

## HELICOBACTER PYLORI Y EXPRESIÓN DE GKN1 EN PACIENTES CON CÁNCER GÁSTRICO

José Guadalupe Aguilar Díaz<sup>a</sup>, Betsabe Guadalupe Najera Ruiz<sup>a</sup>, Judit Alarcón Millán<sup>a</sup>, Sandra Inés Lorenzo Nazario<sup>a</sup>, Carmen Sol De la Peña Cruz<sup>a</sup>, Julio Ortiz Ortiz<sup>b</sup>, Adolfo Román Román<sup>c</sup>, Gloria Fernández Tilapa<sup>a</sup>, Hilda Jiménez Wences<sup>a</sup>, Dinorah Nashely Martínez Carrillo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Investigación Clínica, [Josesito\\_adm@hotmail.com](mailto:Josesito_adm@hotmail.com), [betsignr@hotmail.com](mailto:betsignr@hotmail.com), [judmi\\_7@hotmail.com](mailto:judmi_7@hotmail.com), [inexita78@hotmail.com](mailto:inexita78@hotmail.com), [carmen\\_soles@yahoo.com.mx](mailto:carmen_soles@yahoo.com.mx), [gferti@hotmail.com](mailto:gferti@hotmail.com), [hjimenez@uagro.mx](mailto:hjimenez@uagro.mx),

<sup>b</sup> Laboratorio de Biomedicina Molecular, [julioortiz771210@gmail.com](mailto:julioortiz771210@gmail.com),

<sup>c</sup> Laboratorio de Investigación en Bacteriología, [arroman6046@gmail.com](mailto:arroman6046@gmail.com)  
Facultad de Ciencias Químico Biológicas. UAGro. [dinomtzcar@outlook.com](mailto:dinomtzcar@outlook.com)

### RESUMEN

Gastroquina 1 (GKN1), se expresa abundantemente en la mucosa gástrica sana, pero se encuentra disminuida en la infección por *H. pylori* y ausente en tejido de cáncer gástrico. Se ha propuesto que individuos con baja expresión de GKN1 tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico. El objetivo del estudio fue analizar la expresión de GKN1 y su relación con la infección por *H. pylori* en pacientes con cáncer gástrico. La expresión de GKN1 en tejido tumoral fue baja en comparación con el tejido adyacente de pacientes con cáncer gástrico. No se encontró relación entre la expresión de GKN1 y la infección por *H. pylori*. La determinación de la expresión de GKN1 podría ayudar a identificar a individuos en riesgo de desarrollar cáncer gástrico.

**Palabras clave:** *H. pylori*, Cáncer gástrico, GKN1.

### ABSTRACT

Gastrokine 1 (GKN1) is expressed abundantly in the healthy gastric mucosa, but is reduced in *H. pylori* infection and absent in gastric cancer tissue. It has been proposed that individuals with low expression of GKN1 have an increased risk of gastric cancer. The objective of this work was analyze the expression of *GKN1* and its relationship with *H. pylori* infection in patients with gastric cancer. The expression of *GKN1* in tumor tissue was low in comparison with the adjacent tissue of patients with gastric cancer. No relationship was found between the expression of *GKN1* and *H. pylori* infection. The determination of the expression of GKN1 could help identify individuals at risk of gastric cancer.

**Key words:** *H. pylori*, gastric cancer, GKN1.

## 1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial el cáncer gástrico ocupa el quinto lugar de incidencia y representa el tercer lugar de mortalidad oncológica en ambos sexos [1]. En México, durante el 2013, el cáncer gástrico ocupó el tercer lugar de mortalidad en individuos mayores de 20 años [2]. Recientemente el cáncer gástrico es considerado un problema de salud pública debido a su elevado índice de mortalidad y baja tasa de supervivencia. Se han determinado diversos factores para el desarrollo de cáncer gástrico, sin embargo, la infección por *H. pylori* es el principal factor de riesgo. Se tiene conocimiento que *H. pylori* induce daño a las células epiteliales gástricas a través de diversos factores de virulencia que garantizan su supervivencia en la superficie de la mucosa gástrica y le permite la evasión de la respuesta inmune por parte del huésped [3]. *H. pylori* induce la activación de DNA metiltransferasas (HDNMTs) promoviendo así, la metilación del DNA del huésped en las regiones promotoras de varios genes que actúan como supresores tumorales en el cáncer gástrico [4]. Se ha propuesto que la metilación inducida por *H. pylori* está implicada en la disminución de la expresión de gastroquina 1 (GKN1), una proteína supresora de tumor [5]. Diversos estudios se han centrado en la identificación de nuevas moléculas endógenas que participan en el mantenimiento de la mucosa gástrica, brindando una nueva visión de la fisiología normal del estómago y de los mecanismos regulatorios implicados en la oncogénesis gástrica; así como identificación de marcadores moleculares para la detección temprana del cáncer gástrico [6,7]. El objetivo de esta investigación fue analizar la expresión de *GKN1* y su relación con la infección por *H. pylori* en pacientes con cáncer gástrico del Estado de Guerrero.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

*Muestras clínicas.* La toma y colecta de las muestras de cáncer gástrico se realizó en el Servicio de Endoscopia del Instituto Estatal de Cancerología «Arturo Beltrán Ortega» en Acapulco, Guerrero. Todas las muestras fueron colectadas y procesadas previa firma del consentimiento informado. La endoscopia se efectuó después de una noche de ayuno, empleando un video endoscopio gastrointestinal. Las biopsias gástricas se utilizaron para realizar: I) análisis histopatológico en el mismo hospital; II) extracción de ADN para la detección de *H. pylori*; y III) extracción de ARN para los ensayos de RT-qPCR. Estos últimos se realizaron en el Laboratorio de Investigación Clínica de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas. Así mismo se tomaron muestras de tejido adyacente al tumor de cada uno de los pacientes incluidos.

El tejido empleado para la identificación de *H. pylori* fue colocado en solución amortiguadora de Tris 10 mM pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0, SDS 0.5%; la segunda biopsia se colocó en trizol para la obtención del ARN; mientras que la última biopsia fue fijada en formol amortiguado para el estudio histopatológico. Las biopsias destinadas a la detección de *H. pylori* se mantuvieron a -20 ° C hasta su procesamiento.

*Extracción de ADN.* Se empleó la técnica de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico, previa digestión con proteinasa K. La detección de *H. pylori* se realizó mediante PCR de punto final, en la cual se amplificó un fragmento del gen *16S* del ARNr, siguiendo la metodología ya

definida por Román-Román *et al.*, (2017). Todas las reacciones se realizaron en un termociclador Mastercycler Ep gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemania).

*Extracción de ARN.* Se procedió a lisar y homogenizar las biopsias gástricas en trizol para posteriormente realizar la extracción del ARN, de acuerdo con el procedimiento establecido por Chomczynski y Sacchi. La pureza y cantidad del ARN se determinó mediante lectura de la densidad óptica de cada muestra a 260 nm y 280 nm usando el espectrofotómetro Nanodrop ND (Thermo Scientific, Wilmington, USA).

*RT-qPCR.* Los iniciadores y sonda empleados para el estudio de la expresión de *GKNI*, fueron diseñados, validados y sintetizados por la compañía Applied Biosystems. Se colocaron 25 ng de RNA, 2X TaqMan® RT-PCR Mix (Applied Biosystems, California, USA), 20X de TaqMan® Gene Expression Assay *GKNI* (Applied Biosystems, California, USA), 20X de TaqMan® Gene Expression Assay *GAPDH* (Applied Biosystems, California, USA) 40x TaqMan® RT Enzyme Mix (Applied Biosystems, California, USA) en un volumen final de 10 µl. La reacción se realizó empleando un equipo 7500 Fast Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). El programa de amplificación consistió en 48°C por 15 min, 95°C por 10 min, 95°C por 15 seg y 60°C por 1 min a 40 ciclos. En todas las reacciones de qPCR se usaron controles negativos para cada gen con la finalidad de verificar la existencia de posible contaminación, la expresión de *GKNI* fue normalizada mediante la expresión de *GAPDH* y se empleó el método  $2^{\Delta C_T}$  para detectar cambios en la expresión del gen de interés.

### 3. RESULTADOS

Se incluyeron siete pacientes con diagnóstico endoscópico e histopatológico de cáncer gástrico, de los cuales, el 71.4% (5/7) fueron del género femenino y el 28.6% (2/7) del masculino. La edad promedio de los pacientes fue de 60.7 años  $\pm$  19.6 años, con un rango de 29 a 89 años. La frecuencia de *H. pylori* fue del 57.1% (4/7) (Tabla 1).

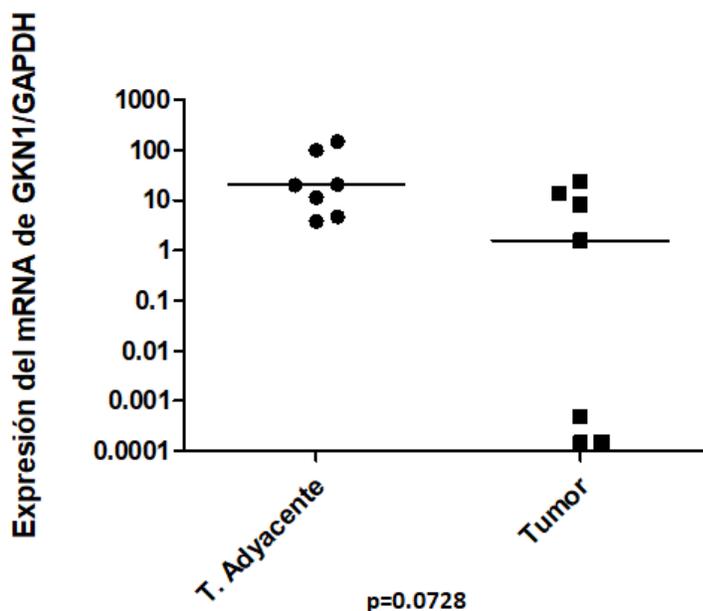
En relación con la infección se encontró que hubo una mayor frecuencia de pacientes *H. pylori*-positivos en comparación con los pacientes *H. pylori*-negativos (57.2% vs. 42.8%, respectivamente); estos hallazgos coinciden con investigaciones donde se reporta una frecuencia similar en México en las cuales describen a *H. pylori* como uno de los principales factores a desarrollar cáncer gástrico.

Tabla 1. Frecuencia de la infección por *H. pylori* en pacientes con cáncer gástrico.

Estado de <i>H. pylori</i>	Cáncer gástrico n=7
<i>H. pylori</i> n (%)	
Positivo	4(57.1)
Negativo	3(42.9)
<b>Total</b>	<b>7(100)</b>

## Expresión del ARNm de *GKNI*

Al analizar la expresión del ARNm de *GKNI*, se encontró disminuida la expresión en el tejido tumoral en comparación con el tejido adyacente, la expresión de *GKNI* estuvo disminuida en cáncer gástrico; sin embargo, entre la disminución de *GKNI* en tejido tumoral y tejido adyacente no hubo mayor diferencia, lo cual se puede deber a que al momento de tomar la biopsia de tejido adyacente, éste pudiera contener células tumorales y por ello no se obtuvo un valor estadístico significativo ( $p=0.0728$ ) en la expresión de *GKNI* entre ambos tejidos (**Figura 1**). Estos resultados son similares a los obtenidos por Guo *et al.*, en 2014, quienes reportan una disminución de la expresión de *GKNI* en tejido tumoral con respecto a su tejido adyacente [8]. De los siete pacientes con cáncer gástrico, dos correspondían a cáncer gástrico de tipo intestinal y cinco de tipo difuso, la expresión del ARNm de *GKNI* en cáncer gástrico de tipo intestinal fue menor en comparación con el tipo difuso, lo que difiere con estudios realizados por Guo *et al.*, en 2014 en el cual encontraron menor expresión del ARNm de *GKNI* en pacientes con cáncer gástrico de tipo difuso en comparación con el tipo intestinal, lo cual podría estar relacionado con el estadio tumoral [8].



**Figura 1. Expresión del mRNA de *GKNI*.** Expresión de *GKNI* en muestras de cáncer gástrico y tejido adyacente. La expresión de *GKNI* se normalizó con el gen *GAPDH*. La expresión de *GKNI* en tejido tumoral fue baja en comparación con el tejido adyacente de pacientes con cáncer gástrico (Prueba de Mann-Whitney).

## Análisis de *H. pylori* con la expresión de ARNm *GKNI*

Entre los pacientes *H. pylori* positivo la expresión de *GKNI* fue mayor que en los *H. pylori* negativos ( $p=0.1143$ ) (**Figura 2**). Los resultados obtenidos pueden indicar que la infección por *H. pylori* no es necesaria para la disminución de *GKNI* una vez desarrollado el tumor, sin embargo, la infección por *H. pylori* puede estar implicada en el inicio de la carcinogénesis gástrica, y puede contribuir en la disminución de la expresión de *GKNI*.

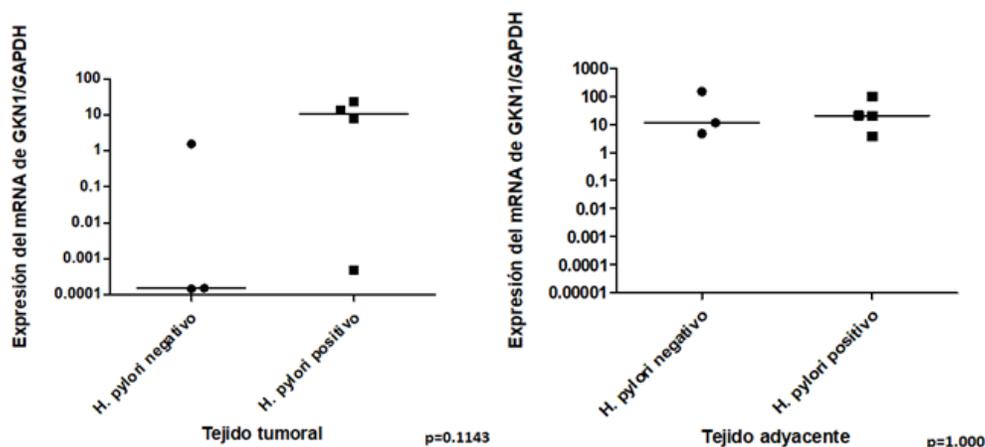


Figura 2. Expresión del mRNA de *GKN1* en relación a *H. pylori*. Expresión de *GKN1* en muestras de cáncer gástrico y tejido adyacente (Prueba de Mann-Whitney).

#### 4. CONCLUSIONES

La expresión de *GKN1* en tejido tumoral fue baja en comparación con el tejido adyacente de pacientes con cáncer gástrico. No se encontró relación entre la expresión de *GKN1* y la infección por *H. pylori*. La determinación de la expresión de *GKN1* podría ayudar a identificar a individuos en riesgo de desarrollar cáncer gástrico.

#### AGRADECIMIENTOS

La investigación se realizó con financiamiento otorgado por la Secretaría de Educación Pública, a través del programa para el Apoyo a la incorporación de nuevos/as profesores/as de tiempo completo convocatoria 2017 y por el CONACyT Convocatoria Ciencia Básica CB-2015-01.

#### 5. BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Globocan, 2012. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>. [citado 28 de octubre de 2017].
- [2]. Sánchez-Barriga, J. J., Tendencias de mortalidad y años potenciales de vida perdidos por cáncer gástrico en México, 2000-2012. *Rev. Gastroenterol. México* 81, 65–73 (2016).
- [3]. Mnich, E., Kowalewicz-Kulbat, M., Sicińska, P., Hinc, K., Obuchowski, M., Gajewski, A., Moran, A.P. and Chmiela, M., Impact of *Helicobacter pylori* on the healing process of the gastric barrier. *World J. Gastroenterol.* 22, 7536–7558 (2016).
- [4]. Na, H.-K. and Woo, J. H., *Helicobacter pylori* Induces Hypermethylation of CpG Islands Through Upregulation of DNA Methyltransferase: Possible Involvement of Reactive Oxygen/Nitrogen Species. *J. Cancer Prev.* 19, 259–264 (2014).
- [5]. Yoon, J. H., Choi, Y. J., Choi, W. S., Ashktorab, H., Smoot, D. T., Nam, S. W., Lee, J. Y. and Park, W. S., *GKN1*-miR-185-DNMT1 axis suppresses gastric

- carcinogenesis through regulation of epigenetic alteration and cell cycle. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 4599–4610 (2013).
- [6]. Cooke C. L., Torres, J. and Solnick, J. V., Biomarkers of *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer. *Gut Microbes.*4(6):532-40 (2013).
- [7]. Shiota, S. and Yamaoka, Y., Biomarkers for *Helicobacter pylori* infection and gastroduodenal diseases. *Biomark Med.* 8(9):1127-37 (2014).
- [8]. Guo, X-Y., Dong, L., Qin, B., Jiang, J. and Shi, A-M., Decreased expression of gastrokine 1 in gastric mucosa of gastric cancer patients. *World J Gastroenterol WJG.* 20(44):16702-6 (2014).