

Instituto de Medicina Tropical «Pedro Kourí». Instituto Estatal de Cancerología «Dr. Arturo Beltrán Ortega», Acapulco, Guerrero, México.

Identificación molecular de *helicobacter pylori* en tejidos gástricos con neoplasias malignas embebidos en parafina

Molecular identification of *helicobacter pylori* in paraffin embedded gastric tissues with malignant neoplasm

Edmundo Dantés Escobar Habeica^I, Yaxsier de Armas Rodríguez^{II}, Nereyda Cantelar de Francisco^{III}, Virginia Capó de Paz^{IV}, Fidel Cathcart Roca^V, Marco Antonio Jiménez López^{VI}

^IUnidad Académica Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Guerrero, México. Profesor Titular. MSc. mescenmundo@ipk.sld.cu

^{II}Instituto de Medicina Tropical «Pedro Kourí», La Habana. Asistente. Investigador agregado. Dr. Ciencias de la Salud. yaxsier@ipk.sld.cu

^{III}Instituto de Medicina Tropical «Pedro Kourí», La Habana, Cuba. Profesora Titular y Consultante. Investigadora Titular. Dr.C Biológicas. nereyda@ipk.sld.cu

^{IV}Instituto de Medicina Tropical «Pedro Kourí», La Habana, Cuba. Profesora Titular y Consultante. Investigadora Titular. Dr.C Médicas. vcapo@ipk.sld.cu

^VUniversidad de Ciencias Médicas de La Habana. Profesor Auxiliar. M.Sc. en Computación Aplicada a la Medicina. rhabanera@cecam.sld.cu

^{VI}Instituto Estatal de Cancerología «Dr. Arturo Beltrán Ortega», Acapulco, Guerrero, México. Profesor Asociado. Especialista en Anatomía Patológica.

marcoajl16@gmail.com

RESUMEN

Introducción: *Helicobacter pylori* es considerado uno de los principales agentes causales de gastritis crónica, úlcera péptica y neoplasias gástricas malignas en humanos.

Objetivo: evaluar el uso de la reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de *H. pylori* y sus genotipos en tejidos gástricos con neoplasias malignas embebidos en parafina.

Material y Métodos: se estudiaron secciones de 5 bloques de parafina

procedentes de 5 pacientes mexicanos con neoplasias gástricas malignas. Se realizaron coloraciones de rutina y especiales de anatomía patológica, así como la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa para la detección del microorganismo y sus genotipos.

Resultados: la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa identificó a este agente infeccioso en todos los bloques analizados en correspondencia con su detección a través de las técnicas histológicas. Esta metodología permitió demostrar una variabilidad genética del patógeno en las muestras analizadas según los genotipos *vacA* y *cagA*.

Conclusiones: la reacción en cadena de la polimerasa podría ser un método eficaz en la identificación del *H. pylori* en tejidos gástricos con neoplasias malignas embebidos en parafina. Esta se perfila como una estrategia atractiva para realizar estudios de epidemiología molecular y permitirá establecer posibles asociaciones de genotipos/subtipos del microorganismo con variables clínicas, epidemiológicas y de manejo del paciente.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, reacción en cadena de la polimerasa, tejidos embebidos en parafina, neoplasias gástricas malignas.

ABSTRACT

Introduction: *Helicobacter pylori* is considered one of the main causal agents of chronic gastritis, peptic ulcer and gastric malignant neoplasms in humans.

Objective: to evaluate polymerase chain reaction for identification of *Helicobacter pylori* and its genotypes in paraffin embedded gastric tissues with malignant neoplasms.

Material and Methods: sections of five paraffin blocks from five patients with gastric malignant neoplasms were studied. They were analyzed through routine and special stains of pathological anatomy, as well as the polymerase chain reaction technic for microorganism and genotypes detection.

Results: the infectious agent was identified in all of the analyzed blocks through the polymerase chain reaction technic in correspondence with its detection through histologic techniques. This methodology showed a genetic variability of the pathogen in the analyzed samples in respect to *vacA* and *cagA* genotypes.

Conclusions: the polymerase chain reaction could be an efficacious method for the identification of *H. pylori* in paraffin embedded gastric tissues with malignant neoplasms. It is projected as an attractive strategy for performing studies of molecular epidemiology and the establishment of possible associations between genotypes/subtypes of the microorganism and clinic or epidemiologic variables, and patient handling.

Key words: *Helicobacter pylori*, polymerase chain reaction, paraffin embedded tissues, gastric malignant neoplasms.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es considerado uno de los principales patógenos causales de gastritis crónica en humanos. La infección persistente por este patógeno podría ser un factor importante en la patogenia de la úlcera péptica y el cáncer gástrico. Este microorganismo está identificado como agente carcinógeno tipo I según la Organización Mundial de la Salud.¹

El diagnóstico de *H. pylori* se realiza mediante métodos histológicos, cultivos microbiológicos, pruebas serológicas, bioquímicas y moleculares. Actualmente, el diagnóstico definitivo se basa en el aislamiento del microorganismo procedente de biopsias gástricas y otros tipos de muestras. Sin embargo, para lograr este objetivo se requiere laboratorios con condiciones especiales, los cuales no se encuentran disponibles en muchos países. Por otra parte, los estudios histológicos brindan importantes detalles de la infección en las muestras que se analizan, pero tienen la desventaja de ser técnicas poco sensibles y requieren un personal especializado para la interpretación de los resultados.^{2,3}

En la actualidad, los métodos moleculares se presentan como una estrategia atractiva para la detección y caracterización de *H. pylori*, ya que combinan en una misma técnica dos importantes aspectos: la rapidez y la sensibilidad. Hasta este momento, escasos han sido los estudios en la literatura que describen la identificación de este agente infeccioso en tejidos fijados en formol y embebidos en parafina (TFEP).⁴⁻⁶

Los TFEP son una fuente importante de información para estudios genéticos y de epidemiología molecular. Este tipo de muestra presenta una ventaja adicional, pues permite el análisis continuo del paciente sin necesidad de tomar una nueva muestra. Por otra parte, se ha descrito que existen incongruencias entre las características genéticas obtenidas de las cepas del paciente en estudio y la evaluación directa de la muestra clínica del mismo.⁷ Por estas razones, el presente trabajo se propone evaluar el uso de la reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de *H. pylori* y sus genotipos en tejidos gástricos con neoplasias malignas embebidos en parafina.

MATERIAL Y MÉTODOS

En la actual investigación se desarrolló un estudio descriptivo. Se estudiaron fragmentos de 5 tejidos fijados en formol y embebidos en parafina procedentes de 5 pacientes mexicanos con neoplasias gástricas malignas conservados en el archivo del Laboratorio de Anatomía Patológica del Instituto de Cancerología «Dr. Arturo Beltrán Ortega», de Acapulco, Guerrero, México.

A cada uno de los bloques seleccionados se le realizaron 2 cortes histológicos consecutivos de 5 µm de espesor con micrótopo rotatorio RM 2035 (Leica, Leipzig, Alemania); uno de ellos se coloreó con hematoxilina y eosina para sugerir evidencias de infección por *H. pylori*. El otro corte, se utilizó para la coloración especial de Giemsa, técnica de referencia para el diagnóstico de este patógeno.² Otros 5 cortes de 10 µm de cada bloque de parafina se colocaron en microtubos estériles de 1,5 mL para realizar la extracción del material genético.

Para la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN), los cortes de tejido gástrico se resuspendieron en 500 µL del tampón de reacción (NaOH 0,1 M y 1 % de SDS) y

se colocaron en una autoclave (Tuttnauer 2340 M, Israel) a 120 °C por 20 min. Los ácidos nucleicos fueron extraídos por fenol/cloroformo y precipitados con isopropanol y una solución de acetato de sodio 3 M.⁷

Se utilizó como secuencia diana dos fragmentos diferentes del ADN del microorganismo. El primer gen estudiado fue *vacA*, cuya amplificación mediante la RCP brinda un fragmento de talla molecular de 120/150 pb de acuerdo con el polimorfismo que presenta esa región en el patógeno (genotipo s1 120 pb y s2 150 pb, respectivamente). El segundo gen amplificado en este trabajo fue *cagA* con una tamaño molecular de 181 pb.⁷ La mezcla de reacción (50 iL) para ambas reacciones contuvo Tris/HCl (pH 8,3) 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, deoxirribonucleótidos (dNTP) 200 iM, iniciadores 0,4 iM (cuadro) 2 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Bioline, Londres, Reino Unido) y 3,0 iL de ADN molde. El perfil de amplificación para ambas reacciones fue: 94 °C por 4 min, 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min a 58 °C, 1,5 min a 72 °C, con una extensión final de 10 min a 72 °C.

Iniciadores utilizados para la detección y caracterización de *H. pylori* en tejidos fijados en formol y embebidos en parafina de pacientes mexicanos con neoplasias gástricas malignas

Gen analizado	Iniciador	Secuencia (5´ - 3´)	Polimorfismo de la región amplificada	Tamaño del producto amplificado	Referencia
VacA	VacA 1D VacA 1I	CTGGT(C/T)TAAAGTC GCACCCTTTGTGC CAATGGCTGGAATGA TCACGGTTGT(A/G)	s1	120 pb	7
	VacA 2 D VacA 1I	CAAACACACCGCAAAA TCAATCGCCC CAATGGCTGGAATGA TCACGGTTGT(A/G)	s2	150 pb	7
CagA	CagA 2 D CagA 2 I	(C/T)GATAGGGATAAC AGGCAAGCTT CTGAAAGCTCTTTGTG GAAGATTC	CagA ⁺	181 pb	7

D: Iniciador Directo, I: Iniciador Inverso

Para la detección de los productos amplificados se analizaron 15 iL de cada mezcla resultante mediante electroforesis en gel de agarosa a 3,0 % con solución amortiguadora de Tris-Borato-EDTA y teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ml). La corrida se realizó a 80 V por 1 h. Los resultados fueron visualizados en un transiluminador ultravioleta (Macrovue 2011, LKB, Suecia) y luego fotografiados con una cámara digital Power Shot G6 (Cannon, Japón).

En las RCP, se empleó como control positivo ADN extraído de una cepa de *H. pylori*, gentilmente donado por el laboratorio de Neisserias patógenas del Instituto de Medicina Tropical «Pedro Kourí» Como control negativo, se utilizó agua destilada estéril en lugar de ADN molde.

Cumpliendo con los requerimientos éticos, la inclusión de los pacientes en el estudio se realizó tras la consecución del consentimiento informado escrito.

RESULTADOS

Las coloraciones histológicas de rutina y las especiales brindaron elementos inequívocos de infección por *H. pylori* en las 5 muestras analizadas. En la Figura se

pueden observar las bandas (120/150 pb para *vacA* y 181 pb para *cagA*) amplificadas a partir de los ADN extraídos de las muestras de neoplasias gástricas malignas de los pacientes mexicanos analizados.

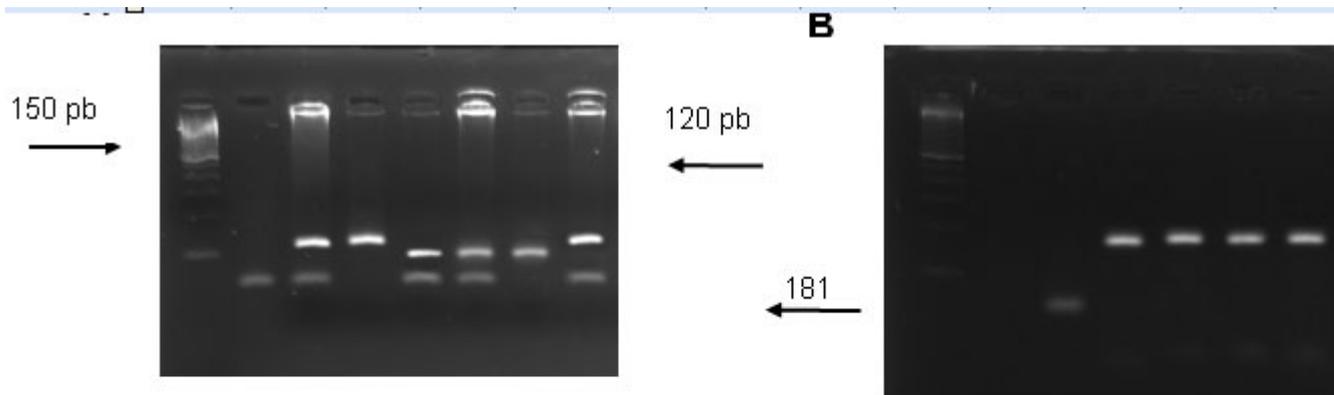


Figura. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de los fragmentos de 120/150 pb (A) y 181 pb (B) de los genes *vacA* y *cagA* en las muestras de neoplasias gástricas malignas de los pacientes mexicanos analizados.

A: Línea 1: Marcador de peso molecular (100 pb, Promega, EE.UU.), línea 2: control negativo de la reacción, líneas 3-4: muestras positivas *vacAs2*, línea 5-7: muestras positivas *vacAs1*, línea 8: control positivo de la reacción.

B: Línea 1: Marcador de peso molecular (100 pb, Promega, EE.UU.), línea 3: control negativo de la reacción, líneas 4-6: muestras positivas *cagA*, línea 7: control positivo de la reacción

El fragmento de 120 pb del gen *vacA* (genotipo s1) se amplificó en tres de las cinco muestras analizadas para 60 %. Las otras dos muestras estudiadas correspondieron al genotipo s2 (150 pb). De la misma manera, el gen *cagA* resultó amplificado en tres de las cinco muestras estudiadas; las dos muestras restantes resultaron negativas para esta secuencia.

La actual investigación identificó tres de las cuatro posibles variantes que pueden existir al combinar ambos genes (*vacA* y *cagA*). En el estudio predominó la asociación de genotipos s1/*cagA*⁻ y s2/*cagA*⁺ con dos casos cada una. La combinación restante resultó s1/*cagA*⁺.

DISCUSIÓN

La presencia de *Helicobacter pylori* en el hombre se asocia con el desarrollo de una variedad de enfermedades gastroduodenales, tales como gastritis activa, úlcera péptica, cáncer gástrico y linfoma gástrico no Hodgkin´s de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT, por sus siglas en inglés).⁷ Estudios recientes, describen que alrededor de 50 % de la población mundial está infectada con este patógeno.^{1,3,4} En México, se ha reportado una prevalencia de esta enfermedad de 66 %⁸ y en pacientes con neoplasias gástricas malignas alcanza hasta 38 %, lo que demuestra que es un serio problema de salud en esa región. Hasta nuestro conocimiento, este es el primer reporte que aborda la infección de *H. pylori* en pacientes con neoplasias gástricas malignas en el estado de Guerrero, México.

Varios estudios serológicos indican que la infección por *H. pylori* causa de tres a seis veces mayor riesgo de desarrollar neoplasias malignas. Sin embargo, solo una

minoría de los pacientes infectados desarrolla algunas de estas enfermedades. Estos trabajos han permitido sugerir que además de los factores ambientales y del paciente, las características genéticas del patógeno desempeñan un papel importante en este proceso.^{1,7}

Se han descrito factores de virulencia de *H. pylori* que le permite a la bacteria la supervivencia en el medio ácido del estómago. Entre ellos, se destacan los genes *vacA*, *cagA* y *iceA*, los que muestran determinado polimorfismo y diferente presencia en las cepas de *H. pylori* de los pacientes que se estudian. La citotoxina (*VacA*) causa degeneración del epitelio gástrico y el gen que la codifica presenta variación en dos regiones, entre ellas la región señal presenta dos polimorfismos denominados s1 y s2.⁸

En este trabajo, 60 % de las muestras analizadas correspondían al genotipo s1. Recientemente, López-Vidal y colaboradores en el mismo país y con similar población, pero con mayor número de pacientes analizados obtuvieron 39 % de esta variante alélica.⁸ Sin embargo, otra investigación desarrollada en la ciudad de México en 39 niños y 29 adultos detectó 81 % del genotipo antes mencionado.⁹ Una posible explicación al respecto es la amplia diversidad genética que se presenta en las cepas de *H. pylori* de esta región.⁸ Sin embargo, se deben realizar otros estudios en el Estado de Guerrero que involucren un mayor número de muestras.

Otro de los genes estudiados es el *cagA*, el cual codifica para un antígeno inmunodominante de la bacteria.⁷ Este gen no se encuentra presente en todas las cepas de *H. pylori* y las que lo presentan se han identificado con mayor frecuencia en los pacientes con cáncer gástrico.⁹ En individuos lituanos con gastritis crónicas y úlceras duodenales, se detectó presencia de *cagA* en 60 % de las cepas analizadas.¹⁰ Coincidentemente, este es el mismo valor que se obtuvo en nuestro estudio. Similares valores fueron obtenidos en dos grupos de pacientes alemanes con neoplasias: 63 % para MALT y 69 % para adenocarcinoma gástrico, respectivamente.⁷ No obstante, mayores tasas 72 % y 86 % han sido descrito en dos estudios mexicanos de diferentes grupos poblacionales.^{8,9}

El análisis de la combinación de las variantes alélicas analizadas en el estudio brindó hallazgos interesantes. Este trabajo corroboró los previos resultados obtenidos por López-Vidal que describen una alta diversidad genética de *H. pylori* en pacientes mexicanos con y sin cáncer.⁸ Por otra parte, la asociación *vacA*⁺/*cagA*⁺ se detectó en 60 % de los casos estudiados, valor superior al obtenido por Paniagua y colaboradores (44 %) en pacientes mexicanos con gastritis crónica.¹¹

Otro de los aspectos novedosos de la actual investigación es la detección molecular de *H. pylori* en TFFEP. Este tema es de vital importancia, pues permite comparar los genotipos encontrados en la muestra con la histología y el curso clínico del paciente. Además, la tipificación de las cepas en este material elimina la posibilidad de preselección de determinadas cepas y la modificación de los factores de virulencia debido al cultivo *in vitro*.⁷ Finalmente, los TFFEP son un material de fácil acceso para estudios reiterados del paciente, sin necesidad de volver a realizar procedimientos invasivos para obtener las muestras gástricas.¹²

Este trabajo constituye el primer reporte de detección molecular de *H. pylori* en TFFEP en pacientes con neoplasias gástricas malignas de Guerrero, México. La posibilidad de contar con métodos moleculares que permitan detectar el patógeno en este tipo de material se perfila como una estrategia atractiva para realizar estudios de epidemiología molecular. Por otra parte, en futuras investigaciones deben ser evaluadas las posibles asociaciones de genotipos/subtipos del

microorganismo con variables clínicas, epidemiológicas y de manejo del paciente, lo que permitirá adoptar acciones importantes para un mejor control de la infección por *H. pylori* en esta región.

CONCLUSIONES

La reacción en cadena de la polimerasa podría ser un método eficaz en la identificación del *H. pylori* en tejidos gástricos con neoplasias malignas embebidos en parafina. Contar con métodos moleculares que permitan detectar *H. pylori* en tejidos fijados en formol y embebidos en parafina se perfila como una estrategia atractiva para realizar estudios de epidemiología molecular y contribuirá a establecer posibles asociaciones de genotipos/subtipos del microorganismo con variables clínicas, epidemiológicas y de manejo del paciente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferreira RM, Machado JC, Letley D, Atherton JC, Pardo ML, Gonzalez CA, *et al.* A novel method for genotyping the *Helicobacter pylori* *vacA* intermediate region directly in gastric biopsy specimens. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(12): 3983-9.
2. Ciesielska U, Dziegiel P, Jagoda E, Podhorska-Okóń M, Zabel M. The detection of *Helicobacter pylori* in paraffin sections using the PCR technique and various primers as compared to histological techniques. *Folia Morphol (Warsz).* 2004; 63(2): 229-31.
3. Vela-Velázquez CT. Comparación entre las biopsias gástricas sin fijar 24 horas frente a la biopsia convencional para el diagnóstico de *Helicobacter pylori* en un hospital de referencia de Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2011; 28(1): 42-6.
4. Sicinschi LA, Correa P, Peek Jr RM, Constanza Camargo M, Delgado A, Piazuelo MB, *et al.* *Helicobacter pylori* genotyping and sequencing using paraffin-embedded biopsies from residents of colombian areas with contrasting gastric cancer risks. *Helicobacter.* 2008; 13(2): 135-45.
5. Farivar TN, Pahlevan A, Johari P, Safdarian F, Mehr MA, Najafipour R, *et al.* Assessment of *Helicobacter pylori* prevalence by scorpion real-time PCR in chronic tonsillitis patients. *J Glob Infect Dis.* 2012; 4(1): 38-42.
6. Han HS, Lee KY, Lim SD, Kim WS, Hwang TS. Molecular identification of *Helicobacter* DNA in human gastric adenocarcinoma tissues using *Helicobacter* species-specific 16S rRNA PCR amplification and pyrosequencing analysis. *Oncol Lett.* 2010; 1(3): 555-8.
7. Koehler CI, Mues MB, Dienes HP, Kriegsmann J, Schirmacher P, Odenthal M. *Helicobacter pylori* genotyping in gastric adenocarcinoma and MALT lymphoma by multiplex PCR analyses of paraffin wax embedded tissues. *Mol Pathol.* 2003; 56(1): 36-42.

8. López-Vidal Y, Ponce-de-León S, Castillo-Rojas G, Barreto-Zúñiga R, Torre-Delgadillo A. High diversity of *vacA* and *cagA* *Helicobacter pylori* genotypes in patients with and without gastric cancer. PLoS ONE. 2008; 3(12):e3849.
9. González-Vázquez R, Herrera-González S, Córdova-Espinoza MG, Zúñiga G, Giono-Cerezo S, Hernández-Hernández JM, *et al.* *Helicobacter pylori*: detection of *iceA1* and *iceA2* genes in the same strain in Mexican isolates. Arch Med Res. 2012; 43(5): 339-46.
10. Miciuleviciene J, Calkauskas H, Jonaitis L, Kiudelis G, Tamosiūnas V, Praskevicius A, *et al.* *Helicobacter pylori* genotypes in Lithuanian patients with chronic gastritis and duodenal ulcer. Medicina (Kaunas). 2008; 44(6): 449-54.
11. Paniagua GL, Monroy E, Rodríguez R, Arroniz S, Rodríguez C, Cortés JL, *et al.* Frequency of *vacA*, *cagA* and *babA2* virulence markers in *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican patients with chronic gastritis. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2009; 8: 14. doi: 10.1186/1476-0711-8-14.
12. Armas Y, Capó V, López L, Mederos L, Díaz R. Comparación de tres métodos de extracción de tejidos embebidos en parafina. Biotecn Apl. 2011; 28(1): 40-3.

Recibido: 12 de marzo de 2013.

Aprobado: 28 de marzo de 2013.