

D
cc
\$2500.7

UNIVERSIDAD DE MONTERREY
DIVISION DE CIENCIAS DE LA SALUD
HOSPITAL CHRISTUS MUGUERZA MONTERREY
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLOGICA



040.61
P972e
2004

EXPRESION DE LA PROTEINA P53 EN GASTRITIS CRONICA
ASOCIADA A HELICOBACTER PYLORI

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN
ANATOMIA PATOLOGICA

DRA. ANA CECILIA PRUNEDA SANTOY

ASESOR

DR. RAUL GARZA GARZA

SAN PEDRO GARZA GARCIA, N. L. ENERO DE 2004

3.3 Métodos	24
3.3.1 Criterios de inclusión y exclusión de las biopsias.	24
3.3.1.1 Criterios de inclusión.	24
3.3.1.1 Criterios de exclusión.	24
3.3.2 Análisis histopatológico	25
3.3.2.1 Tinción de hematoxilina y eosina.	25
3.3.3 Análisis de inmunohistoquímica	26
3.3.3.1 Preparación de portaobjetos	26
3.3.3.2 Procedimiento de inmunohistoquímica	26
3.3.3.3 Interpretación de la inmunohistoquímica	28
IV.-RESULTADOS	29
V.-CONCLUSIONES	34
VI.-BIBLIOGRAFÍA	35
VII.-ANEXO	51

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Características estructurales de HP	1
Figura 2.	Factores de riesgo para el CG	9
Figura 3.	Progresión hacia el CG	10
Figura 4.	Inducción de daño al DNA por HP	13
Figura 5.	Características de p53	16
Figura 6.	Positividad para p53	18
Figura 7.	Interpretación por inmunohistoquímica para p53	28
Figura 8.	Grafica de información general (resultados)	29
Figura 9.	Grafica de los tipos histológicos observados (resultados)	30
Figura 10.	Microfotografías de los tipos histológicos	31
Figura 11.	Grafica de la inmunohistoquímica (resultados)	32
Figura 12.	Microfotografías de la inmunohistoquímica	33

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Información general (resultados)	29
Tabla 2.	Tipos histológicos (resultados)	30
Tabla 3.	Inmunohistoquímica (resultados)	32

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
p	Brazo corto de un cromosoma
q	Brazo largo de un cromosoma
CG	Cáncer gástrico
°C	Grados centígrados
g	Gramos
HP	Helicobacter pylori
h	Hora
hrs	Horas
HchMM	Hospital Christus Muguerza Monterrey
IL	Interleucina
IHQ	Inmunohistoquímica
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µm	Micrómetro
mg	Miligramos
ml	Mililitros
min	Minutos
ng	Nanogramos

RESUMEN

Ana Cecilia Pruneda Santoy
Fecha de graduación: Febrero 2004
Universidad de Monterrey

Título del Estudio: “EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA P53 EN GASTRITIS CRÓNICA ASOCIADA A *HELICOBACTER PYLORI*”

Número de páginas: 51

Antecedentes: *Helicobacter pylori* (HP) es considerado como un carcinógeno humano del grupo I, sin embargo el mecanismo exacto por el cual induce cáncer gástrico no está claro, algunos estudios mencionan que induce mutación del gen supresor p53; pudiendo sugerir el principio de una de las múltiples etapas de la carcinogénesis, esta posibilidad se explorará en la presente investigación.

Material y Métodos: En este trabajo se analizaron 60 muestras obtenidas por biopsia endoscópica con diagnóstico histopatológico de gastritis crónica difusa, folicular, con actividad, hiperplasia foveolar y regeneración epitelial sin evidencia de lesiones preneoplásicas o neoplásicas en las cuales se realizó tinción de DiffQuik para HP formando dos grupos, HP positivo (N=30) y HP negativo (N=30) a ambos grupos se les realizó tinción de inmunohistoquímica para p53.

Resultados: En el grupo HP positivo se observó una expresión para p53 del 33.3% y en el grupo HP negativo no se observó expresión para p53 (0%).

Conclusiones: En este estudio se observó un incremento en la frecuencia de expresión de p53 en gastritis crónica asociada a infección por HP (33.3%) y además se demostró que puede existir expresión de p53 incluso antes de que se observe evidencia morfológica de lesiones preneoplásicas o neoplásicas cuando hay infección por HP.

ASESOR


Dr. Raúl Garza Garza

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 *Helicobacter pylori* y patología gastroduodenal.

1.1.1 *Helicobacter pylori* (estructura).

Helicobacter pylori (HP) es una bacteria móvil no esporulada Gram –, tiene un flagelo que forma parte de su estructura central. En la mucosa gástrica asume una forma curvilíneo, sinuosa o ligeramente en espiral. En pacientes que reciben antibióticos pierde su típica forma en espiral y toma una característica en “U”, circular o forma cocoide. La forma cocoide aparece hasta en un 82% de especímenes gástricos, es frecuentemente observada, especialmente en las muestras de duodeno.

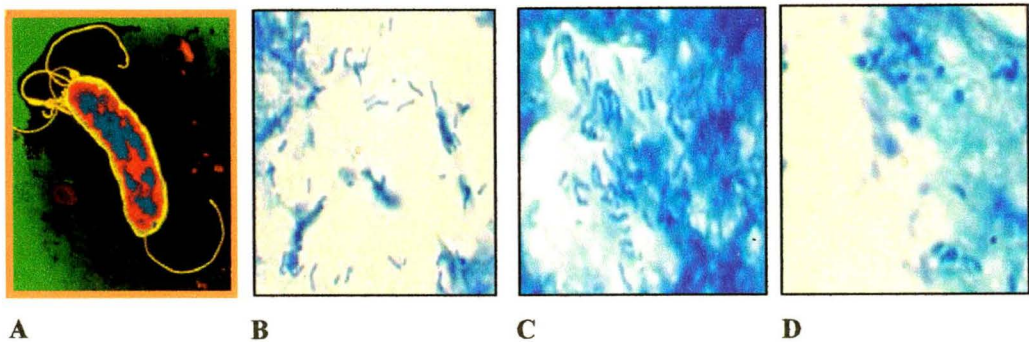


Figura 1.-Características estructurales de HP. A-Imagen que muestra la estructura de HP. B y C-Tinción de DiffQuik que muestra la forma bacilar de la bacteria. D-Forma cocoide de la bacteria.

Aunque las formas cocoides ocurren *in vitro* bajo condiciones de escasa nutrición y exposición de antibióticos, algunos investigadores consideran que son formas distintas siendo un tipo no degradativo de HP con distinta capacidad antihigiénica. Esta forma representa una adaptación a medios hostiles estos parecen ser más resistentes y tienen la habilidad de sobrevivir fuera del organismo teniendo como huésped las heces humanas y el agua para beber. Adicionalmente el debate es aun mayor de que la forma cocoide de HP tiene un importante rol en la transmisión y en la recaída posterior al tratamiento. Histológicamente aparece como grupos de estructuras basofílicas en forma de puntos.

1.1.2 Factores de virulencia

HP coloniza principalmente tres sitios: a)- La capa de moco b)- La superficie de las células epiteliales c)- y los espacios intercelulares. Los organismos que permanecen libremente en la mucosa causan menos daño epitelial que los que se encuentran entre las células o hasta ocasionalmente dentro de las células. El movimiento en forma de espiral y la producción de varias toxinas juegan un papel importante en la patogénesis de la gastritis y úlcera gástrica. HP habita normalmente en la capa mucosa y en la superficie luminal de las células epiteliales gástricas y no se introduce a la célula. La superficie de la bacteria reconoce a las proteínas de la superficie epitelial facilitando la adhesión. HP puede encontrarse en o cerca de las uniones intercelulares.

La pared celular bacteriana permanece en yuxtaposición con la membrana celular de la célula epitelial, formándose uniones muy estrechas entre estas dos.

HP induce degeneración de las microvellosidades, pérdida de los gránulos intracitoplasmáticos. Una vez que las uniones intercelulares se alteran, HP penetra entre los complejos de unión, se desplaza entre las células foveolares. Los espacios intercelulares ensanchados y los polimorfonucleares que fagocitan el HP infiltran la lamina propia causando una respuesta inflamatoria intensa. Generalmente HP no invade la lamina propia. Altera la liberación de mucina intracelular hacia la luz gástrica. Las proteasas producidas por la bacteria, causan gran daño en la capa protectora gástrica al digerir la mucina gástrica.

La ureasa producida por HP tiene varias funciones: a)- La protege del medio ácido creando una microatmósfera alcalina. b)- Actúa como una citotoxina epitelial c)- Rompe las estrechas uniones intercelulares de manera que permite que las células permanezcan viables, permitiendo que el contenido ácido fluya entre las células. HP promueve la adhesión de neutrófilos a las células endoteliales.

Hay varios tipos de HP con diferente virulencia, los que son altamente virulentos poseen el gen A que produce dos proteínas citotóxicas que se conocen como Cag A y Vac A. Aproximadamente el 60% de los HP aislados poseen el gen CagA y expresan la toxina.

La toxina CagA esta correlacionado con un numero de características que sugieren una severa forma de infección que incluyen:

- *Una mayor cantidad de HP.
- *Un denso infiltrado inflamatorio agudo y crónico.
- *Una mayor lesión del epitelio.
- *Presente en la capa que esta asociada a ulcera pépticas (UP)
- *Un alto riesgo de desarrollar atrofia glandular, metaplasia intestinal y adencocarcinoma gástrico.

El efecto dañino de la proteína CagA en mayor parte es mediado por la habilidad de regular la síntesis epitelial de interleucina-8 (IL-8), la cuál promueve la inflamación aguda movilizandó los neutrofilos.

1.1.3 Relación de HP con enfermedades gástricas.

En 1983, Warren y Marshella propusieron la posible asociación de HP con la enfermedad ulceropeptica y CG. En febrero de 1994, la conferencia del instituto nacional para el desarrollo de la salud concluye que la infección por HP representa la más importante causa de enfermedad ulceropéptica, y se documento que pacientes con UP asociada con infección por HP mejoran al recibir terapia antimicrobial y que la desaparición de la ulcera no sucede a menos que la infección por HP no se cure.

HP juega un papel importante en la génesis de múltiples enfermedades gástricas incluyendo la gastritis aguda y crónica, gastritis crónica activa, gastritis folicular, úlcera gástrica y duodenales, adenocarcinoma gástrico y linfoma gástrico.

Inmediatamente después de la infección HP causa una gastritis aguda caracterizada por infiltración por neutrofilos y cambios degenerativos del epitelio superficial y foveolar.

HP causa una persistente infección en la mayoría de los casos. La fase aguda dura de 1 a 4 semanas y es remplazada gradualmente por un infiltrado inflamatorio mononuclear en la lamina propia. La gastritis activa se refiere a la presencia de neutrofilos mezclados con células mononucleares en la mucosa gástrica. La gastritis crónica activa ocurre en la mayoría de los individuos infectados y consiste en degeneración de la superficie epitelial, infiltración persistente de neutrofilos en el epitelio y lamina propia con una infiltración mononuclear (linfocitos y células plásticas) en la lamina propia.

Los folículos linfoides hiperplásicos están en más del 80% y son muy sugestivo de infección por HP. Generalmente la gastritis es más importante en el cuerpo y en el antro con la siguiente distribución:

*Antro y cuerpo 80%.

*Antro 8%.

*Cuerpo 10%.

La infección de larga evolución resulta en una gastritis crónica, separada en distintas entidades clínicamente relevantes que son:

*Pangastritis no atrófica.- Ocurre en la mayoría de las infecciones por HP con una predisposición a enfermedad acidopéptica o gastritis atrófica. La inflamación crónica en la gastritis crónica activa es más importante en el antro predisponiendo a hiperacidez y ulcera duodenal.

*Pangastritis atrófica multifocal y la gastritis atrófica de predominio en el cuerpo, son el resultado de una larga evolución de la infección por HP y es caracterizada por atrofia glandular, metaplasia intestinal y una escasa inflamación dispersa.

La gastritis atrófica con la presencia de metaplasia intestinal están asociadas con un riesgo incrementado de adenocarcinoma gástrico.

Las características de la bacteria y los factores del huésped parecen tener influencia en el tipo de enfermedad gastroduodenal que se genera.

1.1.4 Evaluación histopatológica de la infección por HP.

La endoscopia esofagogastroduodenal permite visualizar la imagen macroscópica de la mucosa con la localización de lesiones ulceradas, nodulares así como lesiones de aspecto maligno. La infección por HP es en parches lo cual resulta de una necesidad de tomar múltiples biopsias para el diagnóstico. La toma de dos biopsias de antro y cuerpo respectivamente con un total de cuatro se obtiene una sensibilidad y especificidad de al menos del 95% para el diagnóstico de HP.

La variable distribución del HP en el estomago y la disminución observada de su crecimiento en el tratamiento con inhibidores de la bomba de protones implica tener que obtener biopsias como mínimo un número de cuatro y que sean de zonas distintas de la mucosa gástrica para tener un óptimo diagnóstico de la infección por HP.

Aunque es frecuentemente posible en la práctica común la identificación de HP en las preparaciones de rutina con hematoxilina y eosina, en casos de que se dificulte su observación se aconseja realizar tinciones como el Giemsa, DiffQuik, Warthin-Starry e incluso inmunohistoquímica.

ANTECEDENTES

1.2.1 HP y Carcinogénesis gástrica.

En junio de 1994 la Agencia Internacional para la investigación del cáncer de la organización mundial de la salud clasificó al HP como un carcinógeno humano del grupo I. En el grupo I están los agentes que se consideran como carcinógenos en humanos. Esta categoría es usada cuando se encuentra suficiente evidencia de carcinogénesis en humanos y hay suficiente evidencia de carcinogénesis en animales de experimentación además de existir una fuerte evidencia de que el agente actúa a través de un mecanismo relevante de oncogénesis en humanos expuestos.

La carcinogénesis gástrica es un proceso multifactorial y de múltiples etapas.

Los factores de riesgo para el CG son divididos en extrínsecos e intrínsecos. Los factores intrínsecos son por ejemplo, la enfermedad gástrica crónica, metaplasia intestinal el grado de atrofia, historia familiar, edad avanzada y sexo masculino. Los factores extrínsecos incluyen el tabaquismo, el consumo de alcohol, el medio ambiente consumo de alimentos ahumados.

Numerosos estudios han demostrado que pacientes con infección por HP tiene un riesgo de hasta seis veces más de desarrollar CG cuando se les compara con sujetos sanos.

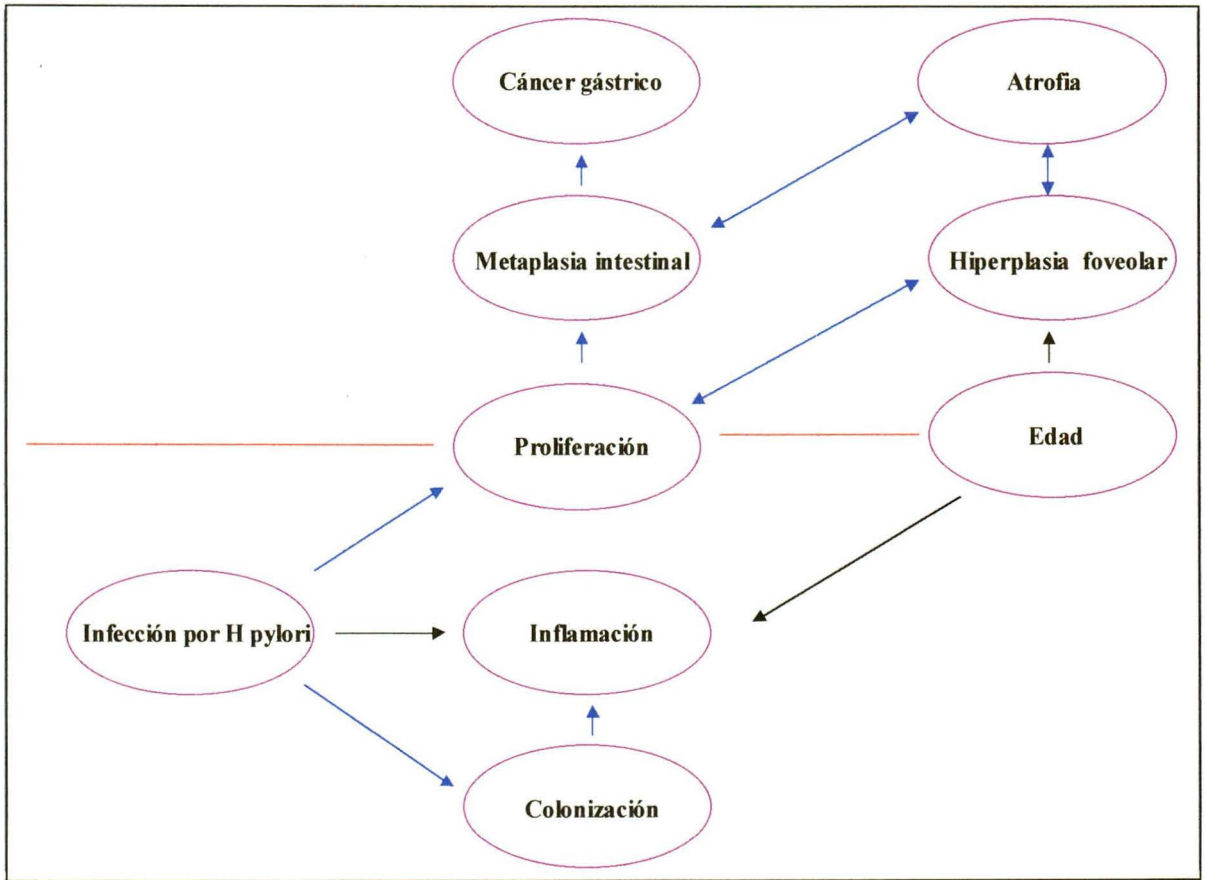


Figura 2.-Factores de riesgo para el CG. Representación esquemática del resultado final de un modelo estadístico de la interacción entre los factores de riesgo para el cáncer gástrico.

El esquema anterior es el resultado final de un modelo estadístico que relaciona los cambios provocados por HP en la mucosa gástrica y con el posterior desarrollo de CG. La metaplasia intestinal es la variable que por si sola tiene una directa interacción con el cáncer gástrico de tipo intestinal, la hiperplasia foveolar y la atrofia glandular, interactúan con el desarrollo de metaplasia intestinal y de proliferación celular.

Aunque esta bien claro que la infección por HP juega un rol significativo como causante de CG, el mecanismo exacto involucrado en la patogénesis no está claro.

Una teoría de la secuencia de eventos para el desarrollo de cáncer de tipo intestinal ha sido propuesta: gastritis crónica superficial que evoluciona a gastritis atrófica, metaplasia intestinal, displasia y CG del tipo intestinal.

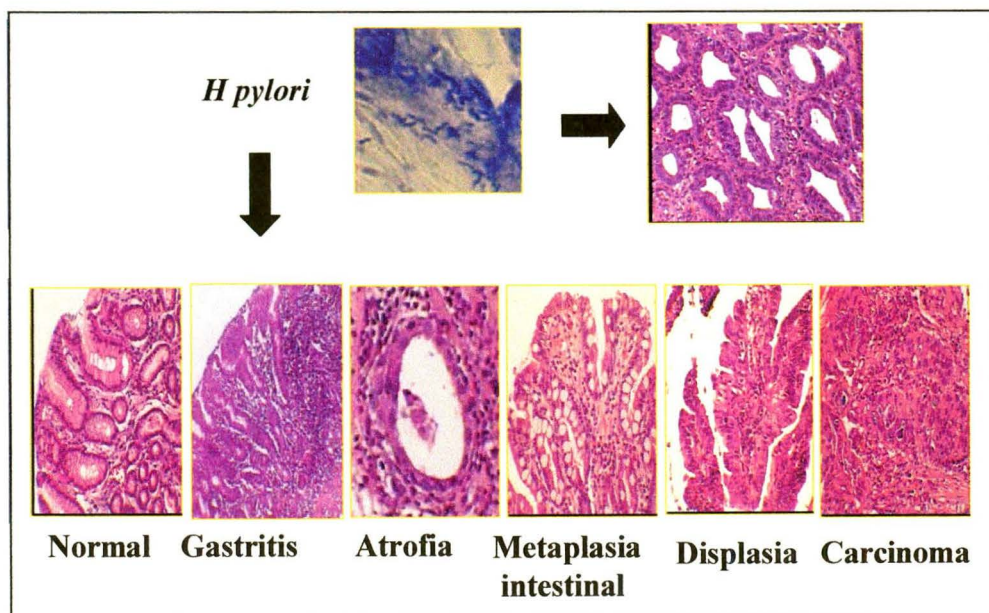


Figura 3.-Progresión hacia el CG. Se muestran los cambios histopatológicos que suceden desde la mucosa normal hasta el cáncer gástrico.

La mucosa gástrica se encuentra en constante estado de renovación el cual se caracteriza por presentar un equilibrio entre la proliferación celular y apoptosis.

Estudios han demostrado que las células apopticas se localizan en la superficie epitelial y forman lo que se llama la zona apoptica, las células proliferativas se encuentran en la región del cuello glandular que forman la zona de tasa de proliferación. Esta distribución es muestra de la maduración gradual de las células desde la zona de proliferación hasta su muerte en la superficie epitelial. Pacientes infectados con cepas altamente virulentas de HP muestran una alta tasa de proliferación celular y un bajo grado de apoptosis en la mucosa gástrica afectada.

Durante la infección por HP se estimula la producción de IL-1, IL-6, IL-8 y factor de necrosis tumoral alfa que atrae neutrofilos y células mononucleares inflamatorias que causan daño a la mucosa.

Los posibles mecanismos por los cuales la infección por HP aumenta el riesgo de cáncer son:

- a)- Productos metabólicos del organismo que pudieran transformar directamente la mucosa o predisponiendo a la mucosa a una transformación por mutágenos endo o exógenos.
- b)- Aumento de la tasa de proliferación celular que bajo estas condiciones, la oportunidad de mutación del DNA se incrementa y el tiempo de reparación se reduce
- c)- Productos que se producen durante la inflamación como radicales libres derivados del oxígeno, que inducen un daño oxidativo al DNA con la posterior mutación.

Aunque la infección por HP se asocia con riesgo de CG es poco probable que el organismo por si solo sea capaz de inducir cáncer gástrico por las siguientes razones. a)- Las tasas de infección exceden a las tasas de CG hasta 10 veces b)- Algunas poblaciones que tienen casi infección universal para HP muestran bajas tasas de cáncer gástrico o de las lesiones precursoras. Las variaciones geográficas en le riesgo de cáncer gástrico entre poblaciones con altas tasas de infección pueden derivar en parte por la cepa de HP que es más prevalente en diferentes países. Un 60% de todas las sepa tienen un gen (CagA) que induce más inflamación que otras sepan. Por lo anterior HP podría ser considerado como un detonante por medio de las alteraciones en la cinética celular sin ninguna influencia directa en el material genético.

La bacteria, junto con otros factores ambientales y la susceptibilidad genética del individuo, determinan el riesgo final para el desarrollo de CG considerando que del 1-2% de sujetos que muestran infección por HP se estima que desarrollaran cáncer gástrico y que HP es considerado la causa del 75% de los casos de CG.

Un análisis reciente ha demostrado que altos niveles de anticuerpos séricos contra las especies CagA se asocian con un aumento de riesgo de cáncer gástrico cuando fueron comparados con controles no infectados y personas con HP CagA negativo.

Se postula que el daño al DNA se refleja en rearrreglos cromosómicos, deleciones, amplificaciones o mutaciones puntuales de genes, que pueden activar oncogenes o inactivar genes supresores de tumor. Para que esto último ocurra se requiere de múltiples eventos genéticos (10 a 20), para que se inicie un desajuste en el crecimiento celular que conlleve posteriormente a la malignidad.

Estos eventos pueden durar varias décadas, lo que se conoce como período de latencia, el cual abarca desde el tiempo de exposición inicial hasta el desarrollo clínico de la neoplasia. Hay datos que sugieren que la infección por HP induce la mutación del gen supresor p53 que pudiera ser el principio del proceso de la carcinogénesis gástrica.

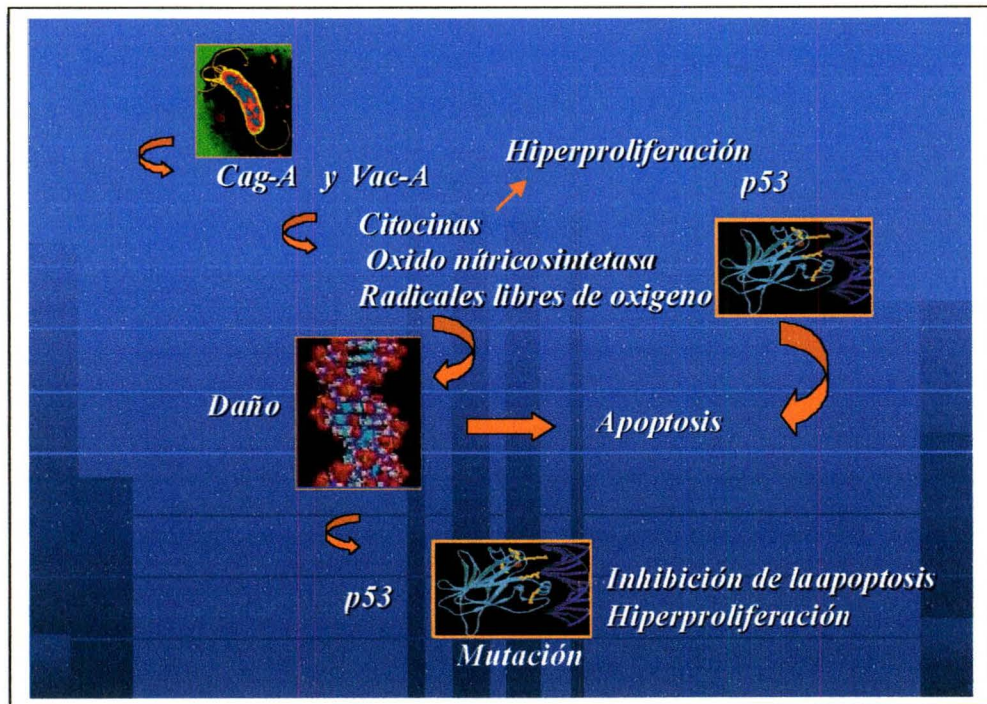


Figura 4. Inducción de daño al DNA por HP. En este esquema se muestra una teoría del mecanismo por medio del cual HP induce alteración del DNA.

Se ha documentado que el daño al DNA no es de manera directa sino que es por medio de las proteínas citotóxicas producidas por algunas cepas con alta virulencia las cuales inducen la síntesis de citocinas, activan algunas enzimas como la óxido nítrico sintetasa así como la producción de radicales libres de oxígeno que inducen un estado de inestabilidad genómica manifestado por mutación del gen supresor de tumor p53, resultando de esto la producción de una proteína que es incapaz de actuar induciendo apoptosis celular por lo cual se perpetúa el estado de hiperproliferación con células inmortales con un DNA dañado.

1.2.2 Gen supresor de tumor p53.

Los genes supresores de tumor proporcionan señales que inhiben la proliferación celular, principalmente cuando ocurre daño al DNA. Si el daño es muy extenso, estos genes inducen apoptosis. Cuando ocurre una inactivación en ambos alelos del gen (mecanismo recesivo), se promueve la transformación maligna

El gen supresor p53 es uno de los puntos clave en la investigación actual en el cáncer, de ahí que muchos estudios se han enfocado a éste y su implicación en relación a la infección con HP. p53 es conocido como el maestro guardián del genoma y se declaró molécula del año en 1993 por la revista Science.

Su estructura molecular fue conocida en 1985 cuando McBride y Benchimol asignaron el locus del gen al brazo corto del cromosoma 17 en la banda 13. El gen tiene 11 exones y se han identificado dos promotores de transcripción, uno localizado 100 a 200 pb antes del primer exón (no codificante) y el segundo es un promotor muy fuerte localizado en el primer intrón. La proteína que codifica es llamada con el mismo nombre y contiene 393 aminoácidos. Su forma tridimensional es parecida a un "sandwich". Presenta tres dominios principales, siendo el segundo el de unión a la secuencia específica del DNA donde suceden cerca del 40% de las mutaciones de sentido erróneo (principalmente en los aminoácidos 175, 248 y 273).

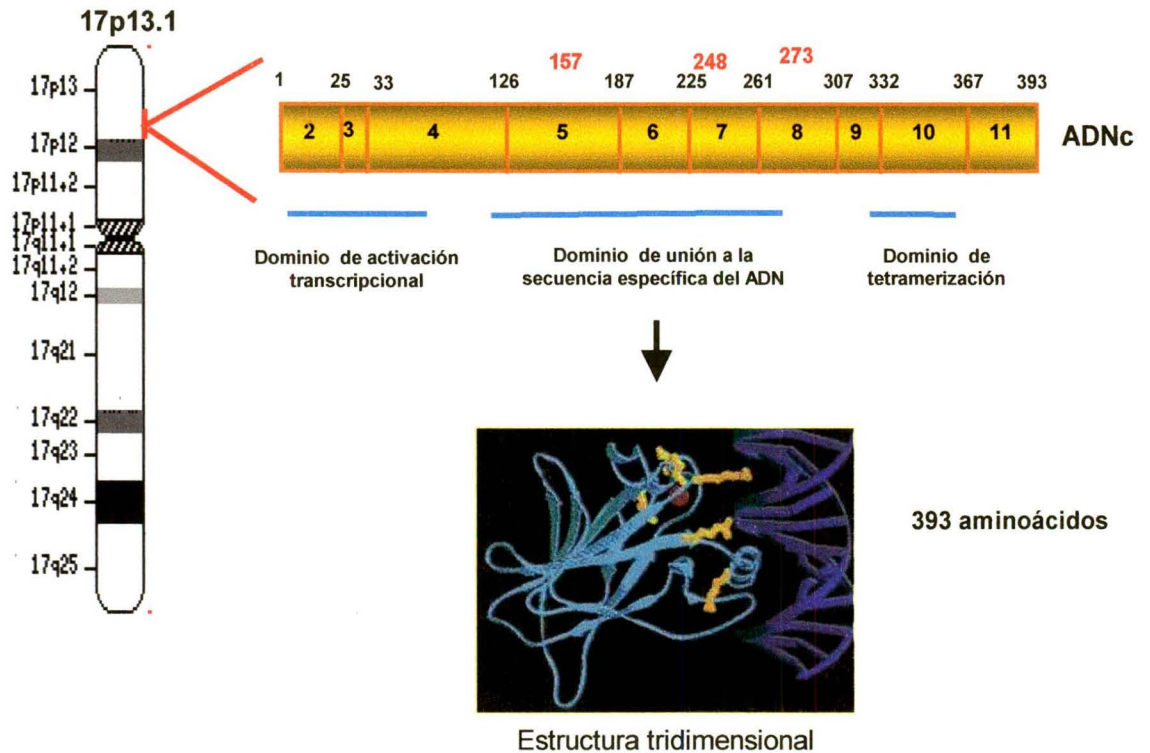


Figura 5. Características de p53. Gen localizado en el cromosoma 17p13.1. Tiene 11 exones (de los cuales el primero no es codificante). La cadena polipeptídica se divide en cuatro regiones, la primera corresponde a los aminoácidos 1-42 que forman el dominio de activación transcripcional que media interacciones proteína-proteína. La segunda corresponde a los aminoácidos 102-292 y es la región central que se une a la secuencia específica del DNA. La tercera corresponde a los aminoácidos 234-355 y es la que permite su oligomerización al DNA. La cuarta es la porción carboxiterminal que comprende los aminoácidos 367-393 y es un sitio no específico de unión a ácidos nucleicos, con una función muy importante en la regulación alostérica⁶⁵.

La expresión normal del gen p53 regula el crecimiento celular y evita la transformación neoplásica. Esta expresión se activa en respuesta a estímulos genotóxicos (incluido el daño al DNA, deficiencia de oxígeno, radiación, estrés oxidativo y depósitos alterados de ribonucleótidos). Su función se lleva a cabo por diversos mecanismos, tales como interrumpir el ciclo celular en fase G1, iniciar la reparación del DNA, propiciar la diferenciación celular e inducir la muerte celular programada, previniendo así que se perpetúe el daño celular.

En cuanto a la inactivación de p53, Volgestein y Kinzler propusieron cinco mecanismos: a) delección de uno o ambos alelos del gen que provoca reducción en la expresión de genes inhibidores del crecimiento, b) mutaciones que alteran la estructura tridimensional de las proteínas y que no permiten su oligomerización (como ocurre con frecuencia en el cáncer pulmonar y de esófago), c) mutaciones con sentido erróneo que destruyen la funcionalidad de la proteína, d) degradación lítica de la proteína, y e) amplificación del oncogen MDM2 que tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad de p53.

La mayoría de las mutaciones reportadas se encuentran dentro de los exones 5-8 y se les ha asociado con una vida media mayor de la proteína nuclear, lo que las hace permanecer más tiempo y favorece su detección por inmunohistoquímica aunque es importante destacar que para la detección de alguna alteración cuantitativa o cualitativa de p53, deben realizarse estudios conjuntos por métodos moleculares y de inmunohistoquímica. La proteína p53 expresada inmunohistoquímicamente es considerada del tipo mutada, con un característico patrón nuclear.

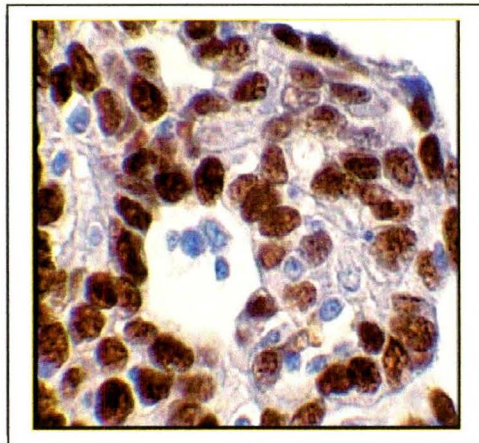


Figura 6. Positividad para p53. Tinción de inmunohistoquímica para p53 que muestra un patrón nuclear de positividad.

CAPÍTULO II

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque esta claro que HP actúa como un cofactor en la carcinogénesis gástrica, el mecanismo exacto involucrado en la patogénesis no esta claro, hay estudios que mencionan que HP induce la mutación del gen supresor p53, que pudiera sugerir al menos, el principio de una parte de las múltiples etapas de la carcinogénesis gástrica. Esta posibilidad se explorará en la presente investigación.

2.2 JUSTIFICACIÓN

Entre enero y octubre del 2003 se diagnosticaron doce casos de CG (adenocarcinomas) nuevos en el Hospital Christus Muguerza Monterrey (HChMM), solo un caso se logró identificar en etapa clínica temprana.

Se propondrá un método para la identificación temprana de pacientes con incremento de riesgo de CG.

El estudio contribuye al conocimiento general sobre la carcinogénesis en CG.

2.3 OBJETIVOS

- Analizar la expresión de p53 en gastritis crónica con o sin HP en ausencia de
 - metaplasia intestinal.
 - atrofia
 - displasia o
 - neoplasia

En material embebido en parafina obtenido por biopsia endoscópica entre marzo y mayo de 2003 en el HChMM.

CAPÍTULO III

DISEÑO, MATERIAL Y MÉTODOS

3.1Diseño

Se trata de un estudio de observación paraclínica en donde se incluyen casos previos y actuales del archivo de bloques del archivo del Departamento de Anatomía Patológica del (HChMM).

Se obtuvo material de 140 endoscopías, seleccionadas por su calidad histológica y la cantidad de anticuerpo disponible (tamaño de muestra) 60 biopsias.

-Transversal

-Comparativo

-Direccionamiento causa-efecto

-Ciego (evaluación histológica e inmunohistoquímica)

Se utilizó prueba de X^2

3.2 Material.

3.2.1 Área de trabajo.

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de Anatomía Patológica del HChMM.

3.2.2 Material Biológico.

Se colectaron especímenes de estomago (material de biopsia endoscópicas) conservados en bloques de parafina por el Departamento de Anatomía Patológica del HChMM.

3.2.3 Reactivos Químicos.

Para el análisis histopatológico se utilizó etanol, xileno, hematoxilina, eosina y ácido clorhídrico de Merck, SA de CV México, D.F.

Para la inmunohistoquímica se utilizó 3-aminopropyltrieoxy silano 98% de Sigma Chemical Company (Saint Louis, MO, EUA). El anticuerpo monoclonal (anti-p53 Clone Bp53-11), proteína bloqueadora, proteinasa K y el reactivo bloqueador de la peroxidasa fueron adquiridos de Ventana Medical Systems.

3.2.4 Material es de medición y montaje.

Las micropipetas de precisión de 2, 10, 20, 200 y 1000 μ l fueron obtenidos de Rainin Instruments (Woburn, MA, EUA). Las puntillas para las micropipetas, los tubos eppendorf de 0.5, 1.5 y 2.0 ml, los tubos cónicos de 15 y 50 ml y los guantes de látex fueron comprados a Cell Associates (Houston, TX, EUA). Los portaobjetos corning de 25 x 75 mm y cubreobjetos 24 x 50 mm fueron de Sigma Chemical Company.

3.2.5 Equipo.

En el análisis histológico se utilizó el Microtomo Microm HM505N, baño de flotación de tejido Lab-line, microscopio Zeiss, el aparato para inmunohistoquímica Ventana Automated Slide Stainer y Horno de microondas Panasonic de alta potencia.

3.2.6 Equipo computacional.

El procesador de texto utilizado fue *Microsoft Word 98* (Microsoft Corporation), Procesadores gráficos *Microsoft Power Point 98* (Microsoft Corporation).

Los programas por vía INTERNET fueron: *Entrez* (National Center for Biotechnology Information (NCBI); BLAST Network Service (Blaster); Gen Bank. El programa utilizado para comunicación en la red fue el *Microsoft Internet Explorer* versión 4.0.

3.3 Métodos.

Este estudio constó de dos etapas: una de carácter clínico que incluyó el diseño de un formulario dirigido al padecimiento en estudio (anexo1). Este formulario fue contestado mediante la revisión de registros que existen en el Departamento de Anatomía Patológica del HChMM constituyó el trabajo experimental, en el cual se utilizaron las técnicas propuestas en los objetivos específicos.

3.3.1 Criterios de inclusión y exclusión de las biopsias de mucosa gástrica.

3.3.1.1 Criterios de Inclusión.

Para los fines de este estudio se eligió un lote de muestras del Departamento de Anatomía Patológica del HChMM con diagnóstico histopatológico de gastritis crónica difusa, folicular, con actividad, regeneración epitelial e hiperplasia foveolar con o sin infección por HP.

3.3.1.2 Criterios de exclusión.

Se excluyeron aquellas muestras donde el material fue escaso o mal procesado para el análisis inmunohistoquímica. Gastritis aguda, con atrofia glandular, metaplasia intestinal, displasia, adenocarcinoma o linfoma gástrico.

3.3.2 Análisis histopatológico.

Primero se realizó la corroboración del diagnóstico histopatológico. Para lo que se extendió el corte de tejido en un baño de flotación para posteriormente montarlo en un portaobjetos de 50 x 75 mm y fijarlo con calor. Después se realizó una tinción con hematoxilina y eosina.

3.3.2.1 Tinción hematoxilina y eosina.

Cada portaobjeto con el tejido fijado, se sumergió dos veces en xileno durante 10 y 5 min respectivamente, seguido de inmersiones sucesivas en etanol al 100%, 96% y 80% por 3 min en cada uno de ellos. Después se hicieron 10 inmersiones en agua corriente, se colocaron en solución de hematoxilina por 4-8 min y luego se realizaron 10 inmersiones en agua corriente. Se sumergieron los cortes 2-4 veces en una solución de ácido clorhídrico al 0.5%, luego se siguió con 10 inmersiones en agua corriente para posteriormente seguir con 4 a 5 inmersiones en hidróxido de amonio al 0.5%, con la finalidad de neutralizar el pH. Enseguida se hicieron 10 inmersiones en agua corriente. Después de esto, los cortes se colocaron en el colorante eosina durante 30 a 45 seg. Los siguientes pasos fueron lavados sucesivos con etanol al 80%, 96% y 100% (10 inmersiones en cada uno) y finalmente se sumergieron dos veces en xileno durante 5 min cada vez. Para preservar las muestras permanentemente, se colocó una resina (bálsamo de Canadá) y se analizaron por microscopía de luz.

3.3.3 Análisis inmunohistoquímico.

De cada bloque de parafina se obtuvo un corte con un grosor de 6 μm cada uno.

3.3.3.1 Preparación de portaobjetos.

Se prepararon los portaobjetos donde serían montados los cortes. Esto consistió en sumergir los portaobjetos en silano al 2% (3-aminopropyltrioxy silano 98%) durante 2 min, para posteriormente enjuagar en agua destilada 10 veces. Después se secaron en una estufa a 37 °C por 2 hr y finalmente se agregó una gota de pegamento (Elmer's glue) a una dilución 1:10 para colocar el tejido. Se esperó a que secan y se continuó con la técnica de inmunohistoquímica.

3.3.3.2 Procedimiento de inmunohistoquímica.

La técnica de inmunohistoquímica consistió en sumergir los portaobjetos en xileno durante 5 min en dos ocasiones, seguido de un paso en etanol al 100%, al 96% y al 80%, durante 3 min en cada alcohol. Los tejidos se hidrataron en agua destilada durante 3 min y posteriormente se procedió a bloquear la peroxidasa endógena con 200 μl de H_2O_2 al 3% por un período de 5 min. Después se enjuagaron en agua corriente por 3 min. Se requirió un pretratamiento con antígeno de recuperación a 90°C y a 37°C durante 20 min, respectivamente. Los cortes con pretratamiento se enjuagaron con agua corriente durante 3 min.

En todos los casos se adicionaron 200 μ l de proteína bloqueadora y se incubaron a temperatura ambiente por 10 min e inmediatamente después se agregaron 200 μ l del anticuerpo primario (dilución 1:500 - 1:1000) y se incubaron durante 5 min a 37 °C.

Posteriormente se enjuagaron en agua corriente por 3 min, para luego agregar 200 μ l del anticuerpo secundario (LSAB2 Link HRP K675), el cual se incubó a 37 °C por 10 min. Se continuó con un lavado en agua corriente por 3 min, para luego adicionar 200 μ l de peroxidasa estreptavidina (LSAB2 streptavidin HRP K675) y se incubó a 37°C por 10 min. Se lavaron los cortes con agua corriente por 3 min y se adicionaron 200 μ l del sustrato (DAB), las laminillas se incubaron por 5 min a temperatura ambiente para que se desarrollara el color. Se enjuagaron con agua corriente por 3 min, para luego contrastar con hematoxilina por 20 seg, seguido de un enjuague con agua corriente por 3 min. Finalmente, se colocó una gota de bálsamo de Canadá y se deslizó un cubreobjetos, se esperó a que secan las preparaciones y se observaron al microscopio de luz a 5,10 y 40X para analizar la presencia del marcador empleado.

3.3.3.3 Interpretación de la prueba de inmunohistoquímica.

La interpretación propuesta por el laboratorio que proporciona el anticuerpo (Ventana Medical Systems) considera como:

Positivo: El patrón debe ser nuclear, de un color café ocre y homogéneo, la intensidad se evalúa en cruces + débil, ++moderado, +++fuerte.

Negativo: Ausencia total de positividad nuclear o presencia de tinción citoplasmática.

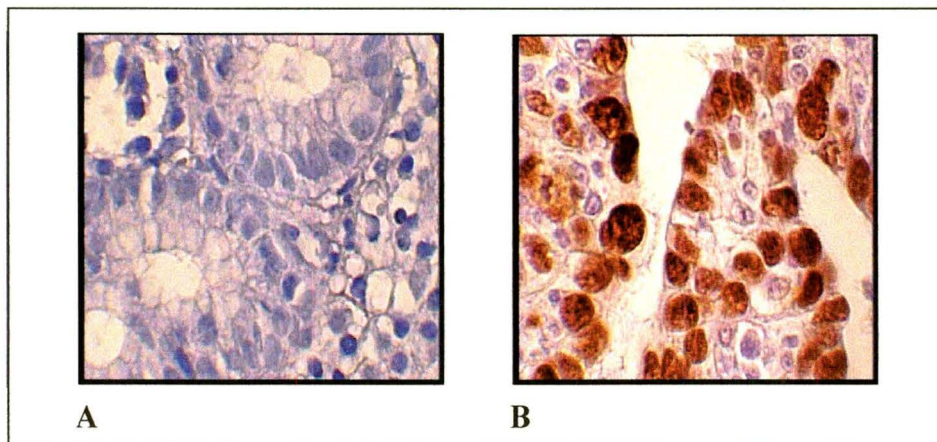


Figura 7. Interpretación inmunohistoquímica de p53. A.- Negativo B.-Positivo.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Información general	HP+		HP-	
	N	%	N	%
Total de pacientes	30	100.0	30	100.0
Hombres	15	50.0	13	43.3
Mujeres	15	50.0	17	56.7
Edad (M,DE)	40.1	9.7	52.1	13.6

Tabla 1.- Se muestra la distribución por sexo y edad de los dos grupos estudiados.

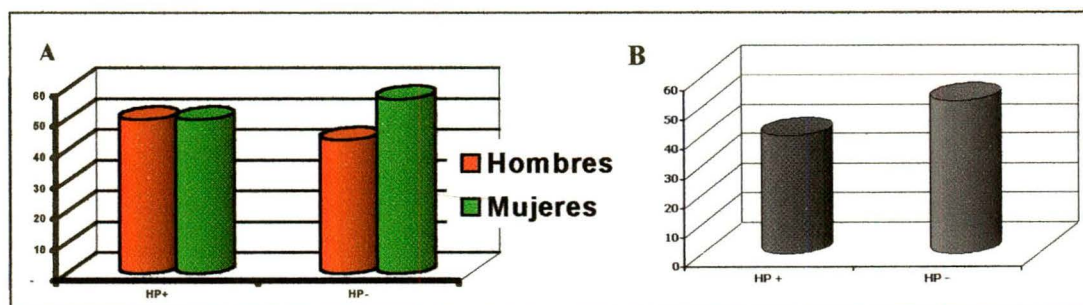


Figura 8.- Información general. A.-Grafica que muestra la distribución por sexo. B.- Grafica en donde se observa la distribución por edad en ambos grupos.

- Se evaluaron 30 muestras de tejido HP+ y 30 HP-.
- La proporción M:F se mantuvo espontáneamente entre los dos grupos.
- Los pacientes HP+ tenían edad promedio menor que los HP- (este dato no estorba en la comparación; hubiese sido un problema si fuese significativamente mayor).

Histopatología	HP+		HP-	
	N	%	N	%
Diff-Quick	30	100.0	30	100.0
GC difusa (p=0.0001)	16	53.3	29	96.7
GC folicular (p=0.0001)	14	46.7	1	3.3
GC c/actividad (p<0.0001)	27	90.0	3	10.0
GC c/regen. epit.	16	53.3	16	53.3
GC c/hiperplasia foveolar (p<0.0001)	26	86.7	9	30.0

Tabla 2.- Se muestra la distribución de él tipo histológico de gastritis crónica en ambos grupos.

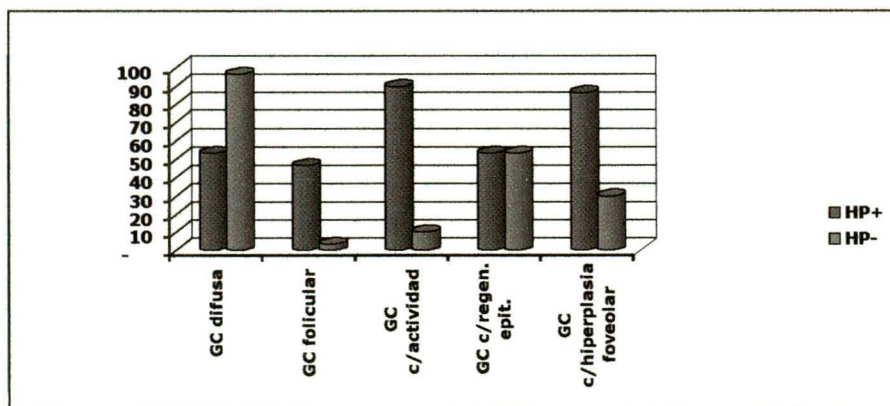


Figura 9.- Tipos histológicos observados. Grafica que muestra la distribución del tipo de gastritis crónica en ambos grupos.

- En el subgrupo HP+ se observó mayor proporción de GC folicular, GC con actividad y GC con hiperplasia foveolar. En cambio, el subgrupo HP- tuvo más GC difusa que eslo esperado según la literatura.
- Estos resultados fueron ampliamente significativos.

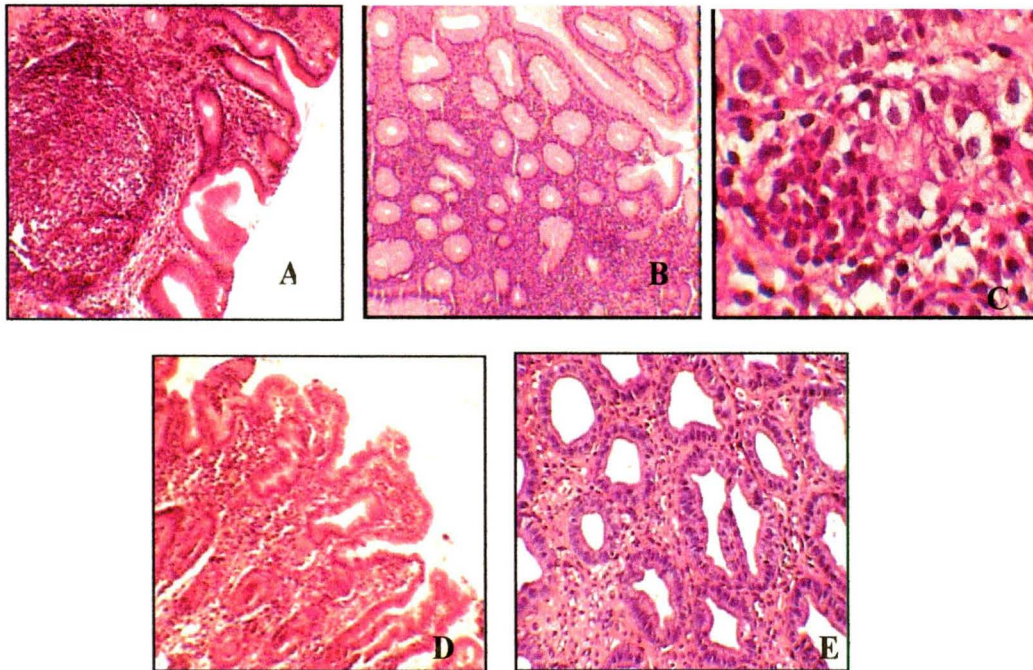


Figura 10.-Microfotografías de los tipos histológicos observados. Imágenes que muestran los tipos histológicos de gastritis crónica observados, con tinción de hematoxilina y eosina. A.-Folicular. B.-Difusa. C.-Activa. D.-Hiperplasia foveolar. E.-Regeneración epitelial.

Inmunohistoquímica	HP+		HP-	
	N	%	N	%
IHQ p53 -	20	66.7	30	100.0
IHQ p53 +	8	26.7	---	---
IHQ p53 ++	2	6.7	---	---
IHQ p53 +++	---	---	---	---

(p=0.0005)

Tabla 3.- Se muestra los resultados de la tinción de inmunohistoquímica.

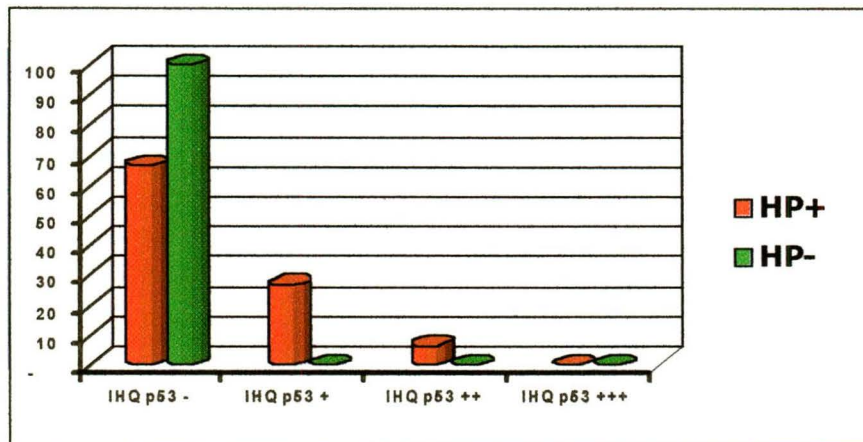


Figura 11.- Resultado de la inmunohistoquímica. Gráfica que muestra la distribución en ambos grupos de la prueba de inmunohistoquímica.

- La tercera parte del subgrupo HP+ (y ninguno del subgrupo HP-) expresó la proteína p53.
- Esta diferencia alcanzó un alto significado estadístico.

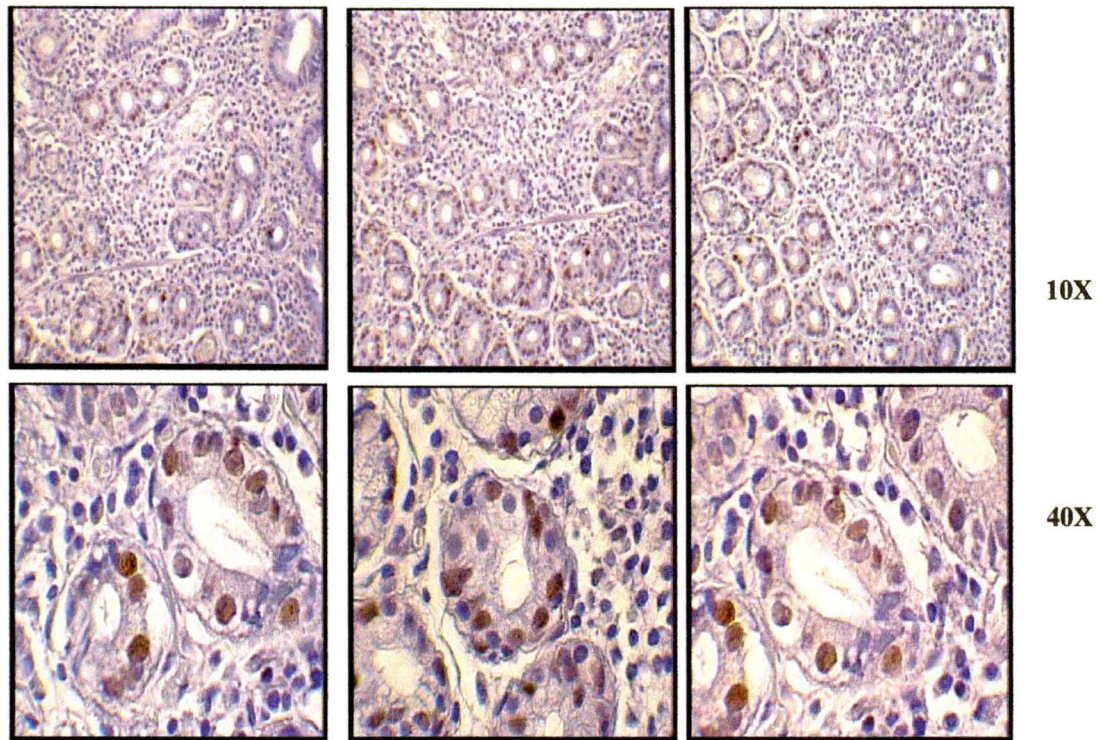


Figura 12.- Microfotografías de los resultados de la inmunohitoquímica. Se muestran la positividad para p53.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Con este trabajo se puede concluir lo siguiente:

1. Se observó un incremento en la frecuencia de sobreexpresión de p53 en gastritis crónica asociada a infección por HP (33.3%).
2. Se demostró que puede existir expresión de p53 incluso antes de que se observe evidencia morfológica de lesiones preneoplásicas o neoplásicas cuando hay infección por HP.
3. La carcinogénesis gástrica es un fenómeno multifactorial y de múltiples etapas, con los resultados obtenidos en este estudio, a pesar del tamaño de la muestra la expresión de proteína p53 de tipo mutada se traduce en que hay inestabilidad genómica y que uno de los factores que contribuye a esto pudiera ser la infección por HP.
4. Se despierta la inquietud para realizar estudios en nuestra población dirigidos a conocer el impacto que pudiera tener HP en el desarrollo de lesiones precursoras así como CG y establecer el mecanismo por el cuál induce daño al DNA.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

1. **Bail SC**, Youn HS, Chung MH. (1996). Increased oxidative DNA damage in Helicobacter pylori infected human gastric mucosa. Cancer Res. 56:1279-1282.
2. **Cahill RI**, Kilgallen C, Beattie S. (1996). Gastric epithelial cell kinetic in the progression from normal mucosa to gastric carcinoma. Gut. 8:177-181.
3. **Correa P.** (1988). Chronic gastritis: A clinico-pathologic classification. Am J Gastroenterol. 83:504.
4. **Correa P.** (1988). A human model of gastric carcinogenesis. Cancer Res 48:3554-3560.
5. **Correa P.** (1992). Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process: First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. Cancer Res. 52:6735-6740.

6. **Correa P.** (1995). Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis . Am J Surg Pathol. 19 Suppl 1:S37-S43.
7. **Danesh J.** (1999). Helicobacter pylori infection and cancer gastric: systematic review of the epidemiological studies. Aliment Pharmacol Ther 13:851-6.
8. **Dehesa M,** Dooley CP, Cohen H. (1991).High prevalence of Helicobacter pylori and histology gastritis in asymptomatic hispanis. J Clin Microbiol 29:1128-1131.
9. **Dehesa M,** Robles G, García F.(1993). Seroepidemiology of Helicobacter pylori in Mexico.Gastroenterol 104 part2:A65.
10. **Dixon MF,** Genta RM, Yardley JH, Correa P. (1996). Classification and grading of gastritis: The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. Am J Surg Pathol 20:1161-1181.
11. **Dixon MF,** Genta RM, Yardley JH, Correa P: (1996). Classification and grading of gaastritis. The updated Sydney system. Am J Surg Pathol 20:1161-1181.
12. **Dundon WG,** de Bernard M, Montecucco C. (2001). Virulence factors of helicobacter pylori . Int J Med Microbiol 29o:647-58.

13. **EI-Omar EM**, Carrington M, Chow WH. (2000). Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*. 404:398-402.
14. **EI-Zimaity HM**, Graham DY, Genta RM, Lechago J. (2000). Sustained increase in gastric antral epithelial cell proliferation despite cure of *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* Apr;95(4):930-5.
15. **Enroth H**, Kraaz W, Engstrand L, Nyren O, Rohan T. (2000). *Helicobacter pylori* strain types and risk of gastric cancer: a case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 9:981-5.
16. **Ernest PB**, Gold BD. (2000). The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol*. 54:615-40.
17. **Eslick GD**, Lim LL, Byles JE. (1999). Association of *Helicobacter pylori* infection with gastric carcinoma: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 94:2373-2379.
18. **Fan XG**, Kelleher D, Fan XJ, Xia HX, Keeling PW.(1996). *Helicobacter pylori* increases proliferation of gastric epithelial cells. *Gut* Jan;38(1):19-22.
19. **Fenoglio, C.**(1999) *Pathology Gastrointestinal* (2^a eds). Philadelphia, PA. Lippincott Williams y Wilkins.

20. **Forman D.** (1998). Helicobacter pylori infection and cancer. Br. Med Bull 54:71-78.

21. **Frenck RW Jr, Clemens J.** (2003). Helicobacter in the developing world. Microbes Infect. Jul;5(8):705-13.

22. **Fujioka T, Kodama R, Honda S, Guei-Hua G, Nishizono A, Nasu M.**(1997). Long-term sequelae of experimental gastritis with Helicobacter pylori: a 5-year follow-up study. J Clin Gastroenterol 25 Suppl 1:S8-12.

23. **Fujioka T, Murakami K, Kodama M, Kagama J, Okimoto T, Sato R.**
(2002). Helicobacter pylori and gastric carcinoma-from the view point of animal model. Keio J Med Dec;51 Suppl 2:69-73.

24. **Genta RM, Hammer HW, Graham DY.** (1993). Gastric lymphoid follicles in Helicobacter pylori infection: frequency, distribution and response to triple therapy. Human Pathol. 24:577-583.

25. **Go MF, Crowe SE.**(2000). Virulence and pathogenicity of Helicobacter pylori. Gastroenterol Clin North Am 29:649-70.

26. **Graham DY.** (2000). Helicobacter pylori infection is the primary cause of gastric cancer. J Gastroenterol. 35:90-97.

27. **Guarner J**, Mohar A, Parsonnet J, Haiperin D. (1993). The association of helicobacter pylori with gastric and preneoplastic gastric lesions in Chiapas, Mexico. *Cancer* 7:297-301.
28. **Gueneaus P**, Loiseaux-De Goer S.(2002). Helicobacter: molecular phylogeny and the origin of gastric colonization in the genus. *Infect Genet Evol.* May;1(3):215-23.
29. **Hayat M**, Arora DS, Dixon MF. (1999). Effects of Helicobacter pylori eradication on the natural history of lymphocytic gastritis. *Gut.* 45:495-498.
30. **Hernández A**, Herrera-Goepfert R, Barrios-Jacobo R, Ayala G. (1999). Factores de riesgo involucrados en la infección por Helicobacter pylori. *FEMS Microbiology Letters.* 178:55-62.
31. **Herrera R**, Goepfert C. (1999). Gastritis crónica y Helicobacter pylori en un grupo de voluntarios jóvenes asintomáticos. *Rev Inst Nat Cancerol (Mex)* 45(1):24-26.
32. **Hibi K**, Mitomi H, Koizumi W, Tanabe S, Saigenji K, Okayasu I. (1997). Enhanced cellular proliferation and p53 accumulation in gastric mucosa chronically infected with Helicobacter pylori. *Am J Clin Pathol* Jul;108(1):26-34.

33. **Honig A**, Witte F, Mirecka J, Binder C, Schauer A.(2000). Helicobacter pylori-induced hyperproliferation: relevance for gastric cancer development in connection with mutagenic factors. *Anticancer Res* May-Jun;20(3):1641-8.
34. **Hoshi T**, Sasano H, Kato K, Ohara S, Shimosegawa T, Toyota T, Nagura H.(1999). Cell damage and proliferation in human gastric mucosa infected by Helicobacter pylori a comparison before and after H pylori eradication in non-atrophic gastritis.*Hum Pathol* Dec;30(12):1412-7.
35. **Hsu PI**, Lai KH, Chien EJ, Lin CK, Lo GH, Jou HS, Cheng JS, Chan HH, Hsu JH, Ger LP, Hsu PN, Tseng HH.(2000). Impact of bacterial eradication on the cell proliferation and p53 protein accumulation in Helicobacter pylori-associated gastritis.*Anticancer Res* Mar-Apr;20(2B):1221-8.
36. **Huang JQ**, Hunt RH. (2003). The evolving epidemiology of Helicobacter pylori infection and gastric cancer. *Scand J Gastroenterol* Jul;38(7):707-11.
37. **IARC Working Group** on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Schistosomes liver flukes and Helicobacter pylori (1994). Lyon, 7-14 June. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Human. 61:1-241.

38. **Ioachim E**, Goussia A, Stefanou D, Agnatis NJ. (1997). Expression of p53 protein in gastric cancer: an immunohistochemical study with correlation to proliferative activity. *Anticancer Res* Jan-Feb;17(1A):513-7.

39. **Ishii HH**, Gobe GC, Pan W, Yoneyama J, Ebihara Y.(2002). Apoptosis and cell proliferation in the development of gastric carcinomas: associations with c-myc and p53 protein expression. *J Gastroenterol Hepatol* Sep;17(9):966-72.

40. **Ito E**, Saito K, Takizawa T, Koike M.(2002). Differential diagnosis of atypical epithelium of biopsied gastric mucosa using immunostaining of Ki-67, p53,hMLH1 and MDM2 expression. *J Exp Clin Cancer Res* Dec;21(4):527-37.

41. **Jang TJ**, Kim JR. (2000).Proliferation and apoptosis in gastric antral epithelial cell of patients infected with *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol* 35(4):265-71.

42. **Jang TJ**, Lee JI, Kim DH, Bae SH.(1997). Decreased gastric proliferation of foveolar epithelial cells after the eradication of *Helicobacter pylori*. *J Korean Med Sci* Oct;12(5):421-6.

43. **Jones NL**, Shannon PT, Cutz E, Yeger H, Sherman PM.(1997). Increase in proliferation and apoptosis of gastric epithelial cell early in the natural history of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Pathol* Dec;151(6):1695-703.

44. **Jorge O**, Cuello Carrion FD, Jorge A, Ciocca DR.(2003).Helicobacter pylori infection affects the expression of PCNA, p53, c-erbB-2 and Bcl-2 in the human gastric mucosa. Rev Esp Enferm Dig. Feb;95(2):97-104, 89-96.

45. **Kodama M**, Fujioka T, Kodama R, Takahashi K Kubota T, Murakami K, Nasu M. (1998). p53 exoression in gastric mucosa with Helicobacter pylori infection. J Gastroenterol Hepatol Feb;13(2):215-9.

46. **Konturek PC**, Bielanski W, Konturek SJ. Helicobacter pylori associated gastric pathology. J Physiol Pharmacol. 50: 695-710.

47. **Lehmann Fs**, Terracciano L, Carena I, (2002). In situ correlation of cytokine secretion and apoptosis in Helicobacter pylori-associated gastritis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 283:G481-G481-G488.

48. **Liu WZ**, Zheng X, Shi Y, Dong QJ, Xiao SD.(1998). Effect of Helicobacter pylori infection on gastric epithelial proliferation in progression from normal mucosa to gastric carcinoma. World J Gastroenterol 4(3):246-48.

49. **Lopez L**, Fernandez C, Robles G, Rascon RA, Ramirez T. (1997) . Hekicobacter pylori infection and gastric cancer in Mexico. A changes for prevention and population control. Rev Gastroenterol Mex. Jan-Mar;62(1):22-8.

50. **Marinone C**, Martinetti A, Mestriner M, Seregni E, Geuna M, Ferrari L, Strola G, Bonardi L, Fea E, Bombardieri E. (2001). p53 evaluation in gastric mucosa of patients with chronic Helicobacter pylori infection. *Anticancer Res Mar-Apr;21(2A):115-8.*
51. **Misra V**, Misra S, Dwevedi M, Singh UP, Bhargava V, Gupta SC. (2000). A topographic study of Helicobacter pylori density, distribution and associated gastritis. *J Gastroenterol Hepatol 15:737-743.*
52. **Mohar A**, Ley C, Guarner J, Herrera-Goepfert R. (2002). Alta frecuencia de lesiones precursoras de cáncer gástrico asociadas a Helicobacter pylori y respuesta al tratamiento, en Chiapas, México. *Gas Med Mex 138(5): 405-410.*
53. **Murakami K**, Fujioka T, Kodama R, Kubota T, Tokieda M, Nasu M. (1997). Helicobacter pylori infection accelerates human gastric mucosal cell proliferation. *J Gastroenterol Apr;32(2):184-8.*

54. **Nardone G**, Staibiano S, Rocco A, Mezza E, Armiento FP, Insabato L, Coppola A, Salvatore G, Lucariello A, Figura N, Rosa G, Budillon G.(1999). Effect of Helicobacter pylori infection and its eradication on cell proliferation, DNA status, and oncogene expression in patients with chronic gastritis. *Gut Jun*;44(6):789-99.
55. **NIH Consensus Development Panel on Helicobacter pylori in Peptic Ulcer Disease**. (1994).NIH Consensus Conference:Helicobacter pylori in peptic ulcer disease. *JAMA*. 272:65-69.
56. **Noguchi K**, Kato K, Moriya T, Suzuki T, Saito M, Kikuchi T Yang J, Imatani A, Sekine H, Ohara S, Toyota T, Shimosegawa T, Sasano H.(2002). Analysis of cell damage in Helicobacter pylori-associated gastritis. *Pathol Int Feb*;52(2):110-8.
57. **Nogueira C**, Figueiredo C, Carneiro F, Taviera A, Barriera R, Figueira P, Salgado C, Belo L, Peixoto A. (2001). Helicobacter pylori genotypes may determine gastric histopathology. *Am J Pathol Feb*;158(2):647-54.
58. **Nozaki K**, Shimizu N, Ikehara Y, Inoue M, Tsukamoto T, Inada K, Tanaka H, Kumagi T, Kaminishi M, Tatematsu M. (2003). Effect of early eradication on Helicobacter pylori-related gastric carcinogenesis in Mongolian gerbils. *Cancer Sci Mar*;94(3):235-9.

59. **O'Rourke JL**, Lee A. (2003). Animal models of Helicobacter pylori infection and disease. *Microbes Infect.* Jul;5(8):741-8.
60. **Pan W**, Ishii H, Ebihara Y, Gobe G.(2003). Prognostic use of growth characteristics of early gastric cancer and expression patterns of apoptotic, cell proliferation, and cell adhesion proteins. *J Surg Oncol* Feb;82(2):104-10.
61. **Parsonnet J Hansen S**, Rodriguez L. (1994). Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma. *N Engl J Med.* 330:1267-1271.
62. **Peek RM Jr**, Blaser MJ.(1997). Pathophysiology of Helicobacter pylori-induced gastritis and peptic ulcer disease. *Am J Med.* 102:200-207.
63. **Peek RM Jr**, Moss SF, Tham KT, Perez-Perez GI, Wang S Miller GG, Atherton JC, Holt PR, Blaser MJ.(1997). Helicobacter pylori cagA+ strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis. *J Natl Cancer Inst* Jun 18;89(12):863-8.
64. **Petersson F**, Borch K, Franzen LE. (2002). Gastric epithelial proliferation and p53 and p21 expression in a general population sample: relation to age, sex, and mucosal changes associated with H. Pylori infection. *Dig Dis Sci* Jul;47(7):1558-66.

65. **Piotr C**, Stanislaw J, Pitor P, Wladyslaw B, Duda A, Marlicz K, Starzynska T, Eckhart G.(2001). Cancerogenesis in Helicobacter pylori infected stomach role of growth, apoptosis and cyclooxygenases. *Med Sci Monit* 7(5):1092-1107.
66. **Polat A**, Cinel L, Dusmez D, Aydin O, Egilmez R.(2002). Expression of cell-cycle related proteins in Helicobacter pylori gastritis and association with gastric carcinoma. *Neoplasma*;49(2):95-100.
67. **Ren H**, Yi C.(1999). Role of Helicobacter pylori infection in pathogenesis of gastric adenocarcinoma. *J Tongji Med Univ* 19(2):127-30, 154.
68. **Rokkas T**, Ladas S, Liatsos C, Petridou E, Papatheodorou G, Theocharie S, Karameri A,(1999). Relationship of Helicobacter pylori CagA status to gastric cell proliferation and apoptosis. *Dig Dis Sci* 44:487-93.
69. **Rubin CE**. (1997). Are there types of Helicobacter pylori gastritis? *Gastroenterology* 112:2108-2110.
70. **Satoh K**, Kihira K, Kawata H, Tokumaru K, Kumakura Y, Ishino Y, Kawakami S Inoue K, Kojima T, Satoh Y, Mutoh H, Sugano K.(2001) p53 expression in the gastric mucosa before and after eradication of Helicobacter pylori. *Helicobacter* Mar;6(1):31-6.

71. **Sepulveda AR.** (2001). Molecular testing of Helicobacter pylori-associated chronic gastritis and premalignant gastric lesions. *J Clin Gastroenterol* 32:377-82.
72. **Sobala GM,** Crabtree JE, Dixon MF. (1991). Acute Helicobacter pylori infection: clinical feature, local and systemic immune response, gastric mucosal histology, and juice ascorbic acid concentrations. *Gut.* 32:1415-1418.
73. **Suerbaum S,** Michetti P. (2002). Helicobacter pylori infection. *N Engl J Med* 347:1175-1186.
74. **Svennerholm AM,** Quiding-Jarbrink M. (2003). Priming and expression of immune response in the gastric mucosa. *Microbes Infect* Jul;5(8):741-8.
75. **Tanaka J,** Suzuki T, Mimuro H, Sasakawa C.(2003). Structural definition on the surface of Helicobacter pylori type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol.* Jun;5(6):395-404.
76. **Testino G,** Gada D, De Iaco F, Cornaggia M.(2002). p53 and Ki-67 expression in epithelial gastric dysplasia and in gastric cancer. *Panminerva Mwd* Dec;44(4):369-71.

77. **Testino G**, Testino R, Ancarani AO. (2001). Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis. *Recenti Prog Med* Oct;92(10):573-7.
78. **Tomb JF**, White O, Kerlavage AR. (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori. *Nature*.388:539-547.
79. **Tomita T**, Jackson AM, Hida N, (2001). Expression of interleukin-18, a Th1 cytokine, in human gastric mucosa is increased in Helicobacter pylori infection. *J Infect Dis* 183:620-627.
80. **Uemura N**, Okamoto S, Yamamoto S. (2001). Helicobacter pylori infection and development of gastric cancer. *N Engl J Med* 345:784-789.
81. **Versalovic J**.(2003). Helicobacter pylori. Pathology and diagnostic strategies. *Am J Clin Pathol* 119(1):403-12.
82. **Vucelic B**, Mesihovic R, Bratovic I, Vanis N, Gribajcevic M, Selak I.(2003). Helicobacter pylori infection and chronic gastritis as extraesophageal factors in gastroesophageal reflux disease. *Med Arh.* 57(1 Suppl 1):39-44.
83. **Wabinga HR**.(2002). Comparison of immunohistochemical and modified Giemsa stains for demonstration of Helicobacter pylori infection in an African population. *Afr Health Sci.* Aug;2(2):52-5.

84. **Wang J**, Chi DS, Kalin GB, Sosinki C Miller LE, Burja I, Thomas E. (2002).
Helicobacter pylori infection and oncogene expressions in gastric carcinoma and its precursor lesions. *Dig Dis Sci Jan*;47(1):107-13.
85. **Warren JR**, Marshall BJ.(1983).Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 1:1273-1275.
86. **Welin M**, Holmgren N, Nilsson P, Enroth H. (2003). Statistical model of the interactions between Helicobacter pylori infection and gastric cancer developmet. *Helicobacter* 8(1):72-8.
87. **Wotherspoon AC**: (1997). Gastric MALT lymphoma and Helicobacter pylori. *Yale J Biol Med* 69:61-68.
88. **Wyatt JI**, Dixon MF. (1988). Chronic gastritis a pathogenetic approach. *J Pathol* 154:113.
89. **Yoshimura T**, Shimoyama T, Tanaka M, Sasaki Y, Fukuda S, Munakata A.(2000).Gastric mucosal inflammation and epithelial cell turnover are associated with gastric cancer in patients with Helicobacter pylori. infection. *J Clin Pathol Jul*;53(7):532-6.

90. **Zarilli R**, Ricci V, Romano M. (1999). Molecular response of gastric epithelial cells to Helicobacter pylori-induced cell damage. *Cell Microbiol.* 1:93-9.
91. **Zhang Z**, Yuan Y, Hua G, Ming D, Lan W, Yue-Hua G. (2001). Apoptosis, proliferation and p53 gene expression of H. Pylori associated gastric epithelial lesions. *World J Gastroenterol* Oct;7(5): 779-82.
92. **Zhou LY**, Shen ZY, Lin SR, Jin Z, Ding SG, Huang XB, Xia ZW, Liu JJ, Guo HL, William C.(2003). Changes of gastric mucosa histopathology after Helicobacter pylori eradication. *Zhonghua Nei Ke Zhi* Mar;42(3):162-4.

ANEXO

HOSPITAL CHRISTUS MUGUERZA MONTERREY

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA

Expresión de la proteína p53 en gastritis crónica asociada a
Helicobacter pylori

DATOS DEMOGRÁFICOS:

1-Nombre: _____

2-No. De registro en patología: _____

3-Edad (años cumplidos) al momento del diagnóstico: _____

4-Sexo: a) Hombre _____ b) Mujer _____

ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO:

5.-Subtipo histológico

- a)- Gastritis crónica difusa. _____
 b)- Gastritis crónica folicular. _____
 c)- Gastritis crónica con actividad _____
 d)- Gastritis crónica con regeneración epitelial _____

6.-Tinción de Diff-Quick

a)-Positivo _____ b)-Negativo _____

ESTUDIO DE INMUNOHISTOQUIMICA

7.- Análisis de p53

a) Positivo b) Negativo _____

(+) _____

(++) _____

(+++)_