



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

Tesis Profesional

**“Inmunodetección de un nuevo marcador tumoral de Cáncer Gástrico en
pacientes con Gastritis Crónica”**

Para obtener el título de Médico Cirujano y Partero

Presenta:

Emmanuel Marcelino Juárez Alvarado

Directora de tesis

D.C. María Alicia Díaz y Orea

PI Titular “C” TC

Asesor Metodológico

D.C. Enrique Torres Rasgado

PI Titular “A” TA

Revisor de Tesis

Dr. Sergio Bustamante Espinoza

Fecha de entrega: Diciembre-2018

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS	3
INDICE DE TABLAS	3
INDICE DE GRAFICAS.....	3
RESUMEN.....	7
INTRODUCCION.....	8
ANTECEDENTES	10
ANTECEDENTES GENERALES	10
ANTECEDENTES ESPECIFICOS	45
JUSTIFICACIÓN	51
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	52
OBJETIVOS.....	54
OBJETIVO GENERAL.....	54
OBJETIVOS ESPECIFICOS	54
MATERIAL Y METODOS	55
DISEÑO DEL ESTUDIO.....	55
POBLACIÓN DEL ESTUDIO	55
CRITERIOS DE INCLUSIÓN	55
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	55
CRITERIOS DE ELIMINACIÓN	56
MARCO MUESTRAL	56
ESTRATEGIA DE TRABAJO	58
ASPECTOS ÉTICOS.....	60
DIAGRAMA DE FLUJO	61
RESULTADOS	62
DISCUSIÓN.....	71
BIBLIOGRAFÍA	75
ANEXOS.....	81

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes del estómago.	12
Figura 2. Arterias y nervios parasimpáticos del estómago.	13
Figura 3. Histología de capa mucosa del estómago.	14
Figura 4. Túnica Mucosa.	15
Figura 5. Moco gástrico.	15
Figura 6. Regiones del estómago y estructura histológica.	18
Figura 7. Generalidades de la fisiología del estómago.	21
Figura 8. Mucosa gástrica.	25
Figura 9. Endoscopia Gastritis Crónica Atrófica.	26
Figura 10. Relación de proteínas que comparten los pacientes CG, GC y grupo control.	69
Figura 11. Electroforesis en geles de poliacrilamida.	82

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Antecedentes Específicos	50
Tabla 2. Variables de población.	57
Tabla 3. Variables de estudio	57
Tabla 4. Variables Confusoras	58
Tabla 5. Número de pacientes	63
Tabla 6. Proteínas que comparten pacientes de CG, GC con el grupo control.	69

INDICE DE GRAFICAS

Grafica 1. Edad promedio de población.	63
Grafica 2. Distribución de género de pacientes con Gastritis Crónica.	64
Grafica 3. Proteinas detectadas en GC.	65

Grafica 4. Distribución de género de pacientes con Cáncer Gástrico.	65
Grafica 5. Proteínas detectadas en pacientes con CG.	66
Grafica 6. Distribución de género en Controles.	67
Grafica 7. Proteínas detectadas en controles.	68
Grafica 8. Distribución de proteínas detectadas.	70

Esta tesis se realizó en el Departamento de Inmunología Experimental de la Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y del servicio de Endoscopia y Gastrocirugía del Hospital de Especialidades CMN Gral. De División “Manuel Ávila Camacho”.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres

Por brindarme su apoyo incondicional, creer en mí y apoyarme cuando más lo he necesitado, ustedes son el pilar fundamental en todo lo que soy.

A mi directora de tesis

D.C. Ma. Alicia Díaz y Orea quien en todo momento me ha dirigido por el sendero correcto y me ha ayudado a aprender de mis errores, siempre le voy agradecer su confianza, apoyo y tiempo.

A mi asesor metodológico

D.C. Enrique Torres Rasgado por motivarme a seguir adelante, por compartir sus conocimientos, tiempo y paciencia.

A mis maestros

Por su conocimiento, por su tiempo y sobre todo por su experiencia transmitida.

A mis compañeros

Augusto, Andrea, Hilda, Dra. Ángeles, Vianey, por su amistad y apoyo.

RESUMEN

Introducción: El cáncer gástrico (CaGa) a nivel mundial es la cuarta causa de mortalidad, y la quinta en México, a pesar de que actualmente existen métodos de diagnóstico sérico, a través de marcadores tumorales como CEA, CA 19.9 y TAG 72.2, es detectado en estadios avanzados, debido a que estos marcadores, no son sensibles ni específicos para su detección temprana y oportuna, lo que crea la necesidad de evaluar, proteínas tumorales gástricas que sean detectadas en los pacientes, con gastritis crónica atrófica, antes de que la enfermedad avance hasta carcinoma, para poder brindarle al paciente un tratamiento oportuno.

Objetivo: Identificar un nuevo marcador tumoral de cáncer gástrico en pacientes con gastritis crónica.

Material y métodos: Se trata de un estudio descriptivo, comparativo, observacional, transversal, prolectivo, unicéntrico y homodemico, en el que se estudiaron 150 pacientes (50 controles, 50 GC y 50 CG) y biopsias de tumor de CaGa, se evaluó el perfil de proteínas obtenidos de los sobrenadantes de antígenos de secreción tumoral a través de la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS PAGE). Se realizó un Western Blot y se reveló con los sueros de los pacientes CG, GC y controles, realizado en el departamento de Inmunología Experimental de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y el servicio de Endoscopia y Gastrocirugía del Hospital de Especialidades CMN Gral. De División Manuel Ávila Camacho de la Ciudad de Puebla de agosto de 2017 a mayo de 2018.

Resultados: En nuestro estudio la edad promedio fue de 59 ± 9 años para CG y 50 ± 11 años para GC con una relación hombre mujer de 1.4:1.1 en pacientes con CG y 1:2 para GC para el grupo control el mayor porcentaje de población fue masculina en una relación hombre mujer 2:1 con una edades promedio 41 ± 11 . Se detectaron 16 proteínas para pacientes con GC, 22 proteínas en pacientes con CG y 12

proteínas en pacientes controles de las cuales presentaron en común 7 proteínas con los siguientes pesos moleculares 260 KDa, 122 KDa, 81 KDa, 44 KDa, 35 KDa y 25 KDa, más 3 proteínas de 59 KDa, 48 KDa y 40 KDa que comparten CG y GC pero no la detecta en los pacientes control, así como 5 proteínas de 238 KDa, 140 KDa, 118 KDa, 78 KDa y 16 KDa que solo se detectan para GC, y 5 proteínas de 172 KDa, 151 KDa, 117 KDa, 76 KDa y 19 KDa CG.

Conclusiones: Se determinó que la proteína con el peso molecular de 260 KDa, se expresa en pacientes control, CG y GC la que pensamos que podría ser utilizada como marcador diagnóstico. Además se identificaron 3 proteínas de 59 KDa, 48 KDa y 40 KDa que comparten CG y GC, y que no son detectadas por los pacientes control las que podrían ser utilizadas como marcadores de progresión de GC a CG. También se identificaron 5 proteínas de 238 KDa, 140 KDa, 118 KDa, 78 KDa y 16 KDa que solo detectan para GC y 5 de 172 KDa, 151 KDa, 117 KDa, 76 KDa y 19 KDa solo para CG, las que podrían servir para la detección de estas patologías.

INTRODUCCION

El cáncer Gástrico es una enfermedad muy frecuente, que a nivel mundial ocupa la cuarta causa de muerte y la quinta en México, con una relación hombre mujer de 2:1. Se ha demostrado que está asociado al consumo de tabaco, infección por *Helicobacter Pylori*, bajo consumo de frutas y hortalizas, consumo de sal, chile, carnes ahumadas y principalmente tener el antecedente de padecer Gastritis Crónica. La principal característica de esta enfermedad es la proliferación descontrolado de células anormales de la mucosa gástrica que adquieren la capacidad de evasión del sistema inmunológico, invadiendo y diseminándose hacia otros tejidos.

La Gastritis Crónica es un proceso inflamatorio de la mucosa gástrica, causada por infecciones, el uso prolongado de Antiinflamatorios no Esteroideos, la ingesta de bebidas alcohólicas, el consumo abundante de cereales, produciendo el daño del epitelio de la mucosa gástrica, que puede evolucionar a gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal y finalmente displasia (leve, moderada y severa), que en teoría toma entre 8 y 10 años en que las células se malignicen a un cáncer. Por lo que la gastritis crónica atrófica se considera el primer paso en la histogénesis del cáncer gástrico, asociada hasta en un 80% a *Helicobacter pylori* como causa etiológica del proceso inflamatorio que dio origen a la gastritis crónica.

Desafortunadamente el Cáncer Gástrico es diagnosticado en etapas avanzadas, con una tasa de sobrevida muy baja y una mala calidad de vida.

En la actualidad el diagnóstico de Cáncer Gástrico se realiza por endoscopia con toma de biopsia la cual sigue siendo el estándar de oro y a pesar de contar con marcadores tumorales TAG-72, CA-19.9 y CEA, estos no son específicos de la enfermedad, también existen estudios que reportan la relación de Pepsinógeno, Gastrina, y anticuerpos contra *Helicobacter Pylori* que diagnostican la atrofia de la mucosa gástrica pero no a este cáncer.

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES GENERALES

Gastritis Crónica

La gastritis crónica (GC) es una patología común, se estima que más de la mitad de la población en cierto grado tiene esta enfermedad. La gastritis es conocida desde el siglo XX, en 1982 después del descubrimiento de *Helicobacter pylori* por Warren y Marshall dejan en claro que es la causa de gastritis en la mayoría de los casos (1). “*Helicobacter pylori* es una bacteria Gram-negativa que coloniza el tracto gastrointestinal de los humanos, principalmente la mucosa gástrica en el 80% de la población infectada, esta bacteria produce inflamación crónica de la mucosa gástrica con curso asintomático que puede evolucionar a gastritis crónica, metaplasia intestinal, displasia y finalmente a cáncer gástrico” (2).

a. Definición

Inflamación de la mucosa gástrica con infiltrado inflamatorio crónico de células mononucleares (Gastritis a largo plazo-crónica) (3).

b. Epidemiología

Se reporta, que a nivel mundial el 50% de la población en general, está infectada con la bacteria *Helicobacter pylori*, El bacilo se reconoce como la causa principal de gastritis atrófica, úlcera gástrica y duodenal así como cáncer gástrico de tipo intestinal. La OMS lo ha considerado, como carcinógeno tipo 1, en humanos. Se estima que el 40.6% de la población infectada con *H. pylori*, presenta indigestión y el 25% alguna vez al menos acidez y regurgitación. (4).

En México el 80% de la población sufre de gastritis (4). El mayor porcentaje son mujeres con un 66.86% con una incidencia de 2, 269.67 mientras que en los hombres fue de 34.14% y una incidencia de 1, 238.12 ambas por 100,000 habitantes

(3). En el lugar de úlceras, gastritis y duodenitis ocupó en el 2014 el cuarto lugar de morbimortalidad con un número de casos 1, 497, 802 (5). En el 2017 se reportan 390, 916 nuevos casos siendo la Secretaría de Salud quien reporta más casos nuevos, 139, 888 casos y el Estado de México el que mayor incidencia presenta con 15, 221 casos reportados (6).

Se estima que el gasto total de salud en el 2013 fue de 17.9 mil millones de dólares para Secretaría de Salud y 16.1 mil millones de dólares para el Instituto Mexicano del Seguro Social de los cuales la gastritis absorbe el 5% del presupuesto por institución (7).

c. Factores de riesgo

La gastropatía crónica es un padecimiento de etiología multifactorial en la que se pueden distinguir factores de riesgos endógenos y exógenos.

Factores de riesgo endógenos: edad avanzada, historia de úlcera péptica, género masculino (3), jugo gástrico con pH mayor o igual a 3 (8).

Factores de riesgo exógenos: la infección por *Helicobacter pylori* es la principal causa (9), empleo prolongado de Antiinflamatorios No Esteroideos (AINES) como la aspirina (10), ingesta de bebidas alcohólicas (11), consumo abundante de cereales, grasas, escaso consumo de vegetales e incorporación de sal a los alimentos posterior a la cocción (12).

d. Fisiopatología

I. Anatomía

El estómago es una dilatación del conducto alimentario entre el esófago y el intestino delgado, tiene una forma de “J”, puede albergar 2 a 3 litros de alimento, tiene cuatro partes. (13)

- **Cardias:** la primera parte es la más cercana al esófago.
- **Fondo:** la parte superior del estómago próxima al cardias.

- **Cuerpo:** la parte principal del estómago, entre las partes superiores e inferiores.
- **Antro:** la parte inferior (cercana al intestino), donde se mezclan los alimentos con el jugo gástrico.
- **Píloro:** la última parte del estómago que actúa como una válvula para controlar el vaciado del contenido del estómago en el intestino delgado (Figura 1) (14).

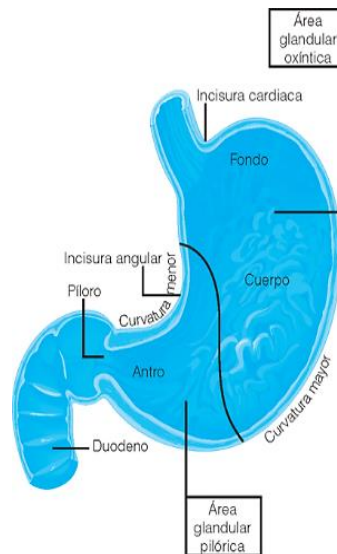


Figura 1. Partes del estómago.

Cardias, fondo, cuerpo, antro y píloro.

(Tomado de <https://accessmedicina.mhmedical.com/Content.aspx?bookId=1478§ionId=102880240>)

Se encuentra inervado por ramas del nervio neumogástrico, nervio vago, plexo de Meissner y plexo de Auerbach, irrigado por el tronco celiaco y sus ramas, un retorno venoso por las venas gastroepiploica izquierda, vena coronaria estomacal, vena pilórica afluentes de la vena porta y un sistema linfático (Figura 1.1) (15)

II. Histología

Histológicamente el estómago se encuentra estructurado por una túnica mucosa forma numerosos pliegues (arrugas gástricas), que desaparecen cuando se llena el

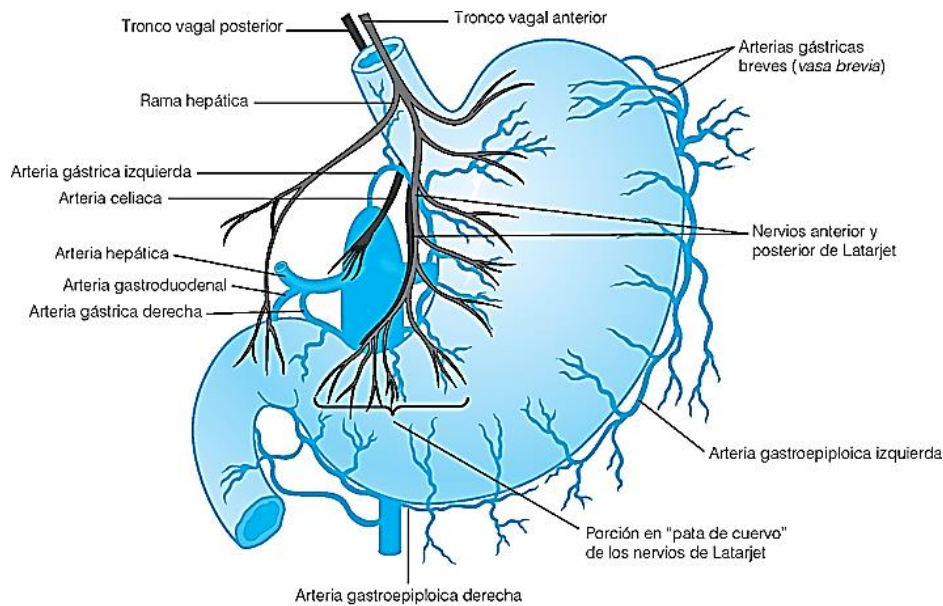


Figura 2. Arterias y nervios parasimpáticos del estómago.

(Tomado de <https://accessmedicina.mhmedical.com/Content.aspx?bookId=1478§ionId=102880240>)

estómago, se caracteriza por una red de surcos bajos que divide la mucosa en

áreas gástricas, en cada área existen pequeños orificios con forma de embudo (fovéolas gástricas), en el interior de las fovéolas gástricas se encuentran las glándulas gástricas las cuales son distintas en las partes del estómago por lo que se describen tres zonas de membrana mucosa (figura 1.3) (16).

- Glándulas cardiales: alrededor del cardias.
- Glándulas corpofúndicas: se encuentran en el cuerpo y el fundus.
- Glándulas pilóricas: contiene casi una tercera parte del estómago del píloro hasta la curvatura menor, secretan mucina para protección de la mucosa gástrica (17).

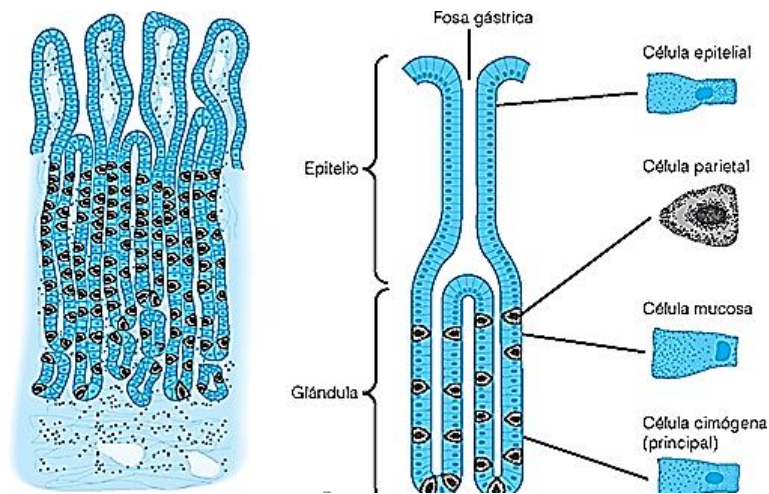


Figura 3. Histología de capa mucosa del estómago.

(Tomado de <https://accessmedicina.mhmedical.com/Content.aspx?bookId=1478§ionId=102880240>)

La túnica mucosa: contiene epitelio superficial cilíndrico simple alto que se distingue por un epitelio apical lleno de gránulos de secreción, aparato de Golgi bien desarrollado que secretan mucina viscosa de varios micrómetros de espesor y bicarbonato que se une a la mucina para alcalinizarlo y actué como amortiguador frente al ácido clorhídrico como función protectora creando un punto neutro (barrera de mucosa gástrica), a nivel del cuerpo y el fondos encontramos 5 tipos de células corpofúndicas (16).

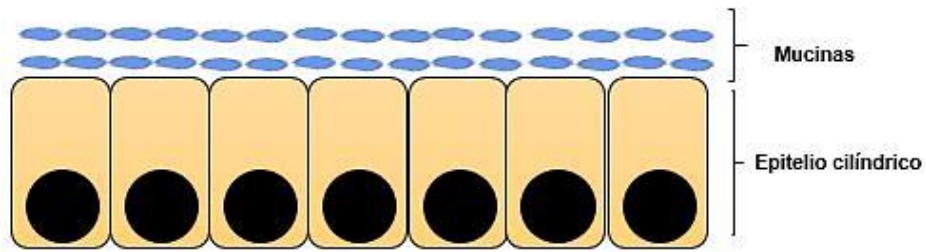


Figura 4. Túnica Mucosa.

Representa epitelio superficial cilíndrico, capa interna de mucinas adherida al epitelio cilíndrico y otra que se desprende con los alimentos.

La capa mucosa está dispuesta en dos capas: la capa interna también denominada moco visible, forma un recubrimiento gelatinoso con alta concentración de bicarbonato para mantener un pH neutral (7.0), que confiere protección a la mucosa, las moléculas de mucina en esta capa se entrelazan por puentes disulfuro confiriéndole una consistencia altamente viscosa, la capa externa o moco soluble es menos viscosa debido a la falta de enlaces disulfuro entre las moléculas de mucina, esta capa se encarga de la liberación constante de óxido

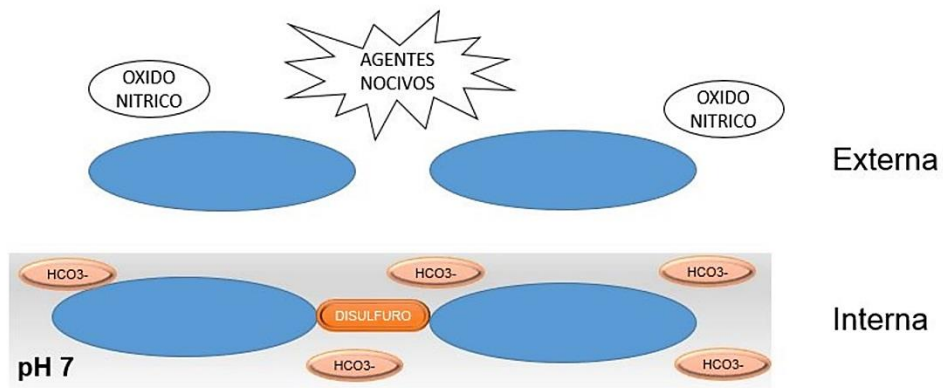


Figura 5. Moco gástrico.

Dispuesto en dos capas una interna adherida al epitelio, viscosa debido a los puentes disulfuro entre las moléculas de mucina, con pH neutro y una capa externa que no cuenta con puentes disulfuro la cual se desprende mezclándose con los alimentos y agentes tóxicos.

nítrico y de la unión constante de agentes nocivos se mezcla con los alimentos y se desprende (18).

- Células principales: más abundantes de tipo seroso, basofilia en la porción basal y gránulos de zimógeno apical que contienen pepsinógeno que al secretarse es activada por el ácido clorhídrico a pepsina, la pepsina escinde las proteínas a compuestos más simples. Figura 1.3 (16)
- Células parietales: grandes y redondeadas, con núcleo redondo y central con gran cantidad de mitocondrias, expresan receptores H3, M3, CCK2 y sst2, secretan pepsinógeno y ácido clorhídrico con un pH de hasta 0.8 que elimina casi todas las bacterias que ingresan con los alimentos, también secreta la glucoproteína “factor intrínseco” sirve para la absorción de vitamina B₁₂. (19).
- Células mucosas del cuello: están insertadas entre las células parietales son cilíndricas bajas con núcleo basal con un aparato de Golgi bien desarrollado, son productoras de mucina que su función es proteger la membrana mucosa (16).
- Células endocrinas: pertenecientes al sistema endocrino por lo regular solitarias productoras de hormonas.
 - Células G: se encuentran en el antro, son productoras de gastrina producida en el cromosoma 17 que se libera por exocitosis a la circulación sanguínea, estimula la secreción de ácido clorhídrico al unirse a los receptores CCK2 de las células parietales y células ECL que favorece al mantenimiento y crecimiento de la mucosa. Su estimulación depende del contenido de la luz del estómago, su distensión y pH gástrico, un pH alto estimula su secreción y un pH bajo lo inhibe (19).
 - Células D: productoras de somatostatina que cuya función es la de inhibir la producción de gastrina, se encuentran en

las glándulas pilóricas y en las glándulas corpofúndicas.
(16)

- Células ECL (células similares a las enterocromafines): se encuentran en las células corpofúndicas y secretan histamina, que estimula la secreción de ácido clorhídrico. Estas células son estimuladas por la gastrina y acetilcolina
(17).

- Células madre pluripotenciales: se encuentran en el istmo de las glándulas, son cilíndricas o cúbicas sin gránulos, su número es reducido, sufren mitosis creando células que se diferencian los otros tipos de células ya mencionadas.

Lámina propia: se compone de tejido conectivo muy rico en células (linfocitos y células plasmáticas), se pueden formar folículos solitarios principalmente en la porción pilórica.

Lamina muscular de la mucosa: compuesta por una capa circular interna y una capa longitudinal externa.

Túnica submucosa: compuesta de tejido conectivo contiene vasos (sanguíneos y linfáticos) y el plexo nervioso de Meissner.

Túnica muscular: compuesta por tres capas externa, intermedia e interna se encuentra el plexo de Auerbach y del nervio vago.

Túnica serosa o también peritoneo: recubre el estómago (16).

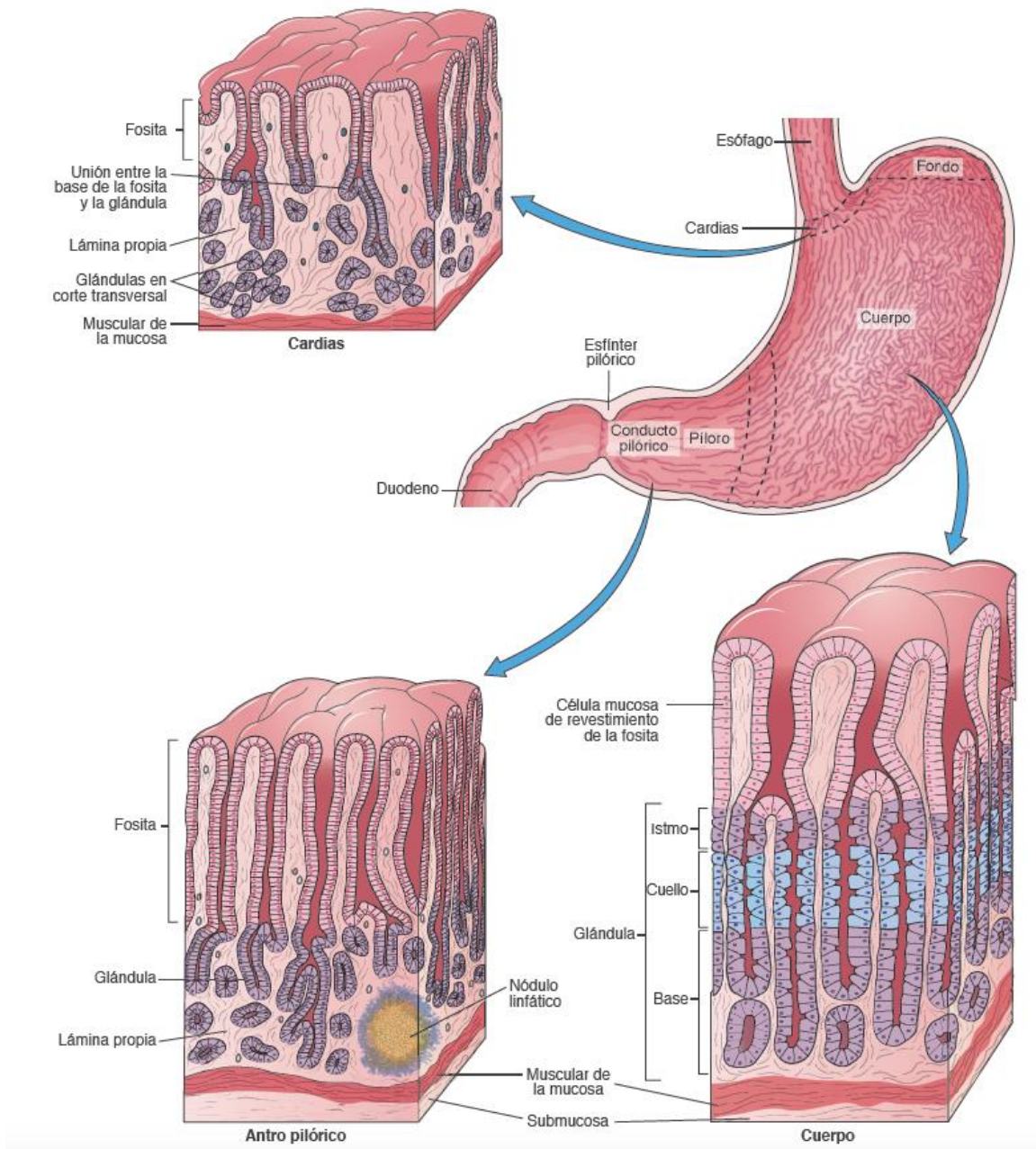


Figura 6. Regiones del estómago y estructura histológica.

(Tomado de <http://www.proxydgb.buap.mx:2089/visorebookv2/ebook/9786079356682#>
 {"Pagina": "289", "Vista": "Indice", "Busqueda": ""})

III. Fisiología

Una de las funciones de la cámara gástrica es la trituración de partículas sólidas junto con enzimas digestivas y ácido gástrico. Cuando se ingiere un alimento este pasa a través del esfínter esofágico inferior iniciando la fase I también llamada quiescencia motora, seguida de la fase II que culmina con contracciones fásicas ininterrumpidas, cada ciclo tarda 1 a 2 horas que se distingue por patrones de motilidad en regiones específicas, el fondo y el cardias generan contracciones tónicas que pueden mantenerse durante minutos y horas, el cuerpo distal y antro exhiben actividad motora fásica, con ciclos de contracción (despolarización) y relajación (polarización) de ondas lentas con duración de segundos, cabe mencionar que el sistema nervioso central juega un papel importante, el estrés mental, el hambre aumenta la actividad motora fásica, el miedo y la depresión reducen las contracciones gástricas así como el frío y la isquemia.

La secreción ácida se divide en tres fases cefálica, gástrica e intestinal, en la fase cefálica es activada con la simple imaginación, oler, probar y la percepción visual de la comida, la fase gástrica es el resultado del efecto químico de los alimentos y la distensión gástrica, la gastrina es el mediador principal de esta fase, la fase intestinal secreta la menor cantidad de ácido; los distintos alimentos pueden estimular (proteínas y aminoácidos) e inhibir (carbohidratos y grasas) la secreción de ácido que está regulada mediante la interacción de señales endocrinas, paracrinas y neurocrinas por tres vías mensajeras principales: gastrina-histamina, CCK-somatostatina y neural. La gastrina es liberada por las células G actuando en los receptores CCK2 de las células ELC, estimulando la producción de segundos mensajeros como el fosfatidil inositol y el calcio, activando la pKC y aumentando la expresión de ARNm de la histidin carboxilasa (HDC), liberando histamina que actúa en los receptores H2 de las células parietales estimulando la secreción de ácido. La CCK actúa en los receptores CCK1 de las células D que liberan somatostatina que inhibirá las células G, los ELC y las células parietales, los receptores sst2 inhiben la vía gastrina-histamina. La ACh actúa en los receptores M3 de las células parietales estimulando la producción de ácido y en, M2 y M4 de las células D para inhibirla.

También cabe mencionar que la adrenalina actúa sobre los B2 de las células ELC movilizando histamina.

Las células epiteliales secretan moco constituido principalmente glicoproteínas, mucinas y agua, en el estómago se han identificado distintos tipos de mucinas, la MUC5AC que compone ambas capas secretada por las células mucosas superficiales, MUC6 por las células del cuello y MUC1, MUC4, MUC16 cuyo rol está ligado a señalización de transducción y adhesión, el moco está dispuesto en dos capas una externa que se encarga de la unión con agentes nocivos, nitritos así como liberación constante de NO, esta primera capa se mezcla y desprende con los alimentos, la otra capa es interna firmemente adherida al epitelio y su remoción dañaría el epitelio manteniendo un pH neutral (pH yuxtamucosal), disminuye la difusión retrógrada de iones hidrógeno y mantiene el bicarbonato secretado por epitelio. El pepsinógeno secretado por las células peptídicas y mucosas de las glándulas gástricas es una enzima proteolítica muy activa a un pH 1.8 -3.5 pero inactiva a un pH 5, estimulada por péptidos. El factor intrínseco producido por las células parietales junto con la secreción de HCL es esencial para la absorción de B12 o cobalamina, la cobalamina se une al factor intrínseco para posteriormente ser absorbido en la mucosa ileal (20).

IV. Patogenia

El daño de la mucosa gástrica es dependiente del proceso inflamatorio crónico de la mucosa debida a factores endógenos y exógenos, estos juegan un papel importante en la pérdida de la primera capa de defensa, las mucinas que a través de la hipersecreción de HCL produce daño en las células parietales, lo que conlleva a pérdida del equilibrio epitelial gástrico, produciendo la liberación de citosinas con acción pro-inflamatoria (IL1-IL6-IL-8-TNF alfa) activando la respuesta inmune innata (Th1), que al ser liberadas en la circulación inducen la liberación de histamina, vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, estimulación y proliferación

de células inmune a si como señalizaciones para adherencia y reclutamiento de las mismas (21).

Las células M son especialistas en trasladar de un lado a otro antígenos desde la luz intestinal hasta la lámina propia, permite que células inmunes fagociten al antígeno, formen el fagolisosoma para posteriormente ingresen al antígeno en los sitios inductivos y efectores del GALT, para llevar a cabo la presentación de antígeno a los linfocitos T y B e iniciar la respuesta inmune adaptativa, estimulando a los linfocitos Th0 que pueden diferenciarse en T cooperadores de respuesta inmunológica Th1 promovida por IL12 (Respuesta celular) o Th2 promovida por IL4 (Respuesta inmune humoral).

Si el proceso inflamatorio continua, se produce el daño al tejido endotelial que la convierte en célula diana o blanco para los linfocitos T citotóxicos por la molécula de histocompatibilidad clase I, el daño producido ocasiona el paso de antígenos a través de este hacia la lámina propia, las células dendríticas detectan los antígenos que han logrado atravesar esta primera barrera de defensa, fagocitan el antígeno, lo degradan y lo presentan a los linfocitos B y linfocitos T a través de la Molécula de Histocompatibilidad clase II, la respuesta inmune específica y no específica ataca al agente causal, este proceso dinámico produce defensa y lesión al tejido gástrico (22).

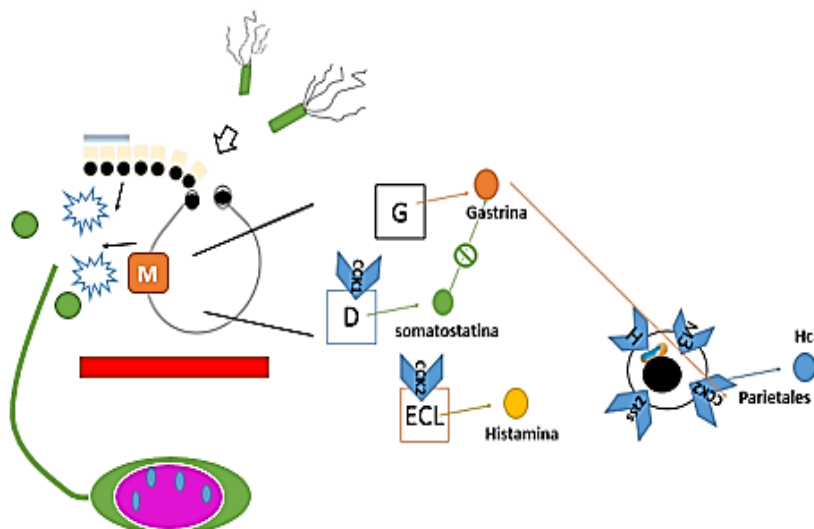


Figura 7. Generalidades de la fisiología del estómago.

Al inicio del daño las células G se producen gastrina, sobreestimulando las células parietales en la secreción de HCL, conforme el daño endotelial se desarrolla las células G son inhibidas por la somatostatina y IL beta lo que retarda el vaciamiento gástrico (23).

e. Cuadro Clínico

El cuadro clínico puede incluir: malestar o dolor de estómago, eructos, náuseas, hemorragia abdominal, vómitos, plenitud gástrica, ardor en el estómago, sangre en vómito (hematemesis) y en heces (melena) (4).

De lo anterior mencionado las complicaciones en “frecuencia de aparición de melena o hematemesis es en personas con ingesta crónica de AINES siendo del 0.8% al 18% dependiendo de factores de riesgo asociados y dosis del medicamento” (3).

f. Clasificación

La gastritis crónica se puede clasificar de acuerdo a su etiología, morfología, presentación y topografía.

Por su etiología se clasifica dos tipos:

Gastritis del tipo A: Alteraciones inmunológicas (con el 5% de los casos, es la gastritis crónica más infrecuente); afecta principalmente al cuerpo del estómago (fundus).

Gastritis del tipo B: Bacteriana (con el 85% de los casos, es la más común de las gastritis crónicas) por lo general está causada por la bacteria *Helicobacter pylori*; afecta principalmente a la parte del estómago anterior al píloro (antro) (4).

Basada en la morfología:

La clasificación se basa en la pérdida de glándulas propias de la mucosa gástrica esta definición incluye dos fenotipos de atrofia:

- Pérdida completa de las unidades glandulares sin modificación de las células nativas, que es remplazada por una extensión fibrótica de la lámina propia.
- Reemplazo por glándulas metaplasicas:
 1. Metaplasia que expresa polipeptidos espasmolíticos (SPEM), compromiso morfológico de glándulas tipo pilórico.
 2. Metaplasia intestinal es la sustitución del epitelio glandular por epitelio intestinal asociada a mayor riesgo de Cáncer Gástrico. (24)

De acuerdo a sus características histológicas la metaplasia intestinal se ha subtipificado:

- Tipo I: incompleto o de intestino delgado.
- Tipo II: completo o de tipo colonico
- Tipo III: completo o de tipo colonico presenta sulfocinas en el epitelio columnar considerado como el subtipo con el mayor riesgo de transformación neoplásica. (24)

Clasificación basada en función de la presentación:

- Crónica: puede clasificarse por el tipo de infiltrado y daño de la mucosa.
Por el tipo de infiltrado:
 - Activa: Infiltrado linfocitario, células plasmáticas y presencia de polimorfonucleares.
 - Inactiva: caracterizada por un infiltrado linfocitario y células plasmáticas.

Por el daño a la mucosa:

- Superficial: el infiltrado compromete la zona superficial de la lámina propia entre las criptas de las foveolas hasta los cuellos glandulares sin compromiso de las glándulas gástricas.
- Profunda: el infiltrado compromete la lámina propia en toda su extensión.

Clasificación de Sydney

Correlaciona el aspecto endoscópico topográfico, topológico, etiología y morfológico del estómago:

Gastritis Crónica no atrófica o Difusa: predominio antral, causada por *Helicobacter pylori* la mayoría de los casos, sin molestia con endoscopia normal y diagnóstico establecido por histología. También es conocida como: Superficial, gastritis difusa antral, gastritis crónica antral, intersticial-folicular, hipersecretora.

Gastritis Crónica Atrófica Corporal Difusa o Autoinmune: multifocal, poco frecuente, relacionada a anemia perniciosa, en la endoscopia se puede observar borramiento de los pliegues gástricos y adelgazamiento de la mucosa del fundus. También es conocida como tipo A.

Gastritis Atrófica multifocal: multifactorial (genéticos, *Helicobacter pylori*, ambientales), en la endoscopia la mucosa se encuentra pálida, superficie brillante y vasos submucosos prominentes, pudiera existir metaplasia por lo que es considerado como riesgo para la displasia y posteriormente cáncer. Los componentes de este tipo de gastritis, están relacionados a anticuerpos contra células parietales y a la absorción deficiente de vitamina B12. Existe mayor riesgo de adenocarcinoma (25).

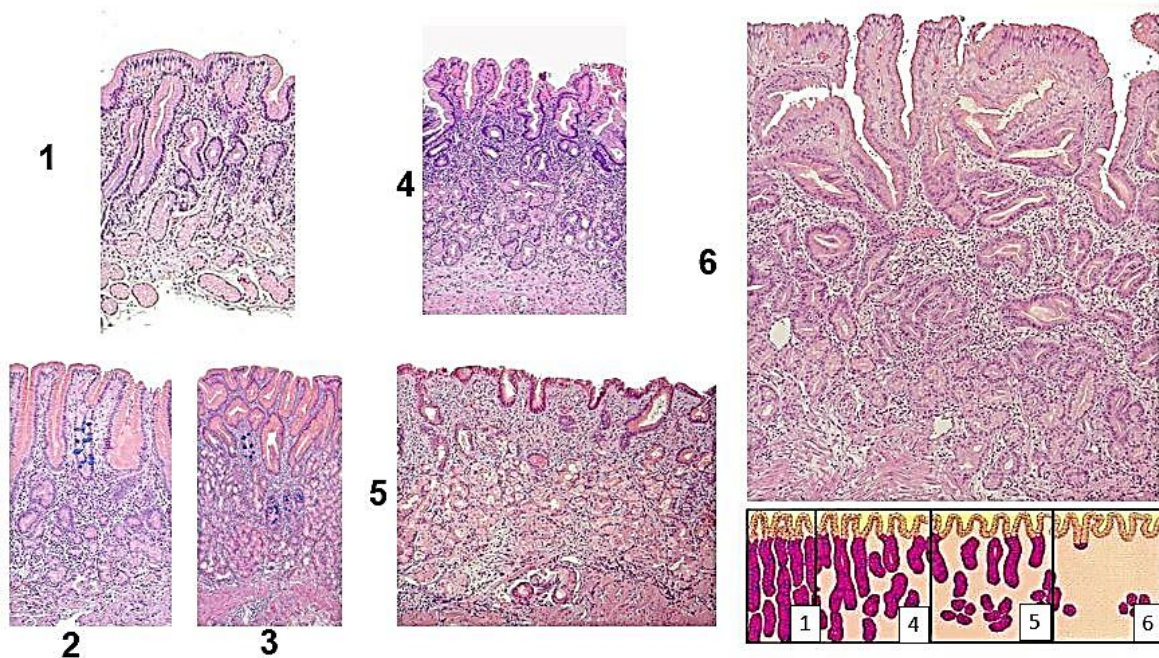


Figura 8. Mucosa gástrica.

1.- Sin evidencia de atrofia. 2.- Mucosa del cuerpo con sustitución metaplásica focal del epitelio superficial por células caliciformes y enterocitos, no afecta la unidad glandular completa. 3.- Mucosa de cuerpo con sustitución metaplásica que afecta a una unidad glandular completa grado leve de atrofia. 4.- Mucosa antral atrofia no metaplásica de grado leve. 5.- Atrofia no metaplásica de grado moderado mucosa de cuerpo. 6.- Atrofia no neoplásica de grado severo de mucosa de cuerpo.

(Tomado de http://www.conganat.org/7congreso/trabajo.asp?id_trabajo=521)

Clasificación basada en criterios etiológicos endoscópicos y patológicos.

De acuerdo a estos factores se clasifican en tres categorías:

- a) Gastritis erosivas o hemorrágicas: consideradas sin componente inflamatorio pero con daño epitelial o endotelial, causa más común son las drogas (AINES) con acción local o directa que produce daño metabólico de la célula gástrica, estrés e hipertensiva portal debida a ectasia o congestión vascular

de capilares y vénulas en la mucosa y submucosa del estómago causa 10-25% de sangrados.

- b) Gastritis no erosiva o no específica: algunos casos por endoscopia son normales pero histológicamente se demuestra un componente inflamatorio. La causa más prevalente es la infección por *Helicobacter pylori*, y en mucho menor prevalencia gastritis autoinmune, biliar, linfocítica y no específicas.
- c) Gastritis de tipo específico: incluye un grupo variado de entidades, bacterias, virus, parásitos, micóticos, granulomatosa, colagenósica, eosinofílica, hipertrófica y úremica (25).

g. Diagnostico

El diagnostico se realiza por métodos invasivos y no invasivo.

Diagnostico invasivo

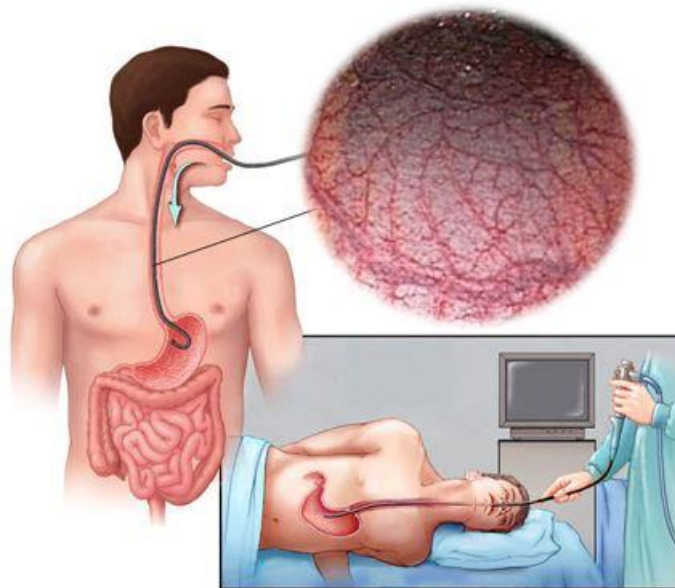


Figura 9. Endoscopia Gastritis Crónica Atrófica.

Mucosa adelgazada, con disminución de glándulas.

(Tomado de https://www.gastrointestinalatlas.com/espanol/gastritis_cronica.html)

- Diagnostico por endoscopia: se observan hallazgos asociados a esta entidad como lo son edema, eritema, mucosa hemorrágica, punteados hemorrágicos, fiabilidad, exudados, erosiones, nódulos, pliegues hiperplasicos, signos de atrofia de la mucosa como vasos submucosos con aplanamiento y visualización de metaplasia como placas blanquecinas (26).
- Diagnostico histológico: es el segundo método de diagnóstico apoyado por el sistema de Sydney actualizado que recomienda 5 biopsias de máximo 5 um; dos del antro (27), una de la incisura y dos del corpus la cual se tipifica por la expresión de mucina, la Tipo I (completo) es positiva a sialomucina, Tipo II (incompleto) positiva para sialomucina en copa y columna y la Tipo III (incompleto) es positiva para la sulfomucina (28) .
- Diagnostico por laboratorio: se realiza para determinar la causa a partir de la toma de biopsias se puede realizar prueba de ureasa rápida, cultivo para Helicobacter pylori (29), y la determinación serológica de IgG (25).

Diagnostico no invasivo:

- Diagnóstico clínico: debido a la presencia síntomas como ardor, molestia postprandiales en epigastrio, llenadura precoz, nauseas, distensión abdominal, dispepsia y melena (25).
- Biomarcadores: GastroPanel es un método diagnostico diseñada por Biohit Oyj. a finales de 1990 como la primera prueba serológica no invasiva es una ELISA que incluye 3 marcadores de mucosa atrófica PGI (pepsinógeno I) y PGII (pepsinógeno II) para el corpus; G-17 (gastrin-17) para el antro combinada con anticuerpos IgG contra Helicobacter Pylori, con una sensibilidad del 53.8% y especificidad del 93.9% para Gastritis atrófica crónica 70.2% y la Gastritis atrófica aguda una sensibilidad del 53.8% y una especificidad del 84.1% (30).

Gastrin-17 es una proteína secretada específicamente por las células G antrales, se sugiere que su nivel sérico puede reflejar la severidad de

la atrofia antral por método ELISA con una sensibilidad 48% y una especificidad 73% para la detección de gastropatía atrófica (31).

Pepsinógeno II como marcador de Gastritis del Cuerpo, el pepsinógeno II se produce en todas las células de la mucosa gástrica y el aumento a nivel sérico se correlaciona con la detección de Gastritis atrófica que en relación con *Helicobacter pylori* se asocia a cáncer gástrico (32).

h. Tratamiento

El tratamiento de la gastritis crónica se establece de acuerdo a la etiología en farmacológico y no farmacológico.

Tratamiento farmacológico

Helicobacter pylori

El tratamiento consiste en su erradicación con los diferentes esquemas establecidos:

- Terapia triple: como primera opción: Inhibidores de la bomba de protones omeprazol 20 mg cada 24 horas por 4 a 12 semanas o pantoprazol 20 mg cada 24 hrs por 4 a 12 semanas más claritromicina 500 mg cada 12 horas por 14 días más amoxicilina 1000 mg cada 12 horas por 14 días, en la actualidad es la terapia más empleada.
- Terapia cuádruple: como primera opción Inhibidores de la bomba de protones omeprazol 20 mg tabletas 20 mg cada 24 horas por 4 a 12 semanas o pantoprazol 20 mg tabletas 20 mg cada 24 hrs por 4 a 12 semanas más bismuto 120 ml cada 6 horas por 14 días más metronidazol más claritromicina 500 mg cada 12 horas por 14 días.
- Para cepas resistentes a metronidazol o amoxicilina: Tetraciclina 500 mg cada 6 horas por 14 días (33).

- Terapia cuádruple con levofloxacino y bismuto: Inhibidor de bomba de protones en dosis estándar cada 12 horas por 14 días más amoxicilina 1 gramo cada 12 horas por 14 días más subcitrato de bismuto 240 mg cada 12 horas por 14 días.
- Terapia triple con levofloxacino: Inhibidor de bomba de protones dosis estándar cada 12 horas más amoxicilina 1 gramo cada 12 horas más levofloxacino 500 mg cada 24 horas por 10 días.
- Terapia triple con rifabutina: Inhibidor de bomba de protones dosis estándar cada 12 horas más amoxicilina 1 gramo cada 12 horas más rifabutina 150 mg cada 12 horas por 10 días (34).
- Cosme et al; en el 2015 con población española evaluó la terapia cuádruple sin bismuto por 5 años en 118 pacientes con duración de 10 días con omeprazol 20 mg cada 12 horas erradicando a *Helicobacter pylori* en un 87% que al asociarlo con tratamiento guiado por antibiograma la erradico en un 94% (35).

Gastritis por AINES:

Deben ser tratados sintomáticamente con sucralfato 1gr 4 veces por día, antagonistas de receptores H₂ (ranitidina 150 mg 2 veces por día) o inhibidores de la bomba de protones (omeprazol 20mg cada 24 horas por 14 días) más retiro, reducción, administración del medicamento con alimentos.

Gastritis alcohólica:

Su tratamiento consiste en el uso profiláctico de antagonistas de los receptores H₂ o inhibidores de la bomba de protones por vía oral.

Gastritis por hipertensión portal:

Se indica propanolol o nadolol que reduce la incidencia de sangrado en aquellos pacientes que falla el uso de propanolol el procedimiento es la descompresión portal (25).

Cada tratamiento en las diferentes etiologías va dirigido a la enfermedad de fondo.

Tratamiento no farmacológico

Modificar el estilo de vida evitando ayunos prolongados, comidas abundantes, situaciones que produzcan estrés, automedicación, consumo de tabaco, café, bebidas carbonadas y alcohólicas seguir un plan nutricional, control de peso y al dormir elevar la cabecera de la cama de 5 a 10 centímetros. (33).

i. Complicaciones

Existen diferentes complicaciones de gastritis crónica, dentro de las complicaciones más importantes se encuentran:

- Enfermedad Ulcerosa Péptica (36).
- Atrofia de la mucosa y metaplasia intestinal.
- Gastritis quística.
- Displasia.
- Metaplasia.
- Cancer (37).

Cáncer Gástrico

El cáncer gástrico se desarrolla de manera progresiva a partir de una respuesta inflamatoria crónica condicionando la evolución a gastritis crónica, gastritis atrófica crónica, con inducción de alteraciones genéticas evolucionando a metaplasia intestinal a displasia y carcinoma (37).

a) Definición

El cáncer gástrico es un tipo de crecimiento tisular maligno producido por la proliferación contigua de células anormales con capacidad invasiva y destrucción de otros tejidos y órganos, que en sus formas metastásicas, pueden infiltrar los vasos linfáticos, diseminarse a ganglios linfáticos y penetrar en la circulación sanguínea para diseminarse a cualquier órgano del cuerpo (38).

b) Epidemiología

El cáncer gástrico ocupa el cuarto lugar de mortalidad a nivel mundial con 754 000 defunciones (39). En México es la quinta causa de muerte con 6 065 defunciones con una tasa de mortalidad (10^5), la mortalidad por servicio de salud el seguro popular tiene 7.1%, Secretaria de Defensa Nacional el 7.1%. Los estados con mayor mortalidad son Chiapas 8.1, Oaxaca 7.3, Ciudad de México 6.8, Guerrero 6.6 y Morelos 6.5 (40).

c) Factores de Riesgo

El cáncer gástrico se considera una entidad multifactorial. La edad mayor de 55 años, sexo masculino, el consumo de tabaco e infección con *Helicobacter pylori*, gastritis atrófica crónica en el cuerpo del estómago, metaplasia intestinal tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico (38).

Existe evidencia que permite definir una dieta con bajo consumo de frutas, hortalizas no feculadas, vegetales, leguminosas, alto consumo de sal, chile, carnes procesadas, alimentos ahumados, alimentos de origen animal asados (41).

d) Patogenia

La inflamación crónica activa de la mucosa gástrica, lesiona la infiltración de la mucosa gástrica por tejido linfoide y células del sistema inmune, así como el daño a las células de arquitectura gástrica, produciendo daño por metilación del ADN de las células del tejido endotelial, afectando la homeostasis celular, en diferentes niveles, modificando mecanismos reguladores del ciclo celular (P53), maduración y proliferación (HER 1-HER 2) y proteínas de adhesión (E-caderina) (42).

La pérdida de células supera la regeneración normal de la mucosa esta se adelgaza produciendo atrofia multifocal característicos de la gastritis que progresan a anomalías arquitectónicas más avanzadas, reemplazo de tejido conectivo sin metaplasia o reemplazo con presencia de glándulas inapropiadas para su ubicación (metaplasia) ambos eventos pueden coexistir, la atrofia y la metaplasia, considerados como condiciones precancerosas más mutaciones progresivas evolucionando a adenocarcinoma (37).

Cuadro clínico

El cáncer gástrico que solo compromete la mucosa o submucosa va a ser asintomático en el 80% de los casos, el 20% restante, tiene síntomas inespecíficos, algunas veces se presentan náuseas, anorexia o saciedad precoz. La hemorragia digestiva alta o pérdida de peso significativa se va a presentar en menos del 2% de los casos precoces. En etapas avanzadas, la sintomatología se hace presente en la mayoría de los casos, el dolor abdominal y la baja de peso se va a encontrar en al menos el 60% de los casos. También suelen presentar náusea, anorexia, vómitos, anemia, saciedad precoz, disfagia, hemorragia digestiva (43).

e) Clasificación

La clasificación más utilizada es la de Laurén, que reconoce dos tipos básicos de tumor:

- Cáncer tipo difuso: es aquel que crece en forma de células sueltas, aisladas, formando glándulas que se asemeja en forma a un cáncer de colon, es más agresivo es pacientes jóvenes, tiende más hacia la carcinomatosis peritoneal que se detecta más frecuentemente en estadios III y IV.
- Cáncer tipo intestinal: es el más frecuente en estadios I y II tiende a la metástasis hematógena más que a la diseminación peritoneal y es característicamente también el que se presenta como secundario a factores ambientales (44).

f) Diagnóstico

Desafortunadamente el diagnóstico se hace cuando la enfermedad ya está avanzada, solo el 15% de los pacientes se diagnostican en etapas tempranas debido a que el cuadro clínico se presenta en etapas avanzadas (44).

El ultrasonido endoscópico tiene una precisión en cuanto a extensión del tumor, principalmente en enfermedad regional, y una sensibilidad de hasta 91% y una especificidad de 84% y la predicción de poder extirpar con una sensibilidad de 94% y una especificidad 83%, la Tomografía computarizada con hallazgos quirúrgicos puede subestadificar un 32% de los casos y 4% sobreestadificar, el ultrasonido

abdominal varia su sensibilidad 12.2 a 80% y especificidad 56.3 a 100%. La sensibilidad. La sensibilidad y especificidad para el estudio PET/TC fue de 54.7% y 92.2% (45).

Cabe mencionar que en las Guías de Práctica Clínica se establece que el estándar de oro para el diagnóstico del cáncer se realiza por endoscopia con toma de biopsia (38).

g) Tratamiento

Al igual que en todos los tipos de cáncer, la elección del tratamiento va a depender de tres puntos primordiales:

- **Factores dependientes del paciente:** edad, estado general, situación nutricional y comorbilidades.
- **Factores dependientes del tumor:** Localización del mismo, estadio, tipo de tumor y la existencia o no de metástasis.
- **Factores dependientes del tratamiento:** tipo de cirugía, tolerancia y eficacia de la quimioterapia y/o radioterapia así como el riesgo beneficio que ofrece el tratamiento (38).

Una vez establecidos y clasificados los puntos anteriores, se determinara el tratamiento de elección para el paciente.

- Mucosectomía: se recomienda realizar endoscópicamente cuando el médico endoscopista cuente con la experiencia solo en lesiones menores de 30 mm.
- Cirugía: puede disminuir la mortalidad entre un 20 y un 36% con soporte nutricional adecuado con una recurrencia del 50%.
 - Regional: basada en linfoadenectomía la cual la sociedad japonesa tiene resultados controvertidos, la serie holandesa

reporto que la clasificación japonesa no ofrece beneficio en la supervivencia.

- Laparoscópica: esta técnica de abordaje inicia a principios de los 90, se tiene registro que el procedimiento abierto y el laparoscópico en estadios T2N1 se obtuvieron los mismos resultados.
 - Cirugía multiorganica: en consideración de presentación avanzada y conocimiento de mal pronóstico se ha llevado una serie de cirugías más extendidas para incrementar la supervivencia en el cual se han reportado buenos resultados.
 - Quirúrgico en el peritoneo: el objetivo es incrementar la supervivencia, esta puede incrementar la supervivencia en un 13% a cinco años comparada con la cirugía convencional.
 - Paliativa: tiene mejores resultados que no operar a los pacientes (45).
- Quimioterapia: con el esquema de McDonald mostro un beneficio en la supervivencia del 24% (43).

Marcadores Tumorales

Los marcadores tumorales, también conocidos como marcadores biológicos o biomarcadores no son nuevos en la práctica médica, su conocimiento se remonta a mediados del siglo XIX, cuando Henry Bence-Jones informó la precipitación de una proteína en la orina acidificada de un paciente con mieloma múltiple, descubriendo el primer marcador tumoral, llamada proteína de Bencen-Jones (46), que desde ese momento surgen nuevas proteínas como la gonadotropina coriónica (47), fosfatasa alcalina (48), 1963 se descubrió la alfafetoproteína como marcador de hepatocarcinoma (49), 1975 Köhler y Milstein descubren los anticuerpos monoclonales que abren nuevas metodologías terapéuticas (50).

a) Definición.

Los marcadores tumorales se definen como una sustancia, una molécula que se altera cuantitativa o cualitativamente como resultado de un proceso cancerígeno que es detectable por una prueba de laboratorio en sangre, líquidos orgánicos o en tejidos (51).

b) Clasificación

De acuerdo al tipo de marcador:

- Marcadores Serológicos:

Los marcadores serológicos se pueden agrupar de acuerdo a dos criterios: por el origen (derivado del tumor e inducido por su presencia) y utilidad clínica.

- Por su origen: clasificados en dos grupos, producidos por las células tumorales y las inducidas por la presencia del mismo (derivados del tumor) como son el antígeno carcinoembrionario, alfa-fetoproteína, antígeno prostático específico, la subunidad beta de la hormona, etc. En el segundo grupo se incluyen proteínas de fase aguda (PCR, ferritina) y moduladores del sistema inmune (citosinas o interleucinas).
- Por su utilidad clínica: Se clasifican en dos grupos por su sensibilidad (porcentaje de pacientes portadores de un determinado tumor que da positivo a un determinado marcador) y especificidad (porcentaje de pacientes sin un tumor maligno, con valores normales de un determinado marcador), de acuerdo a estos criterios se clasifican en tres grupos (52).

- MT de muy elevada especificidad y sensibilidad.
- MT de especificidad t sensibilidad variable.
- MT de baja especificidad.

Los marcadores tumorales serológicos son una herramienta frente al cáncer que deben ofrecer: resultados positivos en enfermos y negativos en sanos, ser válida (mide lo que debe medir), reproducible, segura, sensibilidad, especificidad, con valor predictivo positivo y negativo (51).

- Marcadores Moleculares (Proteínas, DNA y RNA):

Es una herramienta necesaria en muchos campos biología, bio-medicina, forense y diferentes estudios. La aportación en el estudio del cáncer es detectando polimorfismos en locí único o múltiples.

a) Definición

Molécula biológica que se encuentra en la sangre, otros líquidos o tejidos del cuerpo y es un signo de un proceso normal o anormal, que permite identificar alteraciones genéticas (53).

b) Clasificación

- I. ADN NUCLEAR (NADN): basado en detectar polimorfismos del ADN nuclear.
- II. ADN DE CLOROPLASTOS (CLADN): su aplicación es en organismos fotosintéticos.
- III. ADN MITOCONDRIAL (MTAND): el genoma mitocondrial tiene un tamaño de 15 a 17 kb y su longitud varía considerablemente entre especies su

aplicación es trazar historias filogeográficas y de estructura poblacional genética estrechamente relacionada al linaje, son de herencia uniparental y no recombinada, también permite inferir cambios demográficos y de dispersión entre especies.

- IV. ADN RIBOSIMAL (RADN): son isoenzimas definidas como formas moleculares múltiples de las enzimas que tienen funciones idénticas o similares presentes en un individuo, pueden presentar varias formas alélicas (aloenzimas), son utilizadas como marcadores hereditarios para cuantificar las frecuencias alélicas y genética de una población.
- V. Polimorfismo de ADN amplificados al azar (RAPDs): son marcadores que amplifican aleatoriamente segmentos de ADN en una gran variedad de especies, se basa en la probabilidad estadística de se presente sitios complementarios al oligonucleótido de 10 pares de base a lo largo del genoma, útiles en la elaboración de mapas genéticos, en el estudio de parentesco y en el análisis de la estructura poblacional.
- VI. MICROSATÉLITES: también conocidas como secuencias simples repetidas, son secuencias de ADN formadas de 1 a 4 pares de bases, mononucleótidos (TT), dinucleótidos (AT), o tetranucleótidos (AAGG), se encuentran en regiones codificantes y no codificantes del ADN y es probable que se formen por eventos de rompimiento que generan polimorfismos con valores superiores al 90%, su aplicación se fundamenta en estudios de variación genética intra e interespecífica, análisis de linajes y de sistemas reproductivos. También se han encontrado microsatélites en algunos organelos citoplasmáticos, como el cloroplasto y la mitocondria lo que enriquece la fuente de estudios evolutivos.
- VII. SECUENCIAS REPETIDAS INTERSIMPLES (ISSRs): es una técnica relativamente nueva y es similar a los RAPDs, excepto que es un di ó trinucleotido repetido, han sido utilizadas en especies cultivadas desde 1994, se han utilizado en especies donde la variación genética entre individuos de una misma población. Se recomienda estos marcadores para análisis de paternidad.

VIII. ANALISIS DE POLIMORFISMO DE LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLPs): es el primer marcador de ADN utilizado por los biólogos poblacionales, este método expresa diferencias específicas del ADN reconocidas por enzimas de restricción particulares (endonucleasas), cada endonucleasa de origen bacteriano, reconoce y corta una secuencia específica de bases nitrogenadas en el ADN siempre que no estén metiladas, por consiguiente cualquier ADN que no este metilado (protegido), puede ser reconocido y cortado en fragmentos de longitud definida, para detectar estos RFLPs hay dos técnicas: Southern blots e hibridización y PCR.

1. SOUTHERN BLOTS E HIBRIDIZACIÓN: en primer lugar se debe aislar el ADN del organismo de interés, purificarlo y cortarlo con endonucleasas de restricción, los fragmentos se separan en geles de agarosa por electroforesis y se transfieren a una membrana que puede ser de nylon o de nitrocelulosa, hará visible un fragmento de ADN específico el que puede ser comprado con otros genomas tratados de la misma forma, se requiere construir una biblioteca genómica mediante el aislamiento, restricción y clonación del ADN en un vector apropiado, se inserta en un fago, una obtenido se procede a infectar una colonia de E coli en una caja de Petri, que producirá una placa (una caja de Petri de 150 mm pueden caber 50 mil placas).
2. RFLP-PCR: es el segundo método utilizado, se realiza una digestión con diferentes enzimas de restricción, los fragmentos resultantes de la digestión son separados por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio o con acrilamida teñidos con nitrato de plata, generalmente utilizado para construir mapas genéticos, para la clonación de genes basados en mapas y para ayudar a resolver problemas taxonómicos o filogenéticos.

- IX. POLIMORFISMO DE LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLPs): son una técnica que combina la digestión de dos enzimas de restricción, esta técnica detecta múltiples loci polimórficos y es útil para generar huellas genéticas y mapeo.
- X. SECUENCIACIÓN DE ADN: es el análisis más detallado de diferenciación de ADN permite obtener secuenciación de regiones de interés para diferentes individuos, incluye cuatro pasos:
- Identificar secuencias que tengan la variación necesaria.
 - Aislar y purificar un número elevado de la secuencia.
 - Secuenciar.
 - Alinear la secuencia.
- XI. MICRIARRAYS (MICROARREGLOS): es un arreglo de cientos de millares de secuencias de ADN inmovilizadas y bien ordenadas en forma de matriz adheridas a una superficie sólida, generalmente de cristal, esta técnica se utiliza para detectar niveles de expresión de los genes colocados en el microrray (54).

- Marcadores Ultraestructurales:

Los marcadores ultraestructura de la célula mediante la microscopia electrónica ha permitido la visualización de diversos cambios y características propias de la células durante el proceso de carcinogénesis por lo que se ha optado por usar estos cambios estructurales como marcadores tumorales para diversos tipos de cáncer (55).

a) Definición

Marcador que actúa a nivel de la estructura celular y sus organelos, que se visualiza por microscopia electrónica.

b) Fundamento

El fundamento es la especificidad de la reacción entre un antígeno y un anticuerpo (56).

c) Clasificación

En la actualidad existen diversos tipos de técnicas de inmunocitoquímica, que permiten la detección de antígenos tisulares e intracelulares por el microscopio electrónico.

- I. Inmunofluorescencia directa: técnica en la que aplica un anticuerpo primario (monoclonal o policlonal), acoplado a un fluorocromo, que reacciona con un antígeno en la muestra.
- II. Inmunofluorescencia indirecta: tiene una sensibilidad mucho mayor que los métodos directos que con frecuencia reciben el nombre de “técnica emparedado”, primero se aplica un anticuerpo primario específico dirigido contra el antígeno, el fluorocromo se conjuga con un anticuerpo secundario que es dirigido contra el anticuerpo primario, aumentando la señal fluorescente (57) .
- III. Inmunoperoxidasa: es un método inmunoenzimático, en la que la peroxidasa, enzima que cataliza la formación de peróxido de hidrógeno, altamente oxidante (58).
- IV. ALEXA FLUOR: es un colorante que se puede conjugar directamente con anticuerpos primarios y secundarios (59).

Marcadores Tumorales y Cáncer Gástrico

El cáncer gástrico en estadios tempranos generalmente no presenta sintomatología evidente, por lo tanto su diagnóstico es tardío con baja tasa de supervivencia a los 5 años (39), en la actualidad no existe un marcador específico de cáncer gástrico, sin embargo se estudian marcadores presentes en otros

tumores digestivos como el CEA, CA19.9 y el TAG72 que de forma individual no presentan una sensibilidad ni la especificidad necesaria, por lo que se evalúan de forma conjunta.

- CEA: es una proteína 180 kDa, identificada por primera vez en carcinoma colorrectal metastásico, su función biológica es desconocida, aunque se relaciona con la adhesión y el reconocimiento celular, marcador en múltiples neoplasias, cáncer de colon, pulmón, mama, etc. En algunos casos esta aumentada en patología hepática benigna, insuficiencia renal, EPOC y enfermedades inflamatorias intestinales.
- CA19.9: es una mucina, compuesta por el 85% por hidratos de carbono, descrita en cultivo celular de carcinoma colorrectal, elevada en neoplasias pancreáticas, del tracto gastrointestinal, adenocarcinomas mucinosos de ovario y neoplasias pulmonares.
- TAG72: es una glucoproteína de elevado peso molecular, detectable en numerosas neoplasias epiteliales, su especificidad es superior a CEA y CA19.9, elevado en patología hepática, problemas gastrointestinales, cáncer gástrico y gastritis.

Al no ser específicos para CG, parecen útiles para el seguimiento de los pacientes con neoplasias avanzadas CEA y CA19.9 un descenso >50% tienen una media de supervivencia de 17 meses en comparación con sólo 6 meses (60).

En los últimos años se han evaluado nuevos marcadores de utilidad en el estudio del cáncer gástrico.

- A. Piruvato quinasa tipo 2 - M2 (M2-PK): juega un papel clave en el metabolismo tumoral y la producción de energía usado como indicador pronóstico del cáncer gástrico que asociado a Factor de crecimiento endotelial vascular aumenta su valor pronóstico (61).
- B. Mucina que codifica para las proteínas mucínicas (MUC): se han identificados al menos 14 genes de mucina, se les denomina MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8, MUC9, MUC11, MUC12, MUC13 y MUC16. Se ha demostrado que la expresión de MUC5AC (antro)

se asocia con carcinomas difusos e infiltrantes y MUC2 (cardias) con carcinomas mucinosos, pero no con el comportamiento clínico y biológico de los tumores (62).

- C. Inhibidor Tisular de la Metaloproteasa 1 (TIMP-1): se realizó un estudio en el que se evaluó la utilidad clínica del plasma del TIMP-1 en donde se compararon 73 pacientes con CaGa y 61 controles sanos en el que TIMP-1 los resultados salieron elevados en comparación con los controles por lo cual es un buen biomarcador que podría ser útil para el diagnóstico y pronóstico del cáncer gástrico (63).
- D. Metaloproteasa 9 (MP-9): pertenece a un grupo de enzimas que pueden descomponer las proteínas que se encuentran normalmente en los espacios entre las células de los tejidos, participan en la curación de heridas y en la angiogénesis en el CaGa se ha reportado expresión aumentada (64).
- E. Amplificación del gen HER2: es un proto-oncogén localizado en el cromosoma 17 que pertenece a la familia de los HER2 también llamado ErbB-2 c-erbB2 o Her2/neu, codifica una proteína transmembrana de tipo tirosina-quinasa, este receptor coopera en la regulación de diferentes procesos, como proliferación, diferenciación y la supervivencia celular, su sobreexpresión se ha relacionado con mayor agresividad y peor pronóstico, se apoya el rol que tiene la sobreexpresión en la evolución del cáncer gástrico (65).

La relación entre la expresión de MP-2, MP-9 y TIMP-1 en el CG, se pueden usar como índices importantes para evaluar el comportamiento biológico y el pronóstico (66).

Cáncer Gástrico y Gastritis Crónica

El cáncer gástrico ocupa la cuarta causa de muerte a nivel mundial, en la actualidad sigue siendo una preocupación sanitaria debido a que la mayoría de los casos se diagnostican cuando el tumor ha invadido la capa muscular del estómago.

Lauren clasificó el cáncer gástrico como tipo intestinal y difuso, Pelayo Correa fue el primero en describir la historia natural del cáncer gástrico de tipo intestinal, según su teoría, el cáncer gástrico tipo intestinal surge de un proceso que inicia como gastritis crónica, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal y finalmente displasia (leve, moderada y severa), que en teoría toma entre 8 y 10 años, por lo que la gastritis crónica atrófica se considera el primer paso en la histogénesis del cáncer gástrico, asociada hasta en un 80% a *Helicobacter pylori* como causa etiológica del proceso inflamatorio que dio origen a la gastritis crónica. La gastritis crónica atrófica se asocia con hiposecreción ácida y bajos niveles de pepsinógeno, lo cual permite la colonización de bacterias y formación de agentes carcinógeno,

que progresan el remplazo del epitelio gástrico el cual puede ser de forma completa (metaplasia intestinal completa) o incompleta (metaplasia intestinal incompleta).

Se considera que las lesiones metaplasicas deben ser consideradas como paracancerosas, el siguiente paso es la displasia que de acuerdo a Organización Mundial de la Salud se considera como neoplasia gástrica no invasiva y entre mayor sea el grado de displasia el riesgo de desarrollar CaGa aumenta. Cuando se ha establecido la displasia el proceso inflamatorio crónico origina en una célula gástrica pluripotencial no neoplásica (*stem cell*) que degenera hacia el tipo intestinal originando cáncer (67).

Concluyendo que la cascada precancerosa evoluciona de la siguiente manera: Mucosa gástrica normal, gastritis no atrófica, atrofia gástrica multifocal, metaplasia intestinal completa e incompleta (expresando MUC), displasia y adenocarcinoma (68).

ANTECEDENTES ESPECIFICOS

Biomarcadores tumorales para cáncer gástrico.

El desarrollo de cáncer gástrico en pacientes con gastritis crónica atrófica, se relaciona con la pérdida de la arquitectura de la mucosa gástrica debida a inflamación persistente sobre la mucosa gástrica debida principalmente a *Helicobacter pylori*, generando en ella alteraciones que se manifiestan a nivel molecular, estructural así como de su capacidad de regeneración, proliferación y diferenciación del epitelio nativo, produciendo manifestaciones locales y sistémicas que en la actualidad la detección encaminada a la infección por *Helicobacter pylori* y cambios a nivel serológico o de forma localizada a través de las diferentes técnicas diagnósticas.

En Europa Me'graud, et al; realizo un estudio transversal en el que se inscribieron 14 países Europeos, incluyeron 451 pacientes con dispepsia obtenidos

del banco de sangre Eurohepygast en el periodo 1995 a 1997 del con una edad promedio 18 -75 años sin tratamiento para *Helicobacter pylori* se tomó biopsia para realizar estudio histopatológico más cultivo para determinación de agente etiológico y toma de muestra sanguínea por venopunción las cuales se les realizo pruebas serológicas para *Helicobacter pylori* (Anti-H.Pylori) por inmunonotransferencia y ELISA, para PGA, PGC y gastrina se determinaron mediante radioinmunoensayos obteniendo los siguientes resultados PGA, PGC, PGA / PGC y gastrina positivos en 381 de los 451 pacientes incluidos en el estudio. La edad media de estos 381 pacientes fue de 43,5 años y osciló entre 19 a 75 años de lo que 138 (36,2%) fueron hombres. En cuanto al estado de H. pylori, 37 (10,0%) de los pacientes no estaban infectados, 102 (27,7%) estaban infectados pero sin anticuerpos anti-CagA, y 229 (62,2%) estaban infectados y tenían anticuerpos anti-CagA, en 13 pacientes CagA era desconocido. El estudio de histología mostró que 42 pacientes tenían una mucosa normal, 180 gastritis crónica no atrófica y 62 con gastritis crónica atrófica llegaron a la conclusión de que la relación de PGA/PGC pudiera ser un marcador aceptable para la detección de gastritis crónica atrófica, y un buen marcador para H. pylori predominantemente en el cuerpo o para atrofia multifocal, al mismo tiempo se demostró que PGA, PGC, y la gastrina por sí sola no eran apropiados como marcadores. (69)

En ese mismo año en Colombia Oliveros, et al; realizaron un estudio en 176 pacientes, 66 con CG y 110 tomados al azar del Instituto Nacional de Cancerología, a todos los pacientes se les tomo una muestra de sangre por venopunción en ayunas la cual fue almacenada a -20 grados centígrados en las que se realizó a través de prueba inmunoenzimometrica (Gastroset) para PGI, se determinaron anticuerpos IgG y IgA para *Helicobacter pylori* debido a que su presencia eleva los niveles de pepsinógeno y toma de biopsia para estudio histopatológico, con los siguientes resultados 45 gastritis superficial (126.9 ng/ml), 16 gastritis folicular (95.56 ng/ml), gastritis atrófica, (70.68 ng/ml), cáncer gástrico(76.68 ng/ml) y displasia 3 (7.6 ng/ml), con una sensibilidad 90% y un valor predictivo positivo de 13%, debido al tamaño de muestra no permite una conclusión definitiva pero para

la determinación de pepsinógeno I con valores de 150 ng/ml se puede concluir que se correlaciona con gastritis atrófica severa con metaplasia intestinal. (70).

Otro estudio en Japón por Ichinose, et al; durante el mismo año realizó un estudio de cohorte longitudinal para determinar la asociación de *Helicobacter Pylori* y la progresión de gastritis crónica atrófica con cáncer gástrico, una cohorte de 4,655 sujetos asintomáticos sanos (trabajadores de una fábrica), de 40 a 59 años, seguidos por un periodo promedio de 7.7 años, evaluados anualmente entre 1994 y 2002, se detectaron 45 casos de cáncer gástrico, usando dos pruebas serológicas (anticuerpo anti-H pylori/Pepsinógeno sérico), el 78.6% (3,657/4,655) de los sujetos estaban infectados con *Helicobacter pylori* y 28.9% (1,347/4,655) fueron positivos a Gastritis crónica atrófica, la incidencia de *H. pylori* negativa con gastritis crónica atrófica positiva fue del 3.1% y *Helicobacter pylori* (HP) positivos con gastritis crónica atrófica positiva fue del 36%, durante el seguimiento se detectaron 45 casos de cáncer gástrico, 30 casos (67%) de tipo intestinal y 15 casos (33%) tipo difuso, con una incidencia de 126 por cada 100000 personas al año; de esta manera se mostraron que la infección por HP y la gastritis crónica atrófica estaban significativamente asociados con cáncer gástrico. Con la progresión de gastritis inducida por *H. pylori* el riesgo de cáncer aumenta importantemente y es probable determinar que la infección por *H. pylori* por sí sola no está directamente asociada a la carcinogénesis en estómago; en cambio *H. pylori* aparece como una influencia a la carcinogénesis con el desarrollo de gastritis crónica atrófica (71).

En el 2017 en Europa Zagari et al; realizaron un Metanálisis, revisando 20 estudios evaluaron la combinación de pepsinógeno, gastrina-17 y anti-H.Pylori de ensayos séricos hechos para el diagnóstico de GC, reportando una sensibilidad del 74.7% y una especificidad del 95.6% usados los tres marcadores como prueba pronóstica y diagnóstica, por lo que sugieren que la combinación de anticuerpos contra pepsinógeno, gastrina 17 y anticuerpos contra *Helicobacter pylori* en sueros es una herramienta confiable para el diagnóstico de gastritis atrófica que al ser un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico se sugiere como prueba de detección de CG (23).

En este mismo año en Colombia Magnuson et al; realizo un estudio en 89 pacientes a los que por diagnostico endoscópico a 27 CG antral, CG avanzado 25, Pangastritis crónica 15, cáncer temprano en 7, Sospecha de metaplasia intestinal en 6, sospecha de gastritis atrófica en 34, adenocarcinoma intestinal 20, metaplasia intestinal 18, cáncer de tipo difuso en 11, displasia de bajo grado en 4 y de alto grado 1 y atrofia solo 1. Expresión genética por microrray de ADN: 14 genes para CA difuso /intestinal y 48 genes para gastritis crónica y metaplasia intestinal llegando a la conclusión de que cada etapa de la cascada de correa expresa genéticamente cambios en el ARN mensaje que puede ser identificado en sangre periférica a través de la técnica de Microrray de ADN de lo que se sugiere como método diagnóstico de CG en etapas tempranas (72).

En el departamento de Inmunología Experimental de la Facultad de Medicina de la BUAP, se han estudiado las proteínas de secreción/excreción provenientes de células tumorales de pacientes con adenocarcinoma gástrico y se han desarrollado anticuerpos policlonales en conejo contra 7 de estas proteínas de secreción, detectando 3 proteínas que podrían actuar contra blancos inmunológicos por reconocimiento de la célula tumoral, encontrando que la proteína denominada CGA 5 resultó ser la más inmunogénica, al realizar Inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo policlonal 5, resultó ser muy específico para identificar células tumorales de pacientes con adenocarcinoma de tipo difuso; además, se han detectado niveles medibles del antígeno CGA-5 en los sueros de los pacientes con cáncer gástrico tanto difuso, como intestinal.

Los recientes avances en la detección de nuevas proteínas han contribuido al descubrimiento y desarrollo de pruebas no invasivas, practicas, confiables y económicas como herramientas para el diagnóstico de muchas patologías, por tal motivo, en este proyecto, se evaluara la presencia de proteínas tumorales gástricas en pacientes con gastritis crónica capara detectar un nuevo marcador diagnóstico/pronóstico de cáncer gástrico (Tabla 1.).

Autor	Lugar	Año	Muestra	Resultados	Conclusión
Me'graud	Europa	2003	451 Pacientes con edades de 19 a 75 años de los cuales 138 fueron hombres con el 36.2%.	-H. pylori 37 (10%)	La relación de PGA/PGC pudiera ser un marcador para la detección de Gastritis Crónica atrófica, y un para H. pylori predominantemente en el cuerpo o para atrofia multifocal, al mismo tiempo se demostró que PGA, PGC, y la gastrina por sí sola no eran apropiados como marcadores para cualquiera condición.
Oliveros	Colombia	2003	176 Pacientes de los cuales 66 padecían CaGa, 110 tomados al azar procedentes del Instituto Nacional de Cancerología.	Pepsinógeno ng/ml 45 con gastritis superficial con 126.9, 16 con gastritis folicular con 95.56, con cáncer gástrico una lectura de 76.68, y displasia 3 pacientes con 7.6.	El tamaño de muestra no permite una conclusión definitiva pero para la determinación de Pepsinógeno I con valores de 150 ng/ml se puede determinar que se correlaciona con gastritis atrófica severa con metaplasia intestinal.
Ichinose	Japón	2003	4655 sujetos hombres entre 40 a 59 años asintomáticos Seguidos por 7.7 años (1994 - 2002) infectados por <i>H.pylori</i> .	45 casos con cáncer gástrico.	La gastritis crónica atrófica asociada a <i>Helicobacter pylori</i> aumenta el riesgo de cáncer gástrico.
Zagari	Europa	2017	Metanálisis 20 estudios que evaluaron la combinación de pepsinógeno, gastrina-17 y anti-H. Pylori de ensayos	Sensibilidad 74.7% y una especificidad 95.6%.	Se sugiere que la combinación de anticuerpos contra pepsinógeno, gastrina 17 y anti- <i>Helicobacter pylori</i> en sueros es una herramienta confiable para el diagnóstico de gastritis atrófica que la GC al ser un factor de riesgo para el desarrollo de CG se sugiere

			séricos para el diagnóstico Gastritis.		como prueba de detección de CG.
Magnuson	Colombia	2017	89 Pacientes	Endoscopia: 27 GC antral avanzado, CG avanzado 25, Pangastritis crónica 15, Cáncer temprano en 7, Sospecha de metaplasia intestinal en 6, sospecha de gastritis atrófica en 34, adenocarcinoma intestinal 20, metaplasia intestinal 18, cáncer de tipo difuso en 11, displasia de bajo grado en 4 y de alto grado 1 y atrofia solo 1. Expresión genética por microrray de ADN: 14 genes para CA difuso /intestinal y 48 genes para gastritis crónica y metaplasia intestinal.	Se identificaron biomarcadores a través de la expresión genética del ARN mensajero, el cual diferencia en sangre las etapas de la cascada de Correa y permite diagnosticar el CG.

Tabla 1. Antecedentes Específicos

JUSTIFICACIÓN

La Gastritis Crónica (GC), es un proceso inflamatorio de la mucosa gástrica resultado de mecanismos de defensa al sufrir daño en ella, el cual, según Correa produce cambios en el epitelio que pueden progresar hacia un Cáncer Gástrico (CG), enfermedad maligna, que debido a su epidemiología y falta marcadores diagnósticos-pronósticos, es detectado en estadios avanzados con muy limitados niveles de supervivencia, por lo cual es necesario desarrollar nuevos métodos diagnósticos más efectivos y específicos que permitan su detección temprana para poder desarrollo de programas de tamizaje de CG, y puedan ser detectados en pacientes con GC para evitar su progresión hacia una enfermedad maligna con la finalidad de poder ofertar un tratamiento oportuno, proporcionando al paciente, una mejor calidad de vida así como disminución en la morbimortalidad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Cáncer Gástrico (CG) es un tumor maligno que ocupa el cuarto lugar de mortalidad a nivel mundial y la quinta causa en México siendo más frecuente en los estados de Chiapas y Oaxaca. Se ha demostrado que es una patología que se caracteriza por presentarse en hombres mayores de 55 años, con dietas baja en consumo de hortalizas, con consumo de tabaco e infección por "*Helicobacter pylori*". En el 80% de los casos es asintomático y el 20% restante tiene síntomas inespecíficos, como son; náuseas, anorexia o saciedad precoz.

En el 1965 Lauren clasifica al CG por sus características histológicas en dos tipos: intestinal y difuso; para su diagnóstico la guía de práctica clínica mexicana establece al, ultrasonido endoscópico, como el estándar de oro, con la toma de biopsias. Además de detección de marcadores moleculares, como el Antígeno Carcinoembrionario (CEA), el Antígeno Carbohidratado 19.9 (CA 19.9) y la Glucoproteína asociada a Tumores.72 (TAG-72) con poca especificidad para CG, pero en la actualidad son utilizados como valor pronóstico, lamentablemente solo el 15% de los pacientes se diagnostican en etapas tempranas con supervivencia a 5 años del 90%, en cambio en etapas avanzadas es de 10 a 20%, el tratamiento dependerá del estado general del paciente y estadio del tumor. Al ser una enfermedad multifactorial que se desarrolla a través de procesos de múltiples pasos que puede durar 20 años o más, según el modelo de la carcinogénesis gástrica propuesta por Correa, se inicia con GC ocasionada en el mayor número de casos por "*Helicobacter pylori*", produciendo inflamación de la mucosa gástrica con

infiltrado de células mononucleares, que de acuerdo al Centro Estatal de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades en el 2016 reportó que en México el 80% de la población sufre gastritis la que es diagnosticada por endoscopia con toma de biopsia más la prueba de ureasa. El tratamiento que está establecido dependerá de la causa que la origine y en aquellos casos que no lo reciben la gastritis crónica puede progresar ha atrófica gástrica, metaplasia intestinal, displasia y, finalmente a un cáncer. A pesar de que el factor desencadenante es el proceso inflamatorio no se han realizado estudios que tengan relación con la respuesta inmunológica asociada a CG y GC en población mexicana.

Por lo anterior se propone la siguiente pregunta de investigación:

¿Existen proteínas de secreción tumoral gástrica que pueden ser detectadas en pacientes con gastritis crónica, como un nuevo marcador tumoral?

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar un nuevo marcador tumoral de cáncer gástrico en pacientes con gastritis crónica.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a) Identificar la presencia de anticuerpos contra los antígenos de secreción tumoral gástricos en los sueros de los pacientes con gastritis crónica.
- b) Identificar la presencia de anticuerpos contra los antígenos de secreción tumoral gástricos en los sueros de los pacientes con cáncer gástrico.
- c) Identificar la presencia de anticuerpos contra los antígenos de secreción tumoral gástricos en los sueros de sujetos normales.

MATERIAL Y METODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Se diseñó un estudio descriptivo, comparativo, observacional, transversal, prolectivo, unicéntrico y homodémico.

POBLACIÓN DEL ESTUDIO

En este trabajo se estudiaron muestras de sangre periférica obtenidas por venopunción de 150 pacientes (50 controles, 50 GC y 50 CG) y biopsias de tumor de CaGa del servicio de Endoscopia y Gastrocirugía del Hospital de Especialidades CMN UMAE "Gral. De División Manuel Ávila Camacho" del IMSS Puebla.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Se incluyeron pacientes de cualquier sexo y edad con diagnóstico de Gastritis Crónica.
- Pacientes de cualquier sexo y edad con diagnóstico de Cáncer Gástrico.
- Sujetos aparentemente sanos de cualquier sexo y edad.
- Pacientes que no padezcan ninguna enfermedad autoinmune.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes con otro tipo de cáncer.

- Pacientes que cuenten con alguna enfermedad autoinmune.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Pacientes que no quieran participar en el estudio.
- Pacientes con expediente incompleto.
- Muestras contaminadas.
- Muestras hemolizadas.
- Pacientes que deseen retirarse del estudio.

MARCO MUESTRAL

UBICACIÓN ESPACIO Y TIEMPO

Este estudio se realizó en el Hospital de Especialidades C.M.N. General de División “Manuel Ávila Camacho” de IMSS de Puebla y el Departamento de Inmunología Experimental de la FM Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. En el periodo de Agosto 2017 a Mayo 2018.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se estudiaron 150 pacientes (50 GC, 50 CG y 50 controles) en el tiempo establecido del 1 de Agosto de 2017 a 31 de junio de 2018.

VARIABLES

- **DEPENDIENTES**

Antígenos de secreción tumoral

- **INDEPENDIENTES**

Edad

Genero

TABLA DE VARIABLES

VARIABLES DE POBLACIÓN				
VARIABLE	TIPO	ESCALA	UNIDAD DE MEDICION	EQUIPO
Edad	Cuantitativa	Discreta	18-99 años	Hoja de recolección
Género	Cualitativa	Nominal Binaria	1.-Masculino 2.-Femenino	Hoja de recolección

Tabla 2. Variables de población

VARIABLES DE ESTUDIO				
VARIABLE	TIPO	ESCALA	UNIDAD DE MEDICION	EQUIPO
Antígenos de Secreción Tumoral	Cuantitativa	Área bajo la curva	Peso molecular	Hoja de recolección

Tabla 3. Variables de estudio

VARIABLES CONFUSORAS				
VARIABLE	TIPO	ESCALA	UNIDAD DE MEDICION	EQUIPO
Gastritis Crónica	Cualitativa	Nominal	Positivo	Hoja de recolección
Cáncer Gástrico	Cualitativa	Nominal Binaria	1.- Intestinal	Hoja de recolección

Tabla 4. Variables Confusoras

ESTRATEGIA DE TRABAJO

Contando con las muestras sanguíneas seleccionadas, obtenidas por venopunción de los pacientes que fueron diagnosticadas con GC, CaGa y pacientes aparentemente sano (controles) de la UMAE “Manuel Ávila Camacho” IMSS Puebla, en el periodo comprendido de Agosto 2017 a Mayo 2018, siguiendo todas las normas de ética y de salud, se procedió a identificar la presencia de los antígenos de secreción tumoral en los sueros de pacientes con gastritis crónica, cáncer gástrico y sujetos sanos a través de la técnica de Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS PAGE) y WESTERN BLOT.

Con los resultados se realizó una base de datos, y análisis estadístico descriptivo, con tablas de contingencia, gráficas de barra y pastel.

INMUNODETECCIÓN DE UN NUEVO MARCADOR TUMORAL DE CÁNCER GÁSTRICO EN PACIENTES CON GASTRITIS CRÓNICA

Muestras

- El Departamento de Inmunología Experimental cuenta con antígenos de secreción tumoral que fueron obtenidos de biopsias incisionales de pacientes con adenocarcinoma gástrico.
- La sangre periférica obtenida por venopunción se centrifuga a 2500 rpm por 10 minutos, obteniendo el suero y se almacena a -75°C hasta su uso.
- Separación de proteínas a través de la técnica de Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS PAGE) (Anexos).
- Reconocimiento de antígenos de secreción tumoral por WESTERN BLOT (Anexos).

MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados de las variables cuantitativas se presentan con promedio \pm desviación estándar y los de variables cualitativas serán expresados en tablas de contingencia y gráficas de barra y pastel.

LOGÍSTICA

RECURSOS HUMANOS.

- Directora de tesis D.C. María Alicia Díaz y Orea Profesos Investigador Titular “C” Coordinadora del departamento de Inmunología Experimental
- Jefe de Enseñanza de la UMAE-IMSS. D.C, Eduardo Gómez Conde
- Dr. Aurelio López Colombo
- Dr. Rogelio González López
- Dra. Mariana Cruz Roncal
- MP Emmanuel Marcelino Juárez Alvarado

RECURSOS MATERIALES

El proyecto se realizó en el Hospital de Especialidades C.M.N. General de División “Manuel Ávila Camacho” IMSS Puebla y en el Departamento de inmunología Experimental de la FM BUAP.

RECURSOS FINANCIEROS

Este trabajo se llevó a cabo con apoyo económico de la VIEP y recursos propios de los investigadores, además se contó con el apoyo del Departamento de Inmunología Experimental de la FM BUAP.

ASPECTOS ÉTICOS

De acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación el proyecto de investigación, se consideró como riesgo mínimo.

Se siguieron los lineamientos estipulados en:

- Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud.
- Principios básicos de la Declaración de Helsinki de la asociación Médica Mundial.
- Norma Oficial Mexicana Nom-007-SSA3-2011, para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos. (Anexos)

El estudio fue presentado, revisado y aprobado por el comité Local de Investigación del Hospital de Especialidades C.M.N. General de División “Manuel Ávila Camacho” IMSS Puebla.

Comité local de 2101 registro 14CI 21114059 de investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social.

También fue aprobado por el Comité de Investigación de la Facultad de Medicina de la BUAP y la Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrado.

No. de registro: 583

DIAGRAMA DE FLUJO



RESULTADOS

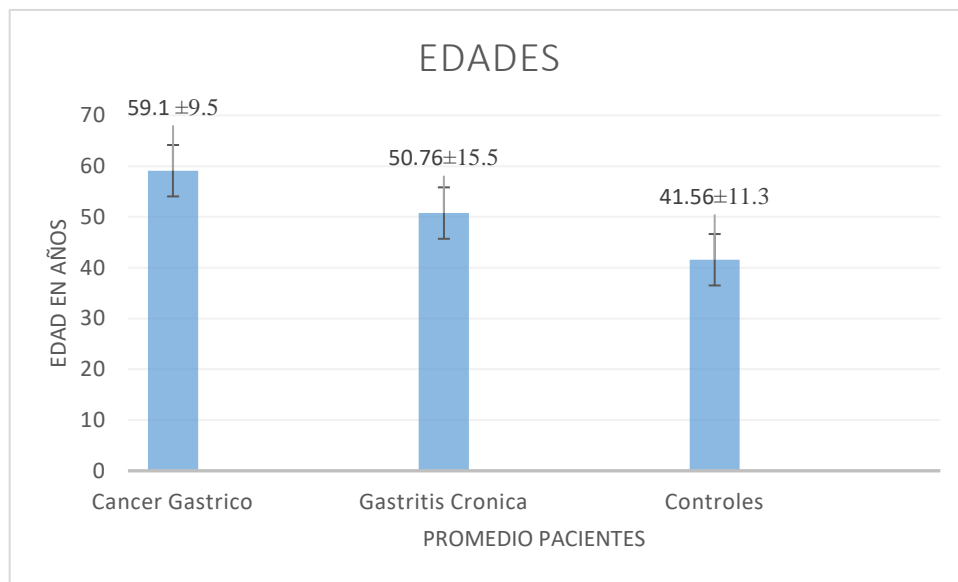
Se obtuvieron 150 muestras de las cuales 50 muestras de pacientes con Cáncer Gástrico, 50 pacientes con de Gastritis Crónica y 50 Pacientes controles del Hospital de Especialidades C.M.N. General de División “Manuel Ávila Camacho” IMSS Puebla durante el periodo de Agosto 2017 a Mayo 2018.

Gastritis crónica	Cáncer Gástrico	Control
n= 50	n= 50	n= 50

Tabla 5. Número de pacientes

(Propia del investigador)

La edad promedio de los pacientes con CaGa fue de 59.1 años, para los pacientes con GC de 50.76 años y 41.5 en los pacientes controles.

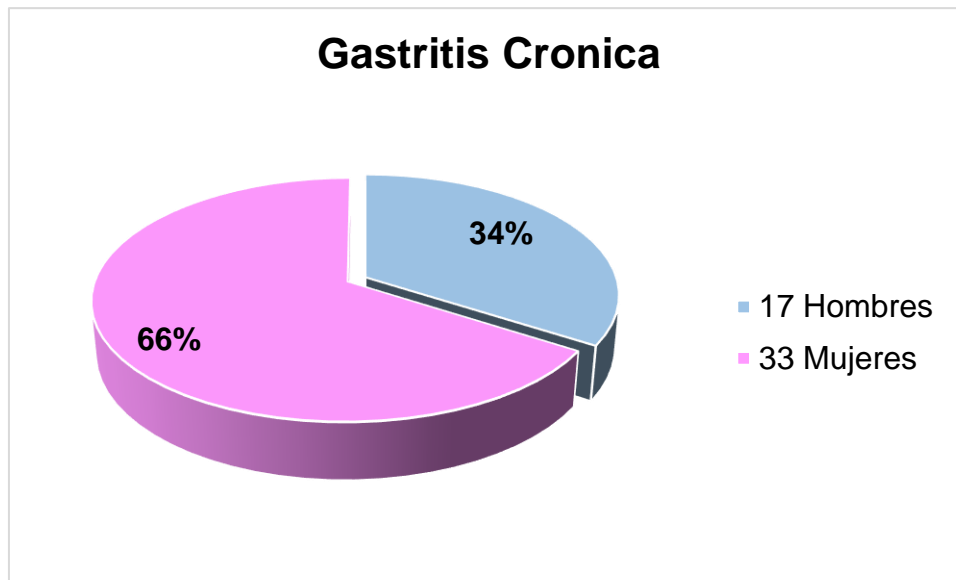


Grafica 1. Edad promedio de población.

(Propia del investigador)

Gastritis Cronica

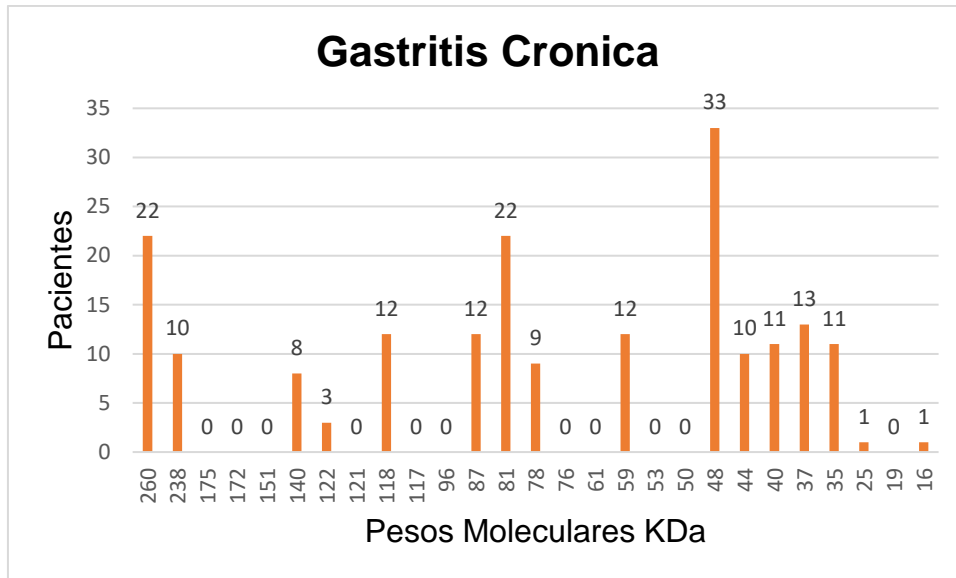
La población de pacientes fue de 17 Hombres representando el 34% y 33 Mujeres que equivale al 66%.



Grafica 2. Distribución de género de pacientes con Gastritis Crónica

(Propia del investigador)

Los sueros de los pacientes con GC detectaron 16 proteínas con los siguientes pesos moleculares 260 KDa (22 pacientes), 238 KDa (10 pacientes), 140 KDa (8 pacientes), 122KDa (3 pacientes), 118 KDa (12 pacientes), 87 KDa (12 pacientes), 81 KDa (22 pacientes), 78 KDa (9 pacientes), 59 KDa (12 pacientes), 48 KDa (33 pacientes), 44 KDa (10 pacientes), 40 KDa (11 pacientes) 37 KDa (13 pacientes), 35 KDa (11 pacientes), 25 KDa (1 paciente) y 16 KDa (1 paciente).

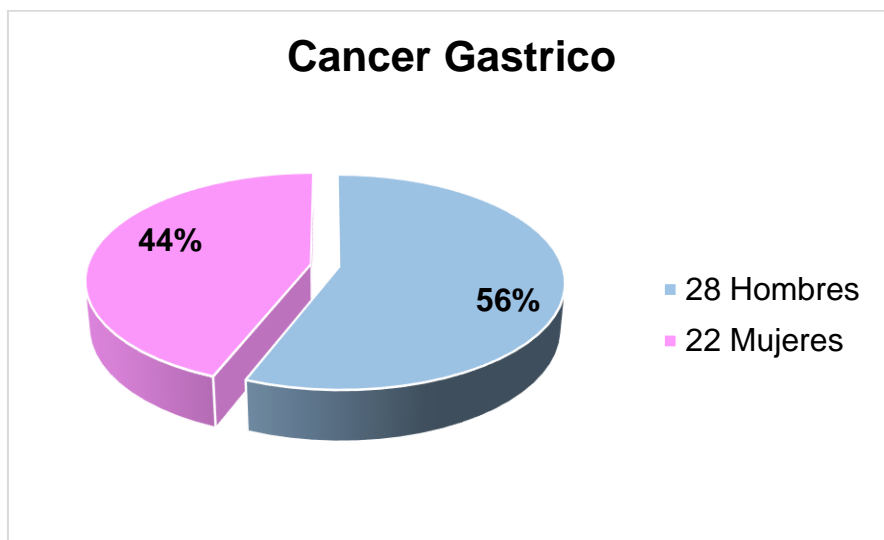


Grafica 3. Proteinas detectadas en GC

(Propia del investigador)

Cáncer Gástrico

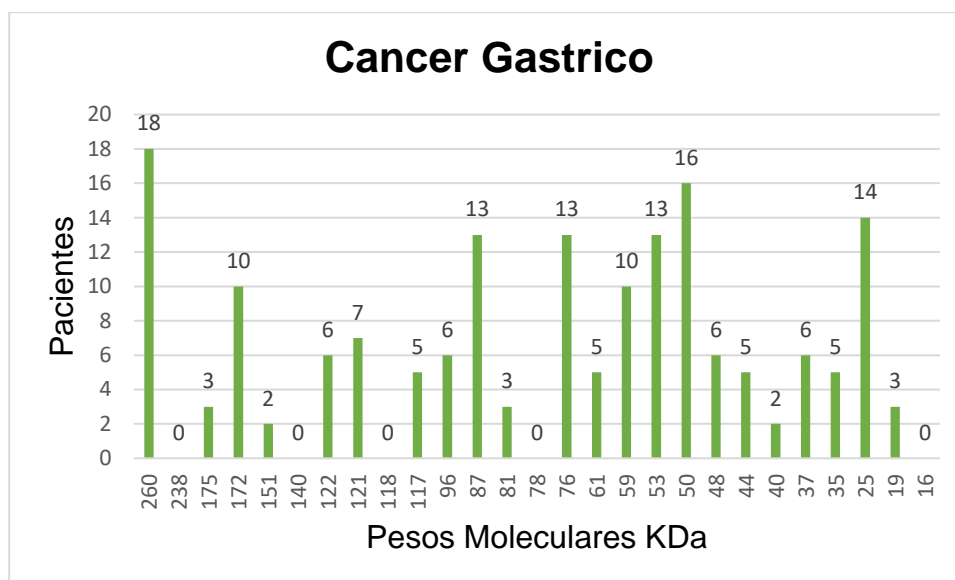
Se obtuvo para CaGa una población de estudio de 50 pacientes de los cuales el 44% (22 pacientes) corresponde al sexo femenino y el 56% (28 pacientes) al sexo Masculino.



Grafica 4. Distribución de género de pacientes con Cáncer Gástrico.

(Propia del investigador)

Los sueros de los pacientes con CaGa detectaron 22 proteínas con los siguientes pesos moleculares 260 KDa (18 pacientes), 175 KDa (3 pacientes), 172 KDa (10 pacientes), 151 KDa (2 pacientes), 122KDa (6 pacientes), 121 KDa (7 pacientes), 117 KDa (5 pacientes), 96 KDa (6 pacientes), 87 KDa (13 pacientes), 81 KDa (3 pacientes), 76 KDa (13 pacientes), 61 KDa (5 pacientes), 59 KDa (10 pacientes), 53 KDa (13 pacientes), 50 KDa (16 pacientes), 48 KDa (6 pacientes), 44 KDa (5 pacientes), 40 KDa (2 pacientes), 37 KDa (6 pacientes), 35 KDa (5 pacientes), 25 KDa (14 pacientes) y 19 KDa (3 pacientes).

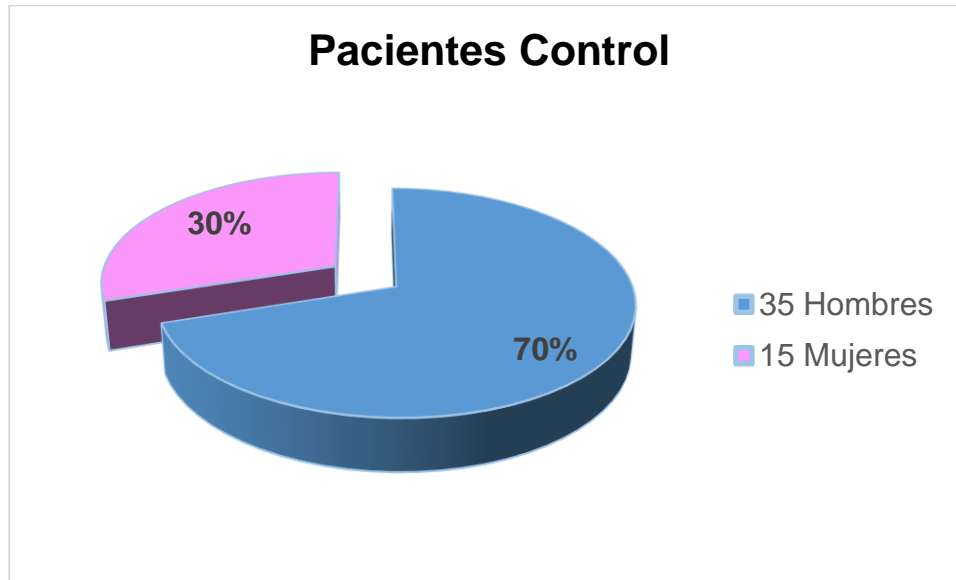


Grafica 5. Proteínas detectadas en pacientes con CG.

(Propia del investigador)

Pacientes Control

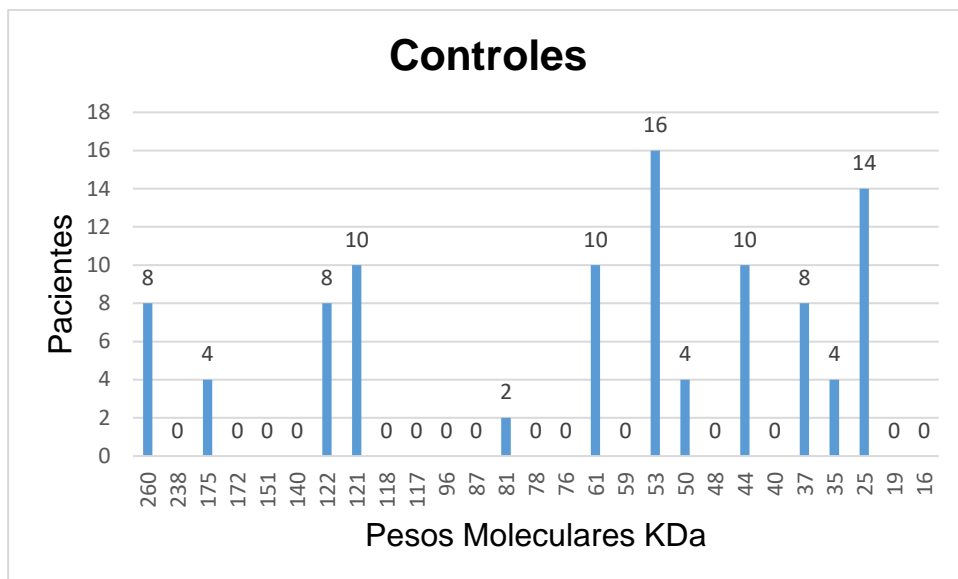
En la población control se obtuvieron 50 sobrenadantes de pacientes sanos de los cuales 30% (15 pacientes), correspondieron a mujeres y el 70% (35 pacientes) a hombres.



Grafica 6. Distribución de género en Controles.

(Propia del investigador)

Los sueros de los pacientes control, detectaron 12 proteínas con los siguientes pesos moleculares 260 KDa (8 pacientes), 175 KDa (4 pacientes), 122KDa (8 pacientes), 121 KDa (10 pacientes), 81 KDa (2 pacientes), 61 KDa (10 pacientes), 53 KDa (16 pacientes), 50 KDa (4 pacientes), 44 KDa (10 pacientes), 37 KDa (8 pacientes), 35 KDa (4 pacientes) y 25 KDa (14 paciente).



Grafica 7. Proteínas detectadas en controles.

(Propia del investigador)

Gastritis Crónica, Cáncer Gástrico y pacientes control.

En total se estudiaron 150 muestras (50 GC, 50 CG y 50 controles), se observó que los pacientes con GC y CG comparten 2 proteínas (59KDa, 48 KDa y 40 KDa), GC y Pacientes Control 1 proteína (87 KDa), CG y Pacientes control 5 proteínas (175 KDa, 121KDa, 61 KDa, 53 KDa y 50 KDa) y GC, CG y pacientes control tienen en común 7 proteínas (260KDa, 122 KDa, 81 KDa, 44 KDa, 37 KDa, 35 KDa y 25 KDa).

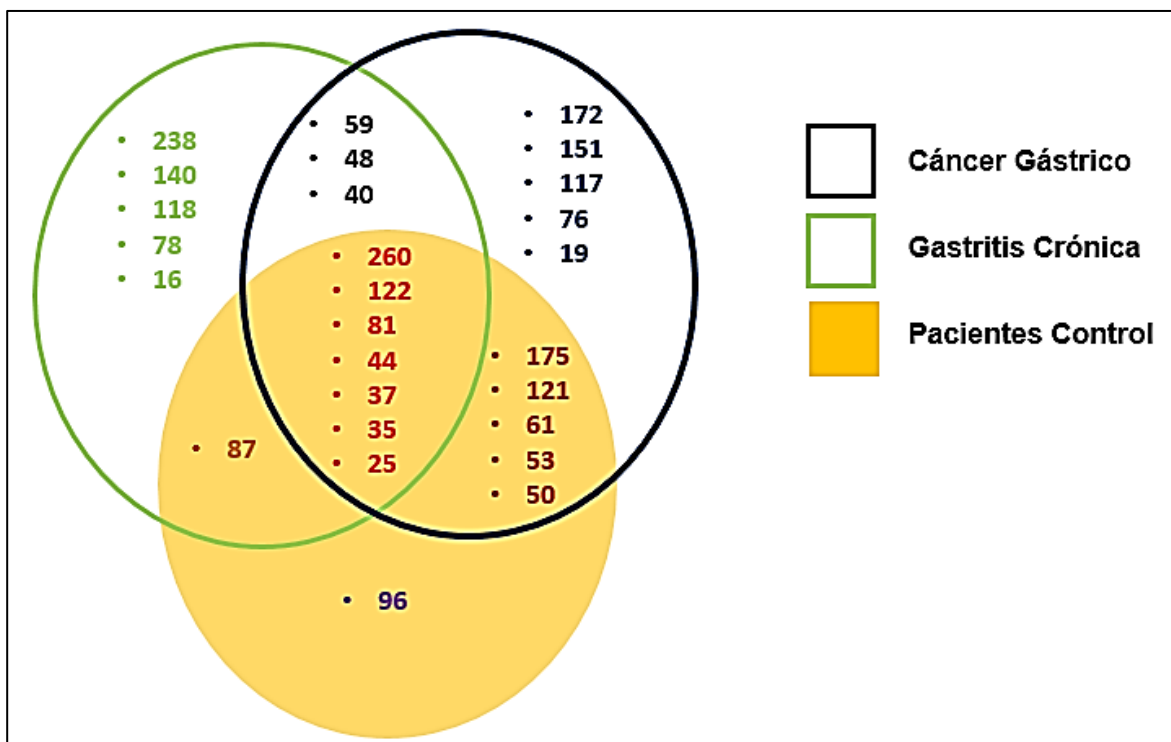


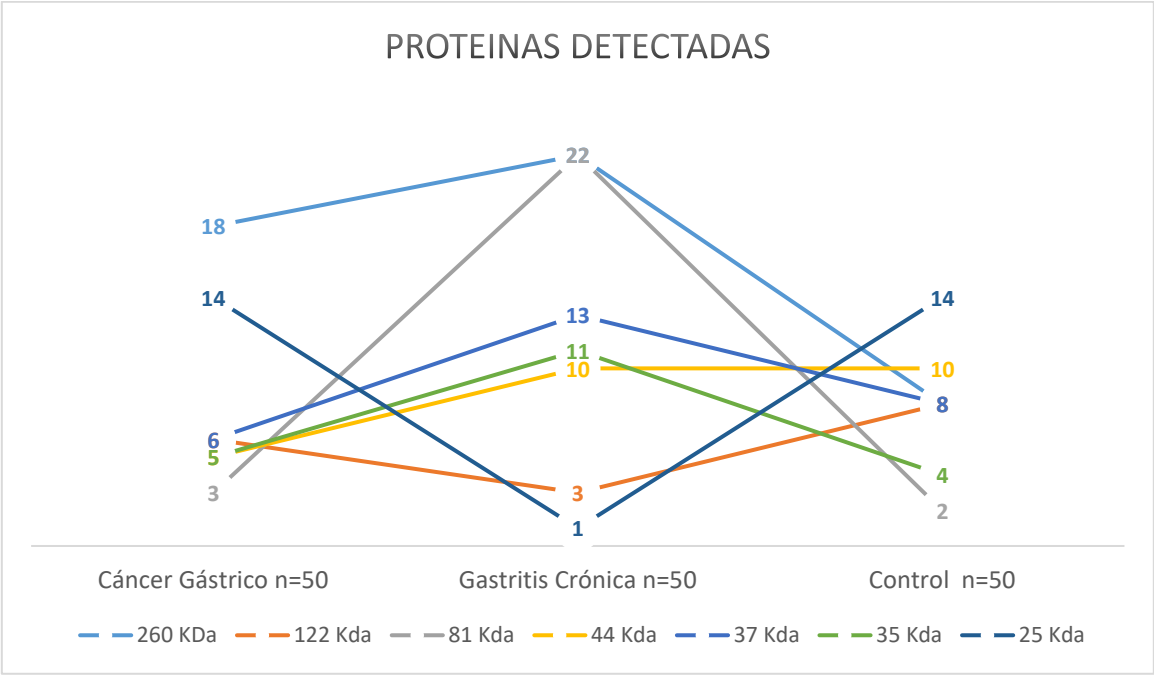
Figura 10. Relación de proteínas que comparten los pacientes CG, GC y grupo control.

(Propia del investigador)

Peso molecular	260 (+/-)	122(+/-)	81(+/-)	44(+/-)	37(+/-)	35(+/-)	25(+/-)
Cáncer Gástrico n=50	18(36%)/ 32(64%)	6(12%)/ 44(88%)	3(6%)/ 47(94%)	5(10%)/ 45(90%)	6(12%)/ 44(88%)	5(10%)/ 45(90%)	14(28%)/ 36(72%)
Gastritis Crónica n=50	22(44%)/ 28(56%)	3 (6%)/ 47(94%)	22(44%)/ 28(56%)	10(20%)/ 40(80%)	13(26%)/ 37(74%)	11(22%)/ 41(82%)	1(2%)/ 49(98%)
Control n=50	8(16%)/ 42(84%)	8(16%)/ 42(84%)	2(4%)/ 58(96%)	10(20%)/ 40(80%)	8(16%)/ 42(84%)	4(8%)/ 46(92%)	14(28%)/ 36(72%)

Tabla 6. Proteínas que comparten pacientes de CG, GC con el grupo control.

(Propia del investigador)



Grafica 8. Distribución de proteínas detectadas.

(Propia del investigador)

DISCUSIÓN

El cáncer gástrico (CG) ocupa el cuarto lugar de mortalidad a nivel mundial y la quinta en México (39). De acuerdo a la clasificación de Lauren existen dos tipos principales: difuso e intestinal (44).

Se sabe que la historia natural del cáncer gástrico, según la teoría cascada de Correa, surge de un proceso que dura entre 8 y 10 años, inicia como gastritis crónica atrófica, que evoluciona a metaplasia, displasia (leve, moderada y severa) y culmina en cáncer gástrico (67). En esta cascada intervienen factores endógenos (edad avanzada, género masculino y genética) (8), y exógenos (infección por *Helicobacter pylori*, uso de Antiinflamatorios no esteroideos, ingesta de bebidas alcohólicas, consumo de grasas, escaso consumo de vegetales y consumo abundante de sal así como alimentos asados) (10).

El 80% de los casos es asintomático, el 20% restante tiene síntomas inespecíficos como son la saciedad precoz, anorexia y náuseas que en etapas avanzadas la mayoría de los casos presenta dolor abdominal con pérdida de peso (43).

Por lo anterior, para generar un CG en un estadio avanzado se requiere de elevados periodos tiempo, lo cual permite su estudio, para buscar nuevas alternativas, que permitan detectar esta enfermedad en fases iniciales, sin embargo hasta el momento no existen pruebas que permitan una detección oportuna. Se han descrito biomarcadores como Gastrin-17 y Pepsinógeno II, solo permiten evaluar si el paciente tiene atrofia de la mucosa gástrica (32).

También es claro que los marcadores tradicionales de CG, como CEA, CA 19.9 y TAG-72 no son específicos para el diagnóstico de este tipo de cáncer (60), y aun, aunque el estándar de oro para su detección se realiza por endoscopia con toma de biopsias que desafortunadamente es realizada en estados avanzados del cáncer (38).

Por tal motivo en este trabajo se estudiaron los sueros de 50 pacientes con gastritis crónica, que fueron comparados con los de 50 pacientes con CG, para evaluar el reconocimiento de antígenos tumorales gástricos que previamente ya han identificados, con la finalidad de detectar un nuevo marcador tumoral de cáncer gástrico en estos pacientes con gastritis crónica, que permita el desarrollo de pruebas de tamizaje a gran escala en nuestro país.

En nuestro estudio la edad promedio fue de 59 ± 9 años con una relación hombre, mujer de 1:1 en pacientes con CG y para GC con una edad promedio de 50 ± 11 años con una relación hombre, mujer de 1:2, que en relación a la literatura, se observa para CG que la población de estudio hombre, mujer igual en nuestro estudio, que lo que se reporta 2.6:1 (7).

De acuerdo a la edad de nuestro estudio se observó que tuvimos pacientes demasiado jóvenes lo que nos hace pensar que esta enfermedad maligna se está presentando en personas jóvenes.

En el grupo control el mayor porcentaje de población fue masculina en una relación hombre mujer 2:1 con una edades promedio 41 ± 11 .

Para la Inmunodetección se evaluó el perfil de proteínas obtenidos de los sobrenadantes de antígenos de secreción tumoral a través de la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS PAGE). Se realizó un Western Blot y se reveló con los sueros de los pacientes CG, GC y controles, encontrando que se detectan 16 proteínas para pacientes con GC, 22 proteínas en pacientes con CG y 12 proteínas en pacientes controles de las cuales presentaron en común 7 proteínas con los siguientes pesos moleculares 260 KDa, 122 KDa, 81 KDa, 44 KDa, 35 KDa y 25 KDa de las cuales la proteína de 260 KDa se presenta en los pacientes control en el 16%, con GC en el 44% y CG 36%, por tal motivo pensamos que podría ser utilizada como marcador diagnóstico.

Además se logró identificar 3 proteínas de 59 KDa, 48 KDa y 40 KDa que comparten CG y GC pero no la detecta los pacientes control, probablemente estas proteínas podrían también ser utilizadas como marcadores de progresión de GC a

CG, así como 5 proteínas de 238 KDa, 140 KDa, 118 KDa, 78 KDa y 16 KDa que solo detectan para GC, y 5 proteínas de 172 KDa, 151 KDa, 117 KDa, 76 KDa y 19 KDa solo para CG, las que podrían servir para la detección de estas patologías.

Se han determinado otras pruebas a través de la toma de muestras séricas, Me'graud, et al; en el 2003, que evaluó la relación del pepsinógeno A/ Pepsinógeno C (PGA/PGC) y gastrina, Oliveros, et al; en Colombia realizó la determinación de anticuerpos IgG y IgA para *Helicobacter pylori* y Magnuson, et al; en el 2017 evaluó la expresión genética por microarray de ADN identificando en sangre periférica cambios en el ARN mensajero en cada etapa de la cascada de correa pero ninguna de ellas ha llegado a ser un biomarcador específico para el diagnóstico del CG.

Aunque en nuestro estudio los resultados obtenidos las proteínas que son detectadas, algunas coinciden para CG, GC y pacientes control, debemos recordar que CG se origina de una celular normal que al sufrir mutaciones, libera antígenos y proteínas creando un microambiente de cambio dinámico y constante el cual es detectado por el sistema inmunológico, creando anticuerpos específicos que se pueden encontrar en sangre periférica, a pesar de que la proteína 260KDa detectada representa resultados prometedores se debe estudiar y realizar en mayor escala para así poder determinar su especificidad y sensibilidad.

CONCLUSIONES.

- En la identificación de un nuevo marcador tumoral se identificaron 16 proteínas para pacientes con GC, 22 proteínas para CG y 12 proteínas para controles.
- Se determinó que la proteína con el peso molecular de 260 KDa, se expresa en pacientes control, CG y GC la que pensamos que podría ser utilizada como marcador diagnóstico.
- Se identificaron 3 proteínas de 59 KDa, 48 KDa y 40 KDa que comparten CG y GC, que no son detectadas por los pacientes control las que podrían ser utilizadas como marcadores de progresión de GC a CG.
- También se identificaron 5 proteínas de 238 KDa, 140 KDa, 118 KDa, 78 KDa y 16 KDa que solo detectan para GC y 5 de 172 KDa, 151 KDa, 117 KDa, 76 KDa y 19 KDa solo para CG, las que podrían servir para la detección de estas patologías.

PROPUESTAS

- Estudiar las proteínas identificadas para determinar su concentración y obtener más conocimiento acerca de ellas, que favorezcan el desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas.
- Es necesario aumentar el número de muestra para sacar la especificidad y sensibilidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Patolab Oy E, al e. Chronic gastritis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2015;; p. 657–667.
2. Alarcón-Mill J. *vacA s1m1 genotype and cagA EPIYA-ABC pattern are*. *Journal of Medical Microbiology*. 2018;; p. 314–324.
3. Salud Sd. *Profilaxis, Diagnóstico y Tratamiento de la Gastritis Aguda (Erosiva)*. *Guia de Practica Clinica*. 2011;; p. 1-48.
4. Centro Estatal de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. *Gastritis. Visión Cenece*. 2016;; p. 1-3.
5. Soto-Estradaa G, al e. *Panorama epidemiológico de México, principales causas*. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*. 2016;; p. 1-15.
6. Salud Sd. *Notificación Semanal Casos Nuevos de Enfermedades*. *SALUD*. 2017;; p. 1-158.
7. Figueroa-Lara A, al e. *Medical Expenditure for Chronic Diseases in Mexico: The Case of Selected Diagnoses Treated by the Largest Care Providers*. *PLOS ONE*. 2016;; p. 1-19.
8. Sociedad Coreana de Gastroenterología. *Asociaciones entre el pH del jugo gástrico, gastritis atrófica, metaplasia intestinal y Helicobacter pylori Infección*. *Gut y Liver*. 2018;; p. 158-164.
9. Toyoshima O, al e. *Decrease in PSCA expression caused by Helicobacter pylori*. *Oncotarget*. 2018;; p. 1-10.
10. Campos. *OVD. Uso de ácido acetilsalicílico (aas) a baja dosis más esomeprazol en tabletas de combinación fija*. *Serbiluz*. 2017;; p. 1-17.
11. Llanos DO. *Tratamiento de la ulcera gastrica*. *ARS MEDICA revista de ciencias médicas*. 2017;; p. 1-5.
12. Caicedo YY, al e. *Lesiones precursoras de malignidad gástrica y su asociación con hábitos alimentarios*. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 2017;; p. 87-108.
13. Keith M. *Estomago*. In L. MK. *Moore Anatomia con orientación clinica*. Buenos Aires.: Lippincott.Williams.Wilkins.; 2013. p. 287-290.

14. Society AC. ¿Qué es el cáncer de estómago? American Cancer Society. 2017;; p. 1-5.
15. Gutiérrez DFQ. Arterias y Venas. In Gutiérrez DFQ. Anatomía Humana. MEXICO: PORRÚA; 2007. p. 111-169.
16. Geneser F. Aparato Digestivo. In Geneser F. Histología. Buenos Aires Bogota: Panamericana ; 2008. p. 489-509.
17. Doherty GM, al e. Estómago y duodeno. In Doherty GM. Diagnóstico y Tratamiento Quirúrgico.: LANGE; 2011. p. 413-436.
18. Díaz-Casasola L. Mucosa gástrica: mecanismos protectores y efectos dañinos del ácido acetilsalicílico. Enfoques fisiológico y bioquímico. Medicina e Investigación. 2015;; p. 1-4.
19. Palomo DR. Actualización de la fisiología gástrica. Medicina Legal de Costa Rica. 2010;; p. 1-10.
20. Palomo DR. ACTUALIZACIÓN DE LA FISIOLÓGÍA GÁSTRICA. Medicina Legal de Costa Rica. 2010;; p. 1-10.
21. Villalta D, al e. Autoimmunity and Gastric Cancer. International Journal of Molecular Sciences. 2018;; p. 1-14.
22. Alpizar-Alpizar W, al e. La inflamación y su papel en el desarrollo del cáncer gástrico. Acta méd. costarric. 2009;; p. 1-7.
23. Zagari RM, al e. Systematic review with meta-analysis: diagnostic performance of the combination of pepsinogen, gastrin-17 and Helicobacter pylori antibodies serum assays for the diagnosis of atrophic gastritis. Aliment Pharmacol. 2017;; p. 1-11.
24. Massimo Rugge MD, al e. Precancerous lesions in the stomach: From. EL SEVIER. 2015;; p. 1-19.
25. Roldán MV. Gastritis y Gastropatías. Gastroenterol. Perú. 2011;; p. 1-11.
26. Maaros PS, al e. Chronic gastritis. Scandinavian Journal of Gastroenterology. 2015;; p. 1-11.
27. Angós R. Gastritis. Medicine. 2016;; p. 1-8.
28. Park YH, al e. Review of Atrophic Gastritis and Intestinal. JOURNAL OF CANCER PREVENTION. 2015;; p. 1-16.

29. Arismendi-Morilloa G, al e. Estimación de riesgo de cáncer gástrico en pacientes con gastritis crónica asociada a la infección por *Helicobacter pylori* en un escenario clínico. *Revista de Gastroenterología de México*. 2013;; p. 1-9.
30. Syrjänen K. A Panel of Serum Biomarkers (GastroPanel®) in Non-invasive Diagnosis of Atrophic Gastritis. Systematic Review and Meta-analysis. *Anticancer Research*. 2016;(1-12): p. 1-12.
31. Xiang Li aHN, al e. The Diagnostic Value of Gastrin-17 Detection in Atrophic Gastritis. *Medicine*. 2016;; p. 1-9.
32. Haj-Sheykholeslami A. Increased Serum Pepsinogen II Level as a Marker of Pangastritis and. *Archives of Iranian Medicine*. 2016;; p. 1-4.
33. Salud Sd. Diagnostico y Tratamiento de la Dispepsia Funcional. *Catalogo Maestro de Guías de Práctica Clínica IMSS-071-08*. 2008;; p. 1-9.
34. Gisbert JP, al e. IV Conferencia Española de Consenso sobre el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. *Gastroenterología y Hepatología*. 2016;; p. 1-25.
35. Cosme A, al e. Antimicrobial Susceptibility-Guided Therapy Versus Empirical. *Helicobacter*. 2015;; p. 1-6.
36. Murillo PC, al e. Actualización en enfermedad ácido péptica. *Revista Clínica de la Escuela de Medicina*. 2015;; p. 1-8.
37. Lage J, all e. Surveillance of patients with gastric precancerous conditions. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2016;; p. 1-26.
38. Salud Sd. Guia de practica clinica. Diagnóstico y Tratamiento del Adenocarcinoma Gástrico en Pacientes Adultos. 2010;; p. 1-50.
39. OMS. Cancer. *Organizacion Mundial de la Salud*. 2018;; p. 1-2.
40. Aldaco-Sarvide F, al e. Mortalidad por cáncer en México: actualización 2015. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 2015;; p. 1-8.
41. López-Carrillo L, al e. Dieta y cáncer gástrico en México. *salud pública de méxico*. 2014;; p. 1-7.
42. Sáenz JB, al e. Acid and the basis for cellular plasticity and reprogramming in gastric repair and cancer. *GASTROENTEROLOGY & HEPATOLOGY*. 2017;; p. 1-17.
43. Villaverdea RM, al e. Cáncer de estómago. *Medicine*. 2017;; p. 1-7.

44. Guzman S, al e. Cancer Gastrico. REV.MED.CLIN.CONDES. 2014;; p. 1-8.
45. Lever-Rosas CD, al e. Cáncer gástrico. Abordaje multidisciplinario, cirugía, psico-oncología y calidad de vida. Rev Sanid Milit Mex. 2014;; p. 1-12.
46. Roshni Rathore RA. What's in a name? Bence Jones protein. Historical Note. 2012;; p. 1-6.
47. Pandey D, al e. Human Chorionic Gonadotropin: "The Magic Molecule". The Internet Journal of Endocrinology. 2009;; p. 1-6.
48. Lin MF, al e. Human Prostatic Acid Phosphatase: Structure. International Journal of Molecular Sciences. 2013;; p. 1-27.
49. Is I, al e. Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatomas. Medical. 2010;; p. 1-7.
50. Jorge J Y. Specific fine chromosomal defects in cancer: an overview. Hum Pathol. 1981;; p. 1-15.
51. Maya GC. Utilidad clínica de los marcadores tumorales. Medicina & Laboratorio. 2010;; p. 1-36.
52. Lazcano IH, al e. Marcadores Tumorales. REV CLÍN MED FAM. 2016;; p. 1-12.
53. Vega MPdl. Marcadores moleculares, variabilidad genética y evolución. III Simposium Científico en Biología Celular y Molecular. 2010;; p. 1-20.
54. Alcántara MR. Breve revisión de los marcadores moleculares. In Eguiarte LE, all e. Las herramientas moleculares. Ciudad de Mexico: El sevier; 2007. p. 247-265.
55. William F. Hickey M, al e. Ul trastructural Markers of Colonic Adenocarcin oma. American Cancer Society. 2007;; p. 1-6.
56. Rahirant S, al e. Técnica inmunocitoquímica para evaluar la proliferación de células en cultivo por la incorporación de bromodeoxiuridina. Biomedica. 2000;; p. 1-7.
57. Agudelo-Flórez P, al e. Evaluación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta para. Biomedica. 2006;; p. 1-8.
58. Pérez EM, al e. Aplicación de la técnica de inmunoperoxidasa para la Aplicación de la técnica de inmunoperoxidasa para latitulación de cepas del virus Dengue 1. VacciMonitor. 2001;; p. 1-5.

59. NY Y, al e. Alexa Fluor®* 488 Fluoronangold™. Nanoprobes. 2009;; p. 1-11.
60. Z. Corte MMC, al e. Marcadores tumorales en neoplasias gástricas. www.jano.es. 2010;; p. 1-8.
61. Yin L, al e. El valor de la expresión de M2 - PK y VEGF en pacientes con cáncer gástrico avanzado. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2013;; p. 1033-1039.
62. A.Menarini. MUC1 (MRQ-17) Mouse Monoclonal Antibody. *ImPath*. 2013;; p. 1-6.
63. Coronato S, al e. Rol de las metaloproteinas y sus inhibidores en patología tumoral. *MEDICINA*. 2012;; p. 1133-1139.
64. Sánchez-López JY, al e. Cáncer gástrico: alteraciones genéticas y moleculares. *Gaceta Médica de México*. 2011;; p. 1-2.
65. Aretxabala X, al e. Expresión y amplificación del gen HER2 en el cáncer gástrico avanzado. *Rev Med Chile*. 2013;; p. 1-9.
66. P. I, al e. Biological and clinical significance of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in non-small cell lung cancer. *Oncology Reports*. 2007;; p. 927-930.
67. Mauricio Velásquez Galvis M, al e. Atrofia, metaplasia y cáncer gástrico: ¿dónde está la evidencia? *Rev. Colomb Cir.* 2007;; p. 1-8.
68. Correa P. Cáncer gástrico: una enfermedad infecciosa. *Rev. Colomb. Cir.* 2011;; p. 1-7.
69. Me'graud F, al e. Pepsinógeno A, pepsinógeno C y gastrina como marcadores de gastritis crónica atrófica en dispepticos europeos. *British Journal of Cancer*. 2003;; p. 1-9.
70. Oliveros R, al e. Evaluación de la concentración sérica de pepsinógeno como método de tamizaje para gastritis atrófica y cáncer gástrico. *Asociaciones Colombianas de Gastroenterología, Endoscopia digestiva, Coloproctología y Hepatología*. 2003;; p. 1-5.
71. Ichinose M, al e. Proression of chronic atrophic gastritis associated with *Helicobacter pylori* infection increases risk of gastric cancer. *International Union Against Cancer*. 2004;; p. 138-143.
72. Magnuson SR, al e. Identificación de biomarcadores sanguíneos para la detección de lesiones premalignas y el diagnóstico el cáncer gástrico. *Asociaciones Colombianas de Gastroenterología, Endoscopia digestiva, Coloproctología y Hepatología*. 2017;; p. 1-13.

73. Madrid Mdl, al. e. Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Diario Oficial de la Federación. 1984;; p. 1-12.
74. Mundial AM. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. 2013;; p. 1-4.
75. Fajardo GE, al. e. Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos. DIARIO OFICIAL. 2012;; p. 1-12.
76. Rhin R. Mga 0311. Electroforesis. Feum Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 2015;; p. 1-10.
77. Mora DALdl, al e. Electroforesis. In Mora DALdl, al e. Metodología del DNA recombinante. Mexico: El sevier; 2014. p. 117-126.
78. Alconada AMM, al e. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de Arabidopsis thaliana. Universitario de Rabanales. 2011;; p. 1-16.
79. Antonio NRJ, al e. Evaluación de Procedimientos de Tinción para el Análisis de Proteínas por Electroforesis (SDS-PAGE). NVURNUS. 2013;; p. 19-27.
80. Karina MF, al. e. Western blot: a tool in the biomedical field. General interest. 2017;; p. 1-11.

ANEXOS

ANEXO 1.

Formatos de captura de datos

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS	
Nombre:	
Edad:	Sexo: M F
Diagnóstico:	
Gastritis Crónica	Tiempo de Diagnóstico:
	Comorbilidades: SI NO ¿Cual?:
	Reporte Endoscópico:
	Tratamiento:

	Intestinal	Difuso
	Tiempo de Diagnóstico:	
	Reporte Histopatológico:	
	Tratamiento:	
	Metastasis: SI NO	Quimioterapia: SI NO
	Radioterapia: SI NO	Otros:

Cáncer Gástrico		
-----------------	--	--

Formatos de consentimiento informado



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO
SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLITICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN
SALUD**

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
(ADULTOS)**

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS
DE INVESTIGACIÓN**

Nombre del estudio:

**Inmunodetección de un nuevo marcador tumoral de
cáncer gástrico en pacientes con gastritis crónica**

Patrocinador externo (si aplica):

Lugar y fecha:

Número de registro:

Justificación y objetivo del estudio:

El cáncer es la tercera causa de muerte en México, en lo que se refiere a cáncer gástrico ocupa el segundo lugar en mortalidad a nivel mundial y el tercero en México, se sabe que 60% de los casos son detectados en etapas avanzadas

En esta investigación se propone el estudio de la proteína CGA-5 que se ha encontrado en los sueros de pacientes con Cáncer Gástrico, con la finalidad de determinar la concentración del antígeno de esta proteína esta vez en los sueros de pacientes con gastritis crónica, con el objetivo de encontrar y utilizarlo como un nuevo marcador que nos ayudara en el diagnóstico y pronóstico de cáncer gástrico

Procedimientos:

Se obtendrá una muestra de sangre periférica por venopunción en pacientes con diagnostico endoscópico de Gastritis Crónica.

Posibles riesgos y molestias:

Dolor a la venopunción, sangrado mínimo y equimosis en sitio de punción.

Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:

Aportación a la inmunodetección de un nuevo marcador para cáncer gástrico y en caso de encontrar la proteína CGA-5 en el paciente, prevención para desarrollo futuro de cáncer gástrico.

Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:

Participación o retiro:

Privacidad y confidencialidad:

Solo se recopilaran edad y sexo de los pacientes, tendrán absoluta confidencialidad

En caso de colección de material biológico (si aplica):

No autoriza que se tome la muestra.

Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.

Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros.

Disponibilidad de tratamiento médico en derechohabientes (si aplica):

Beneficios al término del estudio:

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:

Investigador Dra. María Alicia Díaz y Orea

Responsable:

Colaboradores: Dr. Eduardo Gómez Conde, Dr. Aurelio López Colombo, MPSS
Emmanuel Marcelino Juárez Alvarado

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a:
Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso
Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono
(55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comision.etica@imss.gob.mx

Nombre y firma del sujeto

Nombre y firma de quien obtiene el
consentimiento

Testigo 1

Testigo 2

Nombre, dirección, relación y firma

Nombre, dirección, relación y firma

Este formato constituye una guía que deberá completarse de acuerdo con las características propias de cada protocolo de investigación, sin omitir información relevante del estudio

ANEXO 2

Cronograma de actividades

Grafica de Gantt

I. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES																								
(03 de Agosto 2017 – 29 de Mayo 2018)																								
PERIODO	Agos-Sept				Oct-Nov				Dic-Ener				Feb-Marz				Abril				Mayo			
ACTIVIDADES	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Búsqueda y procesamiento de la información bibliográfica y estadística.	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
Montaje de Técnicas					█	█	█	█																
Obtención de Muestras	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█
Corrimientos de electroforesis y Western Blot													█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█	█

7. Redacción y entrega del Documento Final.																															28
---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

ANEXO 3

Bioética

a. Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud

Publicada el 7 de febrero de 1984 en el Diario Oficial de la Federación establece que la investigación para la salud comprende el desarrollo de acciones que contribuyan al conocimiento de los procesos biológicos y psicológicos en los seres humanos, promoción de las actividades de investigación dentro de las instituciones de salud, impulsando la desconcentración y descentralización de las actividades de investigación, apoyar la coordinación entre instituciones de salud y las educativas que impulsen las actividades así como las disposiciones de bioseguridad de las investigaciones (73).

b. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial

La Asociación Médica Mundial (AMM) ha promulgado la Declaración de Helsinki como una propuesta de principios éticos para investigación médica en seres humanos, incluida la investigación del material humano y de información identificables.

El propósito principal de la investigación médica en seres humanos es comprender las causas, evolución y efectos de las enfermedades y mejorar las intervenciones preventivas, diagnósticas y terapéuticas (métodos, procedimientos y

tratamientos). Incluso, las mejores intervenciones probadas deben ser evaluadas continuamente a través de la investigación para que sean seguras, eficaces, efectivas, accesibles y de calidad (74).

c) Norma Oficial Mexicana Nom-007-SSA3-2011, para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.

Con fecha 19 de julio de 2010, fue publicado en el Diario Oficial de la Federación el Proyecto de Modificación de esta norma, en cumplimiento a la aprobación del mismo por parte del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Innovación, Desarrollo, Tecnologías e Información en Salud; de conformidad con lo previsto en el artículo 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, a efecto de que en los siguientes 60 días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentaran sus comentarios ante el Comité Consultivo Nacional de Normalización de Innovación, Desarrollo, Tecnologías e Información en Salud.

Que durante el periodo de Consulta Pública de 60 días naturales que concluyó el día 17 de septiembre del 2010, fueron recibidos en la sede del mencionado Comité, comentarios respecto del Proyecto de Modificación de la Norma Oficial Mexicana, razón por la que con fecha previa fueron publicadas en el Diario Oficial de la Federación las respuestas a los comentarios recibidos por el mencionado Comité, en los términos del artículo 47 fracción III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

La norma consta de 13 apartados entre los que incluye: Disposiciones generales, Disposiciones específicas, Contratos de servicios de referencia o de subcontratación, Aseguramiento de la calidad, Higiene y bioseguridad, Publicidad, Concordancia con normas internacionales y mexicanas, entre otros. Siendo el más importante para esta investigación el de higiene y bioseguridad por la toma de muestra periférica y la venopunción al paciente.

El presente trabajo se adhiere a la normatividad promulgada por la AMM y las normas oficiales correspondientes a la bioseguridad del paciente y en este sentido, únicamente se tomara una muestra de sangre por venopunción a los pacientes; en

cuanto a las estipulaciones del Expediente clínico, solo se tomara Edad y Sexo por lo que se mantendrá la confidencialidad de los pacientes.

Por lo que en todo momento actuaremos con ética, responsabilidad, dedicación y todas las normativas que conlleve el desarrollo de este proyecto, ya que este trabajo es únicamente para el desarrollo de la Medicina en su ámbito científico para desarrollarlo a nivel práctico (75).

ANEXO 4.

Definiciones operacionales

NOMBRE	DEFINICIÓN OPERACIONAL
Genero	Masculino o Femenino de los pacientes con diagnóstico de Gastritis Crónica, Cáncer Gástrico o Sujetos Normales.
Edad	0-99 años de edad en los pacientes con diagnóstico de Gastritis Crónica, Cáncer Gástrico o Sujetos Normales.
Antígenos de Secreción Tumoral	Presencia o ausencia de los antígenos de secreción obtenidos del cultivo de células tumorales, determinando peso molecular mediante electroforesis.
Nivel de Anticuerpos	Alto o Bajo, determinando porcentajes de 0-99 de los sueros de pacientes con gastritis crónica, cáncer gástrico y sujetos normales mediante Western-blot/ Fotodocumentador.
Antecedente de Diagnóstico	Meses o años de diagnóstico de cáncer gástrico o gastritis crónica obtenida mediante la hoja de recolección de datos.
Cambios Histológicos	Obtención del reporte histopatológico mediante sistema Sydney de los pacientes con diagnóstico de gastritis crónica.
Cáncer Gástrico	Intestinal o Difuso, determinado mediante las biopsias de tumor de pacientes con cáncer gástrico

<i>Helicobacter Pylori</i>	Reporte histopatológico obtenido de biopsia por endoscopia en pacientes con gastritis crónica.
-----------------------------------	--

Definiciones conceptuales

NOMBRE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL
Género	Características Sexuales Secundarias de un individuo.
Edad	Cantidad de años que un ser ha vivido desde su nacimiento.
Antígenos de Secreción Tumoral	Son sustancias biológicas o bioquímicas que aparecen como respuesta del organismo ante cierto tipo de tumores, se detectan en el torrente sanguíneo y reflejan su crecimiento y actividad. Los marcadores de secreción constituyen un subgrupo que engloba sustancias elaboradas por el tumor o por el organismo sobre el que se asienta.
Nivel de Anticuerpos	Macromoléculas glucoprotéicas que son sintetizadas por el aparato inmunológico de un vertebrado superior en respuesta a un antígeno, con el cual reaccionan específicamente a fin de contribuir a su eliminación.
Antecedente de Diagnóstico	Tiempo en meses o años en los que se identifica una enfermedad, entidad nosológica, síndrome, o cualquier estado de salud.
Cambios Histológicos	Modificaciones en la estructura, composición, y las características de los tejidos orgánicos.
Cáncer Gástrico	Crecimiento descontrolado de las células anormales que cubren la superficie interna del estómago.

<i>Helicobacter Pylori</i>	Bacteria descubierta en el año 1983, que afecta la mucosa del estómago y duodeno, etiología principal de gastritis.
-----------------------------------	---

ANEXO 5

Descripción de las técnicas de medición de las variables relevantes

a. Técnica de Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS PAGE)

- Definición

El termino electroforesis se refiere al movimiento de moléculas cargadas en respuesta a un campo eléctrico, resultando en su separación.

- PAGE

PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

Técnica para la separación de proteínas según su movilidad en un campo eléctrico a través de una matriz de poliacrilamida, la velocidad de migración es proporcional a su masa molecular, carga, forma y tamaño.

- Objetivo

Separación de proteínas.

Para el presente trabajo se llevó acabo la electroforesis vertical discontinua.

Reactivos:

- Agua Desionizada (H₂O DI).
- Monómero de acrilamida.
- Solución amortiguadora (Hidroximetil) amino metato (Tris HCL 1.5 M pH 8.8).
- Solución amortiguadora (Hidroximetil) amino metato (Tris HCL 0.5 M pH 6.8).
- Duodecil sulfato de sodio (SDS 10%).
- Persulfato de Amonio (PSA 10%).
- TEMED.
- Buffer de corrida.
- Buffer de muestra o solución amortiguadora de muestra.
- Marcador de peso molecular: Estándar de peso molecular.
- Solución de tñido Azul de Coomassie.

Material

- Fuente de electroforesis.
- Equipo de electroforesis (Cubeta de electroforesis con cristalería, peines y separadores).
- Pipetas.
- Sanitas.
- Cristalería.

Procedimiento:

La electroforesis es una técnica de separación de proteínas sencilla de efectuar y reproducir, antes de iniciar se debe asegurar que todo el material a utilizar (vidriería y equipo de electroforesis), estén previamente lavados cuidadosamente y enjuagados con agua destilada, la muestra por analizar almacenada adecuadamente a 4 grados centígrados y al ser usada en un medio estéril. El equipo

de electroforesis se ensambla, primero colocando el bastidor con los vidrios de electroforesis, el vidrio con espaciadores queda posterior al vidrio plano, ya ensamblado se procede a colocar en el soporte armado de acuerdo a las instrucciones del equipo. Al mezclar en un matraz las soluciones para preparar el gel de acuerdo a la concentración elegida (Gel separador 10% y gel concentrador 5%), se deja de 15 a 10 minutos para eliminar gases, se agregan los reactivos catalizadores PSA y TEMED. El primer gel separador habitualmente ocupa 4/5 partes del total del gel, al colocar el primer gel se adiciona aproximadamente 1 cm de agua destilada con una pipeta Pasteur con la finalidad de que la superficie quede plana y evitar la oxigenación, para una polimerización eficiente, una vez polimerizado el gel separador se retira el agua con papel filtro, se realiza el mismo procedimiento inicial con el gel concentrador a excepción de agregar agua destilada, al agregarse el gel concentrador se procede a colocar el peine de plástico de 10 pozos (30ul pozo), 10 minutos después se desensambla el soporte y el bastidor quedando los vidrios de electroforesis y el gel de electroforesis discontinuo, se arma el soporte para geles y se introduce en el tanque para colocar el buffer de corrida, a través de la guía de carga de muestra se colocaran 30ul de muestra por pozo (76).

La cámara de electroforesis es un dispositivo que permite la generación de un campo eléctrico alrededor del gel en el cual se depositan las muestras, el campo se genera dentro de la solución amortiguadora (buffer de corrida), en la que se encuentra sumergido el gel, el alto contenido de electrolitos permite la transmisión de la corriente eléctrica, manteniendo el pH estable al paso de la corriente, dicha cámara cuenta con dos polos que se conectan a la fuente de poder, el polo positivo se encuentra en la parte inferior de la cámara (electroforesis vertical), identificado con el color rojo y el negativo con el color negro, la acrilamida es un polímero sintético, termoestable, incoloro y químicamente inerte, con el que se puede generar geles con un amplio intervalo de tamaño de poro, la polimerización de los geles es debida a la polimerización química de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida (N,N'-metilenbisacrilamida compuesta por dos moléculas de poli(acrilamida) enlazadas por sus grupos amino), el tamaño del poro depende de la concentración

total de acrilamida presente, la cual debe manejarse con precaución debido a que es neurotóxica. El gel utilizado discontinuo contiene un gel concentrador (superior), el cual al tener un pH de 6.8 menor al buffer de corrida, proporciona un ambiente para que las proteínas recubiertas con SDS se concentren, el segundo gel con un pH 8.8, es donde las proteínas se separan de acuerdo con su tamaño (77).

Las proteínas colocadas en el buffer de muestra se desnaturalizan a través de calor lo que permite la pérdida de la estructura cuaternaria y terciaria, el agente reductor 2-mercaptoetanol reduce los puentes disulfuro a grupos tioles que aseguran la pérdida de la estructura secundaria, el detergente (SDS), el SDS se une a las proteínas (SDS-proteína o carga/masa), rompiendo interacciones hidrofóbicas, se une una molécula de SDS por cada dos residuos de aminoácidos, el SDS enmascara la carga original de la proteína, después de 10 minutos de enfriarse la muestra se coloca 30 ul por pozo del gel concentrador a 50 V, en el que se lleva a cabo la movilización y concentración de las proteínas de forma intermedia entre los iones cloro del gel y el ión glicina Gly del buffer de muestra una vez acomodadas las cargas iónicas pasan al gel separador a 100V, que por su pH básico favorece la ionización de la glicina de forma que sus iones migran a través de los polipeptidos concentrados, justo por detrás de los iones cloro, a partir de este momento migran por el gel separador en una zona de voltaje y pH uniforme de forma que se separan en base a su tamaño a menor tamaño, mayor movilidad de la proteína y viceversa (78).

Las proteínas separadas en el gel de BisAcrilamida serán visualizadas a través de métodos de tinción, utilizando moléculas afines a las proteínas, tal como el azul de Coomassie, diluido en una solución apropiada, se une por atracción de fuerzas de Van Der Waals al grupo amino de las proteínas (79) .

Preparar Buffer de corrida



- H₂O DI 1000 ml
- Tris NO₃ 3.03gr
- Glicina 14.40 gr
- SDS 1.00 gr

Preparar Buffer de muestra



- Azul de bromofenol 20ul
- Mercapto 50ul
- SDS 10% 200ul
- H₂O DI 355ul
- Tris pH 6.8 125ul
- Glicerol 250ul

Reactivo	10%	5%
H ₂ O DI	2 ml	2.1ml
Acrilamida 30%	1.67 ml	500ul
Tris	pH 8.8 / 1.25 ml	pH 6.8/380ul
SDS	50ul	30ul
PSA	25ul	15ul
TEMED	2.5ul	1.5ul

1. Armar el bastidor sándwich con vidrio plano y vidrio más espaciadores integrados de electroforesis en una superficie plana.
2. Preparación de gel separador y gel concentrador.
3. Colocar Gel separador 10 minutos posteriormente colocar el gel concentrador más el peine de plástico para 10 pozos (30ul).
4. Armar el módulo de electroforesis.

5. Colocar el modulo en el tanque de electroforesis.
6. Preparar muestras en buffer de muestra:
 - Dilución 1:1000 (suero:H₂O DI)
 - 15ul buffer de muestra
 - 15ul de muestra
 - Colocarlas a 100 grados centígrados de 5 a 10 minutos.
7. Retirar peine de plástico.
8. Colocar en el primer pozo 3ul de pesos moleculares en los consecutivos 30ul de muestra por pozo.
9. Se agrega al tanque el buffer de corrida, colocamos la tapa del tanque de electroforesis conectando correctamente los electrodos a la fuente de poder y se corre 50 V el gel concentrador y 100 V el gel separador.
10. Se desmonta el gel y se realiza lavados y tinción.
 - Lavados en H₂O DI por 5 minutos cada uno.
 - Teñir con azul de Coomassie por 24 horas.
 - Desteñir con ácido acético/metanol al 5%

- Determinar las proteínas por su peso molecular de acuerdo al peso molecular registrado en el primer carril.

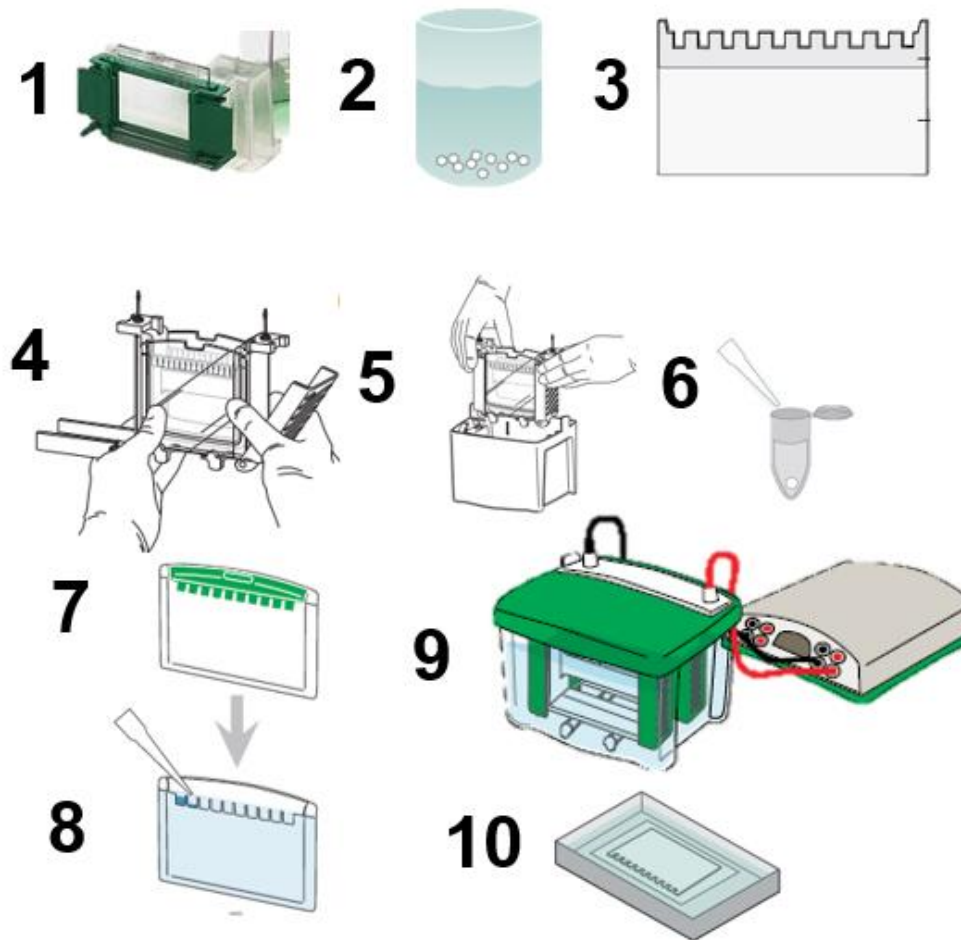


Figura 11. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

(Tomado de <http://conogasi.org/articulos/metodo-gel-de-poliacrilamida-para-proteinas/>)

b. Reconocimiento de antígenos de secreción tumoral por WESTERN BLOT.

El western blot también conocido como inmunoblotting fue descrito por primera vez por Towbin et al. En 1979. La especificidad de la unión antígeno–anticuerpo permite la detección de una única proteína dentro de una mezcla compleja de otras proteínas, se utiliza para obtener datos cualitativos y semicuantitativos sobre la

misma (80).

El primer paso para realización del Western Blot es la separación de las macromoléculas mediante geles de electroforesis (SDS-PAGE); después de la misma, las macromoléculas separadas por su peso molecular se transfieren a una segunda matriz (membrana de nitrocelulosa o PVDF). Posteriormente, se bloquea la membrana para evitar la unión inespecífica a su superficie de los anticuerpos que se van a utilizar para la detección de la proteína de interés. En el siguiente paso, se une a dicha proteína transferida un anticuerpo específico marcado con una enzima y, finalmente, se añade un sustrato apropiado para dicha enzima con lo que se produce un producto detectable como, por ejemplo, un precipitado cromogénico o fluorogénico en la membrana, es importante conocer que la intensidad de la señal se correlaciona con la cantidad del antígeno en la superficie de la membrana.

En el presente proyecto, se realizará una electroforesis, transfiriendo los antígenos de secreción tumoral a una membrana de nitrocelulosa y revelándola con los sueros de las pacientes, como primer anticuerpo y como segundo anticuerpo y una anti IgG humana acoplada a peroxidasa, como sustrato se utilizará tetrametil bencidina. Se verificarán las bandas reconocidas al escanear y capturar las imágenes presentes en la membrana. En un fotodocumentador Bio-rad.