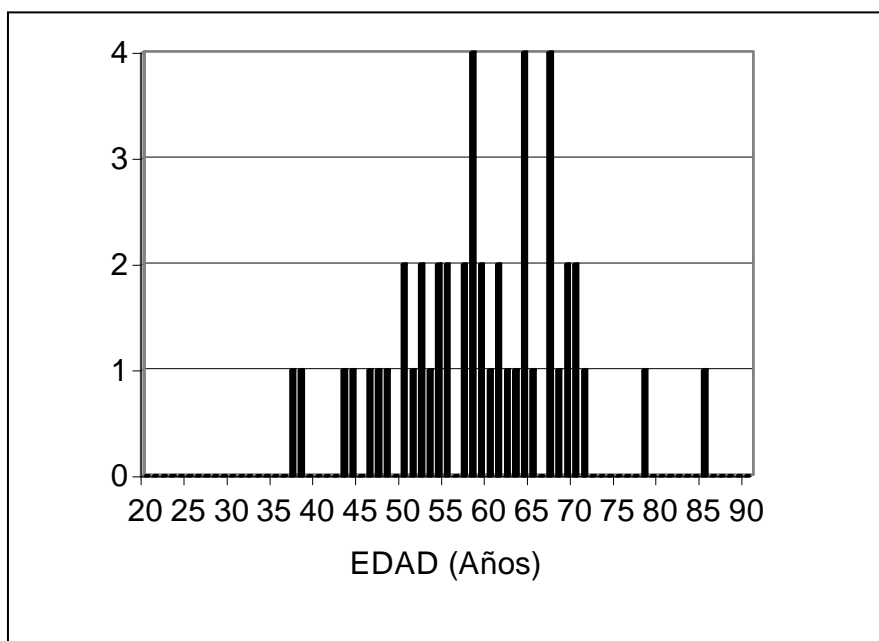


Gráfico 26

2.3.2 TIPAJE DE LAS CEPAS DE HELICOBACTER PYLORI INFECTANTE

De los 47 pacientes con metaplasia intestinal, 34 (72,3%) presentan infección por *Helicobacter pylori*.

En 25 pacientes (73,5%) se comprueba la presencia del gen *cagA* en la cepa infectante. El gen *vacA* s1 es positivo en 26 pacientes (76,5%), el gen s2 en 2

(5,9%), en 12 pacientes (35,3%) se comprueba positividad para m1 y en 16 (47%) para m2.

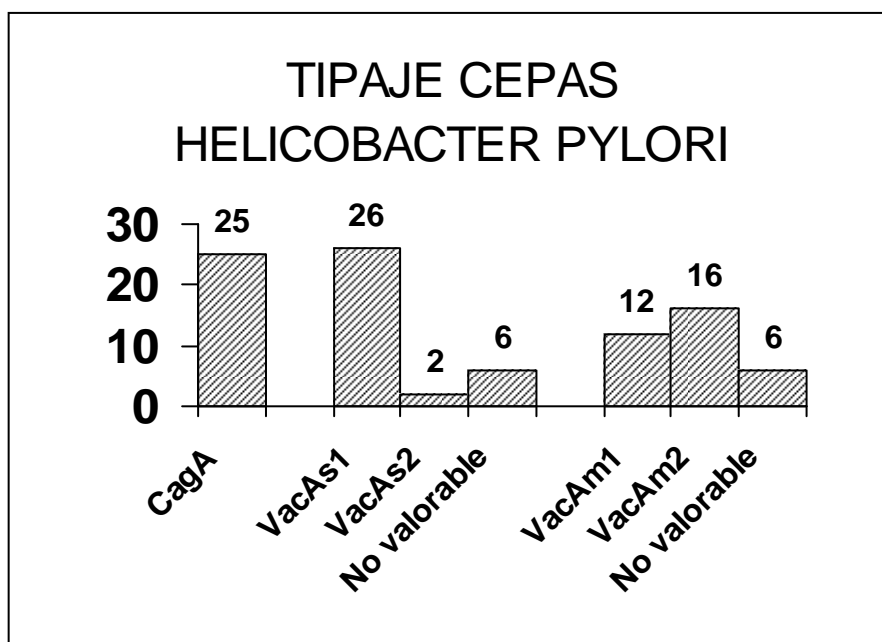


Gráfico 27

12 pacientes (35,3%) tienen la combinación s1m1 de los genes de VacA, 14 pacientes (41,2%) presentan una cepa de Helicobacter pylori con la combinación s1m2 y 2 pacientes (5,9%) la combinación s2m2.

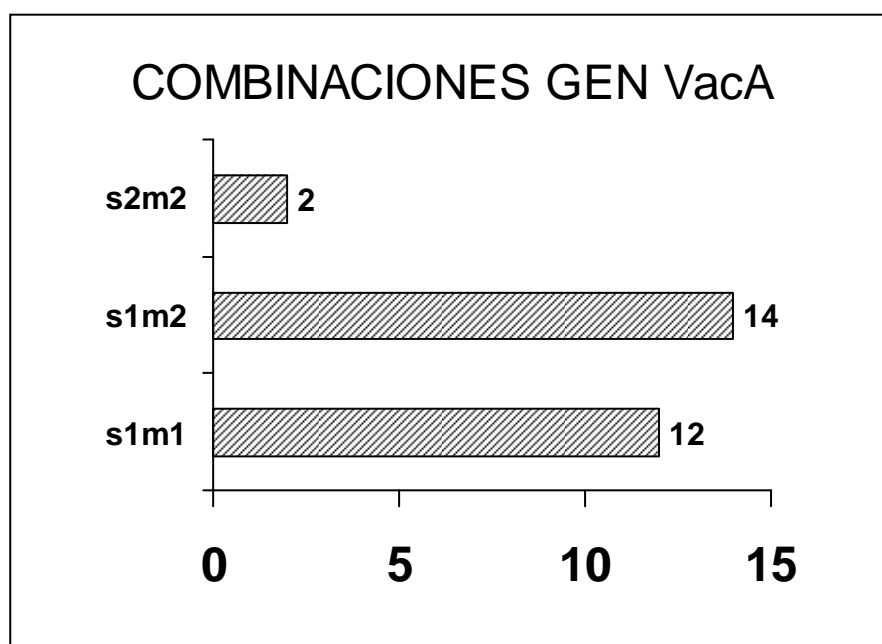


Gráfico 28

2.3.3 TIPAJE DEL DNA GENÓMICO DE LOS PACIENTES

De los 47 pacientes con gastritis crónica con metaplasia intestinal, 4 pacientes (8,5%) tienen el alelo HLA DQ B1*0501, 1 paciente (2,1%) presenta el HLA DQ B1*0502 y 6 (12,8%) el HLA DQ B1* 0503.

24 pacientes (51,1%) son positivos para el alelo HLA DQ A1*0102 y 9 pacientes (19,1%) para el alelo HLA DQ A1*0301.

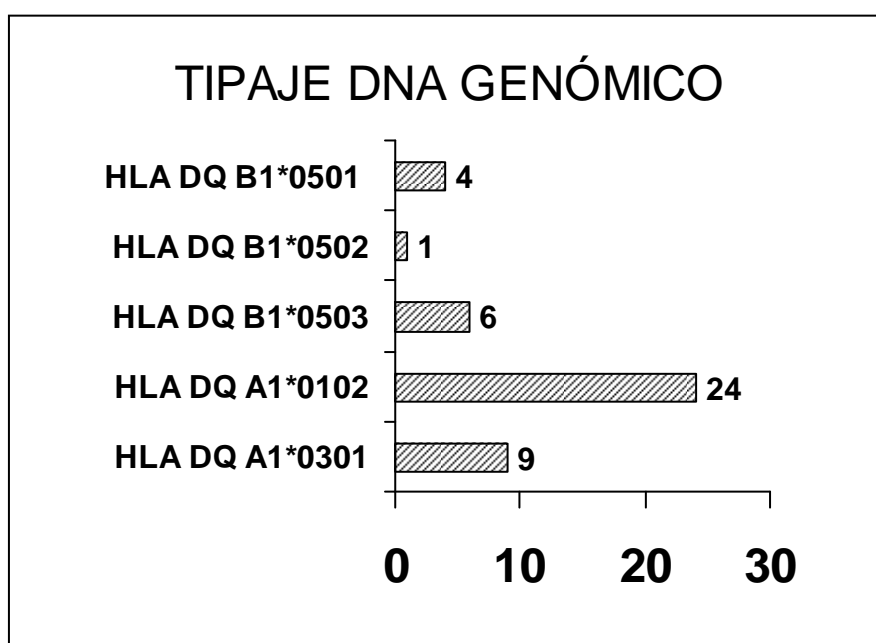


Gráfico 29

2.3.4 CONSUMO DE ALCOHOL, TABACO Y SAL

En 3 ocasiones no se recibió el cuestionario correctamente cumplimentado. Como en los grupos anteriores, el grupo predominante es el de los no consumidores habituales de tabaco y alcohol (54,5% y 50%, respectivamente).

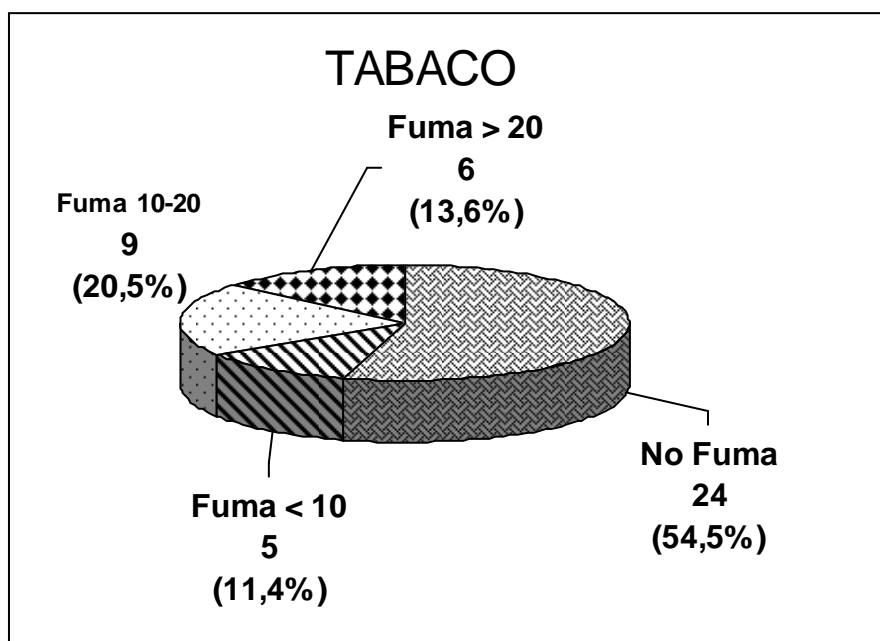


Gráfico 30

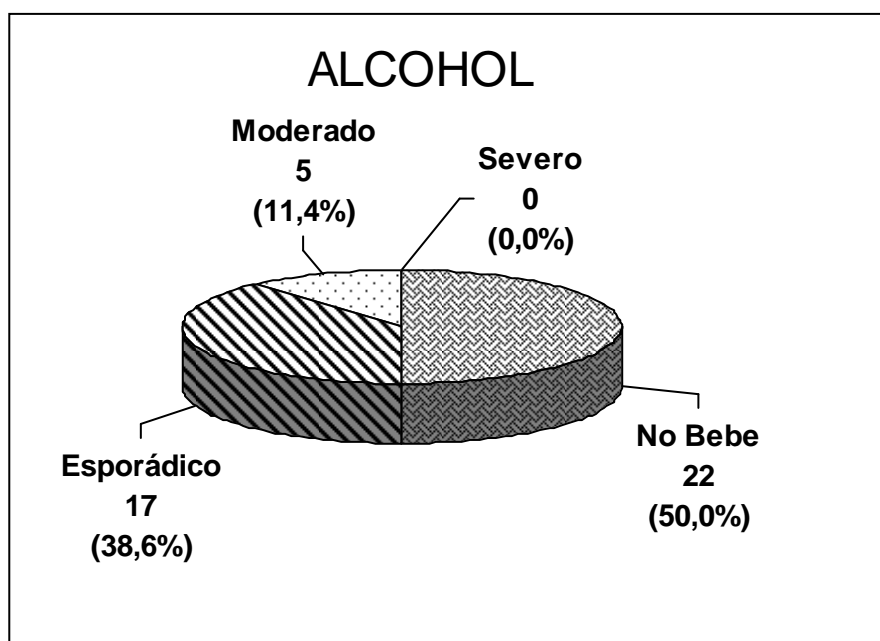


Gráfico 31

9 pacientes (20,5 %) son consumidores de alimentos ricos en sal o de un exceso de sal refinada.

2.3.5 GRUPO SANGUÍNEO

Como se muestra en el gráfico 32, 25 pacientes (53,2%) tienen el grupo sanguíneo O, 18 (38,3%) el grupo A, 3 (6,4%) el grupo B y 1 (2,1%) el grupo AB.

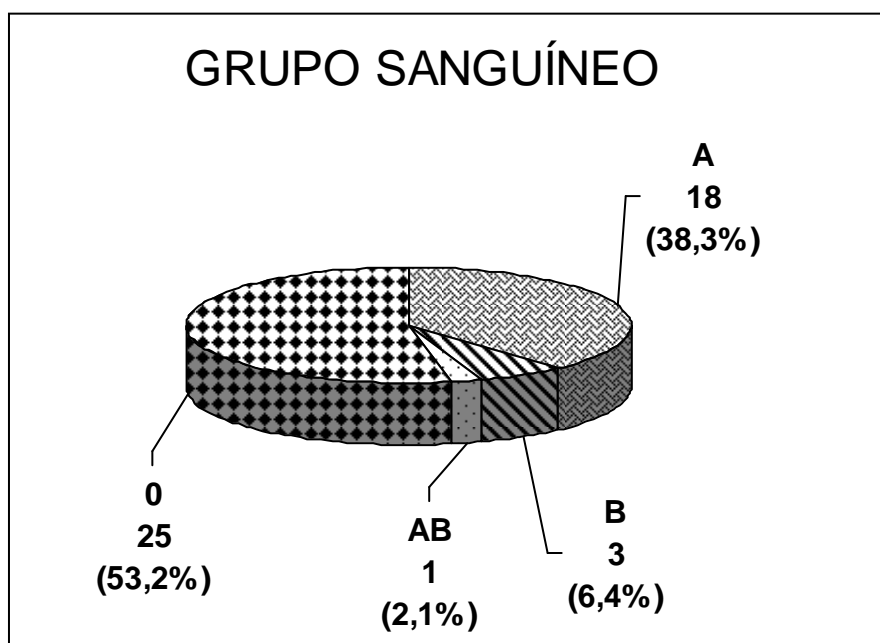


Gráfico 32

2.4 DISPLASIA

A continuación se detallan las características de los 2 únicos pacientes con displasia:

- Paciente nº 1: Varón de 57 años, que presenta infección por Helicobacter Pylori, CagA positivo s1m2. El estudio del DNA genómico muestra positividad para los alelos HLA B1*0501 y el HLA A1*0102. Es no fumador y no bebedor habitual y no reconoce un consumo excesivo de sal. Tiene el grupo sanguíneo A.

- Paciente nº 2: Varón de 43 años, que presenta infección por Helicobacter Pylori, CagA positivo s1m1. El estudio del DNA genómico no muestra positividad para ninguno de los alelos estudiados. Fuma de 10 a 20 cigarrillos al día y no consume de forma habitual alcohol. No consume excesiva sal. Tiene el grupo sanguíneo universal.

2.5 CUADRO RESUMEN DE CARACTERÍSTICAS

A continuación se muestra un cuadro resumen con las características de cada uno de los grupos descritos:

- General: incluye 135 pacientes.
- Gastritis crónica sin atrofia.
- Gastritis crónica atrófica.
- Gastritis crónica con metaplasma intestinal.
- Displasia.

Nº	Sexo		Edad media	HP PCR	CagA		VacA s1/s2			VacA m1/m2			Combinaciones			
	Hom	Muj			Si	No	s1	s2	No Valorable	m1	m2	No Valorable	s1m1	s1m2	s2m2	No Valorable

General	135	71	64	55,3	106	50	56	50	38	18	23	65	18	23	27	38	18
Total		135				106		106			106			106			

GC sin atrofia	64	27	37	51,98	52	18	34	17	27	8	6	38	8	6	11	27	8
Total		64				52		52			52			52			

GC atrófica	22	14	8	57,5	18	5	13	5	9	4	4	10	4	4	1	9	4
Total		22				18		18			18			18			

GC + MI	47	28	19	58,9	34	25	9	26	2	6	12	16	6	12	14	2	6
Total		47				34		34			34			34			

Displasia	2	2	0	50	2	2	0	2	0	0	1	1	0	1	1	0	0
Total		2				2		2			2			2			

General	100%	52,6%	47,4%		78,5%	47,2%	52,8%	47%	35,8%	17,0%	21,7%	61,3%	17,0%	21,7%	25,5%	35,8%	17,0%
---------	------	-------	-------	--	-------	-------	-------	-----	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

GC sin atrofia	47,4%	42,2%	57,8%		81,3%	34,6%	65,4%	32,7%	51,9%	15,4%	11,5%	73,1%	15,4%	11,5%	21,2%	51,9%	15,4%
----------------	-------	-------	-------	--	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

GC atrófica	16,3%	63,6%	36,4%		81,8%	27,8%	72,2%	27,8%	50%	22,2%	22,2%	55,6%	22,2%	22,2%	5,6%	50%	22,2%
-------------	-------	-------	-------	--	-------	-------	-------	-------	-----	-------	-------	-------	-------	-------	------	-----	-------

GC + MI	34,8%	59,6%	40,4%		72,3%	73,5%	26,5%	76,5%	5,9%	17,6%	35,3%	47%	17,6%	35,3%	41,2%	5,9%	17,6%
---------	-------	-------	-------	--	-------	-------	-------	-------	------	-------	-------	-----	-------	-------	-------	------	-------

Displasia	1,5%	100%	0%		100%	100%	0%	100%	0%	0%	50%	50%	0%	50%	50%	0%	0%
-----------	------	------	----	--	------	------	----	------	----	----	-----	-----	----	-----	-----	----	----

	HLA DQ B1* 501	HLA DQ B1* 502	HLA DQ B1* 503	HLA DQ A1* 0102	HLA DQ A1* 0301	Tipo Sangre			
	Si	Si	Si	Si	Si	0	A	B	AB

General	26	4	14	68	24	68	56	7	4
Total	135	135	135	135	135	135			

GC sin atrofia	14	3	6	29	8	32	27	2	3
Total	64	64	64	64	64	64			

GC atrofica	7	0	2	14	7	10	10	2	0
Total	22	22	22	22	22	22			

GC + MI	4	1	6	24	9	25	18	3	1
Total	47	47	47	47	47	47			

Displasia	1	0	0	1	0	1	1	0	0
Total	2	2	2	2	2	2			

General	19,3%	3%	10,4%	50,4%	17,8%	50,4%	41,5%	5,2%	3%
---------	-------	----	-------	-------	-------	-------	-------	------	----

GC sin atrofia	21,9%	4,7%	9,4%	45,3%	12,5%	50%	42,2%	3,1%	4,7%
----------------	-------	------	------	-------	-------	-----	-------	------	------

GC atrofica	31,8%	0%	9,1%	63,6%	31,8%	45,5%	45,5%	9,1%	0%
-------------	-------	----	------	-------	-------	-------	-------	------	----

GC + MI	8,5%	2,1%	12,8%	51,1%	19,1%	53,2%	38,3%	6,4%	2,1%
---------	------	------	-------	-------	-------	-------	-------	------	------

Displasia	50%	0%	0%	50%	0%	50%	50%	0%	0%
-----------	-----	----	----	-----	----	-----	-----	----	----

	Tabaco					Alcohol					Sal		
	No	<10	10-20	>20	No Con- testa	No	Esporá- dico	Modera- do	Severo	No Con- testa	No	Sí	No Con- testa
General	77	15	24	11	8	81	32	12	2	8	104	23	8
Total	127					127					127		
GC sin atrofia	39	5	14	2	4	40	13	6	1	4	52	8	4
Total	60					60					60		
GC atrófica	13	5	0	3	1	17	2	1	1	1	15	6	1
Total	21					21					21		
GC + MI	24	5	9	6	3	22	17	5	0	3	35	9	3
Total	44					44					44		
Displasia	1	0	1	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0
Total	2					2					2		
General	60,6%	11,8%	18,9%	8,7%		63,8%	25,2%	9,4%	1,6%		81,9%	18,1%	
GC sin atrofia	65%	8%	23%	3%		66,7%	21,7%	10,0%	1,7%		86,7%	13,3%	
GC atrófica	61,9%	23,8%	0,0%	14,3%		81%	10%	5%	5%		71,4%	28,6%	
GC + MI	54,5%	11,4%	20,5%	13,6%		50%	39%	11%	0%		79,5%	20,5%	
Displasia	50%	0%	50%	0%		100%	0%	0%	0%		100%	0%	

3 COMPARACIÓN ENTRE PACIENTES CON GASTRITIS CRÓNICA CON METAPLASIA INTESTINAL Y SIN METAPLASIA INTESTINAL

Una vez descritos en detalle los distintos grupos histológicos, nos pareció interesante tratar de establecer la comparación en cuanto a distintos factores entre el grupo de pacientes que presentaban metaplasia intestinal en el estudio histológico y aquellos en los que se describía gastritis crónica sin metaplasia.

3.1. INFLUENCIA DEL SEXO, LA EDAD Y EL GRUPO SANGUÍNEO

En nuestro estudio no se observan diferencias significativas (0,19) en cuanto al sexo entre los grupos de pacientes estudiados.

La presencia de metaplasia intestinal es significativamente más elevada ($p=0.04$) en los pacientes mayores de 55 años que en los menores de esta edad.

No se observan diferencias significativas en cuanto a la presencia de metaplasia intestinal en la mucosa gástrica y los distintos grupos sanguíneos.

	Gastritis crónica con metaplasia intestinal N (%)	Gastritis crónica sin metaplasia intestinal N (%)	p	O.R. (IC 95%)
SEXO			0,19	
Varones	28 (59,6%)	41 (47,7%)		1,62 (0,79-3,32)
Mujeres	19 (40,4%)	45 (52,3%)		
EDAD			0,04	
< 55 años	17 (36,1%)	47 (54,7%)		
> 55 años	30 (63,9%)	39 (45,3%)		2,12 (1,02-4,41)
GRUPO SANGUÍNEO			0,89	
A	18 (38,3%)	37 (43%)		
B	3 (6,4%)	4 (4,9%)		1,54 (0,31-7,63)
AB	1 (2,1%)	3 (3,7%)		0,68 (0,07-7,05)
0	25 (53,2%)	42 (48,8%)		1,22 (0,58-2,6)

3.2. INFLUENCIA DEL HELICOBACTER PYLORI

No se observan diferencias significativas (0,16) en cuanto a la presencia de Helicobacter Pylori en los dos grupos de pacientes.

Sin embargo, existen importantes diferencias significativas en la presencia de metaplasia en los pacientes en las distintas cepas de Helicobacter pylori. La positividad de los genes *cagA*, *VacAs1* y *VacAm1* se relaciona con un incremento del número de pacientes con metaplasia, mientras que la presencia de una cepa de Helicobacter Pylori positiva para los genes *VacAs2* y *VacAm2* parece producir un efecto protector sobre la presencia de metaplasia intestinal.

Como consecuencia de los resultados anteriores, se observan también diferencias significativas al relacionar las distintas combinaciones *s1m1*, *s1m2* y *s2m2* con la presencia de metaplasia intestinal.

En el mismo sentido que anteriormente, los pacientes con cepas *s1m1* y *s1m2* presentan con una mayor frecuencia metaplasia intestinal, mientras que los pacientes con una cepa *s2m2* desarrollan metaplasia intestinal de forma menos frecuente, siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

	Gastritis crónica con metaplasia intestinal N (%)	Gastritis crónica sin metaplasia intestinal N (%)	p	O.R. (IC 95%)
HELICOBACTER PYLORI			0,16	
Presencia	34 (72,3%)	70 (81,4%)		0,55 (0,24-1,3)
Ausencia	13 (27,7%)	16 (18,6%)		

TIPAJE CEPAS HELICOBACTER				
CagA	0,002			
Positivo	25 (53,2%)	23 (26,7%)		3,11 (1,47-6,56)
Negativo	22 (46,8%)	63 (73,3%)		
VacAs1	<0,001			
Positivo	26 (55,3%)	22 (25,6%)		4,7 (2,2-10)
Negativo	21 (44,7%)	64 (74,4%)		
VacAs2	<0,001			
Positivo	2 (4,2%)	36 (41,9%)		0,06 (0,01-0,27)
Negativo	45 (95,8%)	50 (58,1%)		
VacAm1	0,06			
Positivo	12 (25,5%)	10 (11,6%)		2,3 (0,94-5,8)
Negativo	35 (74,5%)	76 (88,4%)		
VacAm2	0,02			
Positivo	16 (34%)	48 (55,8%)		0,43 (0,2-0,9)
Negativo	31 (66%)	38 (44,2%)		

	Gastritis crónica con metaplasia intestinal N (%)	Gastritis crónica sin metaplasia intestinal N (%)	p	O.R. (IC 95%)
COMBINACIONES				
VacA				
VacAs1m1			0,02	
Positivo	12 (25,5%)	10 (11,6%)		3 (1,1-7,54)
Negativo	35 (74,5%)	76 (88,4%)		
VacAs1m2			0,03	
Positivo	14 (29,8%)	12 (14 %)		2,6 (1,07-6,22)
Negativo	33 (70,2%)	74 (86%)		
VacAs2m2			<0,001	
Positivo	2 (4,3%)	36 (41,9%)		0,06 (0,13-0,26)
Negativo	45 (95,7%)	50 (58,1%)		

3.3 TIPAJE DEL DNA GENÓMICO DE LOS PACIENTES

Al estudiar los distintos alelos del gen HLA DQ no se observan diferencias significativas entre la presencia de metaplasia intestinal y los alelos HLA B1*0502, HLA B1*0503, HLA A1*0102 y HLA A3*0301. Por el contrario, se observa una diferencia significativa en la frecuencia de metaplasia en el grupo de pacientes con el alelo HLA B1*0501.

	Gastritis crónica con metaplasia intestinal N (%)	Gastritis crónica sin metaplasia intestinal N (%)	p	O.R. (IC 95%)
TIPAJE DNA				
HLA B1*0501			0,02	
Positivo	4 (8,5%)	21 (24,4%)		0,29 (0,09-0,89)
Negativo	43 (91,5%)	65 (75,6%)		
HLA B1*0502			0,64	
Positivo	1 (2,1%)	3 (3,5%)		0,58 (0,06-5,8)
Negativo	46 (97,9%)	83 (96,5%)		
HLA B1*0503			0,54	
Positivo	6 (12,7%)	8 (9,3%)		1,4 (0,46-4,33)
Negativo	41 (87,3%)	78 (90,7%)		

	Gastritis crónica con metaplasia intestinal N (%)	Gastritis crónica sin metaplasia intestinal N (%)	p	O.R. (IC 95%)
HLA A1*0102			0,96	
Positivo	24 (51,1%)	43 (50%)		1,02 (0,5-2,07)
Negativo	23 (48,9%)	43 (50%)		
HLA A1*0301			0,83	
Positivo	9 (19,1%)	15 (17,4%)		1,1 (0,44-2,76)
Negativo	38 (81,9%)	71 (82,6%)		

3.4 CONSUMO DE ALCOHOL, TABACO Y SAL

No se observan diferencias significativas en cuanto a la presencia de metaplasia intestinal en la mucosa gástrica y el consumo de tabaco o un exceso de sal. Sin embargo, existe una asociación significativa entre la presencia de metaplasia intestinal y el consumo de alcohol, fundamentalmente en cantidad moderada.

	Gastritis crónica con metaplasia intestinal N (%)	Gastritis crónica sin metaplasia intestinal N (%)	p	O.R. (IC 95%)
TABACO			0,47	
No fuma	24 (54,5%)	52 (64,2%)		
< 10 cigarrillos/día	5 (11,3%)	10 (12,3%)		1,23 (0,33-3,51)
10-20 cigarrillos/día	9 (20,5%)	14 (17,3%)		1,42 (0,53-3,66)
> 20 cigarrillos/día	6 (13,7%)	5 (6,2%)		2,65 (0,72-9,36)
ALCOHOL			0,04	
No bebe	22 (50%)	57 (70,4%)		
Esporádico	17 (38,6%)	15 (18,5%)		2,94 (1,25-6,88)
Moderado/severo	5 (11,4%)	9 (11,1%)		1,44 (0,43-4,77)
SAL			0,66	
Toma	9 (20,5%)	14 (17,3%)		1,16 (0,48-3,1)
No toma	35 (79,5%)	67 (82,7%)		

3.5 ANALISIS MULTIVARIANTE

Se ha realizado además un análisis multivariante mediante la construcción de un modelo de regresión logística paso a paso, considerando la presencia de metaplasia intestinal como variable dependiente y la edad, el sexo, el grupo sanguíneo, los distintos genes de *Helicobacter pylori*, los alelos del gen HLA DQ del huésped, el consumo de alcohol, tabaco y sal como variables independientes.

El resultado de este análisis multivariante se muestra en la siguiente tabla. Se ha considerado que las diferencias son estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$ y se muestran las odds ratio (OR) con sus intervalos de confianza al 95% (IC 95%) de los factores de riesgo asociados de forma independiente con la presencia de metaplasia intestinal.

	OR	IC 95%
Edad		
<55 años	1	
>55 años	2,88	1,21-6,89
VacA s1		
Negativo	1	
Positivo	3,06	1,22-7,63
VacA s2		
Negativo	1	
Positivo	0,09	0,02-0,48
HLA B1 *501		
Negativo	1	
Positivo	0,15	0,41-0,58

El análisis de regresión logística identifica únicamente a la edad mayor de 55 años, la presencia de una cepa de *Helicobacter pylori* productora de citotoxina vacuolizante y la ausencia del alelo HLA DQ B1*0501 como factores de riesgos independiente para la metaplasia intestinal.

Así, los mayores de 55 años presentan un riesgo casi tres veces mayor de presentar metaplasia intestinal que los menores de esta edad. Un riesgo similar presentan los sujetos infectados por una cepa de *Helicobacter pylori* con el gen VacAs1.

Por otro lado, la infección por cepas la bacteria portadoras del gen VacAs2 y el hecho de que el huésped presente el alelo HLA DQ B1*0501 aparecen como factores fuertemente protectores ante la presencia de la metaplasia.

ESTUDIO 2: ESTUDIO COHORTE DE PROGRESIÓN DE LESIONES PRENEOPLÁSICAS GÁSTRICAS EN UNA POBLACIÓN SELECCIONADA EN UN PERIODO DE TIEMPO SUPERIOR A 5 AÑOS.

1. DESCRIPCIÓN GENERAL

1.1. DESCRIPCIÓN POR GRUPO DE EDAD Y SEXO

Aplicando los criterios de inclusión y exclusión referidos en el apartado de material y métodos se incluyen en el estudio un total de 56 pacientes dispépticos, de los cuales 37 son varones (66,1%) y 19 mujeres (33,9%), con una media de edad de 52,39 años en el momento de inclusión en el estudio (rango 18-65).

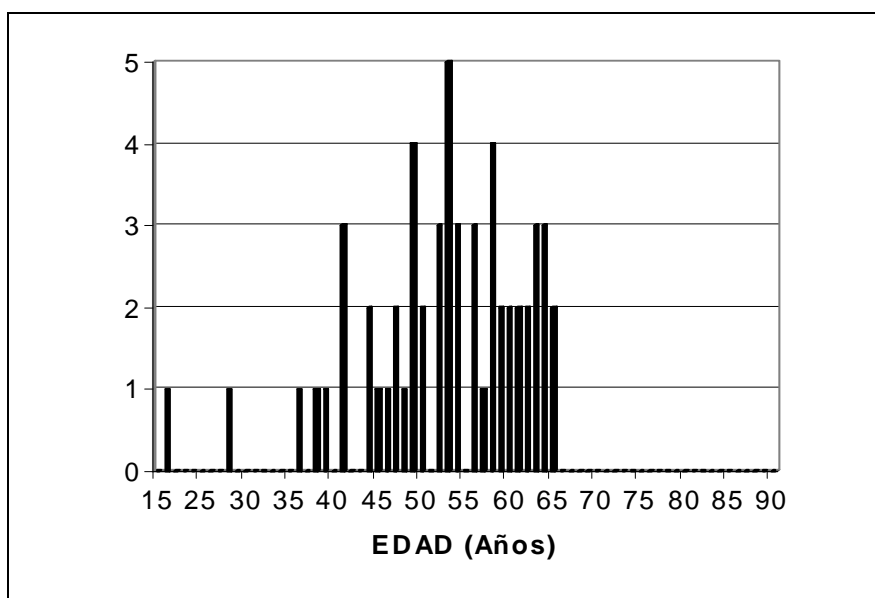


Gráfico 33

1.2. ESTUDIO HISTOLÓGICO

Los resultados del examen histológico de la mucosa gástrica realizado a todos los pacientes en el momento de la inclusión en el año 1994 quedan recogidos en el siguiente gráfico. La mayoría de los pacientes tiene gastritis crónica, con o sin atrofia.

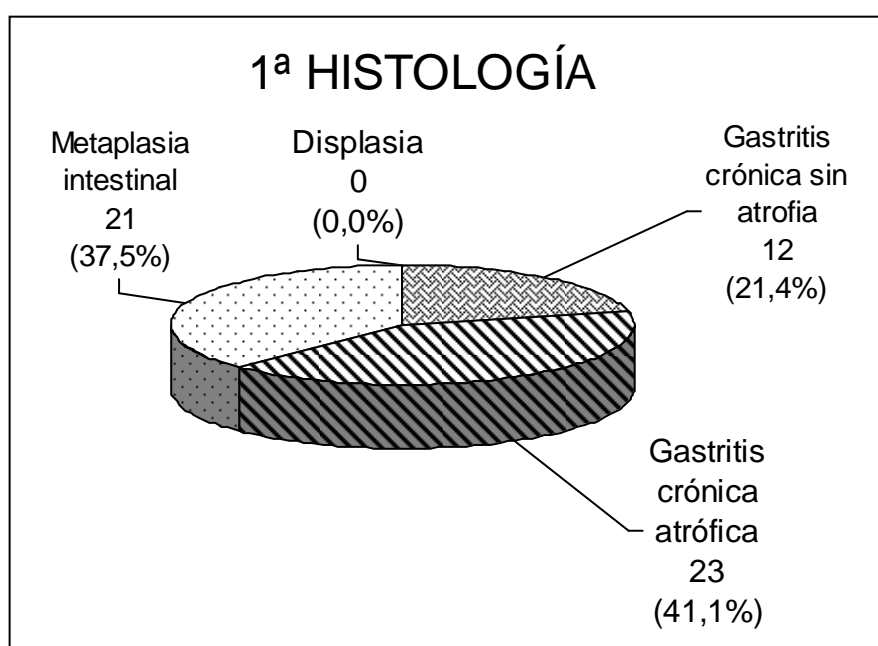


Gráfico 34

Tras un periodo de tiempo medio de 5,7 años, en el momento del segundo estudio histológico, los pacientes se distribuyen de la manera siguiente:

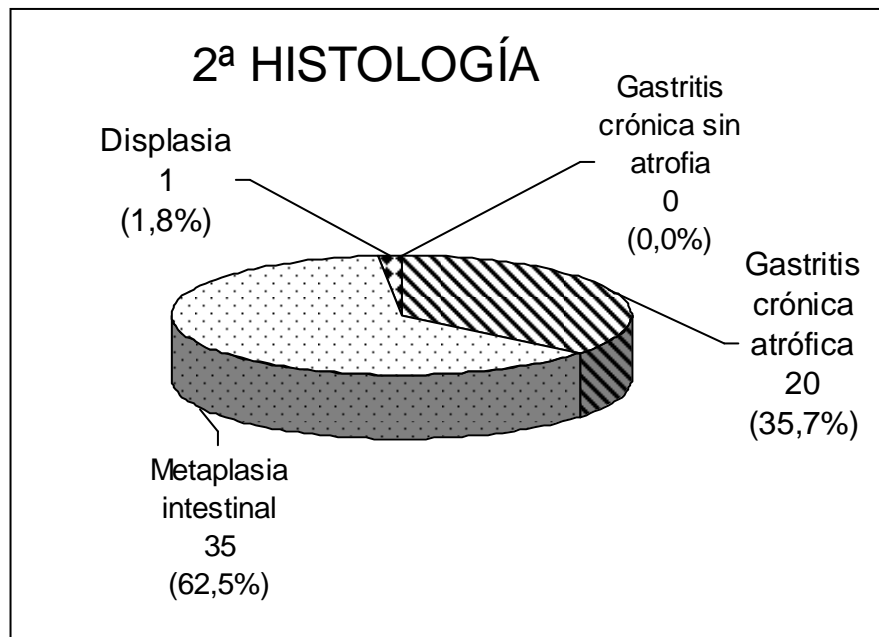


Gráfico 35

En este momento, la mayoría de los pacientes presenta una metaplasia intestinal. Como también puede observarse, se comprueba la presencia de displasia en 1 paciente.

1.3 TIPAJE DE LAS CEPAS DE HELICOBACTER PYLORI INFECTANTE

Se realiza en todos los pacientes el tipaje de las cepas de *Helicobacter pylori* mediante la amplificación por PCR del DNA extraído de las biopsias gástricas, verificando la presencia de la bacteria en 40 pacientes (71,4%).

De estos 40 pacientes infectados por *Helicobacter pylori*, en 22 pacientes (55%) se comprueba la presencia del gen *cagA* en la cepa infectante. El gen *vacA* es positivo en la forma s1 en 24 pacientes (60%) y en la s2 en 10 (25%). En 12 pacientes (30%) se comprueba la amplificación del gen *vacA* m1 y en 22 (55%) del gen *vacA* m2. Estos datos se muestran en el gráfico 36.

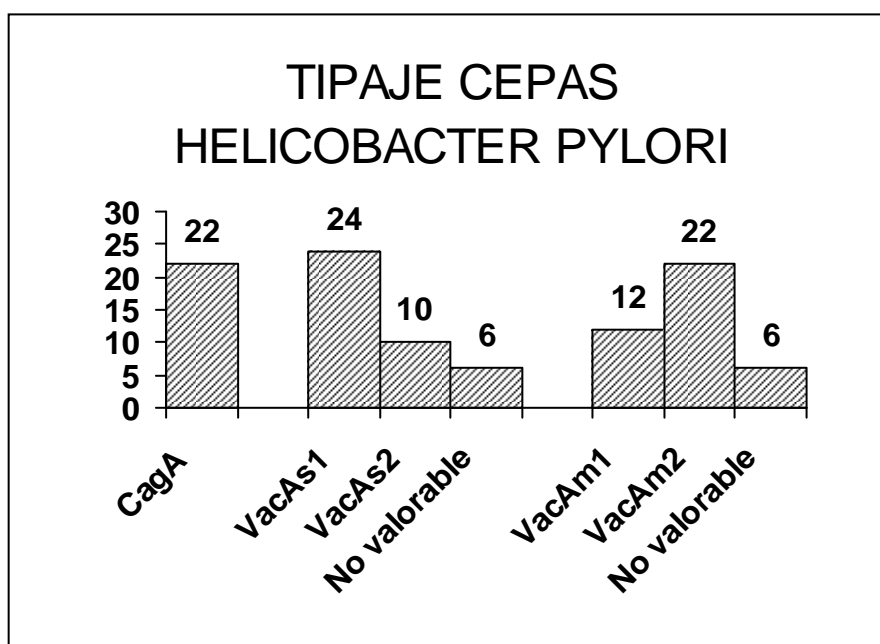


Gráfico 36

Además, al estudiar las distintas combinaciones de los genes de VacA, 12 pacientes (30%) presentan una cepa de *Helicobacter pylori* con la combinación s1m1, otros 12 pacientes (30%) con el tipo s1m2 y 10 (25%) con una cepa del tipo s2m2, tal como se observa en el gráfico 37.

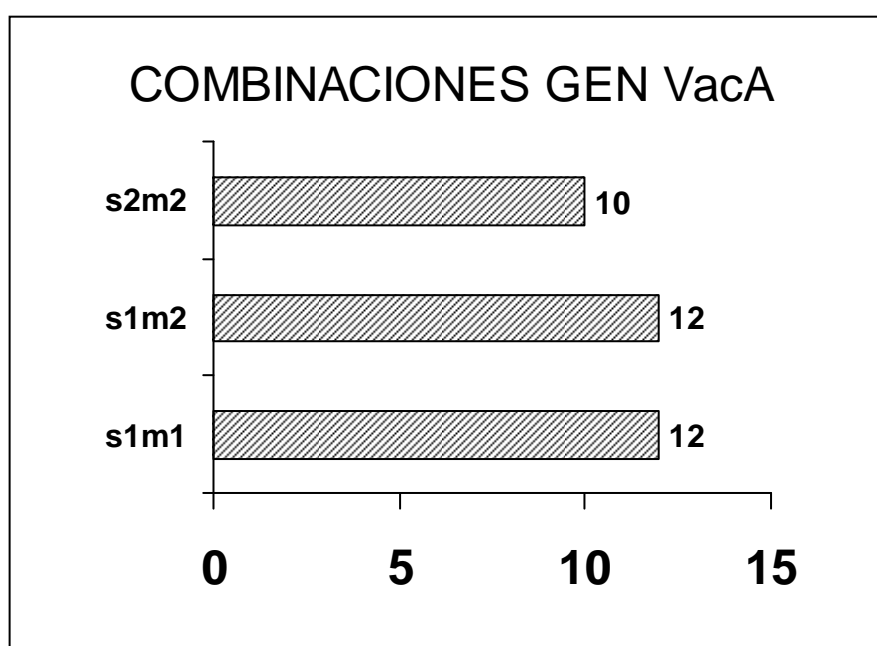


Gráfico 37

1.4 TIPAJE DEL DNA GENÓMICO DE LOS PACIENTES

De los 56 pacientes, 11 pacientes (19,6%) presentan el alelo HLA DQ B1*0501, ningún paciente el HLA DQ B1*0502 y 8 (14,3%) el HLA DQ B1* 0503. Respecto al alelo HLA DQ A1*0102 se comprobó su positividad en 33 pacientes (58,9%) y en 15 pacientes (26,8%) para el alelo HLA DQ A1*0301, tal como se muestra en el gráfico siguiente.

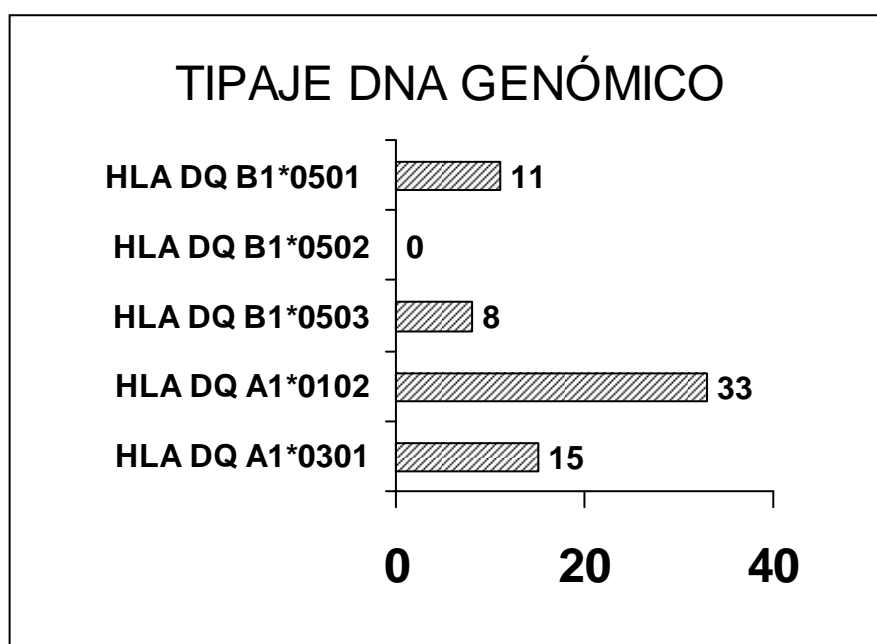


Gráfico 38

1.5 CONSUMO DE ALCOHOL, TABACO Y SAL

No ha sido posible obtener datos en este apartado en 3 pacientes. La mayoría de los pacientes no son consumidores habituales de estas sustancias (tabaco 59% y alcohol 64%).

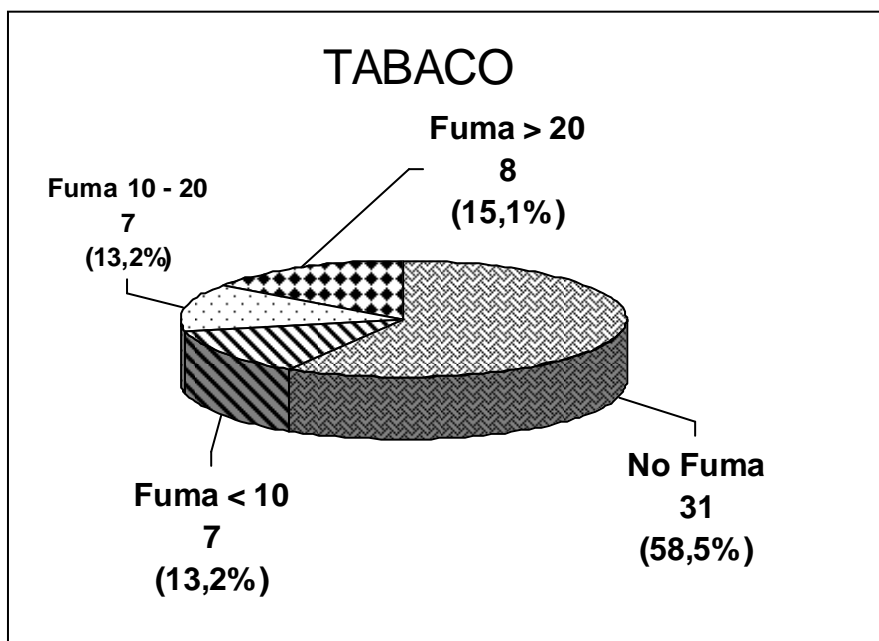


Gráfico 39

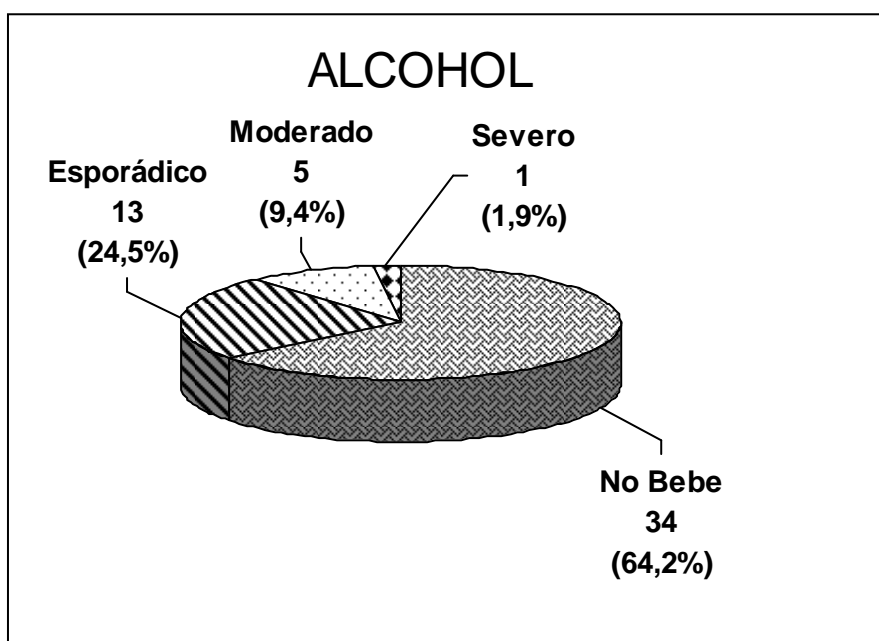


Gráfico 40

En el grupo estudiado, 13 pacientes (24,5%) admiten un consumo habitual de alimentos ricos en sal o un exceso de sal refinada.

1.6. GRUPO SANGUÍNEO

28 pacientes (50%) tienen el grupo sanguíneo universal, seguido en frecuencia por el grupo A (39%).

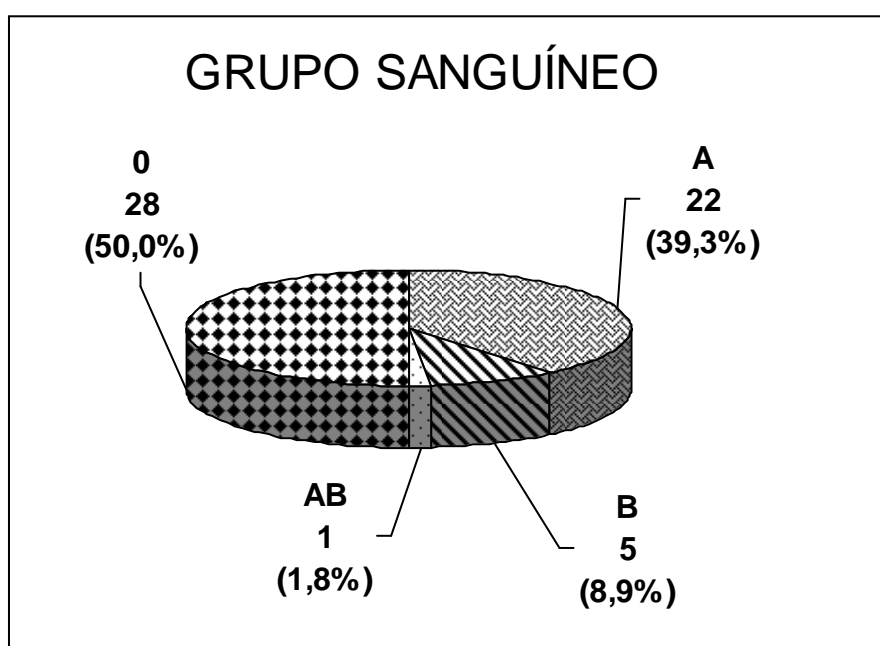


Gráfico 41

1.7 CUADRO RESUMEN DE CARACTERÍSTICAS

A continuación se muestra un cuadro resumen con las características de los 56 pacientes dispépticos cuya evolución histológica en el tiempo es objeto de estudio.

Nº	Sexo		Edad media	HP PCR	1ª Histología				2ª Histología			
	Hom	Muj			Gastritis crónica sin atrofia	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal	Displasia	Gastritis crónica sin atrofia	Gastritis crónica atrófica	Metaplasia intestinal	Displasia

General	56	37	19	52,39	40	12	23	21	0	0	20	35	1
Total	56				56				56				

General	100%	66,1%	33,9%		71,4%	21,4%	41,1%	37,5%	0,0%	0,0%	35,7%	62,5%	1,8%
---------	------	-------	-------	--	-------	-------	-------	-------	------	------	-------	-------	------

CagA		VacA s1/s2			VacA m1/m2			Combinaciones				HLA DQ B1* 501	HLA DQ B1* 502	HLA DQ B1* 503	HLA DQ A1* 0102	HLA DQ A1* 0301
Si	No	s1	s2	No Valorable	m1	m2	No Valorable	s1m1	s1m2	s2m2	No Valorable	Si	Si	Si	Si	Si

General	22	18	24	10	6	12	22	6	12	12	10	6	11	0	8	33	15
Total	40		40			40			40				56	56	56	56	56

General	55,0%	45,0%	60%	25,0%	15,0%	30,0%	55,0%	15,0%	30,0%	30,0%	25,0%	15,0%	19,6%	0%	14,3%	58,9%	26,8%
---------	-------	-------	-----	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	----	-------	-------	-------

Tipo Sangre					Tabaco					Alcohol					Sal		
0	A	B	AB		No	<10	10-20	>20	No Con-testa	No	Esporádico	Modera-do	Severo	No Con-testa	No	Sí	No Con-testa

General	28	22	5	1	31	7	7	8	3	34	13	5	1	3	40	13	3
Total	56				53					53					53		

General	50,0%	39,3%	8,9%	2%	58,5%	13,2%	13,2%	15,1%		64,2%	24,5%	9,4%	1,9%		75,5%	24,5%	
---------	-------	-------	------	----	-------	-------	-------	-------	--	-------	-------	------	------	--	-------	-------	--

2. COMPARACIÓN ENTRE PACIENTES CON PROGRESIÓN HISTOLÓGICA Y PACIENTES SIN PROGRESIÓN HISTOLÓGICA DESDE 1994

Como ya se ha comentado previamente, el proceso de carcinogénesis gástrica se considera un proceso secuencial que se origina a partir de la gastritis crónica, que progresa a distintos grados de atrofia, metaplasia intestinal y displasia (Correa, 1992).

En cuanto a los 12 sujetos en los que se describió una gastritis crónica no atrófica en las primeras biopsias, se observa que 8 han desarrollado atrofia durante el tiempo del estudio y en 4 se confirmó la presencia de metaplasia intestinal en las segundas biopsias.

Respecto a los 23 sujetos con gastritis crónica atrófica en la primera histología, 12 mantuvieron la misma situación histológica durante el tiempo del estudio mientras que 11 desarrollaron epitelio metaplásico sobre la mucosa gástrica.

En cuanto al grupo inicial de 21 sujetos con metaplasia intestinal tan sólo en un caso se confirmó la presencia de displasia en las segundas biopsias.

Tomando como referencia el proceso secuencial descrito que va desde la gastritis crónica a la displasia, se ha considerado como progresión a cualquier avance ocurrido en la secuencia histológica durante el período del estudio, desde la primera a la segunda biopsia.

Como puede observarse en el gráfico 42, hay 24 pacientes (42,1%) en los que se observó progresión histológica en el estudio anatomopatológico durante el periodo de seguimiento, tomando como referencia la situación histológica definida en 1994.

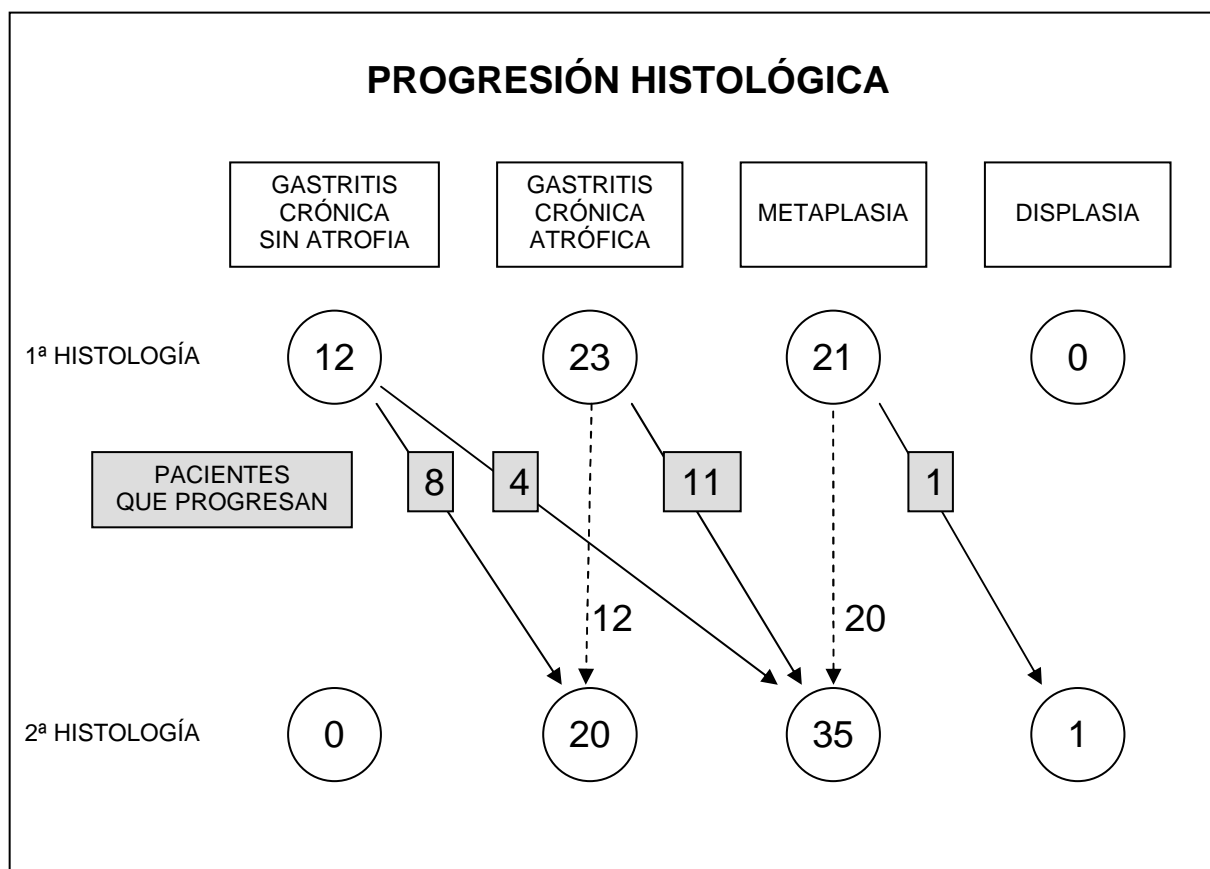


Gráfico 42

En nuestro estudio, nos planteamos la utilidad de establecer la posible influencia de distintos factores sobre la progresión histológica de las lesiones mucosas gástricas con el paso del tiempo.

2.1. INFLUENCIA DEL SEXO, LA EDAD Y EL GRUPO SANGUINEO

En la siguiente tabla se muestran los resultados de comparar las variables sexo, edad y grupo sanguíneo entre el grupo de sujetos que han presentado progresión histológica durante el periodo de seguimiento y aquellos que mantuvieron la primera histología durante el tiempo del estudio.

Al comparar ambos grupos de sujetos en cuanto al sexo, se observa que a pesar de observarse un mayor riesgo relativo de presentar progresión histológica en los pacientes varones (OR=2,9), esta diferencia no alcanza la significación estadística ($p=0,07$).

Se observa un mayor número de pacientes mayores de 55 años en el grupo que han presentado una progresión de su situación histológica respecto a las primeras biopsias, pero esta diferencia no alcanza la significación estadística ($p=0,15$). En este sentido, se calcula un riesgo de presentar progresión histológica en el tiempo de aproximadamente 2,4 para los mayores de 55 años.

En cuanto al estudio de los distintos grupos sanguíneos, tampoco se observan diferencias significativas entre ambos grupos.

	Pacientes con progresión N (%)	Pacientes sin progresión N (%)	p	O.R. (IC 95%)
SEXO			0,07	
Varones	19 (79,2%)	18 (56,2%)		2,956 (0,88-9,89)
Mujeres	5 (20,8%)	14 (43,8%)		
EDAD			0,15	
< 55 años	6 (25%)	14 (43,8%)		
> 55 años	18 (75%)	18 (56,2%)		2,33 (0,73-7,43)
GRUPO SANGUÍNEO			0,13	
A	10 (41,7%)	12 (37,5%)		
B	4 (16,7%)	1 (3,1%)		4,8 (0,45-50,1)
AB	1 (4,2%)	0 (0%)		-
0	9 (37,5%)	19 (59,4%)		0,6 (0,18-1,91)

2.2. INFLUENCIA DE HELICOBACTER PYLORI

Al comparar las características de las cepas infectantes en el grupo de pacientes con evolución histológica y en el grupo sin evolución desde 1994 no se observan diferencias estadísticamente significativas.

Es destacable que los mayores riesgos de presentar progresión histológica corresponden a los pacientes infectados por cepas de *Helicobacter pylori* con el gen *VacAm2* (O.R. 2) o el gen *VacAs1m2* (O.R. 2,55).

	Pacientes con progresión N (%)	Pacientes sin progresión N (%)	p	O.R. (IC 95%)
HELICOBACTER PYLORI			0,87	
Presencia	17 (70,8%)	23 (71,9%)		0.91 (0,29-2,82)
Ausencia	7 (29,2%)	9 (28,1%)		

TIPAJE CEPAS HELICOBACTER				
CagA			0,22	
Positivo	7 (43,8%)	15 (62,5%)		0,44 (0,12-1,66)
Negativo	9 (56,2%)	9 (37,5%)		
VacAs1			0,65	
Positivo	9 (56,3%)	15 (62,5%)		0,73 (0,20-2,74)
Negativo	7 (43,7%)	9 (37,5%)		
VacAs2			0,87	
Positivo	4 (25%)	6 (25%)		1,13 (0,25-5,12)
Negativo	12 (75%)	18 (75%)		

	Pacientes con progresión N (%)	Pacientes sin progresión N (%)	p	O.R. (IC 95%)
TIPAJE CEPAS HELICOBACTER				
VacAm1 0,24				
Positivo	3 (18,7%)	9 (37,5%)		0,4 (0,09-1,86)
Negativo	13 (81,3%)	15 (62,5%)		
VacAm2 0,3				
Positivo	10 (62,5%)	12 (50%)		2 (0,54-7,45)
Negativo	6 (37,5%)	12 (50%)		

COMBINACIONES VacA				
VacAs1m1 0,2				
Positivo	3 (18,8%)	9 (37,5%)		0,37 (0,08-1,74)
Negativo	13 (81,2%)	15 (62,5%)		
VacAs1m2 0,21				
Positivo	6 (37,5%)	6 (25%)		2,55 (0,58-11,28)
Negativo	10 (62,5%)	18 (75%)		
VacAs2m2 0,93				
Positivo	4 (25%)	6 (25%)		1,07 (0,23-4,84)
Negativo	12 (75%)	18 (75%)		

2.3. TIPAJE DEL DNA GENÓMICO DE LOS PACIENTES

Al estudiar el gen HLA DQ tampoco se observaron diferencias significativas en la aparición de los distintos alelos del gen en el grupo de pacientes con y sin evolución histológica desde 1994. Es destacable que el mayor riesgo de presentar progresión histológica corresponde a los pacientes que presentan el alelo HLA*A1*301. (O.R. 2,6).

	Pacientes con progresión N (%)	Pacientes sin progresión N (%)	p	O.R. (IC 95%)
TIPAJE DNA				
HLA B1*0501			0,38	
Positivo	6 (25%)	5 (15,6%)		1,8 (0,48-6,79)
Negativo	18 (75%)	27 (84,4%)		
HLA B1*0502			-	
Positivo	0 (0%)	0 (0%)		-
Negativo	24 (100%)	32 (100%)		-
HLA B1*0503			0,66	
Positivo	4 (16,7%)	4 (12,5%)		1,4 (0,31-6,27)
Negativo	20 (83,3%)	28 (87,5%)		
HLA A1*0102			0,31	
Positivo	16 (66,7%)	17 (53,1%)		1,76 (0,59-5,28)
Negativo	8 (33,3%)	15 (46,9%)		
HLA A1*0301			0,12	
Positivo	9 (37,5%)	6 (18,8%)		2,6 (0,77-8,74)
Negativo	15 (62,5%)	26 (81,2%)		

2.4. CONSUMO DE ALCOHOL, TABACO Y SAL

Se observan diferencias estadísticamente significativas al relacionar el consumo de tabaco con la evolución histológica en el tiempo, de hecho, el 40,9% de los pacientes que presentan progresión admiten fumar más de 10 cigarrillos al día, mientras que en el grupo sin progresión, sólo el 19,3% fuma más de 10 cigarrillos diarios.

Por otro lado, no se observan diferencias significativas en cuanto al consumo de alcohol y sal.

	Pacientes con progresión N (%)	Pacientes sin progresión N (%)	P	O.R. (IC 95%)
TABACO			0,03	
No fuma	13 (59,1%)	18 (58,1%)		
< 10 cigarrillos/día	0 (0%)	7 (22,6%)		-
10-20 cigarrillos/día	3 (13,6%)	4 (12,9%)		1,04 (0,19-5,45)
> 20 cigarrillos/día	6 (27,3%)	2 (6,4%)		4,15 (0,72-23,9)
ALCOHOL			0,55	
No bebe	15 (68,2%)	19 (61,3%)		
Esporádico	4 (18,2%)	9 (29%)		0,56 (0,15-2,19)
Moderado	2 (9,1%)	3 (9,7%)		0,84 (0,13-5,72)
Severo	1 (4,5%)	0 (0%)		-
SAL			0,3	
Toma	7 (31,8%)	6 (19,4%)		1,94 (0,55-6,88)
No toma	15 (68,2%)	25 (80,6%)		

2.5 ESTUDIO MULTIVARIANTE

Se ha realizado además un análisis multivariante mediante la construcción de un modelo de regresión logística paso a paso, considerando la presencia de progresión histológica en el período del estudio como variable dependiente y la edad, el sexo, el grupo sanguíneo, los distintos genes de *Helicobacter pylori*, los alelos del gen HLA DQ del huésped, el consumo de alcohol, tabaco y sal como variables independientes.

Se ha considerado que las diferencias son estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

Cuando se realiza el estudio multivariante ninguna variable se asocia de forma significativa con la progresión o no de la histología en el periodo de tiempo de estudio.

3. COMPARACIÓN ENTRE PACIENTES CON PROGRESIÓN A GASTRITIS CRÓNICA CON METAPLASIA INTESTINAL Y SIN PROGRESIÓN

En nuestro estudio nos pareció interesante el análisis más detallado de aquellos sujetos que habían desarrollado metaplasia intestinal durante el período del estudio y en concreto, nos planteamos la utilidad de establecer con qué variables se relaciona la aparición del epitelio metaplásico con el paso del tiempo.

Como ha quedado esquematizado en el gráfico 43, en el primer estudio histológico se describió metaplasia intestinal en la biopsia gástrica de 21 sujetos mientras que en las segundas biopsias la presencia del epitelio metaplásico se presentó en 35 sujetos.

Como puede observarse la gran mayoría de los sujetos con metaplasia intestinal permanecieron invariables en su situación histológica durante el tiempo de seguimiento y en tan sólo 1 de ellos se puso de manifiesto la presencia de displasia en las segundas biopsias.

En cuanto a los nuevos casos de metaplasia intestinal aparecidos en las segundas biopsias, se identifican 4 sujetos procedentes del grupo con gastritis crónica sin atrofia y 11 del grupo con gastritis crónica atrófica.

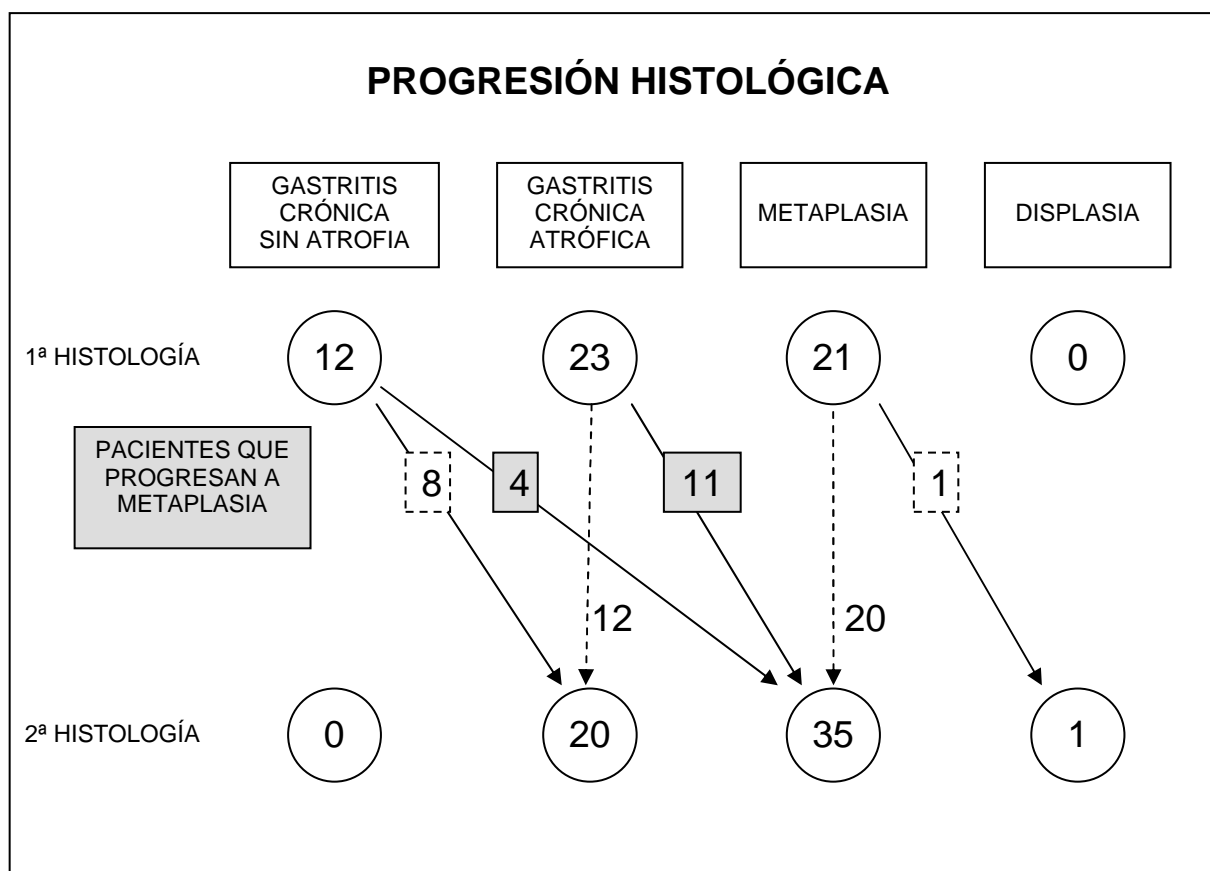


Gráfico 43

Como puede observarse dentro del grupo de pacientes que presentan progresión histológica durante el periodo de seguimiento, se observa progresión a metaplasia intestinal en 15 sujetos (62,5%).

3.1. INFLUENCIA DEL SEXO, LA EDAD Y EL GRUPO SANGUÍNEO

No se observan diferencias estadísticamente significativas respecto al sexo ($p=0,152$) y la edad ($p=0,539$) entre el grupo de pacientes en los que se observa progresión a metaplasia intestinal y el grupo que no progresa, a pesar de que a la vista de los resultados, se sugiere una tendencia a la progresión en los mayores de 55 años ($OR=1,67$), que no llega a alcanzar significación estadística.

No se observan diferencias significativas en la evolución histológica a gastritis crónica con metaplasia intestinal en relación con los distintos grupos sanguíneos.

	Progresión a metaplasia intestinal N (%)	Sin progresión a metaplasia intestinal N (%)	P	O.R. (IC 95%)
SEXO			0,15	
Varones	13 (86,7%)	11 (64,7%)		3,54 (0,59-21,24)
Mujeres	2 (13,3%)	6 (35,3%)		
EDAD			0,54	
< 55 años	3 (20%)	5 (29,4%)		
> 55 años	12 (80%)	12 (70,6%)		1,67 (0,32-8,59)
GRUPO SANGUÍNEO			0,55	
A	4 (26,7%)	8 (47,1%)		
B	2 (13,3%)	1 (5,9%)		4 (0,27-58,56)
AB	1 (6,7%)	0 (0%)		-
O	8 (53,3%)	8 (47,1%)		2 (0,42-9,41)

3.2. TIPAJE DE LAS CEPAS DE HELICOBACTER PYLORI INFECTANTE

Al comparar las características de las cepas infectantes en el grupo de pacientes con evolución a metaplasia intestinal y en el grupo sin evolución desde 1994, se observan diferencias estadísticamente significativas al relacionar la evolución a metaplasia intestinal con el gen VacA s1 y s2, así como para las combinaciones s1m2 y s2m2.

No se observan diferencias estadísticamente significativas respecto al resto de los genes al relacionarlos con la progresión a metaplasia intestinal, a pesar de que a la vista de los resultados, se sugiere tendencia a la progresión en los pacientes con presencia del gen CagA (OR=3,6), que no llega a alcanzar significación estadística.

	Progresión a metaplasia intestinal N (%)	Sin progresión a metaplasia intestinal N (%)	p	O.R. (IC 95%)
HELICOBACTER PYLORI			0,86	
Presencia	11 (73,3%)	12 (70,6%)		1,15 (0,24-5,39)
Ausencia	4 (26,7%)	5 (29,4%)		

TIPAJE CEPAS HELICOBACTER				
CagA			0,15	
Positivo	6 (54,5%)	3 (25%)		3,6 (0,62-21,03)
Negativo	5 (45,5%)	9 (75%)		

	Progresión a met intestinal	Sin progresión a met. intestinal	p	O.R. (IC 95%)
VacAs1			0,01	
Positivo	8 (72,7%)	2 (16,7%)		13,33 (1,77-100,14)
Negativo	3 (27,3%)	10 (83,3%)		
VacAs2			0,01	
Positivo	1 (9,1%)	7 (58,3%)		0,07 (0,07-0,75)
Negativo	10 (90,9%)	5 (41,7%)		
VacAm1			0,54	
Positivo	3 (27,3%)	2 (16,7%)		1,87 (0,25-14,08)
Negativo	8 (72,7%)	10 (83,3%)		
VacAm2			0,55	
Positivo	6 (54,5%)	8 (66,7%)		0,6 (0,11-3,24)
Negativo	5 (45,5%)	4 (33,3%)		

COMBINACIONES				
VacA				
VacAs1m1			0,61	
Positivo	3 (27,3%)	2 (16,7%)		1,68 (0,22-12,81)
Negativo	8 (72,7%)	10 (83,3%)		
VacAs1m2			0,01	
Positivo	5 (45,5%)	0 (0%)		
Negativo	6 (54,5%)	12 (100%)		-
VacAs2m2			0,01	
Positivo	1 (9,1%)	8 (66,7%)		0,06 (0,05-0,63)
Negativo	10 (90,9%)	4 (33,3%)		

3.3 TIPAJE DEL DNA GENÓMICO DE LOS PACIENTES

Al estudiar el gen HLA DQ no se observaron diferencias significativas en la aparición de los distintos alelos del gen en el grupo de pacientes con y sin evolución a metaplasia intestinal desde 1994.

La presencia del alelo HLA B1*503 parece tener una asociación con la progresión a metaplasia intestinal en el grupo de pacientes con gastritis crónica, mientras que la presencia del alelo HLA B1*501 parece tener un carácter protector frente a la progresión.

	Progresión a metaplasia intestinal N (%)	Sin progresión a metaplasia intestinal N (%)	p	O.R. (IC 95%)
TIPAJE DNA				
HLA B1*0501			0,27	
Positivo	2 (13,3%)	5 (29,4%)		0,37 (0,06-2,27)
Negativo	13 (86,7%)	12 (70,6%)		
HLA B1*0502			-	
Positivo	0 (0%)	0 (0%)		-
Negativo	15 (100%)	17 (100%)		-
HLA B1*0503			0,23	
Positivo	3 (20%)	1 (5,9%)		4 (0,37-43,38)
Negativo	12 (80%)	16 (94,1%)		

	Progresión a metaplasia intestinal N (%)	Sin progresión a metaplasia intestinal N (%)	p	O.R. (IC 95%)
HLA A1*0102			0,65	
Positivo	10 (66,7%)	10 (58,8%)		1,4 (0,33-5,93)
Negativo	5 (33,3%)	7 (41,2%)		
HLA A1*0301			0,6	
Positivo	4 (26,7%)	6 (35,3%)		0,67 (0,15-3,04)
Negativo	11 (73,3%)	11 (64,7%)		

3.4 CONSUMO DE ALCOHOL, TABACO Y SAL

No se observan diferencias estadísticamente significativas al relacionar el consumo de tabaco, alcohol y sal con la progresión a gastritis crónica con metaplasia intestinal.

Sin embargo, es destacable que el 50% de los pacientes que presentan progresión admiten fumar más de 10 cigarrillos al día, mientras que en el grupo sin progresión, sólo el 12,5% fuma más de 10 cigarrillos diarios.

Además, el 42,9% de los pacientes que presentan progresión admiten beber alcohol, frente al 12,8% de los pacientes que no progresan.

En 2 pacientes no ha sido posible la recogida de datos sobre este apartado.

	Pacientes con progresión a met. intestinal Nº (%)	Pacientes sin progresión a met. intestinal Nº (%)	p	O.R. (IC 95%)
TABACO			0,09	
No fuma	7 (50%)	13 (81,3%)		
< 10 cigarrillos/día	0 (0%)	1 (6,2%)		-
10-20 cigarrillos/día	3 (21,4%)	0 (0%)		-
> 20 cigarrillos/día	4 (28,6%)	2 (12,5%)		3,7 (0,54-25,6)
ALCOHOL			0,16	
No bebe	8 (57,1%)	14 (87,4%)		
Esporádico	4 (28,6%)	1 (6,3%)		7 (0,66-73,92)
Moderado	2 (14,3%)	1 (6,3%)		3,5 (0,27-44,95)
Severo	0 (0%)	0 (0%)		-
SAL			0,52	
Toma	5 (35,7%)	4 (25%)		1,67 (0,35-8,04)
No toma	9 (64,3%)	12 (75%)		

3.5 ANALISIS MULTIVARIANTE

Como en el estudio de progresión histológica en general, se ha realizado además un análisis multivariante mediante la construcción de un modelo de regresión logística paso a paso, considerando la presencia de progresión histológica en este caso hacia metaplasia intestinal en el periodo del estudio como variable dependiente y la edad, el sexo, el grupo sanguíneo, los distintos genes de *Helicobacter pylori*, los alelos del gen HLA DQ del huésped, el consumo de alcohol, tabaco y sal como variables independientes.

Se ha considerado que las diferencias son estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

Cuando se analizan conjuntamente las variables que dan resultados significativos en el análisis univariante, únicamente permanece significativa la variable s2m2 con el siguiente OR e IC: 0,09 (0,001-0,87)

1. MECANISMO DE CARCINOGENESIS SOBRE LA GASTRITIS

La mayoría de los pólipos gástricos, los adenocarcinomas, los tumores carcinoideos, y los linfomas de células B se generan sobre mucosa gástrica dañada por gastritis crónica de larga evolución. Aunque existe una gran variedad de condiciones que pueden originar la inflamación de la mucosa, la mayoría de las gastritis crónicas diagnosticadas en las biopsias gástricas permiten detectar a *Helicobacter pylori* o alguna característica histopatológica que apoye firmemente la presencia de infección por la bacteria. Por lo tanto, se considera que la forma más común de gastritis crónica es la causada por la infección por *Helicobacter pylori*.

Existen cuatro categorías de neoplasias que pueden aparecer en el estómago: epitelial, linfoide, neuroendocrino, y estromal. Dentro del proceso de carcinogénesis gástrica todavía hoy no se conocen bien ni el estímulo inicial que desencadena el proceso ni los mecanismos oncogénicos que forman parte de él.

Si bien una pequeña parte de los tumores epiteliales, en particular aquellos de células en anillo de sello, pueden aparecer de novo, sin evidencia de lesiones preneoplásicas previas, se postula que la mayoría de las neoplasias aparecen siguiendo una secuencia que se inicia con la inflamación de la mucosa y la destrucción de las glándulas gástricas (atrofia), su sustitución por un epitelio de tipo intestinal (metaplasia intestinal), y la progresión posterior a displasia.

El término histopatológico de displasia describe la manifestación más temprana de una neoplasia no invasiva. Aunque existen otros factores, sólo comprendidos parcialmente, que participan en la génesis de los adenocarcinomas gástricos como

son las alteraciones moleculares inducidas en los procesos inflamatorios, se considera que *Helicobacter pylori* es el principal agente causal de la gastritis crónica que es la condición más importante asociada al desarrollo del adenocarcinoma gástrico.

Una de las manifestaciones de la respuesta inmune local desencadenada por *Helicobacter pylori* es la formación de agregados linfoides en la mucosa gástrica infectada. A partir de estos folículos linfoides, pueden crecer poblaciones monoclonales, que eventualmente, a través de mutaciones y traslocaciones pueden crecer independientemente como linfomas B de bajo grado.

Por tanto, se considera que la gastritis crónica inducida por *Helicobacter pylori* es el único factor de riesgo conocido para el desarrollo de los linfomas MALT en el estómago. A diferencia de los adenocarcinomas que tienden a producirse sobre el epitelio metaplásico del estómago, el fenotipo de la gastritis sobre la que se generan los linfomas MALT todavía no ha sido definido.

En una porción de pacientes con gastritis crónica, la destrucción de las glándulas oxínticas es tan grave que la mucosa productora de ácido del cuerpo gástrico se atrofia, y se produce hipoclorhidria en distintos grados. En ausencia de ácido, las células endocrinas productoras de gastrina (células G) localizadas en la mucosa antral incrementan su producción, lo que determina un efecto trófico sobre las células endocrinas del cuerpo gástrico, que pueden dar lugar a tumores carcinoides.

En cuanto a los tumores del estroma, no se conoce ninguna posible asociación entre la gastritis u otro proceso patológico gástrico.

A la vista de la breve discusión previa, parece claro que la inflamación prolongada en el tiempo es la condición necesaria para que las neoplasias gástricas puedan generarse. Sin embargo, también parece evidente a la vista del gran número de sujetos afectados de gastritis crónica que nunca desarrollaran una neoplasia gástrica a lo largo de su vida, que se precisa de la actuación de uno o varios factores sobre el epitelio gástrico inflamado para precipitar el proceso de carcinogénesis, es decir al desarrollo de un linfoma MALT, a la progresión desde metaplasia a displasia y carcinoma, o a la aparición de un tumor carcinoide.

ESTUDIO 1: ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LAS LESIONES HISTOPATOLÓGICAS DE LA MUCOSA GÁSTRICA EN RELACIÓN CON DETERMINADOS FACTORES AMBIENTALES EN UNA POBLACIÓN AFECTA DE DISPEPSIA FUNCIONAL.

Este estudio se diseñó con el fin de realizar una descripción de las lesiones histopatológicas de la mucosa del estómago en relación con distintos factores ambientales y otros propios del huésped que se ha considerado pueden tener alguna influencia en el proceso de carcinogénesis gástrica.

Si bien en un primer momento se planteó la realización de este análisis sobre una población control, la difícil aceptación de los participantes asintomáticos a la realización de una endoscopia nos llevó a replantear el estudio descriptivo sobre la mucosa gástrica en una población dispéptica.

En general, se considera que la prevalencia de la dispepsia en la población general oscila entre el 25% y el 45% (Penston JG, 1996), considerándose en dos terceras partes de los casos como dispepsia funcional. Se ha observado que los estudios histológicos practicados en muestras gástricas procedentes de pacientes con este trastorno no permiten correlacionar el grado de inflamación con el tipo ni la gravedad de las manifestaciones clínicas (Schubert T, 1992).

Por tanto, y como ha quedado establecido en el diseño de nuestro estudio 1, la totalidad de los pacientes incluidos en nuestro estudio estaban afectados de dispepsia funcional. Se han incluido 135 pacientes durante un periodo de dos años

consecutivos procedentes de la consulta de Aparato Digestivo de un centro de especialidades de nuestra área geográfica.

Al tratarse de pacientes dispépticos y no aplicar muestreo para la inclusión de los pacientes en el estudio, nuestros resultados sólo tienen validez interna, no pudiendo extrapolar los resultados obtenidos a la población general.

En nuestro estudio, aproximadamente la mitad de los pacientes eran varones (52,6%) y la otra mitad mujeres (47,4%) siendo la media de edad de los pacientes de 55,3 años (22-89).

En el estudio anatomopatológico de la mucosa gástrica de estos pacientes la forma histológica más frecuente era la gastritis crónica sin metaplasia intestinal (64%) y básicamente la forma no atrófica (48%). Se confirmó la presencia de gastritis crónica con metaplasia intestinal en un 35% de los pacientes, con una mayor presentación del epitelio metaplásico a nivel antral (89%) y fundamentalmente en la forma de metaplasia intestinal incompleta (62%).

Al estudiar los distintos subgrupos histológicos encontramos un ligero predominio masculino en el grupo de sujetos con metaplasia intestinal (60%) y gastritis crónica atrófica (68,2%) frente a un mayor porcentaje de mujeres (57,8%) entre los pacientes con gastritis crónica sin atrofia. Desconocemos si las hormonas sexuales pueden jugar algún papel en esta aparente diferencia de distribución histológica. Tampoco hemos encontrado datos en la literatura que nos aporten datos sobre si

existen posibles diferencias de presentación histológica en la mucosa gástrica en dependencia del sexo.

En nuestro grupo se observó que la media de edad en nuestra serie va aumentando progresivamente desde el grupo de pacientes con gastritis crónica sin atrofia (51,9 años), al de gastritis crónica atrófica (57,5 años) y finalmente al grupo de pacientes con gastritis crónica y metaplasia intestinal (58,9 años). Este aumento en la edad de los pacientes con metaplasia concuerda con lo publicado en la literatura, ya que en general, se considera que la edad avanzada es uno de los factores asociados al desarrollo de metaplasia intestinal (Russo A, 2001).

A pesar de que a priori no se planteó como un dato fundamental en nuestro estudio, también nos pareció interesante la tipificación de los distintos grupos sanguíneos en los pacientes incluidos.

Se sabe que en el cáncer gástrico se dan alteraciones del genotipo de las células tumorales por lo que inicialmente se puede advertir una reducción o una pérdida total de los antígenos de los grupos sanguíneos A y B (Masamune H. 1958). Por otra parte, si bien algunos estudios previos habían observado un aumento de la frecuencia del grupo sanguíneo O en pacientes infectados por *Helicobacter pylori* (Boren T, 1993), otros estudios no han apoyado esta hecho (Niv Y, 1996).

La mayoría de los pacientes de nuestro estudio poseen el grupo sanguíneo O (50,4%) y A (41,4%), lo cual se mantiene con ligeras variaciones en el estudio por grupos histológicos, con independencia del status *Helicobacter pylori*.

2.1 INFECCIÓN POR HELICOBACTER PYLORI: EL ESPECTRO DE LESIONES

Tras décadas de intensa investigación sobre la patogenia, epidemiología, clínica, diagnóstico y tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*, como ya se ha comentado en párrafos anteriores, actualmente esta bacteria se considera el principal agente causal de la gastritis crónica en humanos.

Distintos estudios epidemiológicos han demostrado una asociación positiva entre la infección por *Helicobacter pylori*, la atrofia progresiva de la mucosa gástrica y la aparición del cáncer gástrico, por lo que se ha implicado a la bacteria como cofactor en la secuencia de acontecimientos que en algunos sujetos desemboca en algunas formas de cáncer gástrico (Correa P, 1992. Sipponen P, 1994).

Existen trabajos que indican que el desarrollo de las lesiones epiteliales preneoplásicas (displasia) puede prevenirse de forma efectiva a través de la erradicación de *Helicobacter pylori* (Uemura N, 1997 y 2001).

Sin embargo, se sabe que aunque todos los pacientes infectados por *Helicobacter pylori* desarrollan una gastritis crónica, tan sólo una parte de ellos se verán afectados por un carcinoma gástrico. Probablemente, esto se deba a la modulación del proceso inflamatorio por una serie de factores ambientales o dependientes de la virulencia de la bacteria, así como del desarrollo de diferentes respuestas inflamatorias dependientes del huésped.

En un intento por encontrar una explicación para el hecho de que sólo una pequeña parte de los individuos con gastritis producida por *Helicobacter pylori* desarrollan

cáncer gástrico, se ha postulado incluso la participación directa de otras bacterias en la inducción de inflamación en estómagos con hipoclorhidria.

Si bien en modelos animales se ha podido comprobar que la respuesta inflamatoria que aparece es indistinguible de la inducida por *Helicobacter pylori*, se desconoce si en humanos existen otras bacterias implicadas en la secuencia gastritis-cáncer (Zavros, 2002).

En líneas generales se admite que la prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* en la población mundial se sitúa en el 60%. La prevalencia de *Helicobacter pylori* en Aragón se ha estimado en un 67,4% para pacientes controles (Santolaria S, 2001).

Aunque algunos estudios admiten una prevalencia superior de infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con dispepsia funcional, los datos referidos en la literatura distan de ser unánimes. Así, mientras Boixeda (Boixeda D, 1997) y Amstrong (Amstrong D, 1996) encuentran un predominio de infección por *Helicobacter pylori* en los sujetos dispépticos, otros estudios no han demostrado ninguna relación entre la infección por *Helicobacter pylori* y la presencia de dispepsia (Collet JA, 1999).

En nuestro estudio, en el estudio histológico de las muestras se comprobó la presencia de *Helicobacter pylori* en 103 pacientes (76,9%) lo que supone un porcentaje similar a los datos encontrados en la literatura.

Como se puede observar en los resultados, en nuestro estudio se ha comprobado la presencia de *Helicobacter pylori* por PCR en 106 pacientes (78,5%), por tanto tres más que en el estudio anatomopatológico. Esta discrepancia en el número de

sujetos infectados diagnosticados por PCR se podría explicar por una toma de antibióticos no reconocida por los sujetos el mes previo a la endoscopia o por una toma de biopsias de zonas afectadas por atrofia severa (Sipponen P, 1992. Hu PJ, 1994).

Por otra parte, hay que tener en cuenta que dada la elevada sensibilidad de la técnica de la PCR se pueden detectar también formas no viables de la bacteria, y que es posible la existencia de algún falso positivo por contaminación de las muestras negativas con DNA amplificado.

En el grupo con gastritis crónica sin atrofia se comprobó la presencia de *Helicobacter pylori* en 81,2% (52/64) y en el de gastritis crónica atrófica en 81,8% (18/22) mientras que esta cifra es inferior (72,3%) en el grupo de pacientes con metaplasia intestinal (34/47).

En el presente estudio, los genotipos *vacA* y el gen *cagA* fueron detectados directamente a partir de biopsias gástricas por PCR, utilizando primers específicos para las distintas variantes de *Helicobacter pylori* (van Doorn LJ, 1998* y 1998**). Se estima que este método permite obtener globalmente resultados satisfactorios en más del 90% de los casos con biopsias positivas para *Helicobacter pylori* (Rudi J, 1999).

2.1.1 GEN CAGA

Se ha observado que la isla *cag* es altamente inmunógena e induce una intensa respuesta humoral en el huésped, tanto a nivel sistémico como local (Hirschi AM, 1988). La expresión de la citotoxina CagA se ha asociado con un incremento de la expresión del factor nuclear kappa B y de la concentración de interleukina 8 que

desempeña un papel fundamental en los fenómenos inflamatorios asociados a la infección por *H. pylori* ya que posee una importante actividad quimiotáctica para los neutrófilos y para los linfocitos T (Yamaoka Y, 1997).

Estudios recientes han indicado que la producción de IL-8 no depende del gen *cagA*, aunque sí de varios segmentos codificantes de proteína del islote de patogenicidad *cag* que exportan un factor desconocido que estimula la liberación de citocinas, en el que, además, existen secuencias que probablemente están involucradas en procesos de transposición que justifican la elevada variabilidad en el genoma de *Helicobacter pylori* (Maeda S, 1999).

Esto hace que la expresión de *CagA* pueda considerarse tan solo un marcador genético de patogenicidad de un grupo de genes cuyos efectos biológicos se basan en la inducción de inflamación al exportar uno o varios factores que estimulan la liberación de citocinas.

Se ha visto que las cepas *cagA+*, la mayoría de las cuales son capaces de producir la proteína *cagA*, retienen todos los otros genes de la isla mientras que las cepas *cagA-* pierden completamente esta isla.

Esto implica que la presencia del gen *cagA* puede ser usado, con algunas salvedades, como un marcador de virulencia asociado a la isla de patogenicidad *cag* y se ha postulado también que la presencia de un islote de patogenicidad intacto parece ser una condición necesaria para el desarrollo de úlcera péptica y cáncer gástrico.

Se considera que en los países occidentales, virtualmente todos los pacientes con úlcera péptica y entre el 60 y el 70% de los pacientes con dispepsia funcional están colonizados por cepas de *Helicobacter pylori* cagA+ (Weel JFL, 1996).

En nuestro estudio, esta cifra es algo inferior y en la muestra general se ha comprobado la existencia del gen cagA en 50 pacientes, es decir, en el 47,2% de los sujetos estudiados. Esta cifra aumentó en el grupo de pacientes con metaplasia intestinal, que presentaban positividad para cagA en casi una tercera parte de los casos (25/50).

Esto apoyaría el hecho de que la infección por las cepas más virulentas de *Helicobacter pylori* se asocia a un mayor daño sobre la mucosa gástrica. Por lo que parece lógico postular que la presencia de metaplasia intestinal se describiría en aquellas infecciones por *Helicobacter pylori* en las que se induce un mayor componente inflamatorio o en aquellos sujetos que son más susceptibles a la bacteria.

2.1.2 GEN VACA

En los países occidentales, un 50-60% de las cepas de *Helicobacter pylori* producen la citotoxina vacuolizante (VacA) que induce la vacuolización citoplásmica de las células eucariotas (Cover TL, 1990). Además, la producción de VacA se ha asociado con el desarrollo de gastritis atrófica (Fox JG, 1992).

En un estudio efectuado en biopsias gástricas humanas, se ha demostrado que los fenómenos inflamatorios irían ligados a la región s del gen, mientras que la intensidad de la lesión epitelial dependería de la región m. (Atherton JC, 1997). En general, se considera que todas las cepas s1 (s1a y s1b) son potencialmente ulcerogénicas (Atherton JC, 1997).

Se ha observado que el subtipo s1a predomina en el nordeste de Europa mientras que el s1b es mas frecuente en España y Portugal. El subtipo s1a es la forma predominante en el norte de Europa, mientras que las cepas s1a y s1b coexisten en el sur de Europa y América, y las cepas s1c son la forma de *Helicobacter pylori* más frecuente en Asia Oriental.

Por otra parte, las cepas m1 y m2 tienen una presencia uniforme, excepto en la península ibérica y en América del sur y del centro donde la forma m2 es algo más prevalente (Van Doorn LJ, 1999).

Como ya habían demostrado previamente varios autores, los resultados de nuestro estudio indican que las cepas de *Helicobacter pylori* con el genotipo vacA s1 (49,53%) son predominantes en la población general, y en los pacientes dispépticos en particular (Rudi J, 1999. van Doorn LJ*, 1998. Strobel S, 1998).

El porcentaje de cepas s1 aumentó de forma significativa en el grupo de pacientes con metaplasia intestinal (85,3%) respecto al resto de los otros grupos; gastritis crónica sin atrofia (32,7%) y atrófica (27,8%). De nuevo, este dato apoyaría el hecho de que la aparición del epitelio metaplásico se asocia a la infección por las cepas de *Helicobacter pylori* que inducen una mayor respuesta inflamatoria.

En nuestra población existía un bajo porcentaje de infección por cepas s2 (5,9%) en el grupo de pacientes con metaplasia intestinal, lo que concordaría con lo comentado anteriormente.

Si bien algunos estudios también han relacionado a las cepas m2 con la producción de cáncer gástrico (Paggiaccia C, 1998), a la vista de nuestros resultados no parece que este alelo de la bacteria tenga un papel inductor en la presencia de epitelio metaplásico sino más bien secundario, ya que el grupo de pacientes con metaplasia intestinal era el que presentaba una frecuencia menor (50%) de este genotipo respecto al resto de los grupos.

Respecto al gen vacA, llama la atención en nuestro estudio el haber obtenido un resultado no valorable en un porcentaje no despreciable del total de la muestra (13,08%). Este hecho no resulta inusual en otros estudios, e incluso, en la literatura (Rudi J, 1999) se postula que los casos en los que no se detectan los genotipos vacA podría ser debido a la pequeña cantidad de tejido gástrico en la biopsia o a una baja densidad de *Helicobacter pylori* en la mucosa gástrica de las biopsias.

También hay que destacar que en cuatro pacientes de nuestra muestra, el resultado del genotipado para VacA sugirió la presencia de dos o más cepas de *Helicobacter pylori* (vacA s1+ y vacA s2+). Si bien a primera vista este resultado podría tomarse como un error de laboratorio, por los datos de la literatura se sabe que en más de un 10% de los pacientes infectados por *Helicobacter* en Europa occidental, la infección se debe a múltiples cepas de la bacteria (van Doorn LJ, 1998 y 1998*).

2.1.3 COMBINACIONES DE GENES VACA

Respecto a las distintas combinaciones del gen vacA no existen datos uniformes en la literatura. En algunos estudios, la combinación s1/m2 es más frecuente que las combinaciones s1/m1 o s2/m2 (Rudi J, 1999) mientras que en algunos estudios norteamericanos, los genotipos s1/m1 y s2/m2 eran las más frecuentes (Atherton JC, 1995).

Se ha demostrado que las cepas tipo s1/m1 y s1/m2 producen los niveles altos y moderados de toxina vacuolizante, mientras que las cepas s2/m2 no la producen (Atherton JC, 1995).

En nuestra muestra, al estudiar las combinaciones de los distintos genes de vacA se observó que la combinación más frecuente era la del tipo s2m2 (35,8%). Llamaba la atención el marcado descenso de esta combinación en el grupo de sujetos con metaplasia intestinal (5,9%) respecto al grupo de sujetos con gastritis crónica de forma aislada, en los que esta combinación se presentaba en aproximadamente la mitad de ellos (gastritis crónica sin atrofia: 51,9% y gastritis atrófica: 50%).

Como puede observarse en el grupo de sujetos con metaplasia intestinal, las combinaciones más frecuentes eran la s1m2 (41,2%) y s1m1 (35,3%) en las que se producen los niveles más altos de toxina vacuolizante, y por tanto los mayores fenómenos inflamatorios.

2.2 FORMAS DE GASTRITIS CRÓNICA E INFLUENCIA DE OTROS FACTORES

Por razones que todavía hoy no comprendemos totalmente, la infección crónica por *Helicobacter pylori* produce distintas lesiones en sujetos diferentes. El hecho de que determinados factores del huésped o ambientales, tales como la dieta o el estilo de vida sean los principales determinantes que dirigen el proceso que desemboca en un determinado tipo de lesión histológica sigue siendo especulativo.

La infección crónica por *Helicobacter pylori* parece seguir dos caminos distintos. Por una parte un segmento de la población desarrolla una gastritis antral difusa y por otra, una gastritis atrófica multifocal.

La gastritis antral difusa es una forma de gastritis crónica superficial que afecta al antro y suele respetar la mucosa oxíntica lo que determina una mayor secreción de ácido que en la forma multifocal. La gastritis crónica difusa no predispone al desarrollo de metaplasia intestinal, displasia y cáncer gástrico, sino que incluso estos pacientes podrían estar protegidos de esta neoplasia (Uemura, 2001). La lesión sintomática asociada más frecuentemente a la gastritis difusa antral es la úlcera duodenal, que ocurre en menos del 20% de los pacientes.

La metaplasia intestinal se desarrolla en la mucosa atrófica asociada con la gastritis atrófica multifocal y se postula que este es el sustrato en el que la displasia y finalmente el carcinoma se desarrollan. La gastritis atrófica multifocal comienza como una pangastritis crónica superficial de distribución parcheada, y que en la mayoría de los casos afecta a la curvatura menor. Con el tiempo, la gastritis crónica superficial se convierte en atrófica, con la sustitución de las glándulas normales por

otras metaplásicas. Las úlceras gástricas benignas, no asociadas a AINEs, también se desarrollan sobre el sustrato de la gastritis atrófica multifocal.

Algunos autores (Rubin CE, 1997) postulan incluso que pueden encontrarse dos subgrupos de sujetos dentro de la población afecta de gastritis crónica. El grupo más numeroso es el de los individuos con pangastritis no ulcerosa y en ellos la mucosa presenta atrofia parcheada en el cuerpo y el antro, y muy poca metaplasia intestinal. Estas personas no desarrollan úlceras gástricas, displasia o cáncer y permanecen asintomáticas. En contraste, un número mucho menor desarrollan mucho más rápidamente atrofia y metaplasia intestinal y continúan desarrollando úlceras gástricas y cáncer gástrico.

Se ha postulado que tanto los factores ambientales como algunos propios del huésped pueden dirigir a la gastritis atrófica multifocal hacia un curso asintomático o hacia uno más agresivo, donde el sujeto desarrolla úlceras gástricas benignas o displasia y cáncer.

Ejemplos de factores ambientales son la dieta (especialmente el contenido en sal), las condiciones socioeconómicas, los estilos de vida tales como el alcohol y el tabaco, y factores asociados a la cepa infectante de *Helicobacter pylori*.

Distintos factores intrínsecos del huésped tales como los polimorfismos en el gen de la IL-1 (El-Omar, 2001) y el reflujo biliar a través del píloro pueden jugar también un papel a la hora de determinar el curso clínico de la gastritis atrófica.

2.2.1 INFLUENCIA DE DETERMINADOS FACTORES AMBIENTALES Y DE ESTILO DE VIDA: CONSUMO DE ALCOHOL, TABACO Y SAL

Existen algunos estudios en la literatura (Kneller RW, 1992. Block G, H 1990. Fontham E, 1995) que postulan que el consumo de sal, bebidas alcohólicas y de tabaco suponen un factor de riesgo aumentado para el desarrollo de gastritis atrófica.

Sin embargo, otros estudios no han demostrado que los factores dietéticos y de estilo de vida contribuyan a un aumento estadísticamente significativo en el riesgo de gastritis atrófica (Ozasa K, 1999. Parsonnet J, 1992).

De cualquier forma, en varios estudios realizados uno de los hechos constatados con una mayor frecuencia es el elevado consumo de sal en las personas con cáncer gástrico (Chen VW, 1990). Un dato que también podría avalar esta afirmación es el descenso paralelo de las tasas de mortalidad por cáncer gástrico y por accidentes cerebro-vasculares, en relación con una disminución en el consumo de sal de estos pacientes (Joossens JV, 1981. Sonnenberg A, 1988).

En nuestro estudio, la mayoría de los sujetos se calificaron como no consumidores habituales de alcohol y tabaco (63,8% y 57.8%, respectivamente). La mayoría también consideró que su ingesta de sal no era excesiva (81,9%).

En cuanto a la distribución por grupos histológicos, se observó que en el grupo de sujetos con metaplasia intestinal se encontraban las mayores frecuencias globales de fumadores (45,5%) y consumidores de alcohol de forma habitual (50%). Respecto a la sal, los mayores consumidores se hallaban en el grupo de sujetos con gastritis

atrófica con o sin metaplasia intestinal (28,6% y 20,5%, respectivamente). Esto nos permitiría argumentar que atrofia de la mucosa gástrica y la posterior aparición del epitelio metaplásico podría verse influidas por aquellas situaciones ambientales menos “saludables” para el individuo.

2.2.2 TIPAJE DEL DNA GENÓMICO DE LOS PACIENTES

Además de la infección por *Helicobacter pylori* y de la posible influencia de otros factores ambientales, se sabe que una historia familiar positiva para cáncer gástrico supone otro factor de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad (Rokkas T, 1995).

En este sentido se ha observado que los familiares de pacientes con cáncer gástrico tienen un grado significativamente mayor de gastritis crónica, con una mayor actividad inflamatoria a nivel del cuerpo gástrico, así como de metaplasia intestinal (Meining A, 1999).

Todos estos datos sugieren que algunos factores inmunogenéticos pueden determinar una cierta susceptibilidad o resistencia a la enfermedad causada por *Helicobacter pylori* en el huésped.

Según un estudio realizado por Azuma et al, el alelo DQA1*0102 podría contribuir a una resistencia frente a la atrofia gástrica asociada a *Helicobacter pylori* y la presencia del alelo *0301 podría suponer un factor de susceptibilidad genética en el huésped para el desarrollo de gastritis atrófica secundaria a la infección por *Helicobacter pylori*.

Como puede observarse nuestros datos no concuerdan totalmente con lo publicado por Azuma, ya que las mayores frecuencias para los alelos HLA DQ A1*0102 y *0301 se han calculado en ambos casos para el grupo de sujetos con gastritis crónica atrófica.

Por otra parte, Yoshitake et al realizaron en Japón un estudio en el que se valoró la asociación de distintos genes del HLA de clase II con la infección por *Helicobacter pylori*. Las frecuencias para los alelos *01021, *01022 y *0301 del gen HLA DQA1 obtenidas en este estudio en los pacientes controles no infectados por *Helicobacter pylori* eran del 41,1%, 2,9% y 17,6%, y para los pacientes con gastritis infectados por *Helicobacter pylori* del 15,6%, 2,2% y 17,8%, respectivamente.

En el mismo estudio en los pacientes controles no infectados por *Helicobacter pylori* la frecuencia de los alelos *0501, *0502 y *0503 del gen HLA DQB1 fue de 11,8%, 2,9% y 20,6%, y para pacientes con gastritis infectados por *Helicobacter pylori* de 13,3%, 4,4% y 6,7%, respectivamente (Yoshikate S, 1999).

En nuestra serie general de pacientes, el estudio del alelo *0102 era positivo en un 50,4% y el *0301 en un 17,8% del total, lo cual no coincide totalmente con las frecuencias ofrecidas por el estudio japonés. En cuanto a los alelos del gen HLA DQB1 *0501, *0502 y *0503, las frecuencias de nuestra serie difieren también de las del citado estudio (19,3%, 3% y 10,4%, respectivamente).

Como puede observarse nuestras frecuencias no coinciden con los datos obtenidos para la población japonesa. Sin embargo, es difícil establecer comparaciones entre el estudio realizado por Yoshitake et al y el nuestro ya que en nuestra serie no se

han separado a los pacientes infectados por *Helicobacter pylori* de aquellos que no están infectados por la bacteria, lo que sin duda podría tener influencia a la hora de interpretar las frecuencias alélicas obtenidas.

Además, hay que tener en cuenta que los genes que forman el complejo mayor de histocompatibilidad se sitúan en el brazo corto del cromosoma 6 y son altamente polimórficos, lo que determina importantes diferencias genéticas entre poblaciones distintas (Santolaria S, 2001). Por tanto, hay que ser cauteloso al establecer comparaciones con otros estudios realizados en otras áreas geográficas diferentes y sobre una población étnicamente diferente.

2.3 METAPLASIA INTESTINAL

En estudios prospectivos se ha descrito una frecuencia de metaplasia intestinal en la población general del 25% (Craanen ME, 1991), siendo la forma completa la más frecuente (98%).

Distintos estudios epidemiológicos han comunicado que la prevalencia de metaplasia intestinal y gastritis atrófica es más elevada en las regiones del mundo con las tasas más elevadas de cáncer gástrico (Correa P, 1990).

Otras publicaciones han sugerido que la metaplasia intestinal incompleta, y particularmente la variedad colónica o tipo III, se observa con frecuencia alrededor de las regiones con displasia o cáncer temprano.

Por tanto se considera que la existencia de esta lesión implica un riesgo aumentado para el futuro desarrollo de un carcinoma de tipo intestinal (Rokkas T, 1991. Filipe MI, 1994). A la vista de estos datos, otros investigadores han recomendado la realización de endoscopias de control periódicas en las personas con este tipo de metaplasia (Silvia S, 1990).

Sin embargo no existe un acuerdo global en cuanto a este respecto y otros autores sugieren probablemente que el tipo de metaplasia sea menos crucial de lo que se ha considerado, y postulan que la extensión de la atrofia y de la metaplasia intestinal en el estómago puedan ser más importantes (El-Zimaity, 2001).

A la vista de estos datos y los resultados obtenidos en el estudio descriptivo por grupos histológicos nos planteamos la utilidad de establecer una comparación entre el grupo de sujetos con metaplasia intestinal en la mucosa gástrica y el resto de los sujetos de nuestra muestra.

Se observa que al comparar a los sujetos con gastritis crónica sin metaplasia intestinal y a aquellos con metaplasia intestinal, no se obtienen diferencias estadísticamente significativas en cuanto al sexo.

Como ya se ha comentado previamente se considera que la edad avanzada es uno de los factores asociados al desarrollo del epitelio metaplásico en la mucosa gástrica (Russo A, 2001). Sin embargo, nuestros resultados no avalan completamente esta consideración, ya que al comparar el grupo de sujetos con metaplasia intestinal con el resto de los grupos respecto a la edad, se observa que aunque la presencia de metaplasia intestinal se describe con más frecuencia en los pacientes mayores de

55 años (63,9%), estas diferencias no alcanzan la significación estadística ($p=0,04$), lo que sin duda puede estar influido por el limitado tamaño de nuestra muestra.

Por otra parte, en nuestro estudio se observa también que el número y la prevalencia de *Helicobacter pylori* es menos pronunciada cuando se confirma la presencia de metaplasia intestinal, aunque tampoco se trata de una diferencia estadísticamente significativa.

Esta observación ya se había observado en estudios previos que mostraban que *Helicobacter pylori* no coloniza el epitelio intestinal metaplásico (Craanen ME, 1994. Hui PK, 1992. Eidt S, 1994). La ausencia de la bacteria en las áreas con presencia de metaplasia intestinal, sin embargo, no significa que la infección no ocurrió en el pasado (Craanen ME, 1992).

Se postula que probablemente la mucosa gástrica cada vez es más inhóspita para *Helicobacter pylori*, en el proceso de atrofia progresiva, hiperplasia, y formación de metaplasia intestinal (Craanen ME, 1992).

Al estudiar las características de las distintas cepas infectantes, se observan diferencias estadísticamente significativas ($p=0,002$) en la frecuencia del gen CagA en el grupo de sujetos con metaplasia intestinal. Esto parece lógico si consideramos que las cepas más virulentas de *Helicobacter pylori* son las que inducen un mayor daño a nivel de la mucosa gástrica.

Es bien sabido que la actividad del gen *vacA s1* y la del gen *cagA* se encuentran muy relacionadas. En el grupo de sujetos con metaplasia intestinal, se observa también que existen diferencias estadísticamente muy significativas ($p<0,001$) en la

frecuencia de presentación del genotipo vacA s1 (OR 4,7) y vacA s2 (0,06). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos para el gen cagA y sugieren que la presencia de metaplasia intestinal se asocia con la infección por las cepas más virulentas de *Helicobacter pylori*.

De forma opuesta, en nuestro estudio no se observan diferencias significativas en la frecuencia de la región media del gen entre los sujetos con gastritis crónica y con metaplasia intestinal

Al comparar el grupo de pacientes afectados de gastritis crónica con metaplasia intestinal con el resto se observa una diferencia muy significativa ($<0,001$) en cuanto a la presencia de la combinación s2/m2, que parece tener un efecto protector (OR 0,06) para la presentación de metaplasia.

Como hemos comentado los tipos s1/m1 y s1/m2 producen niveles altos o moderados de citotoxina, mientras que las cepas s2/m2 no producen toxina (Atherton JC. 1995). Por tanto, también resulta lógico que la infección por cepas menos productoras de citotoxina confiera un cierto efecto protector ante el desarrollo de la metaplasia intestinal.

Dentro del grupo de pacientes con gastritis crónica atrófica, al comparar el grupo de pacientes con metaplasia intestinal con el resto no se observan diferencias significativas en cuanto al consumo de sal, tabaco y alcohol. Esta observación estaría en la línea de lo descrito en varios estudios previos (Ozasa K, 1999. Parsonnet J, 1992), en los que no se ha demostrado un aumento en el riesgo de desarrollar

gastritis atrófica en relación a determinados estilos de vida y hábitos dietéticos. Sin duda también se debe considerar que el número limitado de pacientes del que disponemos puede condicionar de forma importante nuestros resultados.

Tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas al comparar la frecuencia de ninguno de los alelos del gen HLA DQA1 en los sujetos con metaplasia intestinal y con gastritis crónica sin metaplasia intestinal, lo cual no concuerda con los estudios realizados por Azuma, como ya se ha comentado previamente.

Respecto al gen HLA DQ5, un grupo británico (Beales ILP, 1995) demostró una frecuencia alélica significativamente mayor en presencia de atrofia con o sin metaplasia intestinal (65%), de forma independiente a la existencia de *Helicobacter pylori*.

Los datos obtenidos en nuestra serie concuerdan con lo publicado por Beales ya que tampoco se observan diferencias significativas al comparar la frecuencia de los alelos del gen HLA DQB1*05 en los pacientes con presencia y ausencia de metaplasia intestinal.

2.4 DISPLASIA

La displasia gástrica es una lesión rara, y en algunos estudios se ha comunicado una prevalencia en las endoscopias que no supera el 0,4% (Rugge M, 1991). La presencia de gastritis atrófica representa el principal antecedente de las lesiones displásicas y los mayores grados de atrofia gástrica se han detectado en asociación

con las formas más severas de displasia. La presencia de *Helicobacter pylori* en las biopsias de pacientes con displasia supera el 80% (Rugge M, 1994).

Hasta hace pocos años, existía una considerable falta de acuerdo sobre el tema de la displasia y su gradación entre los patólogos. Incluso, tras el establecimiento de la clasificación de Padua (1998), se ha mantenido una variabilidad interobservador no despreciable, con un grado de acuerdo que oscila entre el 77,7% y el 86,5% (Rugge M, 2000).

A pesar de las posibles discrepancias en cuanto a la clasificación histológica, los resultados de varios estudios longitudinales prospectivos sugieren que la displasia de alto grado es una lesión precursora del cáncer gástrico de tipo intestinal (Farinati F, 1993*. Rugge M, 1994. Fertita AM, 1993. Saraga EP, 1987).

En estos estudios, se observa que más del 70% de los pacientes diagnosticados de displasia grave se diagnostican de carcinoma temprano o invasivo en periodos cortos de tiempo. Sin embargo, existen varios problemas metodológicos respecto a estos estudios sobre los que hay que reflexionar antes de establecer conclusiones.

Por una parte, hay que tener en cuenta que estos estudios se realizaron antes del establecimiento de la clasificación de Padua, y en vez de hacerse referencia a la displasia de alto grado se utiliza el termino displasia grave o grado III.

Por otra parte, en algunos de estos estudios no se describen las poblaciones incluidas en detalle, a quienes se les realiza la endoscopia por motivos muy diversos.

En cualquier caso, lo que si parece claro, es que independientemente del grado, es resulta crucial la opinión de un segundo patólogo cuando se establece el diagnóstico histológico de displasia. En este sentido, existen evidencias de que cuando dos patólogos expertos coinciden en el establecimiento del diagnóstico de displasia de alto grado, la resección mucosa endoscópica o la cirugía son probablemente mejores opciones terapéuticas que la realización de endoscopias seriadas (Inoue H, 2001. Ponchon T, 2001), que podrían reservarse para pacientes con displasia de bajo grado.

A diferencia de otras patologías como el esófago de Barret, en el caso de la displasia gástrica no existe acuerdo sobre cual es la tasa de conversión a cáncer gástrico. Algunos autores consideran que la conversión a carcinoma es improbable (Saraga EP, 1987) y que precisa periodos largos de tiempo, mientras que otros calculan tasas superiores al 30% para la displasia moderada (Farinati F, 1993. Fertitta AM, 1993).

En nuestro estudio se comprueba la presencia de displasia en la mucosa gástrica de dos pacientes (1%) en nuestra serie, estando ambos infectados por *Helicobacter pylori*.

En ambos casos se trata de pacientes infectados por cepas agresivas de *Helicobacter pylori*, es decir, positivas para los genes *cagA* y *vacA s1*. Aunque es evidente que no es posible establecer conclusiones a partir de un número de pacientes con displasia tan pequeño como el de nuestra muestra, se puede observar que la descripción general de nuestros dos pacientes se ajusta a lo esperable a la luz de los datos existentes en la literatura.

ESTUDIO 2: ESTUDIO COHORTE DE PROGRESION DE LESIONES PRENEOPLÁSICAS GÁSTRICAS EN UNA POBLACIÓN SELECCIONADA EN UN PERIODO DE TIEMPO SUPERIOR A 5 AÑOS.

En el modelo de carcinogénesis actual se admite que la gastritis crónica no atrófica evoluciona a lo largo de los años a gastritis crónica atrófica y metaplasia intestinal, para en determinados casos posteriormente, probablemente en relación a características genéticas y factores ambientales, desarrollar displasia y carcinoma gástrico de tipo intestinal.

Distintos estudios han demostrado el riesgo de progresión hacia carcinoma gástrico de tipo intestinal de las lesiones metaplásicas (Filipe MI, 1994). En concreto, se ha observado que los pacientes que en la primera biopsia presentaban metaplasia intestinal tipo III o del tipo incompleto mostraban un riesgo aumentado cuatro veces respecto al tipo completo de desarrollar adenocarcinoma gástrico.

En general, se admite que la progresión a cáncer ocurre entre un 12% y un 35% de la displasia moderada, y en casi un 100% de los pacientes con displasia severa (Di Gregorio C, 1993. Farinati F, 1993*).

Algunos estudios no han demostrado la progresión de la atrofia en la mucosa gástrica durante periodos de seguimiento relativamente cortos (3 años) y con un número pequeño de pacientes (Sakaki N, 1995). Sin embargo, se ha observado una expansión del área atrófica en un 22% de los pacientes con infección por

Helicobacter. En estadios de atrofia ligera, la progresión afectaba al 35% de los pacientes infectados.

Este estudio se diseñó con el objetivo de evaluar si la evolución en un período determinado de tiempo de las lesiones gástricas consideradas como preneoplásicas se asocia con la presencia de diferentes cepas de Helicobacter pylori, con determinados factores inmunogenéticos del huésped y con determinados hábitos tóxicos y alimentarios.

Se ha realizado un estudio epidemiológico cohorte de una población seleccionada hace más de 5 años, incluyendo 56 pacientes, de los que se dispone de un estudio histopatológico completo de la mucosa gástrica y de información sobre hábitos dietéticos y tóxicos en el momento de inclusión. La media de seguimiento ha sido de 5,7 años.

En nuestra opinión, la principal limitación de nuestro estudio es el pequeño número de sujetos que ha sido posible incluir en el estudio lo que determina intervalos de confianza muy amplios para estimar asociaciones.

La mayoría de los pacientes incluidos en nuestro estudio eran varones (66,1%), con una media de edad de 52,4 años. A la vista del estudio de las primeras biopsias, el grupo histológico más frecuente era el de los sujetos con metaplasia intestinal (41%), seguido por aquellos con gastritis crónica atrófica sin metaplasia intestinal (39%) y finalmente por los que presentaban gastritis crónica sin atrofia (20%).

En el momento de la inclusión en el estudio, cuando se toman las segundas biopsias, el grupo histológico más frecuente sigue siendo la metaplasia intestinal (59%), seguido por la gastritis crónica atrófica (39%), y de forma novedosa se observa la presencia de displasia en un 2% de los sujetos.

En cuanto a las frecuencias obtenidas cabe destacar que nuestros resultados no concuerdan totalmente con los de la literatura en cuanto a la frecuencia de metaplasia intestinal en cualquiera de los dos momentos cronológicos, ya que en estudios prospectivos se ha descrito una frecuencia de metaplasia intestinal en la población general del 25% (Craanen ME, 1991), lo que supone un porcentaje bastante inferior al de nuestra población en cualquiera de los dos momentos histológicos.

Resumiendo los datos obtenidos en ambos estudios histológicos, obtenemos que 24 sujetos (42,1%) de nuestra población han experimentado una progresión en su situación histológica durante el periodo de estudio, mientras que en ningún paciente se observa regresión de sus lesiones histológicas.

Al establecer la comparación entre los pacientes que han presentado progresión de sus lesiones histológicas y aquellos que no la han presentado progresión, se observa un aumento del riesgo relativo de presentar progresión en los varones (OR=2,9) y en los mayores de 55 años (OR=2,4). Sin embargo, ninguna de estas diferencias alcanza la significación estadística.

Aún en el supuesto de que nuestros resultados estén condicionados por el limitado número de pacientes incluidos en nuestro estudio, no hemos encontrado datos en la

literatura sobre la posible influencia del sexo en la progresión de las lesiones preneoplásicas gástricas.

En cuanto a una posible tendencia a una mayor tendencia a la progresión histológica en los grupos de mayor edad, esto resultaría lógico en un proceso que parece básicamente tiempo dependiente.

Dentro del grupo de pacientes con progresión histológica, en 15 pacientes (62,5%) se comprueba la progresión a metaplasia intestinal en el periodo del estudio. Si bien se mantiene la tendencia a un aumento de la progresión a metaplasia intestinal en los varones (OR=3,5) y en los mayores de 55 años (OR=1,67), al comparar este grupo con el que no presenta progresión histológica las diferencias de nuevo no llegan a alcanzar la significación estadística.

En distintos estudios ofrecidos por la literatura se establece una clara asociación entre metaplasia intestinal y edad (Wang CC, 1998. Rugge M, 1996). En nuestro estudio, el desarrollo de metaplasia intestinal presenta una asociación positiva, aunque no significativa con los grupos de edad más elevada, de forma que a mayor edad la frecuencia de metaplasia intestinal aumenta.

Un factor a tener en cuenta a la hora de interpretar nuestros resultados es el tiempo limitado de seguimiento en nuestro estudio. Como ya hemos comentado previamente en otros estudios no se ha conseguido demostrar en la mucosa gástrica la progresión de la atrofia durante periodos de seguimiento relativamente cortos y

con un número pequeño de pacientes (Sakaki N, 1995). Es muy difícil prever si los resultados hubieran sido diferentes con tiempos de seguimiento más largos.

Si nos olvidamos de la posible influencia del número de sujetos incluidos en nuestro estudio, el hecho de que la edad no mantenga una asociación significativa con la progresión a metaplasia intestinal, apuntaría hacia la hipótesis de que la progresión de las lesiones histológicas no depende de un factor de riesgo independiente sino de la confluencia de varios factores.

En este sentido hemos considerado que también podría resultar interesante obtener información sobre la posible influencia de los distintos grupos sanguíneos en la progresión de las lesiones histológicas del estómago.

Como ya se ha comentado previamente se han descrito alteraciones del genotipo de las células tumorales gástricas con una reducción o una pérdida total de los antígenos de los grupos sanguíneos A y B (Masamune H, 1958).

También se sabe que *Helicobacter pylori* se une de forma específica a glicoproteínas celulares de superficie y se ha comprobado que los individuos que tienen el grupo sanguíneo universal o aquellos que no son secretores de ciertos antígenos glicoprotéicos expresan receptores para la bacteria.

En nuestra muestra el grupo sanguíneo más frecuente es el universal (50%) seguido del grupo sanguíneo A (39%). Al estudiar a los pacientes que presentan progresión histológica se observa que el 42,9% presenta el grupo sanguíneo O y

33,3% el A. En el grupo que evoluciona a metaplasia, la frecuencia del grupo sanguíneo O aumenta hasta el 54,2%, mientras que la frecuencia del grupo sanguíneo A disminuye ligeramente (37,5%).

No se ha observado diferencias significativas en relación a los distintos grupos sanguíneos en cuanto a la evolución histológica en general o la progresión histológica a metaplasia intestinal. Por tanto, a la vista de nuestros resultados los grupos sanguíneos no parecen presentar una asociación con la progresión histológica de las lesiones gástricas.

3.1 INFLUENCIA DE HELICOBACTER PYLORI EN LA PROGRESIÓN DE LAS LESIONES GÁSTRICAS

Estudios previos sugieren que la progresión de la gastritis atrófica puede ser causada por la infección por *Helicobacter pylori* (Sipponen M, 1992). En este sentido, varios estudios han puesto de manifiesto la asociación entre la infección por *Helicobacter pylori* y un riesgo aumentado de desarrollo de atrofia (OR 6,4) y metaplasia intestinal en la mucosa gástrica (OR 4,7) (Fontham E, 1986). Sin embargo, a pesar de esta asociación, se sabe que sólo algo más de la mitad de los sujetos infectados desarrolla metaplasia intestinal (Fontham ET, 1995. Rugge M, 1996).

En nuestra serie, mediante amplificación por PCR del DNA extraído de la mucosa gástrica, se comprueba la presencia de *Helicobacter pylori* en 40 pacientes (71,4%), lo que supone una frecuencia de infección similar a lo descrito en la literatura.

Varios estudios han demostrado que los pacientes con lesiones gástricas neoplásicas y preneoplásicas están infectados con mayor frecuencia por cepas cagA positivas de *Helicobacter pylori* (Blaser MJ, 1995. Sozzi M, 1998).

A pesar de que a la vista de estos datos parecería esperable que la infección por estas cepas cagA positivas aumentará el riesgo de desarrollar atrofia y metaplasia intestinal, en nuestro estudio no se ha confirmado la asociación entre el islote de patogenicidad CagA y la progresión histológica en el periodo de tiempo del estudio.

Al comparar el tipaje de las cepas infectantes en el grupo de pacientes que presentan progresión histológica con aquellos que no progresan no se observan diferencias estadísticamente significativas para ningún gen de *Helicobacter pylori*, calculándose el mayor riesgo relativo de desarrollar progresión para los pacientes con cepas vacA m2 (OR=2) y la combinación s1m2 (OR=2,5).

Sin embargo, al estudiar el grupo de pacientes que desarrollan metaplasia intestinal en el periodo de tiempo del estudio, se observan diferencias significativas en relación a la presencia del genotipo vacA s1 (OR=13,3) y s2 (OR=0,07).

Estos datos sugieren que los sujetos infectados por las cepas que producen una mayor cantidad de citotoxina vacuolizante, y que por tanto son más virulentas, presentan una mayor tendencia a desarrollar metaplasia intestinal con el paso del tiempo. Contrariamente la infección por cepas s2 menos virulentas parece conferir un cierto carácter protector frente a la progresión hacia el epitelio metaplásico.

En cuanto a las distintas combinaciones génicas, se observan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de sujetos con evolución a metaplasia intestinal y sin evolución para las combinaciones s2m2 (OR=0,06) también en sentido protector.

Se ha observado que las cepas de *Helicobacter pylori* positivas para *cagA* y *vacA* s1 están asociadas con gastritis más severa pero que estos factores de virulencia no parecen determinar el patrón global de gastritis. De este modo, parece probable que la naturaleza de la enfermedad derivada de la infección crónica por *Helicobacter pylori* venga determinado por factores del huésped y ambientales, mientras que los factores bacterianos determinen la magnitud del riesgo de desarrollar una determinada enfermedad (Warburton VJ, 1998).

Muchos pueden ser los factores moduladores que pueden influir en la variabilidad de la respuesta a la infección por *Helicobacter pylori*. En nuestro caso tratamos de determinar las posibles diferencias entre las distintas cepas de la bacteria y la relación de esta respuesta con la situación genética del huésped, distintos factores de la dieta y determinados estilos de vida, como el consumo de alcohol y tabaco.

3.2 INFLUENCIA DEL DNA GENÓMICO DE LOS PACIENTES

Distintos estudios han intentado determinar la posible influencia de distintos factores inmunogenéticos podrían tener en la susceptibilidad o resistencia del huésped a la infección por *Helicobacter pylori*.

Aunque varios alelos presentan una frecuencia alterada en pacientes con adenocarcinoma gástrico, la asociación del alelo HLADQB1*0301 con el cáncer gástrico parece la más fuerte.

Algunos estudios (Lee J. 1996) han establecido que aunque el alelo HLADQB1*0301 es el más común en los pacientes caucásicos con adenocarcinoma gástrico, no parece probable que se relacione con una susceptibilidad aumentada a la infección por *Helicobacter pylori*.

Sin embargo, otros estudios han establecido que el HLA-DQB1*0301 podría determinar una susceptibilidad alterada a la infección por *Helicobacter pylori* o bien a la progresión del cáncer después de la infección por esta bacteria (Okada K, 1985. Campbell RD, 1993).

Al igual que en el caso anterior, la asociación entre HLA-DQA1*0102 y la resistencia a la atrofia gástrica asociada a *Helicobacter pylori* tampoco no está clara.

Mientras que algunos estudios sugieren que el gen HLADQA1 podría determinar la evolución clínica de la infección por *Helicobacter pylori* (Azuma I, 1998), otros autores no han encontrado ninguna asociación entre los alelos del gen HLADQA1 y la infección por *Helicobacter pylori* en la población de Finlandia (Karhukorpi J, 1999).

En otros estudios se ha observado que la frecuencia del alelo HLA-DQA1*0102 en los pacientes con adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal con infección por *Helicobacter pylori* es significativamente más baja que en los pacientes no infectados por esta bacteria (Takeshi A, 1998).

Como ya se ha comentado algunos autores sugieren que el alelo HLA-DQA1*0102 podría contribuir a la resistencia contra la gastritis atrófica asociada a la bacteria, y su ausencia podría ser un factor genético de riesgo para el desarrollo de gastritis atrófica asociada a *Helicobacter pylori* y para el desarrollo del adenocarcinoma gástrico (Azuma I, 1998).

En este sentido, se ha observado que la frecuencia del alelo HLA-DQA1*0102 es significativamente menor en pacientes con gastritis atrófica con infección por *Helicobacter pylori* que en los pacientes con tan solo gastritis superficial.

Nos planteamos el estudio de distintos alelos en nuestra muestra, con el fin de determinar si alguno de ellos podría mediar alteraciones en el reconocimiento antígeno específico responsable de la resistencia a la infección y la progresión de la atrofia de la mucosa gástrica asociada.

Respecto a las frecuencias globales de nuestro estudio, en los 56 pacientes estudiados el alelo *0102 del gen HLA DQ A1 era el más frecuente (59%) seguido del alelo *0301 del mismo gen (26,8%). Los alelos *0501 y *0502 del gen HLA DQ B1 presentaban una frecuencia mucho menor (19,7% y 14,3%, respectivamente).

Existe un estudio realizado por Santolaria et al, también en nuestra comunidad autónoma donde se ha comunicado una frecuencia bastante similar para el alelo *0301 (24,4%), pero muy inferior para el *0102 (36,7%) en una población control.

En el estudio de Santolaria et al en el caso de los pacientes infectados por *Helicobacter pylori* (67,4%) la frecuencia del alelo *0102 aumentaba (36,7%) aunque

sigue siendo inferior a la de nuestro estudio. No tenemos una explicación clara para esta diferencia pero quizá podría tener que ver con el porcentaje algo más elevado de población infectada por *Helicobacter pylori* de nuestra muestra (71,4% vs. 67,4%).

En nuestro estudio no se ha confirmado la asociación entre los distintos alelos estudiados de los genes HLADQA1 y DQB1 y el desarrollo de progresión histológica. En primer lugar, al comparar el grupo de pacientes con progresión histológica y aquellos sin progresión, y posteriormente al establecer la comparación del grupo que evoluciona a metaplasia con el resto no se observan diferencias significativas respecto a ninguno de los alelos estudiados.

El mayor riesgo relativo de progresión en general se calcula para la presencia del alelo *0301 (OR=2,6) y para el alelo *0503 (OR=4) en el caso del estudio de la progresión a metaplasia intestinal.

Un dato para el que no se ha encontrado explicación es el hecho de que el alelo *0301 parece tener un carácter protector (OR=0,67) en la progresión a metaplasia intestinal.

Como en cualquier estudio que implique factores inmunogénicos, una posible explicación que aclare la diferencia entre los resultados obtenidos en nuestro estudio y algunos de los publicados en la literatura, son las posibles diferencias étnicas de los pacientes estudiados.

Los genes que forman el complejo mayor de histocompatibilidad se sitúan en el brazo corto del cromosoma 6 y son altamente polimórficos, lo que determina importantes diferencias genéticas entre poblaciones distintas (Santolaria S, 2001).

3.3 INFLUENCIA DE DETERMINADOS FACTORES AMBIENTALES Y DE ESTILO DE VIDA EN LA PROGRESIÓN DE LAS LESIONES PRENEOPLÁSICAS

En el grupo de pacientes estudiados en nuestra serie, la mayoría se consideran no consumidores de una cantidad excesiva de sal y no poseen un hábito tabáquico ni consumen alcohol habitualmente.

Si bien se observan diferencias significativas al comparar el consumo de tabaco en los pacientes con y sin evolución histológica ($p=0,03$), esta diferencia no se mantiene al introducir la metaplasia intestinal en la comparación.

No existen datos unánimes respecto a la posible influencia del consumo de tabaco en la progresión de las lesiones preneoplásicas del estomago. Kneller et al han sugerido que el consumo de tabaco duplica el riesgo de progresión a displasia y desarrollar metaplasia intestinal (Kneller RW, 1992). Sin embargo, estudios posteriores han sugerido que el consumo de mas de 20 cigarrillos diarios supone un factor riesgo elevado de progresión de las lesiones preneoplásicas gástrica, aunque no de forma significativa (You WC, 2000. Russo A, 2001).

En cuanto al consumo de sal, algunos estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de alimentos ricos en sal está fuertemente asociado al desarrollo de

cáncer gástrico (Di Palli, 2000), lo cual se ha demostrado también en modelos experimentales con ratas (Takashashi M, 1983). Sin embargo, tampoco hemos encontrado diferencias significativas en la progresión de las lesiones en nuestro estudio.

4. POSIBLES LIMITACIONES Y SEGOS DE LOS ESTUDIOS

4.1 DEBIDOS AL CUESTIONARIO DIETÉTICO EMPLEADO

En nuestros estudios hemos considerado que lo más adecuado era utilizar un cuestionario de frecuencia de alimentos debido a que se pretendía obtener información sobre la ingesta habitual de los individuos durante un periodo de tiempo prolongado desde el momento de inclusión en el estudio.

La elaboración y validación de un cuestionario de frecuencia de alimentos supone un gran esfuerzo, un gran costo y mucho tiempo, y aunque lo ideal hubiera sido realizar el cuestionario con una muestra de la población sobre la que vamos a realizar el estudio, decidimos utilizar un cuestionario que ya había sido validado previamente en la población española (anexo 1).

Uno de los problemas de estos cuestionarios es que no tienen validez en la estimación de la ingesta de los individuos que siguen un patrón muy distinto a los alimentos que aparecen en la lista o que tienen grandes variaciones en éste.

La cumplimentación del cuestionario requiere un cierto esfuerzo de memoria ya que hay que recordar los hábitos alimentarios durante un periodo de tiempo amplio, y el recordatorio de la dieta pasada puede estar influido por la dieta actual. Otro problema que pueden presentar estos cuestionarios es que pueden tener poca precisión en la estimación y cuantificación de las porciones de alimentos.

4.2 DEBIDO AL TAMAÑO DE LAS MUESTRAS

No cabe duda que la exigencia de realizar una endoscopia fue uno de los hechos determinantes para la negativa de muchos sujetos para participar en ambos estudios.

Es bien sabido, que la significación estadística se puede ver afectada si el número de sujetos incluidos es insuficiente. No cabe duda que si hubiera sido posible aumentar el tamaño de la muestra, se habría incrementado el poder estadístico de la prueba para detectar incluso pequeñas diferencias.

Además, en el caso particular del estudio 2, probablemente uno de los factores que más haya podido influir en los resultados, en el sentido de no encontrar asociaciones significativas, es el limitado número de sujetos incluidos lo que responde al hecho de que se partía de una población muy concreta, ya incluida en un estudio previo.

4.3 DEBIDO A LA METODOLOGÍA DEL ESTUDIO

El hecho de que nuestros pacientes en el estudio 2 hubieran participado en un estudio previo determinó que este se diseñara con carácter retrospectivo, aunque es bien sabido que en este tipo de diseño es más difícil establecer conclusiones respecto a posibles relaciones causales.

Por otra parte, aunque todos los estudios histológicos fueron realizados por la misma patóloga, a pesar de disponer de un estudio histológico previo en todos los sujetos incluidos, con el fin de minimizar las pequeñas variaciones derivadas de la adquisición de mayor experiencia con el paso del tiempo y unificar temporalmente los diagnósticos histológicos, se procedió a reevaluar todas las primeras biopsias en el momento de realizar la evaluación histológica de las segundas.

4.4 DEBIDO A LAS VARIABLES NO RECOGIDAS

Aunque hemos intentado recoger la mayoría de las variables que estimábamos importantes en la presentación y progresión de las distintas lesiones histológicas, existe la posibilidad de que algunas variables que no hemos tenido en cuenta estén influyendo en este proceso.

Además, pueden existir factores todavía desconocidos que influyan en la aparición y progresión de las lesiones gástricas preneoplásicas, que no podemos controlar en este momento adecuadamente porque no se conoce en profundidad la patogenia del proceso.

4.5 DEBIDOS A LA POBLACIÓN INCLUIDA

La población incluida en ambos estudios no es representativa de la población general, es una población muy seleccionada sobre la que se han aplicado unos criterios de inclusión y exclusión muy estrictos. Así, las conclusiones no se pueden generalizar a la población general española. Aunque por supuesto éste no era el objetivo de nuestro trabajo, esto hace que la validez externa del estudio esté limitada.

CONCLUSIONES

1. Cuando se realiza un análisis histológico de la mucosa gástrica de una población dispéptica en Zaragoza se observa que la forma histológica más frecuente es la gastritis crónica sin atrofia, seguida en frecuencia por la gastritis crónica con metaplasia intestinal.
2. La mayoría de estos sujetos dispépticos se encuentran infectados por *Helicobacter pylori* y el alelo que presentan con una mayor frecuencia es el HLA DQ A1*0102. En aproximadamente la mitad de estos sujetos infectados por *Helicobacter pylori* se comprueba la presencia del gen *cagA* y del gen *vacA* en la forma s1.
3. Dentro del grupo de pacientes dispépticos estudiados, el único grupo histológico donde existe un predominio de mujeres es el de sujetos con gastritis crónica no atrófica.
4. La frecuencia de presentación del alelo *0501 del gen HLA DQB1 y *0301 se encuentra aumentada en el grupo de sujetos con gastritis crónica atrófica respecto a otros grupos de pacientes con dispepsia funcional.
5. La mayoría de los pacientes dispépticos estudiados no son consumidores habituales de sal refinada, tabaco y alcohol

6. La tasa de infección por *Helicobacter pylori* disminuye en el grupo de sujetos dispépticos con metaplasia intestinal, aunque aumenta la proporción de cepas infectantes que poseen el gen *cagA* y el alelo s1 del gen *vacA*, con una disminución de los alelos s2 y m2.
7. En el grupo de sujetos con metaplasia intestinal, se observa una disminución en la frecuencia de presentación del alelo *0501 del gen HLA DQB1
8. Los factores de riesgo más importantes que se asocian a la presencia de gastritis crónica con metaplasia intestinal son la edad avanzada y la infección por cepas de *Helicobacter pylori* productoras de citotoxina vacuolizante del tipo s1
9. La infección por cepas de *Helicobacter pylori* productoras de citotoxina vacuolizante del tipo s2 y el alelo *0501 del gen HLA DQB1, ejercen un efecto protector significativo sobre el riesgo de presentación de metaplasia intestinal
10. La presencia de los alelos s1 y s2 del gen *vacA* de *Helicobacter pylori* son los factores más importantes asociados a la progresión de las lesiones histopatológicas gástricas hacia metaplasia intestinal.

11. La expresión de ninguno de los polimorfismos HLA estudiados determina un carácter protector o favorecedor en cuanto a la progresión de la gastritis crónica en periodos de tiempo relativamente cortos.

12. El consumo de tabaco, alcohol y de sal no se asocia de forma significativa a la presencia de metaplasia intestinal ni a la progresión histológica de las lesiones preneoplásicas del estómago hacia metaplasia intestinal en periodos de tiempo cortos. El tabaco es el único factor que parece asociarse con una mayor probabilidad de presentar con el tiempo cierto grado de progresión histológica en la mucosa gástrica.

13. Los distintos grupos sanguíneos no se asocian con una diferente progresión de las lesiones histopatológicas de la mucosa gástrica ni con una mayor frecuencia de metaplasia intestinal.

BIBLIOGRAFIA

-
- Abdel-Wahab M, Attallah M, Elshal M, Abdel-Raouf KR, El-Ghawalby N, Ezzat F. Cellular proliferation and ploidy of gastric mucosa: the role of *Helicobacter pylori*. *Hepato- Gastroenterology* 1997; 44: 885- 980
 - Aceti A, Celestino D, Caferro M, et al. Basophile-bound and serum immunoglobulin E directed against *Helicobacter pylori* in patients with chronic gastritis. *Gastroenterology* 1991, 101: 131-137
 - Ames BN, Gold LS. Too many rodent carcinogens: mitogenesis increases mutagenesis. *Science* 1990; 249: 970-1
 - Amiel JL. Study of the leukocyte phenotypes in Hodgkin's disease. In: Curtoni ES, Mattiuz PC, Tosi RM, eds. *Histocompatibility testing*. Copenhagen: Munksgaard, 1967:79-81
 - Amstrong D. H. *pylori* infection and dyspepsia. *Scan J Gastroenterol* 1996; 31(215): 38-47
 - Applemelk BJ, Simoons-Smit I, Negrini R, et al. Potential role molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysacharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity. *Infect Immun* 1996; 64: 2031-2040
 - Applemelk BJ, Negrini A, Moran AP, Kuipers EJ. Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* and the host. *Trends Microbiol* 1997; 5
 - Atherton JC, Cao P, Peek RMJ, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995; 270: 17771-17777

-
- Atherton JC, Peek RMJ, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1997; 112: 92-99
 - Atherton JC. CagA, the *cag* Pathogenicity Island and *Helicobacter pylori* virulence. *Gut* 1999; 44: 307-308
 - Azuma I, Ito S, Sato F, et al. The role of the HLA-DQA gene in resistance to atrophic gastritis and gastric adenocarcinoma induced by *Helicobacter pylori* infection. *Cancer* 1998; 82: 1013-1018
 - Barere MR, Elliot TSJ, Berkeley D, Thomas JE, Eastham EJ. Cytophatic effects of *campylobacter pylori* urease. *J Clin Pathol* 1988; 41: 597
 - Basso D, Navaglia F, Brigato L, Piva MG, Toma A, Greco E, Mario F, Galeotti F, Roveroni G, Corsini A, Plebani M. Analysis of *Helicobacter pylori vacA* genotypes and serum antibody profile in benign and malignant gastroduodenal diseases. *Gut* 1998; 43: 182-186
 - Bayerdörffer E, Lehn N, Haltz R, et al. Differences in expression of *Helicobacter pylori* gastritis in antrum and body. *Gastroenterology* 1992; 102: 1575-1582).
 - Beales ILP, Davey NJ, Pusey CD, Lechler RI, Calam J. Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis. *Lancet* 1995; 346: 381-382
 - Bechi P, Balzi M, Becciolini A, Nlaugeri A, Casini C, Anirosi A, Dei R. *Helicobacter pylori* and cell proliferation of gastric mucosa: possible implications for gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 1996; 91(2): 271-276

-
- Beresford SAA. Is nitrate in the drinking water associated with the risk of cancer in the urban UK? *Int J Epidemiol* 1985, 14: 57
 - Berry M, Armitage JP. The bacterial flagella motor. *Adv Microb Physiol* 1999; 41: 291-337
 - Bishop JM. Cancer: the rise of the genetic paradigm. *Genes Dev* 1995; 9:1309-15
 - Bjelke E. Epidemiological studies of cancer of the stomach, colon and rectum; with emphasis on the role of diet. *Scan J Gastroenterol* 1979; 9 (Suppl): 1-235.
 - Blase MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing CagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995, 55: 2111-2115
 - Blaser MJ. *Helicobacter pylori* phenotypes associated with peptic ulceration. *Scand J Gastroenterol* 1994; 205: 1-5
 - Blaser MJ*. Ecology of *Helicobacter pylori* in the human stomach. *J Clin Invest* 1997; 100: 759-762
 - Blaser MJ. The versatility of *Helicobacter pylori* in the adaptation to the human stomach. *J Physiol Pharmacol* 1997; 48: 307-314
 - Blaser MJ. Allelic variation in *Helicobacter pylori*: progress but no panacea. *Gut* 1999; 45: 477-480
 - Block G, Harman AM, Naughton D. A reduced dietary questionnaire: Development and validation. *Epidemiology* 1990; 1: 58-64
 - Blot W, Devesa S, Kneller R, et al. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *JAMA* 1991; 265: 1287

-
- Blot WJ, Li JY, Taylor PR, et al. Nutrition intervention trials in Linxian, China: Supplementation with specific vitamin/mineral combinations. Cancer incidence and disease-specific mortality in the general population. *JNCL* 1993; 85: 1483-1491)
 - Bodmer WF, Browning IVU, Krausa P, Rowan A, Bicknell DC, Bodmer JG. Tumor escape from immune response by variation in HLA expression and other mechanisms. *Ann NY Acad Sci* 1993; 690: 42-49
 - Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Dupont B, Erlich HA. Nomenclature for factors of the HLA system, 1994. *Tissue Antigens* 1994; 44: 1-18
 - Boixeda D. Infección por *Helicobacter pylori* en la dispepsia funcional. En: Mearin F (ed). *Dispepsia funcional: tan desconocida como frecuente*. Doyma. 1997; 95-111
 - Boland CR, Scheiman JM. Tumours of the stomach. In: Yamada T, ed *Textbook of Gastroenterology*. Philadelphia: JB Lippincott 1996: 1494-1523
 - Boren T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normak S. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* 1993; 262: 1892-1895
 - Brenes F, Ruiz B, Correa P, Hunter F, Ramarishnan T, Fontham E, Shi T. *Helicobacter pylori* causes hyperproliferation of the gastric epithelium. Pre- and post-eradication indices of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 1870- 5

-
- Brown JH, Jardetsky TS, Gorga JC, Stern U, Urban RG, Strominger JL. Three dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 1993; 364: 33-39
 - Calmels S, Ohshima H, Vincente P, Gounot AM, Bartsch H. Screening of microorganisms for nitrosation catalysis at pH 7 and kinetic studies on nitrosamine formation from secondary amines by *E. coli* strains. *Carcinogenesis* 1985; 6: 911-5
 - Campbell RD, Trowsdale T. Map of the human MHC. *Immunol Today* 1993; 14: 349-352
 - Carneiro F, David L, Sobrinho-Simoes M, et al. Oncogenes and onco-suppressor genes in gastric carcinoma. *Surg Pathol* 1994; 5: 225-38
 - Caselli M, Figura N, Trevisani L, et al. Patterns of physical modes of contact between *Campylobacter pylori* and gastric epithelium: implications about bacterial pathogenesis. *Am J Gastroenterol* 1989; 84: 511-513
 - Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type-I specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:14648-53
 - Chavin KD, Qin L, Yon H, Yagita H, Bromberg JS. Anti-CD2 mAbs suppress cytotoxic lymphocyte activity by the generation of Th2 suppressor cells and receptor blockade. *J Immunol* 1994; 152: 3729-3739
 - Chen VW, Abu-Elyazeed RR, Zavala DE, Ktsanes V, Haenszel W, Cuello C, Montes G, Correa P. Risk factors of gastric precancerous lesions in a high-risk Colombian population. I. Salt. *Nutr. Cancer* 1990; 13: 59

-
- Chen G, Sordillo EM, Ramey WG, et al. Apoptosis in gastric epithelial cells is induced by *Helicobacter pylori* and accompanied by increased expression of BAK. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239: 626-32
 - Chyou P, Nomura A, Hankin J, Stemmermann GN. A case-cohort study of diet and stomach cancer. *Cancer Res* 1990, 50: 7501-7504
 - Clark G, Smyrk T, Buriles P, et al. Is Barrett's metaplasia the source of adenocarcinoma of the cardia? *Arch. Surg.* 1994; 129: 609
 - Collet JA, Buert MJ, Frampton CM, Yeo KH, et al. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in the adult population of Christchurch: Risk factors and relationship to dyspeptic symptoms and iron studies. *N Z Med J* 1999; 112: 292-295
 - Correa P. Clinical implications of recent developments in gastric cancer pathology and epidemiology. *Semin Oncol* 1985; 12: 2-10
 - Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1988; 48: 3554-60
 - Correa P, Haenszel W, Cuello C, et al. Gastric precancerous process in a high risk population: Cross-sectional studies. *Cancer Res* 1990; 50: 4731-4736
 - Correa P. Is gastric carcinoma an infectious disease? *N Engl J Med* 1991; 325: 1170-1
 - Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. First American Cancer Society Award Lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Res* 1992; 52: 6735-6740
 - Correa P, Ruiz B, Shi T, et al. *Helicobacter pylori* and nuclear organizer regions in the gastric antral mucosa. *Am J Clin Pathol* 1994; 101: 656-60

- Corzo D, Salazar M, Granja CB, Yunis EJ. Advances in HLA genetics. *Exp Clin Immunogenet* 1995; 12: 156-170
- Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N, Rappuoli R. Molecular characterization of the 128- kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5791- 5795
- Cover TL, Dooley c, Blazer MJ. Characterisation and human response to proteins in *Helicobacter pylori* both culture supernants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect Inmun* 1990; 58: 603-610
- Crabtree JE, Taylor JD, Wyatt JI, et al. Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. *Lancet* 1991; 338: 332-5
- Crabtree JE, Farmery SM, Lindley SM, Figura N, Peichl P, et al. CagA/cytotoxic strains of *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric cell lines. *J Clin Pathol* 1994, 47: 945-950
- Crabtree JE*, Lindley IJD. Mucosal interleukin-8 and *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994; 6 (suppl 1): S33-S38
- Crabtree JE, Covacci A, Farmery SM, et al. *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with cagA positive phenotype. *J Clin Pathol* 1995; 48: 41-5
- Crabtree JE. Gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; 10 (suppl 1): 29-37

-
- Craanen ME, Blok P, Dekker W, et al. Prevalence of subtypes of intestinal metaplasia in gastric antral mucosa. *Dig Dis Sci* 1991; 36: 1529-1536
 - Craanen ME, Dekker W, Blok P, Ferwerda J, Tytgat GNJ. Intestinal metaplasia and *Helicobacter pylori*: An endoscopic bioptic study of the gastric antrum. *Gut* 1992; 33: 16-20
 - Craanen ME, Blok P, Dekker W, Tytgat GNJ. *Helicobacter pylori* and early gastric cancer. *Gut* 1994; 35: 1372-1374
 - Croitoru K, Riddell RII. Reduce, reuse and recycle: Shedding light on shedding cells. *Gastroenterology* 1993; 105: 1243-1250
 - Cuello C, Correa P, Haenszel W, et al. Gastric cancer in Columbia. I. Cancer risk and suspect environmental agents. *JNCI* 1976; 57: 1015-20
 - Di Gregorio C, Morando P, Fante R, De Gaetani C. Gastric dysplasia: A follow-up study. *Am J Gastroenterol* 1993; 88: 1714-1719
 - Di Palli. Epidemiology of gastric cancer: An evaluation of available evidence. *J Gastroenterol* 2000; 35: 84-89
 - Doll R. Epidemiology. En: Trulove SC, Heywoeth MF. Eds. Gastric carcinoma. *Topics in gastroenterology*. Oxford: Blackwell Scientific Publ. 1978; 117-127
 - Eaton KA, Morgan DR, Krakowa S. *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* 1989; 57: 1119-1125
 - Eidt S, Stolte M. prevalence of intestinal metaplasia in *Helicobacter pylori* gastritis. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29: 607-610
 - El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, et al. The role of interleukin-1 polymorphism in the pathogenesis of gastric cancer. *Nature* 2001; 412: 99

-
- El-Zimaity HMT, Ramchatesingh J, Ali Saeed M, et al. Gastric intestinal metaplasia: Subtypes and natural history. *J Clin Pathol* 2001, 54: 679-83
 - Ernst PB, Crowe SE, Reyes VE. How do *Helicobacter pylori* cause mucosal damage? The inflammatory response. *Gastroenterology* 1997; 113: S35-S42
 - Eood JC, Ruiz B, Fonthman ETH et al. *Helicobacter pylori* gastritis and vitamin C concentration in gastric juice. *Nutr Cancer* 1994; 22: 65-72
 - Evans DG, Graham DY. Internalization of *Helicobacter pylori* by epithelial cells: The key to the inflammatory response to *Helicobacter pylori* infection? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1992; 4: S45-S47
 - Evans DJ, Evans DG, Takemura T, et al. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect Immun* 1995; 63: 2213-2220
 - Fan XJ, Chua A, Shai CN, McDevitt J, Keeling PWN, Keleher D. Gastric T lymphocyte response to *Helicobacter pylori* in patients with *H. pylori* colonization. *Gut* 1994; 35: 1379-1384
 - Fan XG, Keleher D, Fan XJ, Xia HX, Keeling PWN. *Helicobacter pylori* increase proliferation of gastric epithelial cells. *Gut* 1996; 38: 19-22
 - Fan X, Crowe SE, Behar S, et al. The effect of class II major histocompatibility complex expression on adherence of *Helicobacter pylori* and induction of apoptosis in gastric epithelial cells: a mechanism for T help cell type I -mediated damage. *J Exp Med* 1998; 187: 1059-69
 - Fang DC, Liu WW. Subtypes of intestinal metaplasia and gastric carcinoma. A clinicoendoscopic follow-up of 112 cases. *Chin Med J* 1991; 104: 467-471
 - Fanidi A, Harrington EA, Evan GI. Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature* 1992; 359: 554-6

-
- Farinati F, Valiante F, Germana B, Libera GD, Baffa R, Rugge M, Plebani M, Vianello F, Di Mario F, Naccarato R. Prevalence of Helicobacter pylori infection in patients with precancerous changes and gastric cancer. *Eur J Cancer Prev* 1993; 2: 321-326
 - Farinati F*, Rugge M, Di Mario F, et al. Early and advanced gastric cancer in the follow-up of moderate and severe gastric dysplasia patients. A prospective study. *Endoscopy* 1993; 25: 261-264
 - Fennerty MB, Emerson JC; Garewal HS; Sampliner RE, Bhattacharyya A. Association between infection with Helicobacter pylori and the presence of a gastric cancer precursor lesion, intestinal metaplasia. *GI cancer* 1995; 1: 39-43
 - Fertitta AM, Comin U, Teruzzi V, et al. Clinical significance of gastric dysplasia: A multicenter follow-up study. *Endoscopy* 1993; 25: 261-4
 - Filipe MI, Muñoz N, Lane DP, et al. Intestinal metaplasia types and risk of gastric cancer: A cohort study in Slovenia. *Int J cancer* 1994; 57: 324-329
 - Fillip MI, Barbatis C, Sandey A, Ma J. Expression of intestinal mucin antigens in the gastric epithelium and its relationship with malignancy. *Hum Pathol* 1988; 19: 19-26
 - Flyger HL, Christensen IJ, Thorup J, et al. DNA aneuploidy in gastric carcinoma. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: 258-64
 - Fontham E, Zavala D, Correa P, Rodríguez E, Hunter F, Haenszel W, Tannenbaum SR. Diet and chronic atrophic gastritis: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 1986; 76: 621-627

- Fontham E, Ruiz B, Perez A, et al. Determinants of Helicobacter pylori infection and chronic gastritis. *Am J Gastroenterol* 1995; 90: 1094-1101
- Forman D, Newell DG, Fullertons F, et al. Association between infection with Helicobacter pylori and risk of gastric cancer. Evidence from a prospective investigation. *Br Med J* 1991; 302: 1302-1305
- Fossum B, Breivik J, Melig GI, Gedde-Dahl T, Hansen T, Knutsen I, Rognum TO, Thorsby E, Gaudernack G. A K-ras 13 Gly-Asp mutation is recognized by HLA-DQ7 restricted T cells in a patient with colorectal cancer: modifying effect of DQ7 on established cancers harbouring this mutation? *Int J Cancer* 1994; 58: 506-511
- Fox JG, Correa P, Taylor NS, Thompson N, et al. High prevalence and persistence of cytotoxin-positive Helicobacter pylori strains in a population with high prevalence of atrophic gastritis. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 1554-1560
- Fu S, Ramanujam KS, Wong A, Fantry GT, Drachenberg CB, James SP, Meltzer SJ, Wilson KT. Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in Helicobacter pylori gastritis. *Gastroenterology* 1999; 116: 1319-1329
- Genta R, Hammer H, Graham D. Gastric lymphoid follicles in Helicobacter pylori infection: Frequency, distribution and response to triple therapy. *Human Pathol* 1983; 24: 577-583
- Genta RM. Helicobacter pylori as a promoter of intestinal metaplasia and gastric cancer: an alluring hypothesis in search of evidence. *Eur J Gastroenterol* 1995; 7 (suppl 1): 25-30

-
- Goodwin CS, Amstrong JA, Chilvers T, et al. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campilobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov, respectively. *Int j Syst Bacteriol* 1989; 39: 397-405
 - Goodwin CS, Worsley BW. Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am* 1993; 22: 5-19
 - Graham S, Schotz W, Martino P. Alimentary factors in the epidemiology of gastric cancer. *Cancer* 1972; 30: 927-38 (Green LK, Graham DY: Gastritis in the elderly. *Gastroenterol Clin N Am* 1990; 19(2): 255-271)
 - Haenszel W. Cancer mortality among the foreign born in the United States. *J Natl Cancer Inst.* 1961; 26: 37-132
 - Haenszel W, Kurihara M, Segi M, et al. Stomach cancer among Japanese in Hawaii. *J Natl Cancer Inst.* 1972; 49: 969
 - Haenszel W, Correa P. Developments in the epidemiology of stomach cancer over the past decade. *Cancer Res.* 1975; 35: 3452-9
 - Haggitt RC. Barrett's oesophagus, dysplasia and adenocarcinoma. *Hum Pathol* 1994; 25: 982-983
 - Hall CN, Darkin D, Brimblecombe R, Cook AJ, Kirkham JS, Northfield TC. Evaluation of nitrosamine hypothesis for gastric carcinogenesis in precancerous conditions. *Gut* 1986; 27: 491
 - Hazell SL, Lee A. *Campilobacter pyloridis*, urease, hydrogen ion back difusión, and gastric ulcers. *Lancet* 1986; 2: 15-17
 - Helland A, Borresen K, Kaem J, Ronningen KS, Thorsby E. HLA antigens and cervical cancer (letter). *Nature* 1992; 356:23

-
- Henderson BE. Summary report of the sixth Symposium on Cancer Registries and Epidemiology in the Pacific Basin. *JNCL*. 1990; 82: 1186-1190
 - Hessey S, Spencer JJ, Wyatt I, et al. bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. *Gut* 1990; 31: 134-138
 - Hirayama K, Matsushita S, Kikuchi I, Luchi M, Ohta N, Sasazuki T. HLA-DQ is epistatic in controlling the immune response to schistosomal antigen in humans. *Nature* 1987; 327: 426-430
 - Hirschl AM, Pletschette M, Hirschl MH, Berger J, Stanek G, Rotter ML. Comparison of different antigen preparations in an evaluation of the immune response to *Campylobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; 7: 570-575
 - Hockenberry DM, Nuñez G, Milliman C, et al. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348: 334-6
 - Howson CP, Hiyama T, Wynder EL. The decline in gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph. *Epidemiologic Reviews* 1986; 8: 1-27
 - Hu PJ, Michell HM, Li YY, et al. Association of *Helicobacter pylori* with gastric cancer and observations on the detection of this bacterium in gastric cancer cases. *Am J Gastroenterol* 1994, 89: 1806-1810
 - Huang J, O'Toole PW, Doig P, Trust TJ. Stimulation of interleukin-8 response in epithelial cell lines by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1995; 63: 1732-8
 - Hui PK, Chan WY, Cheung PS, Chan JKC, Ng CS. Pathologic changes of gastric mucosa colonized by *Helicobacter pylori*. *Hum Pathol* 1992, 23: 548-556

-
- Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, et al. Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 1998; 279: 373-377
 - Inoue H. Treatment of esophageal and gastric tumors. *Endoscopy* 2001; 33: 119-25
 - Iwanaga T, Ham H, Adachi K, Fujita T. A novel mechanism form disposing of effect on epithelial cells in the small intestine of guinea pigs. *Gastroenterology* 1993; 105: 1089-1097
 - Jass R, Filipe MI. A variant of intestinal metaplasia associated with gastric carcinoma: A histochemical study. *Histopathology* 1979; 3: 191-199
 - Jass JR. Role of intestinal metaplasia in the pathogenesis of gastric carcinoma. *J Clin Pathol* 1980; 33(9): 801-810
 - Joossens JV, Geboers J. Nutrition and gastric cancer. *Proc. Nutr. Soc* 1981; 40: 37
 - Kabat G, Wynder E. Tobacco, alcohol intake, and diet in relation to adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Cancer Causes Control* 1993; 4: 123
 - Karita M, Blaser MJ. Acid-tolerance response in Helicobacter pylori and differences between cagA+ and cagA- strains. *J Infect Dis* 1998; 178: 213-219
 - Karhukorpi J, Ikaheimo I, Sivennoinen-Kaissen S, et al. HLA-DQA alleles and the presence of Helicobacter pylori antibodies. *Eur J Immunogenet* 1999; 26:15-17

-
- Kato Y, Kitagawa T, Yanasigawa A, Kubo K, Utsude T, Hiratsuka H, et al. Site-dependent development of complete and incomplete intestinal metaplasia types in the human stomach. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83: 178-183
 - Keefer LK, Roller PP. N-nitrosation by nitrite ion in neutral and basal medium. *Science* 1973; 181: 1245-7
 - Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-57
 - Kitayama Y, Nakamura S, Sugimura S, et al. Cytophotometric and flow cytometric DNA content of isolated glands in gastric neoplasia. *Gut* 1995; 36: 516-21
 - Klein J. Natural history of the major histocompatibility complex. New York: Wiley, 1986
 - Kneller RW, You WC, Chang YS, et al. Cigarette smoking and other risk factors for progression of precancerous stomach lesions. *J Natl Cancer Inst* 1992; 16: 1261-6
 - Krivan HC, Plosils L, Zhang I, Holt V, Kyogashima M. Cell surface carbohydrates as adhesion reports for many pathogenic and opportunistic microorganisms in microbial adhesion and invasion. En Höök M, Swistaski L (Ed). Springer Verlag, New York 1992; 13
 - Kuipers E, Nrez-Nrez GL, Meuwissen SGM, Blaser MJ. Helicobacter pylori and atrophic gastritis: Importance of the cagA status. *J Natl Cancer Inst* 1995
 - Kyrtopoulos SA. Ascorbic acid and formation of N-nitros compounds: possible role of ascorbic acid in cancer prevention. *Am J Clin Nutr* 1987; 45: 1344-50

- Lage AP, Godfroid E, Fauconnier A, Burette A, Butzler J-P, Bollen A, Glupczynski Y. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2752-275
- Lauren P, Nevalainen J. Epidemiology of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma: A time-trend study in Finland with comparison between studies from high- and low-risk areas. *Cancer* 1993; 71: 2926
- Lee A, Fox J, Hazell S. Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: A perspective. *Infect Immun* 1993; 61: 1601-1610
- Lee JE, Lowy AM, Thompson WA, Lu M, Loflin PT, Skibber JIM, Evans DB, Curley SA, Mansfield PM, Reveille JD. Association of gastric adenocarcinoma with the HLA class II gene DQB1 *0301. *Gastroenterology* 1996; 111:426 - 432
- Lee WJ, Hong RL, Lai JR, Chen CN, Lee PH, Huang MT. Clinicopathologic characteristics and prognoses of gastric cancer in patients with a positive familial history of cancer. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: 30-3
- Leunk Rd, Johnson PT, David BS, Kraft WG, Morgan DR. Cytotoxic activity in broth culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol* 1988; 26: 93-99
- Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-6
- Levine DS, Haggitt RC, Blount PL, Ravinovitch PS, Rusch VW, Reid BJ. An endoscopic biopsy protocol can differentiate high-grade dysplasia from early adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 1993; 105: 40-50

-
- Levine DS, Rabinovitch PS, Haggitt RC, et al. Distribution of aneuploid cell population in ulcerative colitis with dysplasia or cancer. *Gastroenterology* 1994; 107: 1198-210
 - Leying H, Suerbaum S, Geis G, Hass R. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Mol Microbiol* 1992; 6: 28-74
 - Li JY, Ershow AG, Chen ZJ, et al. A case-control study of cancer of the oesophagus and gastric cancer in Linxian. *Int J Cancer* 1989, 43: 755-761
 - Li L, Genta RM, Go MF, Gutierrez O, Kim JG, Graham DY. *Helicobacter pylori* strain and the pattern of gastritis among first-degree relatives of patients with gastric carcinoma. *Helicobacter* 2002; 7: 349-55
 - Logan RP, Berg DE. Genetic diversity of *Helicobacter pylori*. *Lancet*. 1996; 348 (9040): 1462-3
 - Logan PRH. Adherence of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 1996*; 10 (suppl 1): 3-15
 - Lynch DAF, Mapstone NP, Clarke AMT, Sobala GM, Jackson P, Morrison L, Dixon MF, Quirke P, Axon ATR. Cell proliferation in *Helicobacter pylori* associated gastritis and the effect of eradication therapy. *Gut* 1995, 36: 346-350
 - Lyon JL, Gardener JW, West DW, Mahoney KM. Methodological issues in epidemiological studies of diet and cancer. *Cancer Res (suppl)* 1983; 43: 2392
 - Maeda S, et al. Structure of *cag* Pathogenicity Island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates. *Gut* 1999; 44: 336-341

-
- Malaty H, Engstrand L, Pedersen N, Graham D. Helicobacter pylori infection: Genetic and environmental influences. A study of twins. *Ann Intern Med.* 1994; 120: 982-986
 - McDougall CJ, Ngoi SS, Goldman IS, Godwin T, Felix J, DeCosse J, Rigas B. Reduced expression of HLA class I and 11 antigens in colon cancer. *Cancer Res* 1990; 50:8023-8027
 - Maeda S, Kanai F, Ogura K, Yoshida H, Ikenoue T, Takahashi M, Kawabe T, Shiratori Y, Omata M. High seropositivity of anti-CagA antibody in Helicobacter pylori-infected patients irrelevant to peptic ulcers and normal mucosa in Japan. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1841-1847
 - Maeda S, et al. Structure of cag Pathogenicity Island in Japanese Helicobacter pylori isolates. *Gut* 1999; 44: 336-341
 - Marrero JM, de Caestecker JS, Corbishley CM, et al. Gastric DNA content in postgastrectomy patients. *Cancer* 1996; 77: 19-24
 - Masamune H, Kawasaki H, Abe S, Oyama K, Yamagu Y. Molisch-positive mucopolisaccharides of gastric cancers as compared with the corresponding components of gastric mucosa. *Tohoku J Exp Med* 1958; 68: 81-91
 - Meining A, Hackelsberger A, Daenecke C, Stolte M, Bayerdorfer E, Ochsenfihn T. Increased cell proliferation of the gastric mucosa in first-degree relatives of gastric carcinoma patients. *Cancer* 1998; 83: 876-81
 - Meining A, Bayerdorffer E, Stolte M. Helicobacter pylori gastritis of the gastric cancer phenotype in relatives of gastric carcinoma patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11: 717-720

-
- Mendz GL, Hazell SL, Burns BP. Glucose utilization and lactate production by *Helicobacter pylori*. *J Gen Microbiol* 1993; 139: 3023-3028
 - Miehlke S, Kirsch C, Agha-Amiri K, et al. The *Helicobacter pylori* *vacA* s1, m1 genotype and *cagA* are associated with gastric carcinoma in Germany. *Int J Cancer* 2000; 87: 322-327
 - Miller AB. Risk factors from geographic epidemiology for gastrointestinal cancer. *Cancer* 1982; 50: 2533-2540
 - Miller AB. Trends in cancer mortality and epidemiology. *Cancer* 1983;51:2413-2418
 - Mirvish SS, Wallcave I, Eagen M, Shubik P. Ascorbate-nitrite reaction: possible means of blocking the formation of carcinogenic N-nitroso compounds. *Science* 1972; 177: 65-8
 - Mirvish SS. Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics and in vivo occurrence. *Toxicol Appl Pharmacol* 1975; 31: 325-51
 - Mirvish SS. Effects of vitamin C and E on N-nitroso compound formation, carcinogenesis and cancer. *Cancer* 1986; 58 (Suppl): 1842-50
 - Morita M, Kuwano H, Bada H, Taketorni A, Kohnoe S, Tomoda H, Araki K, Saeki H, Kitamura K, Sugimachi K. Multifocal occurrence of gastric carcinoma in patients with a family history of gastric carcinoma. *Cancer* 1998; 83: 1307-11
 - Moss SF, Legon S, Davies J, Calam J. Cytokine gene expression in *Helicobacter pylori* associated antral gastritis. *Gut* 1994, 35: 1567-1570
 - Moss SF, Calam J, Agarwal B, et al. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut* 1996; 38:498-501

-
- Mulder JWR, Wielenga VJM, Polak MM, et al. Expression of mutant p53 protein and CD44 variant proteins in colorectal tumorigenesis. *Gut* 1995; 36: 76-80
 - Muñoz N, Correa P, Cuelo C, Duque E. Histological types of gastric carcinoma in high- and low-risk areas. *International Journal of cancer* 1968; 3: 809-818
 - Murakami M, Asagoe K, Dekigai H, et al. Products of neutrophile metabolism increase ammonia-induced gastric mucosal damage. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 268-73
 - Nakamura H, Yoshiyama H, Takeuchi H, Mizote T, Okita K, Nakazawa T. Ureasa plays an important role in the chemotactic motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *Infect Immun* 1998; 66: 4832-4837
 - Nardone G, Staibano S, Rocco A, Mezza E, D'Armiento FP, Insabato L, Coppola A, Salvatore G, Lucariello A, Figura N, De Rosa G, Budillon G. Effect of *Helicobacter pylori* infection and its eradication on cell proliferation, DNA status, and oncogene expression in patients with chronic gastritis. *Gut* 1999; 44: 789-799
 - Negrini R, Lisato L, Zanella I, et al. *Helicobacter pylori* infection induces antibodies cross reacting with human gastric mucosa. *Gastroenterology* 1991; 101: 437-445
 - Nguyen T, Brunson D, Crespi J, et al. DNA damage and mutations in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3030-9
 - Niv Y, Fraser G, Delpre G, Neeman A, Leiser A, Samra Z, Scapa E, Gilon E, Bar-Shany S. *Helicobacter pylori* and blood groups. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 101-104

-
- Noach LA, Rolf TM, Tytgat GNJ. Electron microscopic study of association between *Helicobacter pylori* and gastric and duodenal mucosa. *J Clin Pathol* 1994; 47: 699-704
 - Noach LA*, Bosma NB, Jansen J, Hoek FH, Van Deventer SJH, Tytgat GNJ. Mucosal tumor necrosis factor Alfa, interleukin 1beta and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29: 425-429
 - Nomura A, Grove J, Stemmermann G, Sverson R. A prospective study of stomach cancer and its relation to diet, cigarettes and alcohol consumption. *Cancer Res* 1990; 50: 627-631
 - Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* 1991; 325: 1132-1136
 - Nombra A, Stemmermann GN, Chyou PH, Perez-Perez G, Blazer MJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* 1991; 325: 1132-1136
 - Odenbreit S, Till M, Hofreuter D, Faller G, Haas R. Genetic and functional characterization of the *alpAB* gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol Microbiol* 1999; 31: 1537-1548
 - Ohyama S, Yonemura Y, Miyazaki I. Prognostic value of S-phase fraction and DNA ploidy studied with in vivo administration of bromodeoxyuridine on human gastric cancers. *Cancer* 1990; 65: 116-21
 - Okada K, Boss JM, Prentice H, Spies T, Mengler R, Auffrey C, Lillie J, Grossberger D, Strominger JL. Gene organization of DC and DX subregions

- of the human major histocompatibility complex. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82: 3410-3414
- Olerup et al. Tissue Antigens 1993; 41: 119-134
 - O'Toole PW, Kostrynska M, Trust TJ. Non motile mutants of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* defective in flagellar hook production. Mol Microbiol 1994; 14: 691-703
 - Owen DA. Normal histology of the stomach. Am J Surg Pathol 1986; 10: 48-61
 - Ozasa K, Murata J, Higashi A, Hayashi K, Inokuchi H, Miki K, Tada M, Hawaii K, Watanabe Y. *Helicobacter pylori* infection and atrophic gastritis. A nested case-control study in a rural town in Japan. Dig Dis Sci 1999; 44: 253-256
 - Paggiaccia C, de Bernard M, Lupetti P, et al. The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell specific vacuolating activity. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 10212-10217
 - Panella C, Ierardi E, Polimeno I, Balzano T, Ingrosso M. Proliferative activity of gastric epithelium in progressive steps of *Helicobacter pylori* infection. Dig Dis Sci 1996; 41(6): 1132-38
 - Parham P, Adams EJ, Arnett KL. The origins of HLA-A, B, C polymorphism. Immunol Rev 1995;143:141-180
 - Parkin DM, Muir CS, Whelan SL et al. Cancer incidence in five continents. IARC Scientific publications 1992; 120
 - Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric cancer. N Engl Med 1991, 325: 1127-1131

-
- Parsonnet J, Blaser MJ, Perez-Perez GI, et al. Symptoms and risk factors of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of epidemiologists. *Gastroenterology* 1992; 102: 41-6
 - Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelmann H. Risk of gastric cancer in people with *cagA* positive or *cagA* negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1997; 40:297-301
 - Phadnis SH, Ilver D, Jazon L, Normark S, Westblom TU. Pathological significance and molecular characterization of vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1994; 62: 1557-1565
 - Peek RM, Miller GG, Tham KT, et al. Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to *cagA*+ *Helicobacter* strains. *Lab Invest* 1995; 73: 760-770
 - Peek RM, Kerr LD, Miller GG, et al. *H. pylori* induces apoptosis in gastric epithelial cells by an NFκB-independent mechanism. *Gut* 1997; 41 (suppl 1):A4
 - Peek RM*, Moss SF, Tham KT, et al. *Helicobacter pylori cagA*+ strains an association of gastric epithelial proliferation from apoptosis. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 863-8
 - Penston JG, Pounder RE. A survey of dyspepsia in Great Britain. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; 10: 83-89
 - Piotrowski J, Piotrowski E, Skrodzka D, et al. Induction of acute gastritis and epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Scand Gastroenterol* 1997; 32:03-11

-
- Ponchon T. Endoscopic mucosal resection. *J Clin Gastroenterol* 2001; 32: 6-10
 - Potter CS. The significance of spontaneous and induced apoptosis in the gastrointestinal tract of mice. *Cancer Metastasis Rev* 1992; 11: 179-95
 - Preston Martin S, Pike M, Ross RK, et al. Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res* 1990; 50: 7415-21
 - Rathbone BJ, Wyatt JI, Worsley BW, et al. Systemic and local antibody responses to gastric *Campylobacter pyloridis* in non-ulcer dyspepsia. *Gut* 1986; 27: 642-647
 - Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1993; 124: 1-6
 - Rigas B, Spiro HM. *Clinical Gastroenterology. A handbook*. New York: McGraw Hill, 1995
 - Riley EM, Morris-Jones S, Taylor-Robinson AW, Holder AA. Lymphoproliferative responses to a merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*: preliminary evidences for seasonal activation of CD8+/HLA-DQ-restricted suppressor cells. *Clin Exp Immunolog* 1993; 94: 64-67
 - Rokkas T, Filipe MI, Sladen GE. Detection of an increased incidence of early gastric cancer in patients with intestinal metaplasia type III who are closely followed up. *Gut* 1991; 32: 1110-1113
 - Rokkas T, Papatheodorou G, Karameris A, et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric juice vitamin C levels. Impact of eradication *Dig Dis Sci* 1995; 40: 615-621

-
- Rokkas T, Ladas S, Liatsos C, Petridou E, Papatheodorou G, Theocharis S, Karameris A, Raptis S. Relationship of *Helicobacter pylori* cagA status to gastric cell proliferation and apoptosis. *Digestive Diseases and Sciences* 1999; 44; 3:487-493
 - Rubin CE. Are there three types of *Helicobacter pylori* gastritis? *Gastroenterology* 1997; 112: 2108-10
 - Ruddell WSJ, Bone ES, Hill MJ, Blendis LM, Walters CL. Gastric juice nitrite: A risk factor for gastric cancer in the hypochlorhydric stomach? *Lancet* 1976, 2: 1037
 - Ruddell WSJ, Bone ES, Hill MJ, Walters CL. Pathogenesis of gastric cancer in pernicious anemia. *Lancet* 1978; 1: 521
 - Rudi J, Rudy A, Maiwald M, et al. Direct determination of *Helicobacter pylori* vacA genotypes and cagA gene in gastric biopsies and relationship to gastrointestinal diseases. *Am J Gastroenterol* 1999, 94: 1525-1531
 - Ruid B, Rood JC, Fontman ETH et al. Vitamin C concentration in gastric juice before and after anti *Helicobacter pylori* treatment. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 533-9
 - Rugge M, Farinati F, Di Mario F, et al. Gastric epithelial dysplasia: a prospective follow-up study from the disciplinary group on gastric dysplasia. *Hum Pathol* 1991; 22: 1002-1008
 - Rugge M, Farinati F, Baffa R, et al. Gastric epithelial dysplasia in the natural history of gastric cancer: A multicenter prospective follow-up study. Interdisciplinary Group on Gastric Epithelial Dysplasia. *Gastroenterology* 1994; 107: 1288-1296

-
- Rugge M*, Farinati F, Baffa R, et al. Gastric epithelial dysplasia in the natural history of gastric cancer: A multicenter prospective follow-up study. *Gastroenterology* 1994; 107: 1288-1296
 - Rugge M, Cassaro M, Leandro G, et al. Helicobacter pylori in promotion of gastric carcinogenesis. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 950-5
 - Rugge M, Correa P, Dixon MF, et al. The Padova international classification. *Am J Surg Pathol* 2000 ; 24. 167-76
 - Russo A, Maconi G, Spinelli P, Di Felice G, Eboli M, Andreola S, Ravagnani F, Settesoldi D, Ferrari D, Lombardo C, Bertario L. Effect of lifestyle, smoking, and diet on development of intestinal metaplasia in H. pylori-positive subjects. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1402-1408
 - Saitoh T, Natomi H, Zhao W, et al. Identification of glycolipid receptors for Helicobacter pylori by TLC-immunostaining. *FEBS* 1991; 282: 385-387
 - Sakaki N, Momma K, Egawa N, et al. The influence of Helicobacter pylori infection on the progression of gastric mucosal atrophy and occurrence of gastric cancer. *Eur J Gastroenterol* 1995; 7(suppl 1): S59-S62
 - Salgame P, Convit J, Bloom BR. Immunological suppression by human CD8+ T cells is receptor dependent and HLA-DQ restricted. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2598-2602
 - Santolaria S, Barrios Y, Benito R, Piazuelo E, Quintero E, Lanás A. Helicobacter pylori y factores inmunogenéticos del huésped: relevancia de los alelos HLA DQA*0102 y *0301 en la úlcera péptica. *Gastroenterol Hepatol* 2001; 24: 117-121

-
- Saraga EP, Gardiol D, Costa J. Gastric dysplasia. A histologic follow-up study. *Am J Surg Pathol* 1987; 11: 788-96
 - Schalg P, Ulrich h, Merkle P, Bockler R, Peter M, Herfath CH. Are nitrate and N-nitroso compounds in gastric juice risk factors for carcinoma in the operated stomach? *Lancet* 1980; 1: 727
 - Scheiman JM, Cutler AF. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Am J Med* 1999; 106: 222-226
 - Schubert T, Schubert AB, Ma CK. Symptoms, gastritis, and *Helicobacter pylori* in patients referred for endoscopy 1992; 38: 357-360
 - Sera HM, Crimi c, Sette A, Celis E. Fine restriction analysis and inhibition of antigen recognition in HLA-DQ restricted T cells by major histocompatibility complex blockers and T cell receptor antagonists. *Eur J Inmunolog* 1993; 23: 2967-2991
 - Sharma SA, Tummuru MK, Miller GG, Blaser MJ. Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro. *Infect Immun* 1995, 63: 1681-7
 - Silvia S, Filipe MI, Pinho A. Variants of intestinal metaplasia in the evolution of chronic atrophic gastritis and gastric ulcer. A follow-ip study. *Gut* 1990; 31: 1097-104
 - Sipponen P, Jarvi O, Kekki M, Siurala M. Decreased incidences of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in Finland during a 20-year period. *Scan J Gastroenterol* 1987; 22: 865-871
 - Sipponen P, Kosunen TU, Valle J, et al. *Helicobacter pylori* infection and chronic gastritis in gastric cancer. *J Clin Pathol* 1992; 45: 319-323

-
- Sipponen P: Gastric cancer-a long-term consequence of *Helicobacter pylori* infection? 1994 Scand J Gastroenterol 29 (suppl 201): 24-27
 - Siurala M. Gastritis, its fate and sequelae. Ann Clin Res 1981; 13: 111
 - Smoot DT, Mobley HLT, Chippendale GR, Lewison JF, Resau JH. *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. Infect Immun 1990; 58: 1992-1994
 - Smoot DT, Resau JH, Naab T, et al. Adherence of *Helicobacter pylori* to cultured gastric epithelial cells. Infect Immun 1993; 61: 350-355
 - Sobala GM, Schorah CJ, Sanderson M, et al. Ascorbic acid in human stomach. Gastroenterology 1989; 97: 357-63
 - Sobala GM, Wyatt JI, Dixon MF, et al. Histological aspects of atrophic gastritis. En: Holt PR, Russell RM (Eds). Chronic gastritis and hypochlorhydria in the Elderly. CRC Press, Boca Raton 1993; 49-68
 - Sonnenberg A. Concordant occurrence of gastric and hypertensive disease. Gastroenterology 1988; 95: 42
 - Sozzi M, Valentini M, Figura N, et al. Atrophic gastritis and intestinal metaplasia in *Helicobacter pylori* infection: the role of *cagA* status. Am J Gastroenterol 1998; 93: 375-379
 - Starzynska T, Bromley M, Ghosh A, et al. Prognostic significance of p53 overexpression in gastric and colorectal carcinoma. Br J Cancer 1992; 66: 558-62
 - Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruits and cancer. I Epidemiology. Cancer Causes Control 1991, 2. 325-357

-
- Strobel S, Bereswill S, Balig P, et al. Identification and analysis of a new vacA genotype variant of *Helicobacter pylori* in different patient groups in Germany. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1285-9
 - Suerbaum S, Josenhans C, Labigne A. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flab flagellin genes and construction of *Helicobacter pylori* flaA- and flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J Bacteriol* 1993; 175: 3278-3288
 - Suerbaum S*, Hur C, Josenhans C, Michetti P. Pathogenesis and virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Curr Op Gastroenterol* 1999; 15 (Suppl.1): S11-S16
 - Suerbaum S, Smith JM, Bapumia K, Morelli G, Smith NH, Kuntzmann E, Dyrek I, Achtman M. Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 95: 12619-12624
 - Sugimura T, Kawachi T. Experimental stomach carcinogenesis. In Lipkin M, Good R (eds). *Gastrointestinal Tract Cancer*. New York, Plenum, 1978, 327-341
 - Suzuki M, Miura S, Suematsu M, Fukumura D, Kurose I, Suzuki H, Kai A, Kudoh Y, Oaci M, Teuchiya M. *Helicobacter pylori*-associated ammonia production enhances neutrophil-dependent gastric mucosal cell injury. *Am J Physiol* 1992; 263: G719-G725
 - Takashashi M, Kokubo T, Furukawa F, et al. Effect of high salt diet on rat gastric carcinogenesis induced by n-methyl-N'-nitrosoguanidine. *Gann* 1983; 74: 28-34

- Takeshi A, Shigeji S, Yukinao Y, Hideki M, Yoshiyuki I, Hiroyuki S, Masaru K, Tajuki K, Yoshiriro K. The role of the HLA-DQA1 gene in resistance to atrophic gastritis and gastric adenocarcinoma induced by *Helicobacter pylori* infection. *Cancer* 1998; 82: 1013-8
- Talley NJ, Stanghellini V, Heading RC, Koch KL, Malagelada JR, Tytgat GNJ. Functional gastroduodenal disorders. *Gut* 1999; 45 (SII): 37-42.
- Tatsuta M, Lisshi H, Baba M, et al. Expression of c-myc mRNA as an aid in histologic differentiation of adenoma from well differentiated adenocarcinoma in the stomach. *Cancer* 1994; 73: 1795-9
- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267:1456-62
- Thomson G. HLA disease associations: models for the study of complex human genetic disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1995; 32:183-219
- Thomson G*. HLA disease associations: models for the study of complex human genetic disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1995; 32:183-219
- Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischman RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocaine JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fuji C, Bowman C, Wattey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC: The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; 388: 539-547

-
- Tomlinson IP, Bodmer WF. The HLA system and the analysis of multifactorial genetic disease. *Trends Genet* 1995; 11:493-498.
 - Torrado J, Santiesteban A, Ruiz-Hederá J. Genetic susceptibility to gastric cancer. *Hepatogastroenterology*. 2000; 48 (42):1544-7
 - Tosis P, Filipe MI, Luzi P, Miracco C, Santopietro R, Lio R, et al. Gastric epithelial metaplasia type III cases are classified as low-grade dysplasia on the basis of morphometry. *J Pathol* 1993; 169: 73-78
 - Tsioulas GJ, Triadafilopoulos G, Goldin E, Rizos S, Papavassiliou ED, Rigas B. Expression of HLA class I antigens in sporadic adenomas and histologically normal mucosa of the colon. *Cancer Res* 1993; 53:2374-2378
 - Tsujii M, Kawano S, Tsujii S, et al. Ammonia, a possible promoter in *Helicobacter pylori*-related gastric carcinogenesis. *Cancer Lett* 1992; 65: 15-18
 - Tummuru MK, Cover TL, Blaser MJ. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of a linkage to cytotoxin production. *Infect Immun* 1993; 61: 1799-1809
 - Tummuru MK*, Cover TL, Blaser MJ. Cloning and expression of a high molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: Evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun* 1993; 61. 1799-1809
 - Tummuru MKR, Sharma SA, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* picB, a homologue of the *Bordetella pertussis* toxin secretion protein is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol* 1995; 18: 867-876

-
- Uemura N, Mukai T, Okamoto S, et al. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on subsequent development of cancer after endoscopic resection of early gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6: 639-42
 - Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, et al. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001; 345: 784-789
 - Unger Z, Molnar B, Pronai L, Szalecky E, Zagoni T, Tulassay Z. Mutant p53 expression and apoptotic activity of *Helicobacter pylori* positive and negative gastritis in correlation with the presence of intestinal metaplasia. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15 (4): 389-93
 - Uno H, Kawano K, Matsuoka H, Tsuda K. HLA and adult T cell leukaemia: HLA-linked genes controlling susceptibility to human T cell leukaemia virus type I. *Clin Exp Immunol* 1988, 71: 211-216
 - Valnes K, Brandtzaeg P. Subclass distribution of mucosal IgG producing cells in gastritis. *Gut* 1989; 30: 322-326
 - Van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Pena AS, Midolo P, Ng EK, Atherton JC, Blaser MJ, Quint W. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* vacA. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2597-2603
 - van Doorn LJ*, Figueiredo C, Sanna R, et al. Clinical relevance of the cagA, VacA, and iceA status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1998; 115: 58-66
 - van Doorn LJ**, Figueiredo C, Rossau R, et al. Typing of *Helicobacter pylori* vacA gene and detection of cagA gene by PCR and reverse hybridization. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1271-1275

-
- Van Doorn LJ, Figueiredo C, Megraud F, Pena AS, Midolo P, Queiroz DM, Carneiro F, Vanderborcht B, Pegado MG, Sanna R, Boer W, Scneeberger P, Correa P, Ng EK, Atherton JC, Blaser MJ, Quint W. Geographic distribution of vacA allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1999; 116: 823-830.
 - Vaux DI, Cory S, Adams JM, et al. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988; 335: 440-2
 - Vollmers HP, Dammrich J, Hensel F, Ribbert H, Meyer-Bahlburg A, Utlken.-Gaul T, von Koorf M, Muller-Hermelink HK. Differential expression of apoptosis receptors on diffuse and intestinal type stomach carcinoma. *Cancer* 1997; 79 (3): 433-40
 - Wadström T, Hirno S, Boren T. Biochemical aspects of *Helicobacter pylori* colonization of the human gastric mucosa. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; 10 (suppl 1): 17-27
 - Wakabayashi K, Naggao K, Ochiai M et al. A mutagen precursor in Chinese cabbage: indole- e- acetonitrite, which becomes mutagenic on nitrite treatment. *Mutat Res* 1985; 143: 17-21
 - Wang CC, Wu MS, Wang HH, et al. *Helicobacter pylori* infection and age on the development of intestinal metaplasia: A multiple logistic regression analysis. *Hepatogastroenterology* 1998; 45: 2234-7
 - Wank, R, Thomssen C. High risk of squamous cell carcinoma of cervix form women with HLA-DQw3. *Nature* 1991; 352:723-725

-
- Warburton VJ, Everett S, Mapstone NP, Axon ATR, Hawkey P, Dixon MF. Clinical and histological associations of cagA and vacA genotypes in *Helicobacter pylori* gastritis. *J Clin pathol* 1998; 51: 55-61
 - Webb PM, Forman D. *Helicobacter pylori* as a risk factor for cancer. *Baillière's Clinical Gastroenterology* 1995; 9 (3): 563-582
 - Weel JFL, van der Hulst RWM, Gerrits Y, et al. The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori*-related diseases. *J Infect Dis* 1996; 173: 1171-5
 - Whelan SL, Parkin DM, Masuyer E. *Trends in Cancer Incidence and Mortality*. Lyon. France, IARC Scientific Publications, 1993
 - Whitehead R, Truelove S, Gear MWL. The histological diagnosis of chronic gastritis in fiberoptic gastroscope biopsy specimens. *J Clin Pathol* 1972; 25: 1-11
 - Whitehead R. Gastritis. En: Whitehead, R (Ed). *Mucosal biopsy of the gastrointestinal tract*. 3 Ed. Saunders Co., Philadelphia 1985, Vol.3: 41-58
 - Wingo PA, Tong T, Bolden S, et al. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1996; 65: 5
 - Worku M, Sidebotham RL, Wren BW, Karim QN. Chemotaxis of *Helicobacter pylori* in presence of human plasma. *Gut* 1997; 41: A25
 - Wynder EL, Reddy BS, McCoy GD, Eisburger JH, Williams GM. Diet and gastrointestinal cancer. *Clin Gastroenterol* 1976; 5:463-482
 - Xia HH, Talley NJ. Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: implications in gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96 (1): 16-26

-
- Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Kashima K, Imanishi J. Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by cagA positive *Helicobacter pylori* strains. *Gut* 1997; 41: 442-451
 - Yamaoka Y, Kodama T, Graham DY, Kashima K. Search for putative virulence factors of *Helicobacter pylori*. The low- molecular- weight (33-35K) antigen. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 1482-1487
 - Yamaoka Y, El-Zimaity HMT, Gutierrez O, Figura N, Kim JK, Kodama T, Kashima K, Graham D. Relationship between the cagA3' repeat region of *Helicobacter pylori*, gastric histology, and susceptibility to low PH. *Gastroenterology* 1999, 117: 342-349
 - Yang D, Tannenbaum SR, Buch C, Lee GM. 4-chloro-6-methoxyindole is the precursor of a potent mutagen that forms during nitrosation of fava beans. *Carcinogenesis* 1984; 5: 1219-24
 - Yoshikate S, Okada M, Kimura A, et al. Contribution of major histocompatibility complex genes to susceptibility and resistance in *Helicobacter pylori* related diseases. *Eur j Gastroenterol* 1999; 11: 875-880
 - Yoshiyama H, Nakamura H, Mizote T, Nakazawa T. Chemotaxis of *Helicobacter pylori* in a viscous environment is urease dependent. *Gut* 1997; 41: A23
 - You WC, Zhang L, Gail MH, et al. Gastric dysplasia and gastric cancer: *Helicobacter pylori*, serum vitamin C, and other risk factors. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1607-12

- Zakeri Z, Bursch W, Termiswood M, et al. Cell death. Programmed apoptosis, necrosis or other. *Cell Death Differ* 1995; 2: 87-96
- Zavros Y, Rieder G, Ferguson A, et al. Gastritis and hipergastrinemia due to *Acinetobacter Iwoffi* in mice. *Infect Immun* 2002; 345: 784-9.