

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**DESARROLLO DE MODELOS REPRESENTATIVOS PARA EL ESTUDIO DE CÁNCER GÁSTRICO Y
EVALUACIÓN DE AGENTES CON POTENCIAL ANTITUMORAL EN CÉLULAS DE CÁNCER
GÁSTRICO PRIMARIO Y DE MESTÁSTASIS GÁSTRICA EN HÍGADO**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en
Ciencias Biomédicas para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencias
Biomédicas con énfasis en Bioquímica

NATALIA ORTIZ CHAVES

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2012

Dedicatoria y Agradecimientos

La conclusión de este trabajo ha sido el fruto de mucho esfuerzo de todo un grupo de personas que desde el inicio de mis estudios de posgrado me han apoyado y me han permitido crecer tanto en el área profesional como personal.

El principal agradecimiento es hacia mi tutora, la Dra. Cecilia Díaz, ya que desde un primer momento tuvo confianza en mí y me ha brindado un apoyo incondicional durante todo este proceso. Todo lo que he logrado hasta este momento sería imposible sin sus sabios consejos y espero poder seguirlos recibiendo más adelante.

En segunda instancia, tengo un profundo agradecimiento con mis asesoras de tesis, la Dra. Vanessa Ramírez y la Dra. Teresa Escalante, cuya asesoría ha sido invaluable.

Todo este trabajo hubiera sido imposible sin la colaboración de una gran cantidad de personas a las que quisiera hacer un reconocimiento especial:

Aranza Sáenz, Ernesto Vargas, Adrián Salas y Karol Granados, todos contribuyeron directamente de alguna manera durante la realización de este trabajo.

Dra. Teresa Frisan y la Dra. Ximena Cortes por todo su apoyo y aportes durante mi pasantía en el Instituto Karolinska.

Compañeros del Journal Club por toda la paciencia y sabios consejos brindados.

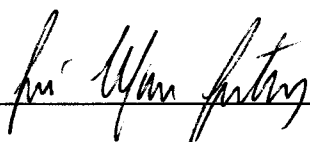
Compañeros del Instituto Clodomiro Picado

Compañeros del Departamento de Bioquímica

Así mismo quisiera agradecer a la Dra. Marcela Suárez y al Dr. Juan Alberto Morales, ambos profesionales de la Escuela de Veterinaria de la Universidad Nacional por suministrarme material y asesoría valiosa para poder realizar esta tesis.

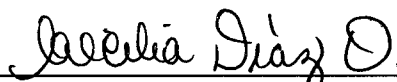
Finalmente este trabajo es dedicado a toda mi familia, ya que son los que han estado detrás de cada minuto de trabajo apoyándome en todo momento.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencias Biomédicas con Énfasis en Bioquímica.”



Dr. José María Gutiérrez Gutiérrez

Representante de la Decana del Sistema de Estudios de Posgrado



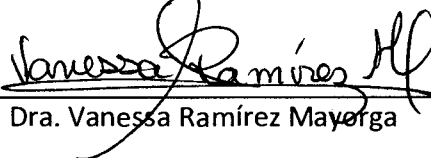
Dra. Cecilia Díaz Oreiro

Directora de Tesis



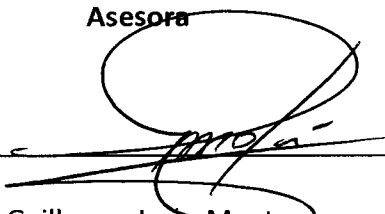
Dra. Teresa Escalante Muñoz

Asesora



Dra. Vanessa Ramírez Mayorga

Asesora



Dr. Guillermo León Montero

Representante de la Directora de Programa de Posgrado en Ciencias Biomédicas



Natalia Ortiz Chaves

Candidata

Tabla de contenidos

Dedicatoria y Agradecimientos	ii
Carta de aceptación	iii
Resumen	vi
Lista de Cuadros	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Abreviaturas	x
Introducción	1
Hipótesis	4
Antecedentes	5
1. Carcinogénesis	5
2. Cáncer Gástrico	7
2.1. Etiología	7
2.2. Papel de la apoptosis en la génesis del cáncer gástrico	10
2.3. Tipos de cáncer gástrico	12
2.4. Metástasis del cáncer gástrico	15
2.5. Tratamiento	16
3. Modelos <i>in vitro</i> para el estudio del cáncer gástrico	20
4. Modelos animales para el estudio del cáncer gástrico	22

Objetivos	27
Metodología	28
Resultados	37
Discusión	59
Conclusiones	72
Perspectivas Futuras	74
Bibliografía	76

Resumen

El cáncer gástrico es la sexta neoplasia más común a nivel mundial y la primera causa de muerte por tumores en Costa Rica, la supervivencia de los pacientes se ve limitada por dificultades en el diagnóstico y la carencia de opciones terapéuticas que permitan mejorar la expectativa de vida. En el siguiente estudio se efectuaron una serie de modelos de investigación que permitirán en un futuro comprender mejor la patología de este tumor y se evaluó la acción terapéutica de retinoides de origen natural y sintético en células de cáncer gástrico. Por medio de la inducción química con MNNG se logró establecer un modelo *in vivo* de carcinogénesis en estómagos de ratas Wistar, en el cual fue posible observar la aparición de tumores en el epitelio estratificado plano queratinizado a partir de la semana 22 de iniciado el ensayo, mientras que para la semana 40 se observaron adenomas en el epitelio cilíndrico simple. Adicionalmente se procuró investigar el papel de la bacteria *Helicobacter pylori* en el desarrollo del cáncer gástrico por medio de la inoculación de dos cepas de la bacteria (CagA+ y CagA-) en el estómago de ratas Wistar, así como el efecto de su administración en conjunto con el MNNG, sin embargo los resultados de estos modelos estuvieron limitados debido a la ausencia de detección de la bacteria en los estómagos de las ratas inoculadas. Además, se estableció un modelo *in vitro* de cultivo celular tridimensional, el cual permite reproducir ciertas de las características observadas *in vivo* en los tumores, en este caso se pudo determinar que las dos líneas celulares de cáncer gástrico presentaron un comportamiento distinto, ya que las células NCI-N87 provenientes de una metástasis gástrica en hígado lograron formar esferoides compactos mientras que las células AGS que son originarias de un tumor primario formaron estructuras fácilmente dispersables y no esferoides compactos.

Finalmente se evaluó el efecto de los retinoides naturales ATRA y el ácido retinoico-13-cis, así como el retinoide de origen sintético retinamida sobre la viabilidad de las células AGS y NCI-N87. Los ensayos de citotoxicidad por medio de la reducción del MTT permitieron observar una variación en la susceptibilidad de los dos tipos de células, ya que las células NCI-N87 fueron resistentes al tratamiento con los dos retinoides naturales, mientras que estos sí fueron tóxicos sobre las células AGS. El único tratamiento que tuvo un efecto citotóxico sobre las dos líneas celulares fue la retinamida, la cual presentó concentraciones inhibitorias semejantes en los dos tipos de células, por lo que su potencial empleo para el tratamiento de tumores gástricos primarios y metastásicos merece más estudios.

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Diámetro de los esferoides tratados con doxorubicina y cicloheximida	42
Cuadro 2. Concentraciones inhibitoras de la viabilidad de los retinoides y la doxorubicina	45

Lista de Figuras

Figura 1. Diseño experimental para la formación de tumores en estómagos de ratas	32
Figura 2. Esferoides formados a partir de células de cáncer de colon y cáncer gástrico	38
Figura 3. Agregados multicelulares inestables de células AGS	39
Figura 4. Agregados multicelulares compuestos por las células NCI-N87	39
Figura 5. Esferoides de células NCI-N87 por microscopía de fluorescencia	40
Figura 6. Comparación del tamaño de los esferoides formados por células NCI-N87 y HT29	41
Figura 7. Efecto de la doxorubicina sobre los esferoides de células NCI-N87	43
Figura 8. Curva de citotoxicidad de la doxorubicina en las células de cáncer gástrico AGS y NCI-N87	44
Figura 9. Curvas de citotoxicidad de los retinoides naturales sobre las células de cáncer gástrico AGS y NCI-N87	46
Figura 10. Curva de citotoxicidad de la retinamida sobre las células de cáncer gástrico AGS y NCI-N87	46
Figura 11. Peso promedio de las ratas en el modelo de inducción de cáncer gástrico con MNNG	47
Figura 12. Lesiones macroscópicas de los estómagos tratados con MNNG por 40 semanas	48
Figura 13. Mucosa gástrica de estómagos tratados con MNNG por 10 semanas	48
Figura 14. Lesiones en el epitelio queratinizado de estómagos tratados con MNNG por 22 semanas	50
Figura 15. Lesiones en el epitelio de estómagos tratados con MNNG por 33 semanas	51
Figura 16. Estómago normal de una rata control a las 40 semanas	52

Figura 17. Lesiones en estómagos tratados con MNNG por 40 semanas	53
Figura 18. Tinción por inmunohistoquímica de PCNA en un estómago tratado por 40 semanas	53
Figura 19. Peso promedio de las ratas en los modelos de inducción de cáncer gástrico con <i>H. pylori</i> solo y en conjunto con MNNG	54
Figura 20. Resultado de amplificación de secuencias de ADN de <i>H. pylori</i>	55
Figura 21. Tinción de Giemsa en estómagos de ratas inoculadas con <i>H. pylori</i>	57
Figura 22. Histología de estómagos de ratas en los modelos de inducción de cáncer gástrico con <i>H. pylori</i> solo y en conjunto con MNNG	58

Lista de Abreviaturas

Ala: Alanina

ANOVA: Análisis de varianza

ATCC: American Type Culture Collection

ATRA: Ácido trans retinoico

Bax: Proteína X asociada a Bcl-2

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

BSA: Albúmina sérica bovina

cagA: Gen asociado a la citotoxina

Cat: Número de catálogo

CDH: gen que codifica para la proteína E-cadherina

c-Met: Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos

CTS: Caldo de Triptona Soya

DAB: 3,3'-diaminobenzidina

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DEN: Dietilnitrosamina

dNTP: desoxinucleótido trifosfato

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidermal

FasL: Ligando de la proteína Fas

FDA: Food and Drug Administration

FITC: Fluoresceína isotiocianato

GIST: Tumores estromales gastrointestinales

Glu: Glutamato

HER-2: Receptor del factor de crecimiento epidermal

H. felis: *Helicobacter felis*

H. heilmanii: *Helicobacter heilmanii*

H. pylori: *Helicobacter pylori*

H. suis: *Helicobacter suis*

H & E: Tinción de hematoxilina y eosina

IARC: Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer

IFN- γ : Interferón gamma

IL-1B: Interleucina 1B

IL-8: Interleucina 8

IL-10: Interleucina 10

Ile: Isoleucina

INISA: Instituto de Investigaciones en Salud

INS-GAS: Insulina-Gastrina

kDa: kilodaltons

MALT: Tejido linfoide asociado a la mucosa

MNNG: N-metil-N'-Nitro-N-nitrosoguanidina

MNNU: N-metil-N'-Nitrosourea

MTT: 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H bromuro de tetrazolio

mm: Milímetro

NFkB: Factor nuclear kappa B

nm: Nanómetro

PAI: Isla de patogenicidad

PBS: Solución amortiguadora de sales de fosfato

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Pro: Prolina

RB: Proteína del retinoblastoma

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

TP53: Proteína tumoral 53

Tyr: Tirosina

***vacA*:** Gen que codifica para la citotoxina vacuolizante

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

μ l: Microlitro

μ M: Micromolar

Introducción

El cáncer gástrico es el sexto tumor más común en el mundo, por detrás de los tumores que se presentan en mama, próstata, pulmón, cérvix y el cáncer colorrectal. Se calcula que alrededor de 989 600 nuevos casos son diagnosticados cada año a nivel mundial (Ferlay et al, 2010).

Pese a que en las últimas décadas la incidencia y la tasa de mortalidad se han visto reducidas, el cáncer gástrico se mantiene como la segunda causa de muerte por neoplasias a nivel mundial, solo por detrás del cáncer de pulmón (Crew y Neugut, 2004 y Ferlay et al, 2010).

En ciertos países como Japón alcanza proporciones epidémicas, ya que 70 de cada 100 mil personas sufren de cáncer gástrico. Se estima que en ese país para la edad de 75 años el riesgo acumulativo de desarrollar cáncer gástrico es del 11% (Barr, 2007). Las regiones con mayor incidencia de este tumor se localizan en el este de Asia y Europa así como Latinoamérica, siendo los 6 países con mayor incidencia la República de Corea, Mongolia, Japón, China, Honduras y Guatemala (Ferlay et al, 2010). Por el contrario hay zonas geográficas con una baja incidencia de tumores en estómago, principalmente son regiones en África, Europa Occidental, América del Norte y Australia (Barr, 2007; Kountouras et al, 2008 y Ferlay et al, 2010).

En Costa Rica el cáncer gástrico constituye la principal causa de muerte por tumores y de acuerdo a estimaciones del proyecto GLOBOCAN de la Organización Mundial de la Salud, ocupa el lugar 11 en cuanto a países con mayor incidencia de cáncer gástrico. En este estudio, se estimó que para el año 2008 la tasa de incidencia por 100 mil habitantes fue de 28,5 para hombres y 15,6 para mujeres, con una tasa de mortalidad por 100 mil habitantes de 23,6 y 10,6 respectivamente (Ferlay et al, 2010). A la vez, se ha reportado una gran variabilidad en la prevalencia de esta enfermedad con respecto a la ubicación geográfica dentro del país (Mora, 2003). De acuerdo a los datos suministrados

por el Registro Nacional de Tumores de Costa Rica, para el período comprendido entre los años 2000 y 2007 se observó una mayor mortalidad por este tumor en hombres en las zonas de Cartago y San José, con tasas ajustadas de mortalidad por 100 mil habitantes de 37,75 y 25,01, respectivamente; mientras que en el caso de las mujeres la mayor mortalidad se observó en Cartago y Alajuela, con tasas ajustadas de mortalidad por 100 mil habitantes de 19,1 y 14,54, respectivamente (Ministerio de Salud, 2010).

En general, la incidencia de cáncer gástrico aumenta de manera proporcional con la edad, presentándose un pico de mayor ocurrencia entre los 50 y 70 años, sin embargo en casos de familias con riesgo hereditario el diagnóstico se puede dar a una edad más temprana (Hatakeyama, 2009). Se ha observado que la tasa de incidencia de cáncer gástrico es mayor en personas de raza negra, grupos de bajo nivel socioeconómico y países en vías de desarrollo (Catalano et al, 2009).

La sobrevida de los pacientes con cáncer gástrico es muy corta, debido a que la mayoría de los casos son diagnosticados en etapas muy avanzadas, y la probabilidad de curación es muy reducida (Kountouras et al, 2008). Adicionalmente, este tipo de tumor presenta recurrencias y una alta incidencia de metástasis (Drebber et al, 2008), y la cirugía y quimioterapia solo han proporcionado resultados modestos en la sobrevida de los pacientes con cáncer gástrico, presentado una tasa de sobrevida a 5 años menor al 24% (Jemal et al, 2007 y Dassen et al, 2010).

La metástasis a hígado es una de las principales rutas de diseminación de los tumores gástricos y representa todo un reto ya que no es curable y tiene un desenlace fatal con una sobrevida a 5 años menor al 10% (Shirabe et al, 2003). El tratamiento de este tipo de lesión avanzada consiste principalmente en un régimen paliativo que usualmente involucra la resección del estómago, quimioterapia y en algunos casos se realiza la resección hepática (Thelen et al, 2008).

En cuanto al tratamiento del cáncer gástrico, la combinación de agentes quimioterapéuticos se ha considerado la mejor estrategia, pero las dosis clínicamente efectivas son muy elevadas, por lo que su empleo se asocia a una alta toxicidad. Por tanto se está promoviendo el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que tengan como blanco principal, vías de señalización moleculares que se expresan de manera diferente entre las células tumorales y normales, con el objetivo que la quimioterapia sea menos tóxica sobre las células normales (Song et al, 2009). Otro abordaje que se está investigando es el efecto quimiosensibilizante de ciertos productos naturales y sintéticos, lo cual permitiría aumentar la eficacia de los tratamientos y disminuir los efectos adversos ocasionados por el uso de agentes antineoplásicos (Weller et al, 2011 y Whitworth et al, 2011).

Además de las dificultades en el diagnóstico de este tipo de tumor, no se ha logrado establecer un tratamiento óptimo que logre mejorar significativamente la sobrevivencia de las personas con cáncer gástrico, principalmente en estadios avanzados. Actualmente, las opciones terapéuticas disponibles generan un gran cambio en el estilo de vida de las personas y los resultados obtenidos son principalmente paliativos, ya que únicamente han logrado generar un aumento en la sobrevivencia del paciente en unos pocos meses.

Por tanto, apremia la necesidad de investigar nuevas opciones terapéuticas que sean más eficaces, pero que a la vez sean más selectivas, con el fin de reducir los efectos adversos producidos por la terapia antitumoral. Para lograr este propósito es fundamental el desarrollo de nuevos modelos más realistas que permitan estudiar la evolución del cáncer gástrico desde sus etapas iniciales, así como el efecto de agentes con potencial quimiopreventivo y terapéutico.

Hipótesis

1- Las células NCI-N87, al haberse desarrollado en un ambiente diferente y haber sufrido algunas adaptaciones a estas condiciones, presentan una mayor resistencia a estímulos pro-apoptóticos como los inducidos por los retinoides de origen natural: ácido retinoico todo trans y ácido retinoico-13-cis y el retinoide sintético 4-hidroxifenil retinamida.

2. La administración intragástrica del agente carcinogénico N-metil-N'-Nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) en el estómago de ratas Wistar, permite reproducir un modelo de inducción química de cáncer gástrico.

3- La inoculación de la bacteria *Helicobacter pylori* (aislada de estómagos humanos) en el estómago de ratas Wistar permite reproducir un modelo de infección bacteriana similar al que ocurre en el ser humano,

4- La inoculación de la bacteria *Helicobacter pylori* en conjunto con la administración intragástrica del agente carcinogénico N-metil-N'-Nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) en el estómago de ratas Wistar permitirá observar diferencias en el fenotipo del tumor, las cuales son dependientes de la cepa de la bacteria.

Antecedentes

1. Carcinogénesis

Desde 1914 Boveri estableció la base genética de la carcinogénesis al plantear la teoría de la mutación somática, la cual fue reforzada posteriormente con el descubrimiento de los oncogenes y los genes supresores de tumores (Stanbridge, 1990; Bishop, 1991 y Cohen y Ellwein, 1991). En 1940 algunos investigadores comenzaron a presentar evidencias sobre las múltiples etapas que constituyen la carcinogénesis, y desde 1947 se introduce el modelo de iniciación y promoción, el cual fue descrito más profundamente por Knudson en 1971 (Cohen y Ellwein, 1991).

El desarrollo de tumores en mamíferos ocurre a través de una serie de tres etapas definidas: iniciación, promoción y progresión. En primera instancia estas fases fueron descritas en modelos animales de carcinogénesis en roedores, pero se aplican de manera general (Pitot et al, 2000). La iniciación involucra habitualmente una mutación no letal en el ADN que altera el genoma de la célula, si esta célula entra a la fase de replicación este error quedará "fijado". La fase de promoción se caracteriza por la expansión clonal de células previamente iniciadas, esta etapa consiste en la inducción de la proliferación y/o la inhibición de la apoptosis, ya para este momento se puede identificar la formación de una lesión focal. La promoción es un proceso reversible que requiere la presencia continua del estímulo promotor. Finalmente en la progresión se da la acumulación de alteraciones genéticas adicionales que llevan a una transición de las células hacia un fenotipo maligno y ya este proceso es irreversible (Pitot et al, 2000; Goodman y Watson 2002 y Klaunig y Kamendulis, 2004).

El concepto de iniciación se derivó de una observación en que la exposición a ciertos agentes físicos o químicos a una dosis por debajo de un umbral no parecía producir cáncer durante toda la vida del organismo, pero la posterior exposición a agentes o condiciones no carcinogénicas sí permitían el desarrollo del tumor (Trosko et al, 2004).

Pese a que la mayoría de los agentes iniciadores de la carcinogénesis son capaces de actuar también como mutágenos, también existen agentes no mutagénicos que pueden actuar como iniciadores, como se ha visto recientemente en estudios en los cuales se demuestra que la epigenética puede participar como un segundo mecanismo de iniciación de la carcinogénesis, a través por ejemplo de la hipermetilación de genes supresores de tumores o más bien la hipometilación de oncogenes, llevando a un aumento en su expresión (Goodman y Watson, 2002 y Lohrum et al, 2007).

La carcinogénesis es un proceso muy complejo constituido por una serie de etapas en las cuales las células van a sufrir una transformación. En primera instancia en el año 2000, Hanahan y Weinberg establecieron 6 alteraciones claves a nivel celular que ocurren en el desarrollo de los tumores, sin embargo actualmente este concepto se ha ampliado con la descripción de 10 características distintivas de las células tumorales. Una de las etapas más iniciales en esta transformación consiste en que las células presentan una señalización de proliferación sostenida, a la vez que logran evadir la acción de las proteínas supresoras del crecimiento TP53 y RB (proteína asociada a retinoblastoma). Una tercera alteración clave consiste en que estas células adquieren un potencial ilimitado para replicarse, por lo cual se inmortalizan. De la mano con la inmortalización de estas células, se ha observado la adquisición de mutaciones e inestabilidad genómica, las cuales generan defectos en el mantenimiento y la reparación del material genético. Adicionalmente estas células presentan una resistencia a sufrir muerte celular, ya sea por apoptosis, autofagia o incluso necrosis. Otra de las observaciones sobre diferencias entre las células tumorales y las células normales, radica en que las primeras realizan un metabolismo energético mucho más dependiente de la glicólisis que las células normales, al grado que existen subpoblaciones celulares que utilizan lactato como combustible. La relación entre el desarrollo de tumores y el papel del sistema inmune es sumamente compleja, ya que a la vez que las células tumorales logran evadir su destrucción por el sistema inmune innato y adaptativo, promueven un microambiente pro inflamatorio, el cual las provee de señales proliferativas y de supervivencia. Finalmente, las últimas dos

alteraciones que se han descrito en las células tumorales son la inducción de la angiogénesis y la activación de programas celulares que favorecen la invasión y la metástasis, como por ejemplo la transición epitelio-mesenquimal (Hanahan y Weinberg, 2000; Boettner y Van Aelst, 2002; Trosko, 2003 y Hanahan y Weinberg, 2011).

A pesar de los últimos avances en las investigaciones científicas, todavía no ha sido posible determinar con certeza cuál es el origen de la célula que inicia todas las etapas y características de la carcinogénesis mencionadas con anterioridad. Actualmente se plantean dos teorías: la primera y más clásica supone que la célula que sufre la iniciación es una célula somática diferenciada, y como resultado adquiere la capacidad de proliferar ilimitadamente (Hanahan y Weinberg 2000 y 2011). La segunda propuesta se basa en la hipótesis de la carcinogénesis por células madre cancerosas, donde se plantea la existencia de células madre cancerosas en tejidos adultos (Schultz y Lucas, 2006; Webster et al, 2007 y Beltrami et al, 2009), y precisamente una de estas células sería la que sufre la iniciación y por tanto es prevenida de diferenciarse, esto generaría que su división se realice únicamente de manera simétrica, inmortalizándose (Trosko, 2009). Sin embargo, cabe destacar que las células madre cancerosas representan un grupo muy pequeño de todas las células en un tumor y su identificación en los tumores mediante el empleo de marcadores específicos es un reto importante que se debe sobrepasar con el fin de estudiar más a fondo esta teoría (Shackleton et al, 2009).

2. Cáncer Gástrico

2.1. Etiología

La carcinogénesis gástrica es un proceso que consta de varias etapas y su origen es multifactorial, evolucionando progresivamente de una gastritis crónica a una gastritis atrófica, seguida de metaplasia intestinal, displasia y finalmente el establecimiento del cáncer gástrico (Correa, 1992).

A partir de estudios epidemiológicos y modelos experimentales en animales se ha identificado varios factores de riesgo para la presentación del cáncer gástrico, los cuales se pueden dividir en factores ambientales, siendo el principal la infección por *Helicobacter pylori* y factores que son propios del huésped.

La dieta es uno de varios factores ambientales que se ha asociado a diferentes etapas de la carcinogénesis gástrica. Se ha reportado una relación en la ingesta de dietas con alto contenido de sal y compuestos N-nitrosos así como en dietas deficientes en frutas y vegetales con un mayor riesgo de padecer cáncer gástrico y una mayor mortalidad (Chyou et al, 1990; Joosens et al, 1996; Ward y López-Carrillo, 1999 y Huang y Hunt, 2000).

En estudios epidemiológicos se ha demostrado que un menor nivel socioeconómico influye en la incidencia de cáncer gástrico (Kato et al, 2004). Otros factores investigados han sido el consumo de cigarrillos y la ingesta de alcohol, en el caso del tabaco se ha hallado un incremento de lesiones tanto de metaplasia intestinal como displasia, mientras que los resultados sobre una posible asociación del licor con cáncer gástrico han sido ambiguos (Kato et al, 2004; Nishino et al, 2006 y Shimazu et al, 2008).

La infección por *H. pylori* es posiblemente el factor ambiental al que se le ha dado más importancia y por tanto el más investigado, esto se podría explicar en parte porque alrededor del 50% de la población mundial presenta la infección por esta bacteria gram negativa capaz de colonizar la mucosa gástrica (Kranzer et al, 2004). En 1994 la Organización Mundial de la Salud y la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) lo declaró un agente carcinogénico tipo I. Su prevalencia es más alta en los países en desarrollo y se ha planteado que la infección se adquiere en los primeros años de vida, permaneciendo la mayoría de las veces de manera asintomática (Barr, 2007). La asociación de la infección por *H. pylori* con un mayor riesgo de padecer cáncer gástrico ha sido controversial debido a que la mayoría de la población infectada nunca llega a desarrollar cáncer gástrico (Bernstein et al, 1999). Sin embargo, se tiene evidencia que la

infección por *H. pylori* es una causa de gastritis crónica atrófica y metaplasia intestinal, las cuales son consideradas dos lesiones preneoplásicas (Huang y Hunt, 2000).

H. pylori presenta varios factores de virulencia que se han asociado con la carcinogénesis gástrica, los principales son los genes *cagA* y *vacA* (Peek y Blaser, 2002). El gen *cagA* se posiciona al final de la isla de patogenicidad *cag* (PAI), la cual promueve la formación de IL-8 por parte de las células epiteliales (Yamaoka, 2010). *H. pylori* introduce a CagA directamente en las células donde se encuentra adherida a través del sistema de secreción tipo IV, la proteína se tiende a ubicar en la cara interna de la membrana plasmática y es blanco de fosforilaciones en secuencias específicas conocidas como los dominios EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) (Selbach et al, 2002). La incidencia de cáncer gástrico es mayor en pacientes infectados con cepas que contienen múltiples repeticiones EPIYA, sin embargo no está claramente establecido que sea una relación causal (Yamaoka, 2010). Las cepas positivas para *cagA* son mucho más virulentas y aumentan de manera significativa el riesgo de desarrollar gastritis severas y carcinomas (Higashi et al, 2002).

Por otro lado, el gen *vacA* codifica para una proteína que es secretada e induce la formación de vacuolas ácidas en las células eucariotas y estimula la apoptosis en las células epiteliales (Peek et al, 2010). Además *vacA* influye en la alteración del tráfico de proteínas, inhibición de la presentación de antígenos, formación de canales aniónicos selectivos en las bicapas lipídicas e interfiere con las funciones dependientes del citoesqueleto (Yamaoka, 2010). Este gen es muy polimórfico y las principales variaciones ocurren en la región señal (s), la cual codifica para el péptido señal y el grupo amino terminal de la proteína madura, en la región intermedia (i) que codifica para la subunidad p33 y en la región media (m), la cual codifica parte del dominio de unión a células epiteliales. Las cepas s1m1 son las que producen una mayor cantidad de la toxina, mientras que la cepa s2m2 es la que produce la menor cantidad (de Magalhaes Queiroz et al, 2010).

Así como ciertos factores propios de la bacteria han sido implicados en un mayor riesgo de padecer cáncer gástrico, se han observado ciertos polimorfismos en ciertas poblaciones humanas asociados con la enfermedad. Por ejemplo individuos que son colonizados por *H. pylori* y tienen un polimorfismo en la región promotora de la IL-1B van a presentar una mayor expresión de esta citoquina, esta alteración conlleva a que presenten una mayor susceptibilidad a desarrollar hipocloridia, atrofia gástrica y el adenocarcinoma gástrico (El-Omar et al, 2000). Además polimorfismos que más bien reducen la expresión de la IL-10 que es una citoquina antiinflamatoria se han asociado también con un mayor riesgo de padecer cáncer gástrico (El-Omar et al, 2003).

2.2. Papel de la apoptosis en la génesis del cáncer gástrico

En los procesos tumorales los mecanismos normales de la regulación del ciclo celular no funcionan adecuadamente producto de un aumento en la proliferación celular y/o un descenso en la remoción de las células (Chan et al, 1999).

Se ha determinado que las células transformadas tienen una menor habilidad para sufrir apoptosis en respuesta a los cambios fisiológicos debido a la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas y/o la regulación descendente o mutaciones en las proteínas proapoptóticas (Khan et al, 2007). Esta disminución en los niveles apoptóticos se ha asociado a la aparición y progresión de una serie de tumores, incluyendo el cáncer gástrico (Tsamandas et al, 2009).

El epitelio gástrico es uno de los tejidos con una mayor capacidad de recambio, la proliferación celular es compensada por una continua remoción de células. En la mucosa gástrica las células progenitoras se localizan en el cuello de las glándulas y la migración epitelial ocurre de manera bidireccional (Von Herbay y Rubi, 2000). En esta zona generativa es raro encontrar células apoptóticas, pero cuando la mucosa gástrica sufre atrofia se da un cambio en esta zona y comienza a aumentar el número de células apoptóticas en las áreas proliferativas (Xia y Talley, 2001). Sin embargo, en lesiones pre

neoplásicas como la metaplasia intestinal y la displasia si se observa un mayor número de células apoptóticas en las porciones más profundas de las glándulas (Xia y Talley, 2001).

En la mayoría de las investigaciones científicas en las que se ha analizado la apoptosis a nivel del estómago, el objetivo principal ha sido dilucidar el rol de la infección por *H. pylori* sobre proteínas reguladoras de la apoptosis y en la patogénesis tumoral. Al inicio de estas investigaciones, se sugirió que las células en el estómago normal no expresan FasL (Li et al, 2007), pero estudios posteriores han revelado que FasL se expresa en algunas células gástricas de manera constitutiva (Dai et al, 2009). De hecho la activación del receptor Fas sería el principal mecanismo mediante el cual *H. pylori* es capaz de inducir apoptosis en las células gástricas. Alternativamente mediante estudios *in vitro* se ha propuesto que la bacteria sería capaz por sí sola de inducir la expresión del receptor (Xia y Talley, 2001). Por otra parte, se ha propuesto que el microambiente inflamatorio generado por la infección bacteriana sería el responsable de la sobreexpresión y activación de la vía de señalización de Fas, llevando a la atrofia y la pérdida de células especializadas (Houghton et al, 2000 y Peter et al, 2005).

Conforme progresa el tumor, los niveles de apoptosis en la mucosa gástrica van disminuyendo y surge una población de células que a pesar de expresar el receptor de membrana es resistente a la apoptosis (Houghton et al, 2000 y Peter et al, 2005). Se ha sugerido entonces que las células de la mucosa gástrica son capaces de adquirir resistencia a la apoptosis y podrían utilizar vías alternativas de señalización de Fas para aumentar la proliferación. Este incremento en la proliferación celular es un arma de doble filo, ya que aunque previene lesiones y facilita la recuperación de la mucosa gástrica, también se ha asociado con un incremento en el riesgo de desarrollar tumores (Li et al, 2007).

También se ha estudiado el rol de la mitocondria en la apoptosis inducida por *H. pylori* en células gástricas. Estudios *in vivo* señalan que la infección se asocia con la regulación ascendente de Bax y la supresión de la expresión de Bcl-2 (Zhang et al, 2007).

Sin embargo, en otras investigaciones, no se ha hallado una relación significativa entre la presencia de *H. pylori* y la expresión de Bcl-2 (Choi et al, 2003).

Es importante resaltar que hasta el momento no se tiene clara la relación entre el nivel de apoptosis y la etapa de desarrollo del tumor, sin embargo en algunos estudios se ha reportado un mayor nivel de apoptosis en tejidos de cáncer gástrico en relación al epitelio normal y pólipos adenomatosos (Mijic et al, 1998). Así mismo en los tumores gástricos en etapas tempranas se ha demostrado un menor nivel de apoptosis en comparación a estos tumores en estadios más avanzados (Ishii et al, 2002).

2.3. Tipos de cáncer gástrico

La mayoría de los tumores gástricos (97%) tienen un origen epitelial y se clasifican como adenocarcinomas (Sierra, 2002). Otros tipos de neoplasias en el estómago son los tumores estromales, y más comunes los linfomas a partir de las células B y T de la lámina propia (Shang y Peña, 2005).

A) Adenocarcinoma gástrico

De acuerdo a las características histológicas de los adenocarcinomas gástricos, Lauren en 1965 estableció una clasificación en la que el adenocarcinoma se puede dividir en dos entidades patológicas distintas que son el adenocarcinoma difuso y el adenocarcinoma intestinal. Ambos se caracterizan por diferencias en cuanto a factores epidemiológicos, clínicos, genéticos y pronósticos (Mingchao et al, 2001).

El cáncer de tipo intestinal es el más común y tiende a presentarse en personas de mayor edad y a predominar en hombres, este tipo de tumor se relaciona de manera más cercana con factores ambientales y dietéticos (Houghton y Wang, 2005). Se disemina de manera hematológica y tiene una prognosis más favorable que el tipo difuso. Histológicamente se considera un tumor expansivo formador de estructuras glandulares atípicas que simulan las glándulas intestinales (Kountouras et al, 2008).

El adenocarcinoma intestinal es el que progresa a través de una serie bien definida de etapas histológicas. Inicialmente un estímulo inflamatorio conlleva al desarrollo de una gastritis activa crónica que en algunos casos puede desencadenar en una gastritis atrófica seguida de metaplasia intestinal, displasia y finalmente el asentamiento del cáncer gástrico (Correa, 1992 y Nardone, 2003).

Por otra parte, el adenocarcinoma de tipo difuso es menos común, afecta a personas más jóvenes y se relaciona de manera más prominente con factores genéticos, afectando de igual manera a hombres y mujeres (Canöz et al, 2002 y Houghton y Wang, 2005). Este tumor se disemina por contigüidad al peritoneo y por vías linfáticas, asociándose con una peor prognosis (Kountouras et al, 2008). Histológicamente es un tumor con pobre diferenciación y está conformado por células neoplásicas infiltrantes que no forman estructuras glandulares y no se asocian con la metaplasia intestinal (Peek y Blaser, 2002). Se caracteriza por la producción de un moco que es secretado hacia el intersticio, cuando este moco permanece en el interior de la célula tiende a desplazar el núcleo hacia la periferia dando la característica de células en anillo de sello (Hatakeyama, 2009).

Anteriormente se creía que la infección por *H. pylori* se asociaba más con la aparición de adenocarcinomas intestinales, pero recientemente estudios epidemiológicos han indicado que la infección desempeña un papel clave no sólo en el desarrollo del adenocarcinoma intestinal, sino también en el difuso (Uemura et al, 2001 y Huang et al, 2003).

B) Linfoma gástrico

El linfoma gástrico primario es un tumor raro que contribuye en menos del 5% de los tumores gástricos primarios, sin embargo es el linfoma extranodal más común, representando el 4-20% de todos los linfomas extranodales. (Al-Akwaa et al, 2004). Los linfomas gástricos se presentan con mayor prevalencia en pacientes con edades mayores

a los 50 años y los hombres se ven de 2 a 3 veces más afectados que las mujeres (Ben-Khelifa y Sabbagh, 2002).

Se piensa que la mayoría de los linfomas surgen en la mucosa o submucosa a partir de lo que se conoce como el tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT por sus siglas en inglés) el cual usualmente se desarrolla posterior a una inflamación crónica inducida en este caso por la infección por *H. pylori* (Parsonnet et al, 1994). La cronicidad de la infección por *H. pylori* es crucial ya que constituye una fuente antigénica que lleva a la estimulación sostenida de las células B, favoreciendo la transformación y el desarrollo del linfoma (Suarez et al, 2006). Conforme progresa la enfermedad pueden ocurrir eventos oncogénicos adicionales como la activación constitutiva de vías de señalización o mutaciones que llevan a una proliferación de linfocitos que se convierte independiente de la estimulación antigénica (Farinha y Gascoyne, 2005).

A pesar que cualquier región del estómago puede estar involucrada, la mayoría de los linfomas gástricos se originan en el antro o el cuerpo distal que son a su vez los lugares usualmente colonizados por *Helicobacter pylori* (Cheng et al, 2003).

C) Tumores estromales

En general los tumores estromales gastrointestinales (GIST por sus siglas en inglés) son neoplasias raras que surgen de la pared gastrointestinal. La incidencia es de 10 a 20 casos por millón de habitantes por año (Folgado Alberto et al, 2008) y ocurren predominantemente en personas por encima de los 40 años con una ligera predominancia en la población masculina sobre la femenina (Burkill et al, 2003). Dentro del estómago el sitio más común donde se presentan es en el fondo gástrico (Cichoz-Lach et al, 2008).

2.4. Metástasis del cáncer gástrico

El cáncer gástrico es un tumor con una alta frecuencia de recurrencia a través de tres vías principales: la recurrencia local, la diseminación peritoneal y la metástasis hematológica (Marrelli et al, 2004).

La forma más común de expansión del tumor gástrico es la diseminación peritoneal, hallándose en 10-20% de los pacientes con cáncer gástrico (Bando et al, 1999). La diseminación peritoneal se puede distribuir de manera local en el abdomen superior y se puede difundir por los nódulos linfáticos y generar numerosas metástasis en el peritoneo distal (Yonemura et al, 2006). El pronóstico de pacientes con metástasis peritoneal es muy pobre, y esta diseminación se considera un factor independiente de mal pronóstico (Yonemura et al, 2006).

Por otra parte, el proceso de metástasis hematológica involucra varias etapas, primero se debe dar la separación de las células cancerígenas de la masa tumoral y la infiltración de estas células a vasos sanguíneos, así como el movimiento intracelular y la adhesión a las células endoteliales vasculares. Posteriormente se da la invasión a los tejidos intersticiales de otros órganos y su subsecuente crecimiento (Iwasaki et al, 1997).

Dentro de las metástasis hematológicas, el hígado es el órgano más frecuentemente afectado (Marrelli et al, 2004). La metástasis hepática se observa en un 5-9% de los pacientes con cáncer gástrico y la supervivencia de estas personas sin tratamiento es muy baja, con un tiempo medio de 3 a 5 meses (Thelen et al, 2008).

La metástasis hepática ocurre más frecuentemente en personas con adenocarcinomas gástricos de tipo difuso, y esta puede ser de dos tipos: sincrónica, cuando aparece al momento del diagnóstico del cáncer gástrico, o metacrónica cuando la metástasis es parte de la evolución de la enfermedad posterior a la gastrectomía curativa, esta última es la más frecuente y en la mayoría de los casos ocurre en los primeros dos

años posterior a la cirugía pudiéndose extender este período hasta los 5 años (Marrelli et al, 2004).

Se ha tratado de establecer marcadores pronósticos y factores de riesgo que puedan ayudar a predecir que una persona va a sufrir la metástasis a hígado. Algunas investigaciones han tratado de medir la sobreexpresión de factores de crecimiento, moléculas de adhesión y enzimas que degradan la matriz extracelular con el objetivo de observar un posible valor pronóstico (Nakanishi et al, 2005). Además, se han determinado ciertos factores de riesgo que se asocian con la recurrencia hepática, como la afectación de nódulos y la presencia positiva pre-operatoria de ciertos marcadores tumorales como CEA, CA 19-9 y CA72-4 (Marrelli et al, 2004).

2.5. Tratamiento

La sobrevida de los pacientes con cáncer gástrico es muy baja cuando se compara con la que se presenta en pacientes con otros tumores sólidos. En gran medida ésta alta mortalidad se asocia a que el tumor en sus etapas tempranas es asintomático, por lo que en la mayoría de las ocasiones el diagnóstico de cáncer gástrico se da hasta que la enfermedad ya se encuentra en etapas avanzadas y no es posible la resección quirúrgica (Wesolowski et al, 2009).

El éxito del tratamiento en términos de sobrevida, depende principalmente del estadio de la enfermedad. En etapas tempranas la resección quirúrgica representa el pilar de cualquier tratamiento curativo, con una tasa de sobrevida a 5 años de 70 a 95% (Cunningham et al, 2006). Sin embargo, se estima que en aproximadamente el 84% de los pacientes con cáncer gástrico los tumores van a evolucionar hacia estadios avanzados. Para estos casos, diferentes estudios clínicos han demostrado que la administración perioperatoria de la quimioterapia proporciona mejores resultados en la sobrevida media de las personas en comparación a únicamente la cirugía o medidas paliativas (Cunningham et al, 2006). Sin embargo el progreso en las últimas décadas con respecto a la

quimioterapia no ha sido exitoso ya que la mayoría de las respuestas son parciales y de corta duración, siendo la sobrevida media únicamente de 7 a 9 meses (Cervantes et al, 2008 y Sakamoto et al, 2009).

Clásicamente, desde la década de los 60 se ha utilizado el 5-fluorouracilo como el tratamiento predilecto, pero debido a la necesidad de mejorar la eficacia del tratamiento, en los años posteriores se han venido implementado diversos protocolos en los cuales se combinan dos o más drogas citotóxicas (Rivera et al, 2007). Por el momento el régimen más utilizado a nivel mundial es la combinación del 5-fluorouracilo con análogos de platino, principalmente el cisplatino. Sin embargo como se ha mencionado anteriormente la tasa de sobrevida no supera los 9 meses, por lo que no ha sido posible establecer una quimioterapia estándar ni un régimen óptimo (Cervantes et al, 2008 y Nishiyama y Wada, 2009).

Recientemente se han realizado seis grandes ensayos clínicos (V325, V-306, REAL-2, JCOG9912, SPIRITS y FLAGS), con el objetivo de probar diferentes regímenes dobles o triples con nuevos agentes citotóxicos como el irinotecan, S1, capecitabine, docetaxel, paclitaxel y oxaliplatel (Ohtsu, 2008; Nishiyama y Wada, 2009 y Inoue et al, 2012). A manera general, se ha observado en todos los ensayos que los tratamientos combinados prolongan de manera significativa la sobrevida de los pacientes en comparación al tratamiento con solo 1 droga como el 5-fluorouracilo (Ohtsu, 2008). Sin embargo el problema de los regímenes combinados es el aumento que se presenta en los efectos adversos a los medicamentos, sobre todo a nivel del sistema hematopoyético, presentándose leucopenias, disminución en el conteo plaquetario y anemia, así como trastornos gastrointestinales como náuseas y vómito (Chung et al, 1997 y Wesolowski et al, 2009).

Los resultados más promisorios han sido obtenidos de la combinación 5-fluorouracilo, cisplatino y docetaxel, el cual fue analizado en el ensayo V325, la sobrevida de los pacientes aumentó de manera significativa en comparación al empleo único de 5-

fluorouracilo y cisplatino (9.2 vs 8.6 meses, $p=0.02$) (Rivera et al, 2007 y Ohtsu, 2008). Otras investigaciones han obtenido resultados similares, por lo que la FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos ha aprobado este régimen para el tratamiento del cáncer gástrico avanzado así como para el adenocarcinoma gastroesofágico (Nishiyama y Wada, 2009 y Wesolowski et al, 2009).

Debido a las limitaciones que se han observado con la utilización de la quimioterapia para el tratamiento del cáncer gástrico, los esfuerzos se dirigen a la investigación de nuevos compuestos que actúen por mecanismos distintos, un ejemplo es el empleo de agentes sintéticos dirigidos hacia vías de señalización características en las células tumorales, este es el caso de las moléculas inhibidoras del receptor c-Met (receptor del factor de crecimiento de hepatocitos) y del factor de crecimiento NF κ B, ambos compuestos se encuentran en fases II y III en ensayos clínicos (Sasaki et al, 2001 y Ohtsu, 2008). El agente sintético más exitoso por sus resultados en la sobrevida de los pacientes ha sido el trastuzumab (HerceptinTM), el cual consiste en un anticuerpo monoclonal humanizado que se dirige contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 (EGFR-2 o HER 2). HER 2 se comporta como un oncogén y forma parte de una familia de receptores tirosinquinasa que participa en procesos vitales para la formación y desarrollo del tumor como la proliferación, invasión, angiogénesis, metástasis e inhibición de la apoptosis (Rowinsky, 2004). Se ha identificado la sobreexpresión de este gen en una variedad de tumores como el cáncer de mama y el cáncer gástrico (Gravalos y Jimeno, 2008), el ensayo clínico fase III de este agente se conoce como el ensayo ToGa, este involucró 130 centros en Europa, Asia, Australia y América Latina y finalizó en el año 2009, y en este estudio se analizó el efecto de la administración de este agente junto con quimioterapia compuesta por fluoropirimidina y cisplatino contra la aplicación de solo quimioterapia. En el primer caso los resultados fueron exitosos, con una mejora en la sobrevida de 2.7 meses, pasando de 11.1 meses a 13.8 meses, momento en el cual se dio como finalizado el análisis y se procedió a la comercialización del producto (Gravalos y Jimeno, 2008 y Chustecka, 2009).

El estudio ToGa fue el primer ensayo en fase III de fármacos dirigidos a moléculas específicas con un resultado positivo en cuanto al incremento en la supervivencia del paciente. Actualmente otros fármacos que se encuentran en fase III de experimentación son: los inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) Cetuximab (Erbix[®]) y Panitumumab (Vectibix[®]), el inhibidor de HER2 Lapatinib (Tykerb[®]) y los inhibidores del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) Bevacizumab (Avastin[®]) y Ramucirumab (Cappeta et al, 2012).

La utilización de compuestos de origen natural es otra estrategia que se ha investigado en los últimos años, ya sea con un propósito terapéutico o quimiopreventivo a través de algunos productos naturales derivados de la dieta (Khan et al, 2007). Se ha estimado que a través de modificaciones en la dieta más de dos tercios de los tumores humanos podrían ser prevenidos (Sarkar y Li, 2004). Además, una vez que el tumor ha sido diagnosticado estos productos naturales podrían contribuir a aumentar la acción de la quimioterapia y la supresión tumoral, así como prevenir las metástasis (Mazzio y Soliman, 2009).

En el caso particular del cáncer gástrico, se ha estudiado el efecto de diversos compuestos con potencial acción anti-tumoral, como por ejemplo los compuestos alilsulfuro del ajo (Park et al, 2005 y Lee, 2008), la capsaicina (Chow et al, 2007) y el resveratrol (Holian et al, 2002).

Un caso especial es el de los retinoides, porque aunque estos compuestos no se han utilizado para el tratamiento del cáncer gástrico sí se utilizan para el tratamiento de diversos tumores. Por ejemplo el ácido retinoico todo trans se ha empleado con éxito para el tratamiento de las leucemias promielocíticas agudas (Fenaux et al, 2001) y se encuentran en progreso varios ensayos clínicos para evaluar su efecto sobre otros tipos de tumores como linfomas, melanomas, neuroblastomas, glioblastomas y tumores en cervix, riñón y pulmón (Bushue et al, 2010). De igual manera, el ácido retinoico- 13-cis ha sido efectivo para el tratamiento de linfomas cutáneos, leucemias mieloides crónicas y

tumores tiroideos (Camacho, 2003 y Handkiewicz-Junak et al, 2009). En el caso de los retinoides sintéticos como la retinamida, existen estudios que han demostrado que podría ser efectiva en el tratamiento de recurrencias de tumores de mama y proteger contra el desarrollo de tumores en ovario (Formelli et al, 2003 y Colombo et al, 2006). En general, se ha propuesto que el metabolismo de los retinoides en las células tumorales es anormal y que su principal mecanismo de acción es por medio de la regulación de la expresión génica (Amann et al, 2011), ya que las señales de los retinoides son mediadas por receptores nucleares que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares para hormonas, que incluye al receptor de la hormona tiroidea y el receptor de la vitamina D. Esta regulación sobre la actividad transcripcional de los retinoides, puede llevar a la diferenciación de las células, arresto del ciclo celular y apoptosis, inhibiendo el crecimiento celular (Noy, 2010).

En general esta es un área de investigación con un gran potencial, por lo que se abre la oportunidad para que en los próximos años se descubran nuevas moléculas naturales con posible aplicación terapéutica para el cáncer gástrico.

3. Modelos *in vitro* para el estudio del cáncer

Normalmente en cultivo celular, las células epiteliales malignas derivadas de las masas multicelulares *in situ* se revierten a un patrón adherente en monocapa, pero mediante condiciones especiales es posible convertir estas células en monocapa a esféroides multicelulares en suspensión (Chun, 2000). Estos modelos tridimensionales de cultivo celular han permitido entender mejor el funcionamiento de las células tumorales.

La noción de que la transformación celular y la progresión tumoral involucran la integración de vías de señalización antiapoptóticas y proliferativas ha sido estudiada en modelos *in vitro* en monocapa y en algunos modelos *in vivo*, sin embargo los modelos de

cultivo celular en tres dimensiones ofrecen la gran ventaja de reproducir algunas de las interacciones fisiológicamente relevantes, permitiendo al mismo tiempo una fácil manipulación genética y realización de análisis bioquímicos (Jacks y Weinberg, 2002).

Los esferoides multicelulares son agregados de células tumorales que pueden alcanzar diámetros de 1 mm o más, y por condiciones especiales al momento de su cultivo adquieren una conformación tridimensional que les permite simular algunas de las propiedades que se observa *in vivo* en los tumores sólidos (Minchinton y Tannock, 2006).

Los modelos *in vitro* con esferoides han sido utilizados desde los años 70, con el objetivo de investigar los mecanismos de acción de la radioterapia y la quimioterapia así como la resistencia a las drogas en células tumorales (Mueller-Klieser, 2000). La principal ventaja de los esferoides con respecto a modelos en dos dimensiones es su capacidad de recrear de manera apropiada la heterogeneidad en el crecimiento celular, ya que *in vivo* no todas las células del tumor están expuestas al mismo microambiente. Las células localizadas más hacia la periferia de la masa tumoral reciben la mayoría de los nutrientes y oxígeno por lo que son metabólicamente más activas y más propensas a proliferar e invadir tejidos, mientras que las células que se localizan más hacia el centro del tumor sufren hipoxia y privación de nutrientes, por lo que usualmente se encuentran necróticas (Smalley et al, 2006) o en un estado de arresto del ciclo celular debido al incremento en la expresión de inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina (LaRue et al, 2004).

De manera interesante algunas de las características de los tumores como por ejemplo el crecimiento, la metástasis y la resistencia intrínseca a varios tipos de terapias anti cancerígenas son usualmente determinadas por las interacciones intercelulares y no así por los factores intrínsecos de las células individuales (Mayer et al, 2001). La resistencia multicelular a una variedad de agentes quimioterapéuticos observada en el modelo en esferoides es similar a la que se presenta en la clínica, por lo que se ha considerado que las interacciones intercelulares así como la influencia del microambiente

son fundamentales en el éxito o fracaso de un tratamiento anti tumoral (Mayer et al, 2001).

En la literatura científica se ha considerado al microambiente tumoral y especialmente las proteínas de adhesión celular como potenciales factores de resistencia al tratamiento (Steadman et al, 2008). El estudio de cultivos celulares tridimensionales ha permitido evaluar el efecto de la difusión de la droga en la masa tumoral así como el incremento en la expresión de proteínas transportadoras de drogas como la p-glicoproteína (Wartenberg et al, 2005).

Además, en los cultivos celulares en monocapa una gran proporción de células se encuentra proliferando y progresando en el ciclo celular de manera activa, y dado que los agentes quimioterapéuticos actúan principalmente en células con una alta tasa de replicación, es de esperar que estas drogas presenten una menor acción en los modelos en esferoides que presentan una fracción importante de células en estado quiescente (Smalley et al, 2006).

Debido a las características propias de los esferoides y el hecho de que las células crecidas en tres dimensiones se encuentren bajo condiciones mecánicas y de microambiente diferentes a los cultivos convencionales en monocapa, se ha propuesto que los esferoides multicelulares representan un modelo *in vitro* más relevante que permite replicar de manera más certera las condiciones de microambiente a las que se encuentra normalmente un tumor (Steadman et al, 2008).

4. Modelos animales para el estudio de cáncer gástrico

Los modelos experimentales con animales han sido utilizados exitosamente desde hace mucho tiempo atrás y han permitido estudiar diversas patologías, así como descubrir factores etiológicos asociados a estas y evaluar múltiples tratamientos (Oliveira et al,

2007). En el caso específico de los modelos cuyo objetivo ha sido estudiar fenómenos asociados con la carcinogénesis en general, la mayoría de las investigaciones se han realizado en roedores, debido sus a semejanzas anatómicas, fisiológicas y bioquímicas con el ser humano (Balmain y Harris, 2000).

Pese a lo anterior, para el caso específico del cáncer gástrico se debe considerar que el estómago de los roedores es morfológicamente diferente al del ser humano, ya que en la porción proximal el estómago de los roedores no cuentan con un epitelio glandular, sino que esta porción del estómago que corresponde a un 60% del área total se compone de un epitelio estratificado plano queratinizado, mientras que el 40% restante sí se asemeja al epitelio cilíndrico simple con función glandular que se observa en el ser humano (Frantz et al, 1991).

Los factores responsables del desarrollo del cáncer gástrico pueden ser exógenos y endógenos. Dentro de los factores exógenos se incluyen los hábitos nutricionales, la exposición a compuestos químicos y agentes biológicos como *H. pylori*. Por otra parte, los factores endógenos involucran procesos complejos como la respuesta del sistema inmune y lesiones ocasionadas por procesos inflamatorios como por ejemplo las úlceras gástricas (Oliveira et al, 2007).

Los modelos animales han permitido conocer múltiples agentes carcinogénicos, los cuales tienen la capacidad de desencadenar bajo las condiciones apropiadas el desarrollo de tumores en humanos y animales (Huff, 1999). Las nitrosaminas son compuestos capaces de inducir tumores en la mayoría de órganos y sistemas. Desde la década de 1960 las nitrosaminas han sido conocidas como los agentes carcinogénicos más importantes en el desarrollo de adenocarcinomas gástricos (Binato et al, 2008). Uno de los carcinógenos más exitosos ha sido el agente N-metil-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidina (MNNG), el cual se utilizó inicialmente con el propósito de desarrollar fibrosarcomas en ratas por medio de su administración por vía subcutánea, sin embargo posteriormente Sugimura y Fujimura en 1967, lo administraron a ratas por vía oral en el agua y observaron la aparición de tumores

en el estómago glandular (Sugimura y Terada, 1998). Posteriormente, Saito y colaboradores demostraron la presencia de erosiones y alteraciones proliferativas previo al desarrollo de los adenocarcinomas, e incluso observaron que en ciertas ocasiones los adenocarcinomas intestinales realizaban metástasis hacia los nódulos linfáticos e hígado (Sugimura y Terada, 1998). A parte de las ratas, otros animales han sido susceptibles a la acción del MNNG, como por ejemplo perros, hamsters y hurones, no así los ratones que muestran resistencia a este agente químico (Sugimura y Fujimura, 1967; Fox et al, 1993; Shimizu et al, 1999 y Tokieda et al, 1999). Sin embargo, otros agentes carcinogénicos alternativos como el N-metil-N'-Nitrosourea (MNNU) y el dietilnitrosamina (DEN) sí han sido capaces de inducir carcinomas gástricos en ratones (Binato et al, 2008 y Tarso et al, 2011).

Por otra parte, los estudios experimentales de infección con *H. pylori* han incluido una amplia gama de animales, desde primates hasta los modelos en roedores (Peek, 2008). Sin embargo, varios de estos modelos no son los más óptimos. Si bien es cierto que animales grandes como los cerdos, gatos y perros han sido exitosamente colonizados, estos modelos presentan muchas limitaciones debido a que los animales no pueden ser manipulados con facilidad o en números grandes, no se encuentran en condiciones libres de patógenos y los índices de infección son muy bajos (Ogura et al, 2000). Además, no ha sido posible reproducir lesiones similares a las que ocasiona *H. pylori* en el ser humano, ya que únicamente se ha podido observar la aparición de gastritis sin presencia de erosiones o el desarrollo de tumores (O' Rourke y Lee, 2003). Otra de las diferencias entre lo que ocurre en estos modelos y lo que se presenta en el ser humano, es que algunas especies como los primates y los cerdos presentan infecciones naturales con otros géneros de la bacteria, como es el caso de *H. heilmanii* y *H. suis*, respectivamente (O' Rourke y Lee, 2003).

Por lo tanto, los modelos con animales más pequeños son más convenientes en cuanto a la manipulación tanto del huésped como de la bacteria, y es por esto que la mayoría de los estudios en modelos animales se han realizado en roedores, especialmente ratones (O' Rourke y Lee, 2003). Sin embargo, la mayoría de las cepas de ratones al ser infectados con la bacteria no desarrollan tumores, sino que únicamente una inflamación moderada (Peek, 2008). Uno de los primeros ejemplos de inducción de gastritis crónica fue con la infección con *H. felis* (Lee et al, 1990), el cual es un patógeno murino que se ha utilizado para inducir lesiones en el estómago, y se ha observado que usualmente el grado de daño es más severo en ratones infectados con *H. felis* en comparación a cuando se infectan con *H. pylori*. Aún más, la infección de ratones C57/Bl6 con *H. felis* por un período largo es capaz de desarrollar adenocarcinomas (Cai et al, 2005).

La infección de ratones con *H. pylori* tiene como principal consecuencia un infiltrado inflamatorio crónico que lleva a un aumento en la proliferación de la mucosa e hiperplasia epitelial, así como la atrofia funcional de células parietales, las cuales son reemplazadas por las células secretoras de moco (O' Rourke y Lee, 2003). Sin embargo no se ha podido establecer un modelo de carcinogénesis gástrica a partir únicamente de la infección con *H. pylori*. Se ha propuesto que la falta de cambios tumorales en los ratones podría deberse a la ausencia de carcinógenos potenciales, los cuales se requieren como cofactores para el desarrollo del cáncer gástrico, ya que se ha observado que la presencia de *Helicobacter* en ratones tratados con MNNU genera un incremento en la hipertrofia de la mucosa y la formación de tumores (Han et al, 2002). Debido a las limitaciones que se han presentado para inducir tumores en los ratones producto de la infección con *H. pylori*, se han generado nuevos modelos con ratones transgénicos, los cuales presentan muchas ventajas, ya que permiten el desarrollo de los tumores de una forma más rápida y el estudio de posibles mecanismos asociados (Oliveira et al, 2007). Un ejemplo, son los ratones INS-GAS, los cuales son ratones transgénicos en los que se les induce la secreción de gastrina. En presencia de la infección bacteriana, a los 20 meses de edad estos ratones

desarrollan hipertrofia de la mucosa, displasia y carcinomas intramucosos (Wang et al, 2000).

Uno de los modelos más utilizados ha sido la infección con *H. pylori* en los gerbos de Mongolia, ya que es el único animal en el cual se ha observado que la infección con *H. pylori* induce la patología gástrica que se observa en los humanos. Después de un periodo de estudio por 12 meses se observaron lesiones de gastritis activa crónica, úlceras pépticas y metaplasias intestinales (Hirayama et al, 1996). A partir de este momento se han desarrollado estudios para evaluar el efecto de la infección con *H. pylori* sobre la carcinogénesis inducida por MNNG y MNU. Los resultados obtenidos en estos estudios, sugieren que *H. pylori* es un fuerte promotor de la carcinogénesis y no un iniciador de la misma (Tsukamoto et al, 2007).

Objetivos

Objetivo General

Comparar dos líneas celulares, un adenocarcinoma gástrico primario y un carcinoma gástrico con metástasis hepática, en términos de la resistencia a agentes con potencial antitumoral y desarrollar modelos representativos de tumores gástricos que permitan realizar estudios de tratamiento y prevención.

Objetivos Específicos

1. Estandarizar un modelo tridimensional de células gástricas con una línea celular de carcinoma primario (AGS) y una línea celular de metástasis hepática (NCI-N87).
2. Cuantificar la muerte celular inducida por sustancias pro-apoptóticas en las líneas celulares AGS y NCI-N87 cultivadas en monocapa, con el fin de evaluar posibles diferencias en la resistencia de ambos tipos de tumor gástrico a nuevos tratamientos.
3. Desarrollar un modelo de carcinogénesis *in vivo* en ratas Wistar mediante la administración intragástrica del agente mutagénico N-metil-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidina (MNNG).
4. Desarrollar un modelo de carcinogénesis *in vivo* en ratas Wistar mediante la administración intragástrica de la bacteria *Helicobacter pylori* aislada de biopsias humanas.
5. Desarrollar un modelo de carcinogénesis *in vivo* en ratas Wistar por medio de la administración conjunta de la bacteria *Helicobacter pylori* y el agente N-metil-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidina (MNNG).

Metodología

1. Materiales

Los siguientes productos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich: Medio de cultivo RPMI 1640 (Cat R5886), agarosa (Cat A9539), doxorubicina (Cat 44583), 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H bromuro de tetrazolio (MTT) (Cat. M2128), ácido trans-retinoico (Cat R2625), ácido retinoico-13-cis (Cat R3255) y N-(4-hidroxifenil) retinamida (Cat H7779).

El medio de montaje para las tinciones por inmunofluorescencia se adquirió de Vector Laboratories (H-1500). El kit de reacción en cadena de la polimerasa Taq DNA Polymerase (Cat EP0402) y el marcador de pares de bases GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Cat SM1331) se adquirieron de Fermentas Life Sciences.

El N-metil-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidina (MNNG) se obtuvo de TCI America (Cat M0527), el formaldehído empleado proviene de Gamma® G y H Steinvorth LTDA (Lote 832-11), el kit de detección para inmunohistoquímica utilizado fue de DakoCytomation En Vision® + Dual Link System-HRP (DAB+) (Cat K4065), el Gel Red™ fue de Biotium (Cat 41003), el colorante Giemsa se compró de J.T.Baker (Cat M702-03) y el anticuerpo anti-PCNA (PC10) (antígeno nuclear de proliferación celular) de Dako (Cat M0879).

2. Líneas celulares.

Se utilizaron dos líneas celulares humanas de cáncer gástrico: AGS (CRL-1739) y NCI-N87 (CRL-5822) obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC) Global Bioresource Center. La línea AGS corresponde a un adenocarcinoma gástrico de tipo difuso obtenido de estómago, mientras que la línea NCI-N87 consiste en un carcinoma gástrico de tipo intestinal derivado de hígado como producto de una metástasis. Ambas

líneas se cultivaron en medio RPMI-1640, 10% de suero fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina y anfotericina B en condiciones de 37°C y 5% CO₂.

3. Formación de esferoides

La obtención de células en suspensión se realizó mediante la disociación enzimática con una solución de 0,05% tripsina y 0,02% de EDTA. Los cultivos se transfirieron cada 3 a 4 días y se evitó la disociación repetida de la monocapa en un período menor a las 48 horas. Se prepararon soluciones conteniendo 100 000 células/ml para la línea celular AGS y 200 000 células/ml para las células NCI-N87, basándose en la diferencia en el período de duplicación de las células, siendo 24 y 48 horas para las células AGS y NCI-N87, respectivamente.

Para la obtención de esferoides se utilizaron dos metodologías: el recubrimiento de platos de cultivo (Friedrich et al, 2009) y la técnica de la “gota colgante” (Fayad et al, 2009). En el primer procedimiento, cada pozo en un plato de cultivo de 96 pozos con fondo cóncavo fue recubierto con 50 µl de una solución de agarosa al 0,5%. Para la preparación de la solución de recubrimiento, la agarosa se disolvió al 1% en agua estéril y se calentó hasta ebullición en el horno de microondas; posteriormente se adicionó medio de cultivo RPMI-1640 precalentado a 60°C y libre de suero fetal bovino. La placa recubierta se dejó secar a temperatura ambiente y se mantuvo protegida de la luz por un período no mayor a 24 horas. Después de este lapso, se adicionaron 200 µl de la suspensión de células en medio RPMI-1640 en cada pozo de la placa y se incubaron por un período de 72 a 96 horas a 37°C y 5% CO₂, evitando que la placa sufriera movimientos bruscos.

Para la formación de los esferoides con el método de la “gota colgante” se recubrieron los pozos como se explicó anteriormente y se adicionaron 200 µl de la suspensión de células en cada pozo de la placa. A diferencia de la técnica anterior, los pozos conteniendo las células se sobrellenaron con 160-170 µl adicionales de medio hasta

adquirir una superficie curva convexa. Se colocaron espaciadores de plasticina (3mm aproximadamente) en cada una de las esquinas de la placa para prevenir que al colocar la tapa se disturbara el medio. Finalmente se invirtió el plato con el fin de permitir que las células se sedimentaran en la interfase aire-líquido y se incubó la placa en agitación en una incubadora a 37°C por 2-4 horas. Posterior a este período, las células se trasladaron a una incubadora sin agitación pero que permitió el intercambio gaseoso (5% CO₂). A las 24 horas se removió el exceso de volumen de medio y se revertió la placa a su posición original, las células se mantuvieron en la incubadora por 48 a 72 horas más.

Una vez concluido este período en ambas técnicas, se tomaron fotografías de los agregados multicelulares en un microscopio invertido a una magnificación de 100X y se procedió al análisis de los diámetros de los esferoides mediante el software Image J (U.S National Institutes of Health, USA).

4. Inmunofluorescencia de los esferoides

Los esferoides fueron removidos de la placa de cultivo celular, se fijaron en paraformaldehído al 4% en amortiguador salino (PBS) por 2 horas y se permeabilizaron en una solución de Tritón-X al 2% y albúmina sérica bovina (BSA) al 0,1% durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados en PBS y luego se incubaron con faloidina marcada con el fluorocromo fluoresceína isotiocianato (FITC) (1:400 en BSA al 1%) por 1 hora a 37°C. Se realizaron nuevamente 3 lavados en PBS y finalmente se montaron los esferoides con un medio de montaje con el colorante DAPI que permitió visualizar los núcleos de las células.

5. Medición de la sensibilidad de las células a los tratamientos.

La respiración celular se empleó como un indicador de la viabilidad celular mediante la reducción enzimática del 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H bromuro de tetrazolio (MTT) en formazán.

Las células AGS (2×10^4 /200 μ l de medio por pozo) y NCI-N87 (4×10^4 /200 μ l de medio por pozo) se sembraron en monocapa en platos de 96 pozos con el fondo plano. Las células se incubaron por 24 horas (hasta obtener la adherencia completa) en una atmósfera humidificada a 5% CO₂ y 37°C).

Diluciones seriadas de doxorubicina (0-8,8 μ M), ácido trans retinoico (0-106,5 μ M), ácido retinoico-13-cis (0-106,5 μ M) y retinamida (0-81,7 μ M) se disolvieron en 20 μ l de PBS, luego se removió la mitad del medio (100 μ l) y este volumen fue reemplazado con el respectivo tratamiento disuelto en medio de cultivo, hasta alcanzar un volumen final de 200 μ l. El control consistió en 20 μ l de PBS disuelto en medio de cultivo. En todos los casos las células fueron incubadas con su respectivo tratamiento por un período de 48 horas. Para la selección de las dosis a evaluar, se basó en reportes previos en la literatura donde estas dosis de retinoides presentaron toxicidad en células de cáncer de hígado (Arce et al, 2005).

La preparación del MTT se realizó a partir de una solución stock en PBS (5mg/ml). Luego de remover el medio de cultivo, se adicionaron 200 μ l de MTT disuelto en medio RPMI-1640 a una concentración final de 0,5 mg/ml en cada pozo y se incubó por 2 horas en una incubadora a 37°C y 5% CO₂. El medio fue aspirado por completo de la placa y se adicionó etanol al 95% para disolver los cristales de formazán. La cuantificación de la cantidad de MTT convertido en formazán se realizó mediante la medición de la densidad óptica a 560 nm utilizando un lector espectrofotométrico (Thermo Scientific Multiskan FC). El porcentaje de viabilidad celular se calculó considerando el valor de absorbancia de las células sin tratamiento como el 100% de viabilidad.

6. Modelo de inducción de carcinogénesis en ratas Wistar

Se realizaron dos modelos de inducción de tumores en el estómago de ratas. El primer modelo consistió en la administración del químico mutagénico N-metil-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidina (MNNG), el cual es un agente alquilante y se tiene evidencia sobre su

poder inductor de tumores en animales (Sugiyama et al, 1998; Tokieda et al, 1999; Velmurugan et al, 2005 y Gunassekaran et al, 2011). El segundo modelo consistió en la infección de ratas con 2 cepas distintas de *H. pylori* previo a la administración del MNNG. El diseño experimental de los tratamientos en ambos modelos se ilustra en la figura 1.

Animales: Se trabajó con un total de 30 ratas macho de la cepa Wistar, las cuales se les permitió aclimatarse por una semana antes de someterlas a la administración intragástrica del MNNG o la inoculación bacteriana, según el caso. Se mantuvieron en cajas cubiertas en su superficie con burucha y se separaron de acuerdo al grupo experimental durante todo el transcurso de los experimentos. Se les administró alimento y agua *ad libitum*, en condiciones de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Todas las ratas fueron pesadas dos veces por semana.

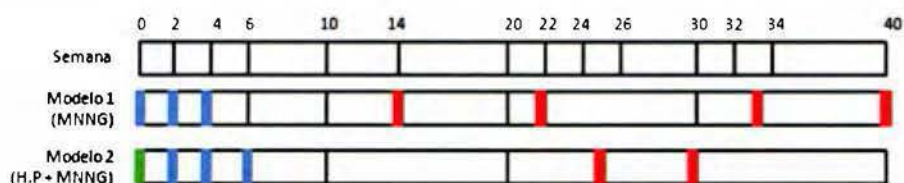


Figura 1. Diseño experimental para la formación de tumores en estómagos de ratas. En el modelo 1 solo se les administró MNNG y para el segundo modelo las ratas se inocularon con *H. pylori* previo a la administración del agente químico. Los cuadros celestes corresponden al momento de la administración del MNNG y en verde a la inoculación con *H. pylori*. En rojo se destaca el momento de sacrificio y extracción de estómagos en los dos experimentos.

Modela de inducción química con MNNG: Se inició con una muestra de 10 ratas macho de la cepa Wistar con un peso promedio de 89.3 ± 4.32 g. El MNNG se diluyó en agua de tubo a una concentración final de 15 mg/ml y se administró en 7 ratas de manera intragástrica en tres ocasiones con un intervalo de 2 semanas entre inoculaciones. En un primer momento se administró 150 mg de agente por kilogramo de peso, mientras que en la segunda y tercera dosis se les aplicó 87,5 mg/kg y 60,7 mg/kg de MNNG, respectivamente. A las tres ratas restantes se les administró únicamente agua y se designaron como ratas control. Los animales se mantuvieron por un período máximo de

40 semanas con libre ingesta de alimento y de agua. A partir de la semana 14 de iniciado el experimento, los animales se sacrificaron cada 8 semanas aproximadamente hasta completar la semana 40 de iniciado el experimento.

Modelo de inducción con H. pylori y MNNG: Las bacterias utilizadas fueron obtenidas previamente de biopsias de estómagos humanos y fueron donadas amablemente por la Dra. Vanessa Ramírez del Instituto de Investigaciones en Salud (INISA). Estas se clasificaron de acuerdo a la presencia de la isla de patogenicidad *Cag* en cepas CagA+ s1/m1 si la presentaban; y CagA- s2/m2 si carecían de ella. Seguidamente, 20 ratas macho Wistar (106.1 ± 7.6 g) fueron separadas en 4 grupos compuestos por 5 ratas cada uno. Los dos primeros grupos fueron inoculados con la bacteria (CagA+ ó CagA-) en una sola dosis, mientras que los dos restantes fueron inoculados una vez con la bacteria y MNNG en tres dosis con un intervalo de 2 semanas entre inoculaciones.

Para la inoculación de la bacteria (CagA+ ó CagA-) se les administró 500 μ l de 10^8 UFC/ml en caldo de triptona soya (CTS). La primera dosis de MNNG que se administró fue de 139.92 ± 10.31 mg/kg y la administración de MNNG se repitió dos y cuatro semanas después a concentraciones de 89.75 ± 2.77 mg/kg y $86,42 \pm 5.2$ mg/kg, respectivamente. Los animales se sacrificaron en las semanas 25 y 30 de iniciado el experimento.

Los sacrificios de las ratas se realizaron en una cámara de CO₂, e inmediatamente se procedió a la disección de los estómagos y posteriormente se realizaron análisis macroscópicos y microscópicos.

9. Histología e Inmunohistoquímica

Una vez extraídos los estómagos se procedió a su lavado y apertura por la curvatura mayor y el tejido se mantuvo extendido mediante el empleo de soportes sobre una superficie rígida. Las muestras se colocaron en formaldehído al 10% amortiguado con PBS por 48 horas y luego se realizaron cortes longitudinales de aproximadamente 2-3 mm.

Posteriormente se sometieron al procesamiento de lavado y deshidratación con una serie de alcoholes de menor (etanol 50%) a mayor concentración (etanol 100%) y el aclaramiento con el disolvente xilol. Posteriormente los tejidos fueron incluidos en parafina y se cortaron secciones de 4 μ m de grosor.

Para la visualización microscópica, los cortes se desparafinaron en una serie de xilol y etanoles con un gradiente de concentración descendente y posteriormente fueron teñidos con hematoxilina y eosina o según el caso con la tinción de Giemsa modificada para detectar la presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica. Adicionalmente se realizó la tinción con el anticuerpo monoclonal anti-ratón anti-PCNA. Para esto se procedió a la exposición de antígenos con una solución amortiguadora de citrato (pH 6) por 10 minutos a 96°C y se bloqueó la actividad endógena de peroxidasa por 10 minutos mediante una solución compuesta por peróxido de hidrógeno al 0,3%, azida de sodio y levamisol. Se realizaron lavados con PBS y posteriormente las muestras fueron incubadas con el anticuerpo (1:400 en una solución de BSA al 1%) toda la noche a 4°C. La unión del anticuerpo fue detectada a través del sistema DakoCytomation En Vision® + Dual Link System-HRP (DAB+). Una vez removido el anticuerpo, las muestras se incubaron con el polímero HRP marcado contra las inmunoglobulinas anti-ratón por 30 minutos y se adicionó la solución cromogénica 3,3'-diaminobenzidina (DAB) por un período no mayor a los 2 minutos.

Las imágenes fueron observadas en un microscopio (Olympus BX51) y se tomaron fotografías con la cámara (Evolution™ MP Color Media Cybernetics).

10. Prueba rápida de la Ureasa para la detección de *Helicobacter pylori*

A partir de los estómagos de ratas inoculadas únicamente con la bacteria ó en conjunto con el MNNG se tomaron fragmentos pequeños de la porción glandular y sin signos evidentes de tumoración, los cuales fueron incubados en caldo de urea que contenía rojo fenilo como indicador. Las muestras se incubaron por un período de 1 hora y

se observó si el color del medio cambió de un color amarillo pálido a rosado producto de la acción de la ureasa de la bacteria.

11. Análisis de la colonización de *Helicobacter pylori* en el moco gástrico mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Una vez sacrificados los animales, se les extrajo el estómago y se procedió a raspar el moco gástrico en el lumen del estómago con una hoja de bisturí. Durante todo este proceso el tejido se mantuvo en hielo, seguidamente la muestra se almacenó a -80°C hasta el momento de realizar el ensayo de PCR.

La extracción del ADN se realizó mediante la suspensión de la muestra en agua desionizada estéril (pH 5), la cual se calentó a 96°C por 5 minutos. Para la preparación del PCR se siguieron las indicaciones del fabricante (Fermentas Life Science), utilizando $5\mu\text{L}$ del ADN, $0,4\text{ mM}$ de dNTP's, 4 mM de MgCl_2 , $0,025\text{U}/\mu\text{L}$ de la polimerasa Taq, $0,1\ \mu\text{M}$ de cada uno de los iniciadores (hacia adelante y reverso), buffer 10X y agua estéril para un volumen total de $25\ \mu\text{L}$. Para este ensayo se contó con iniciadores capaces de amplificar un fragmento de 374 pb específico para *Helicobacter spp.*, los cuales fueron donados gentilmente por la Dra. Marcela Suárez de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional. Se utilizó el iniciador en sentido hacia adelante 5'-CTATGACGGGTATCCGGC-3' y el iniciador en sentido reverso 5'-ATTCCACCTACCTCTCCCA-3' de acuerdo a lo descrito previamente en la literatura (Riley et al, 1996).

El protocolo de amplificación para la secuencia de ADN de *Helicobacter spp.* fue el siguiente: 94° por 10 minutos (desnaturalización previa), 94° por 2 segundos (desnaturalización), 53°C por 2 segundos (alineamiento), 72°C por 30 segundos (extensión) y 70°C por 10 minutos (extensión final). Se realizó un número total de 35 ciclos.

La visualización del ADN se realizó por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los ácidos nucleicos y los marcadores de pares de bases se tiñeron con Gel Red™ mediante la exposición a luz ultravioleta en un transiluminador (Wise Uv® WUV-L20, Daihan Scientific).

12. Análisis estadísticos

Para establecer la diferencia significativa entre los promedios de los grupos experimentales en las pruebas de citotoxicidad se realizó la prueba de t-student, ANOVA y análisis posteriores por Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Para el cálculo de las concentraciones inhibitorias IC_{50} se extrapolaron los valores a partir de curvas de mejor ajuste con el programa Slide Write Plus Application 6.0 (Advanced Graphics Software, Inc.).

Resultados

1. Desarrollo de un modelo tridimensional con células humanas de cáncer gástrico

El cultivo tridimensional de una línea primaria y una línea metastásica de cáncer gástrico se realizó mediante el recubrimiento de los platos con agarosa y adicionalmente por medio de la técnica de la “gota colgante”. A pesar de la creciente utilización de este tipo de cultivo, son muy pocos los reportes respecto a la estandarización y utilización de este tipo de técnica con células de cáncer gástrico (Mayer et al, 2001), por lo que el primer paso en esta investigación consistió en evaluar la capacidad de las líneas celulares AGS y NCI-N87 de crecer y formar estructuras tridimensionales.

Para valorar de manera certera si estas células eran capaces de formar estructuras estables, compactas y redondas (esferoides), y no sólo agregados multicelulares inestables que no reprodujeran de manera efectiva las características observadas en tumores avasculares *in vivo*, se utilizó como punto de comparación la línea celular de adenocarcinoma colorrectal HT29, debido a su capacidad de formar esferoides con todas las características mencionadas anteriormente (Sutherland et al, 1988; Santini y Rainaldi, 1999 y Zheng et al, 2009).

En los ensayos realizados, ambas líneas celulares de cáncer gástrico formaron estructuras multicelulares tanto con la técnica de recubrimiento líquido como con el ensayo de la gota colgante (Figura 2), por lo que se decidió seguir trabajando únicamente con la técnica de recubrimiento líquido que presentó menores dificultades metodológicas.

Las células AGS formaron estructuras multicelulares a las 24 horas de su cultivo y estas se mantuvieron por un período de hasta 96 horas. Inicialmente estas células formaron estructuras redondas con gran homogeneidad, pero posteriormente se determinó que carecían de estabilidad ante la manipulación física. Lo anterior se pudo comprobar al realizar diversas tinciones como por ejemplo la tinción de la actina que

conforma el citoesqueleto mediante la incubación con la micotoxina faloidina y adicionalmente se tiñó el ADN nuclear mediante la incubación con DAPI. Como se puede observar en la figura 3 las estructuras celulares fueron fácilmente dispersables y fue imposible mantener una disposición compacta; con un tamaño y forma homogéneos. Estas características se mantuvieron a pesar de cambiar distintas condiciones como la densidad de células empleadas y el medio de cultivo celular.



Figura 2. Esferoides formados a partir de células de cáncer de colon y cáncer gástrico a las 72 horas por medio de la técnica de recubrimiento líquido. (A) Esferoide conformado por la línea celular colónica HT29. (B) y (C) se observan modelos tridimensionales conformados por las líneas de cáncer gástrico, AGS y NCI-N87 respectivamente (fotografía microscopio invertido 100X).

En el caso de la línea celular NCI-N87 la formación de esferoides presentó ciertas complicaciones, ya que al utilizar el número de 10 000 células que se empleó en la preparación tanto de los esferoides de células HT29 así como para la línea celular AGS, no se pudo crear un esferoide, sino que se obtuvo un agregado amorfo de células, como se puede observar en la figura 4.

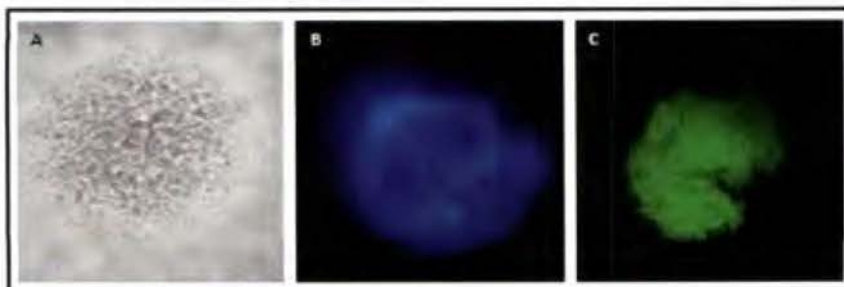


Figura 3. Agregados multicelulares inestables de células AGS. (A) Se observa un agregado multicelular a las 72 h de cultivadas las células, el cual mantiene su forma redonda. Al realizar tinciones del (B) ADN nuclear y (C) del citoesqueleto, se observa una clara disminución en el tamaño y la pérdida de homogeneidad en la forma de la estructura tridimensional (fotografía microscopio de fluorescencia 50X).

Por lo tanto, se procedió a evaluar si elevar la densidad de células favorecería la formación de estructuras más similares a los esferoides observados con las células HT29. Se pudo observar que a densidades menores de 40 000 células la forma de los agregados celulares fue muy variable y en la mayoría de los casos no se formaron estructuras homogéneas. A partir de la utilización de 40 000 células las estructuras fueron más uniformes en cuanto a tamaño y forma, tendiendo a ser un poco más redondas.

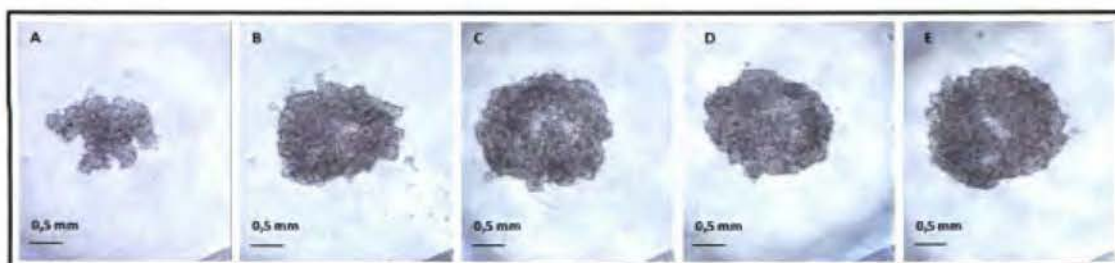


Figura 4. Agregados multicelulares compuestos por las células NCI-N87 a las 72 horas. Al aumentar la densidad de células se genera la formación de esferoides de manera más eficiente. (A) 10 000 células, (B) 20 000 células, (C) 30 000 células, (D) 40 000 células y (E) 50 000 células (fotografía microscopio invertido 50X).

Posteriormente se procedió a evaluar la capacidad de estas estructuras a resistir la manipulación física, por lo que se realizaron tinciones que permitieron la visualización de los núcleos y el citoesqueleto (DAPI y actina respectivamente). Como se puede observar en la figura 5, a diferencia de los agregados multicelulares conformados por las células AGS, los esferoides de células NCI-N87 sí lograron mantener su estructura tridimensional durante todo el proceso de la tinción.

El tamaño de los esferoides es un aspecto que se debe considerar para el estudio de eventos asociados a la muerte celular. Múltiples estudios recomiendan que se trabaje únicamente con estructuras que presentan diámetros pequeños, y así evitar la presencia de necrosis producto de un aumento exagerado en la hipoxia y carencia de nutrientes en el centro del esferoide (Friedrich et al, 2009). Debido a que se requirió el aumento en la cantidad de células empleadas para obtener esferoides de células NCI-N87 se procedió a evaluar el tamaño de los esferoides generados.

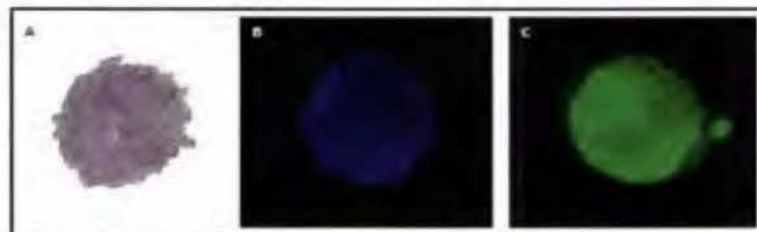


Figura 5. Los esferoides formados por 40 000 células NCI-N87 a las 72 horas preservan su forma y tamaño. (B) Tinción de los núcleos celulares y (C) tinción de actina en las células (fotografía microscopio de fluorescencia 50X).

Con este propósito, se comparó su diámetro con el correspondiente a los esferoides formados a partir de las células de cáncer de colon HT29 (densidad inicial de 10 000 células). Se pudo observar que los agregados celulares con un diámetro similar a los obtenidos a partir de las células HT29 correspondían a las estructuras con menor densidad celular y que carecían de una forma homogénea. Los esferoides formados a partir de 40

000 células presentaron una longitud de diámetro promedio de 1,73 mm, siendo esta medición significativamente mayor ($p < 0,001$) a la que se obtuvo en los esferoides conformados por las células HT29, los cuales tuvieron un diámetro promedio de 1,17 mm a las 72 horas de cultivados (Figura 6).

Finalmente, para verificar si el tamaño de los esferoides obtenidos a partir de las células NCI-N87 permitiría el estudio de la acción de ciertas drogas sobre la viabilidad de las células, se procedió al tratamiento de los esferoides compuestos por 40 000 células con el agente quimioterapéutico doxorubicina y el agente inhibidor de la síntesis proteica cicloheximida. El efecto citotóxico de las drogas fue evaluado mediante la medición del diámetro del esferoide, ya que se ha establecido previamente una asociación entre la disminución en su diámetro y una menor viabilidad de las células que componen el esferoide (Fayad et al, 2009 y Friedrich et al, 2009).

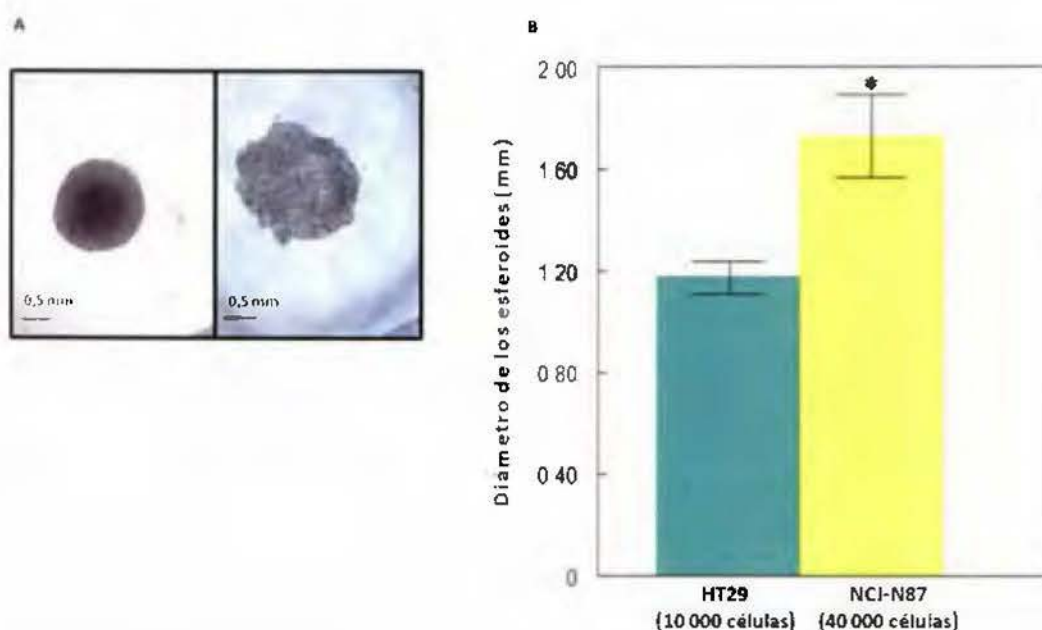


Figura 6. Comparación del tamaño de los esferoides compuestos por células NCI-N87 y HT29. (A) Fotografías de un esferoide formado a partir de una densidad inicial de 10 000 células HT29, mientras que a la derecha se encuentra un esferoide formado a partir de 40 000 células NCI-N87 (fotografía microscopio invertido 50X). (B) Comparación entre la longitud promedio de los esferoides formados por las células de cáncer de colon y de cáncer gástrico ($p < 0,001$)*.

Cuadro 1. Diámetros de los esferoides tratados con doxorubicina y cicloheximida por 48 horas

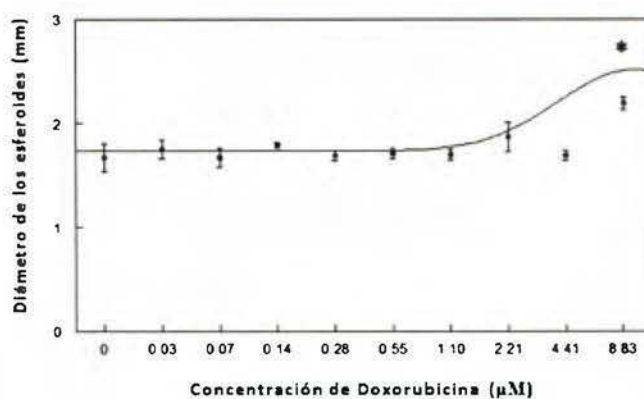
Esferoide	Diámetro (mm)											
	Pre tratamiento	Concentración de Doxorubicina (μM)										CHX ($\mu\text{g/ml}$)
	0	0,00	0,03	0,07	0,14	0,28	0,55	1,10	2,21	4,41	8,83	100,00
1	1,75	1,80	1,65	1,80	1,75	1,77	1,75	1,67	1,67	1,77	2,25	1,37
2	1,75	1,75	1,87	1,62	1,77	1,65	1,67	1,77	1,92	1,65	2,17	1,47
3	1,72	1,52	1,75	1,62	1,80	1,67	1,75	1,67	1,87	1,67	2,12	1,55
4	1,75	1,63	1,72	1,62	1,82	1,67	1,67	1,67	2,00	1,67	2,22	
Promedio	1,7425	1,67	1,75	1,67	1,79	1,69	1,71	1,70	1,87	1,69	2,19 *	1,46
Desviación	0,015	0,13	0,09	0,09	0,03	0,05	0,05	0,05	0,14	0,05	0,06	0,09

* Valor significativamente diferente al obtenido en las células sin tratamiento ($p < 0,001$).

Los esferoides fueron tratados con 9 concentraciones distintas de doxorubicina y cicloheximida a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$, esta concentración previamente había demostrado ser tóxica para las células NCI-N87 cultivadas en monocapa. En el cuadro 1 se observan las mediciones realizadas de los diámetros de los esferoides antes del tratamiento y 48 horas después del mismo. Como se puede observar en la figura 7, concentraciones de doxorubicina menores a 8,83 μM (máxima dosis empleada) no tuvieron ningún efecto sobre la viabilidad celular, mientras que la exposición de los esferoides a esta concentración tuvo el efecto contrario al esperado y el diámetro de los esferoides aumentó de manera significativa en relación con los esferoides tratados únicamente con PBS ($p < 0,001$).

En el caso de los esferoides tratados con cicloheximida, estos presentaron un diámetro promedio de $1,46 \pm 0,13$ mm, mientras que el diámetro promedio de los esferoides no tratados fue $1,67 \pm 0,13$ mm, al realizar los análisis estadísticos correspondientes se determinó que esta diferencia no era significativa ($p = 0,116$).

A



B

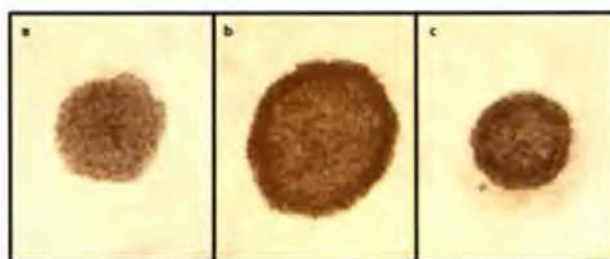


Figura 7. (A) Efecto del tratamiento doxorubicina por 48 horas sobre los esferoides de células NCI-87. El aumento en la concentración de la droga no genera un cambio significativo en el diámetro de los esferoides, con excepción de la concentración máxima ($p < 0,001$)*. (B) En la fotografía se observa el tamaño de los esferoides 48 horas después de ser tratados con (a) PBS, (b) doxorubicina 8,83 µM y (c) cicloheximida a 100 µg/ml (fotografía microscopio invertido 50X).

2. Estudio comparativo del efecto de la doxorubicina y retinoides de origen natural y sintético sobre células humanas de cáncer gástrico cultivadas en monocapa

Con el objetivo de estudiar las diferentes susceptibilidades de dos líneas celulares de cáncer gástrico a posibles tratamientos, se procedió a evaluar la acción de los dos retinoides naturales: ácido trans retinoico (ATRA) y el ácido retinoico 13-cis, así como del retinoide sintético N-(4-hidroxifenil) retinamida. Se utilizaron las líneas celulares de cáncer gástrico primario AGS y las células NCI-N87 que corresponden a una metástasis hepática de un tumor de estómago. Para tener un punto de referencia del efecto de estos

compuestos, las células fueron tratadas con doxorubicina, el cual es un agente quimioterapéutico empleado en la clínica para el tratamiento de cáncer gástrico.

En el caso de las células tratadas con doxorubicina a concentraciones de 0 – 4,4 μM se observa una gran diferencia entre las dos líneas celulares (Figura 8), ya que a bajas concentraciones de la droga las células AGS presentan una gran mortalidad, la concentración necesaria para disminuir el 50% de la viabilidad (IC_{50}) en estas células fue de 0,33 μM (Cuadro 2), siendo la concentración más baja de los 4 tratamientos evaluados. Por el contrario en las células metastásicas NCI-N87 no se observó un efecto citotóxico importante ya que a la máxima concentración, el porcentaje de viabilidad se mantuvo en 68%, por lo que fue imposible calcular la IC_{50} de la doxorubicina en estas células. Este comportamiento se mantuvo pese a aumentar la concentración máxima a 8,8 μM .

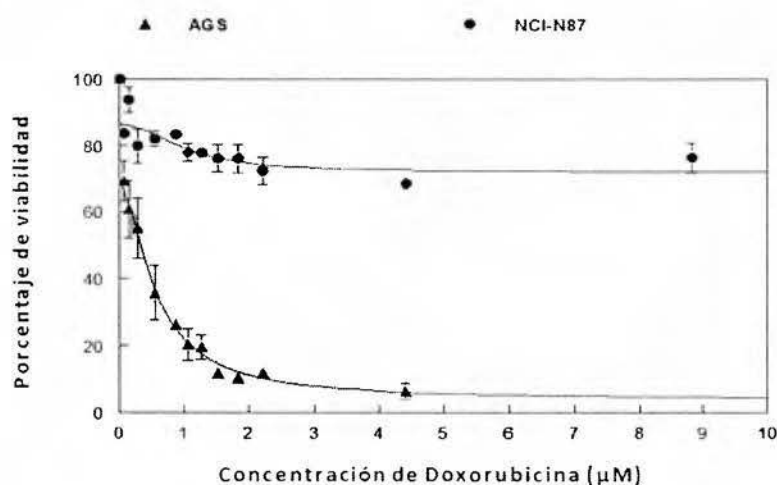


Figura 8. Efecto citotóxico de la doxorubicina en las células de cáncer gástrico AGS y NCI-N87. Curva de citotoxicidad obtenida mediante el ensayo MTT del efecto del tratamiento con doxorubicina después de 48 horas. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos realizados independientemente \pm error estándar.

Por otro lado, cuando se comparó el efecto de los retinoides sobre ambas líneas celulares, se observó que las células provenientes de la metástasis hepática (NCI-N87) fueron más resistentes a todos los tratamientos evaluados en comparación con las células

de tumor primario (AGS). De hecho, el único tratamiento que fue capaz de generar la muerte de más del 50% de las células NCI-N87 fue la retinamida (Cuadro 2).

Cuando las células fueron tratadas con los retinoides naturales ATRA y el ácido retinoico-13-cis a concentraciones de 0 – 106 μ M se observó un comportamiento de las células similar a cuando se trataron con doxorubicina. Como se puede observar en la figura 9, las únicas células sensibles a los tratamientos fueron las células AGS, ya que las células NCI-N87 no alcanzaron niveles de viabilidad menores al 80% a las concentraciones evaluadas. Al comparar los valores de IC₅₀ de los dos tratamientos en las células AGS, se puede observar que estas fueron ligeramente más sensibles a la acción del ATRA que a la del ácido retinoico 13-cis.

Cuadro 2. Concentraciones inhibitoras de la viabilidad de los retinoides y doxorubicina

Concentración inhibitora del 50% de viabilidad celular (IC 50) (μM)		
	Células AGS	Células NCI-N87
Doxorubicina	0,33 (R ² : 0,99)	No se obtuvo a las concentraciones analizadas
Ácido trans retinoico	51,74 (R ² : 0,99)	No se obtuvo a las concentraciones analizadas
Ácido retinoico-13-cis	65,32 (R ² : 0,95)	No se obtuvo a las concentraciones analizadas
Retinamida	23,26 (R ² : 0,98)	25,81 (R ² : 0,97)

Finalmente, el tratamiento con el retinoide sintético presentó resultados muy interesantes, ya que fue el único de los cuatro tratamientos capaz de tener un efecto citotóxico importante sobre las dos líneas celulares (Figura 10). A la dosis máxima evaluada (81 μ M), se obtuvo una viabilidad del 15% en las células AGS y de 30% en las

NCI-N87. Sin embargo, al comparar las concentraciones en que se alcanzó el 50% de viabilidad, los valores fueron muy similares, ya que para las células AGS este valor fue de 23,26 μM , mientras que 25,81 μM para las células NCI-N87 ($p > 0,05$).

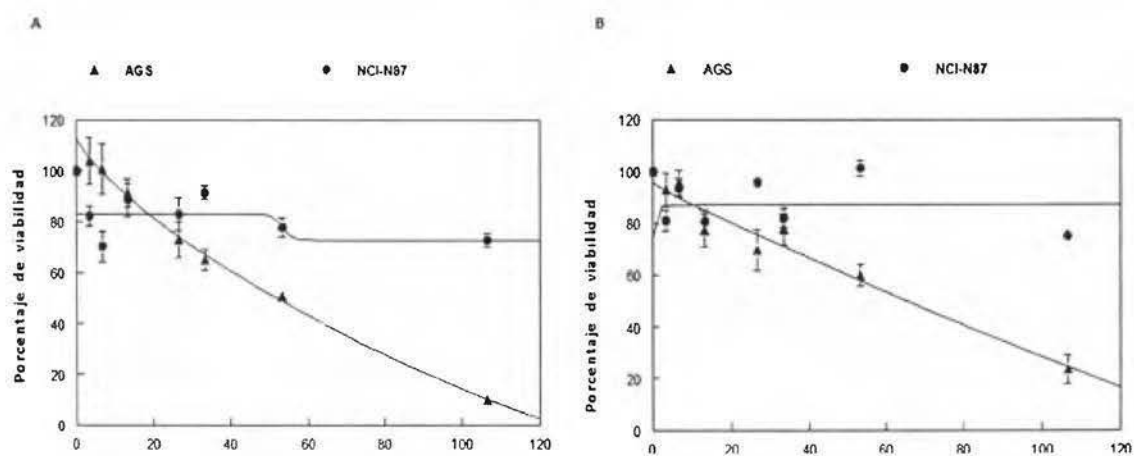


Figura 9. Curvas de citotoxicidad obtenidas mediante el ensayo MTT de los retinoides naturales sobre las células de cáncer gástrico por un período de 48 horas. (A) ATRA, (B) ácido retinoico-13-cis. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos realizados independientemente \pm error estándar.

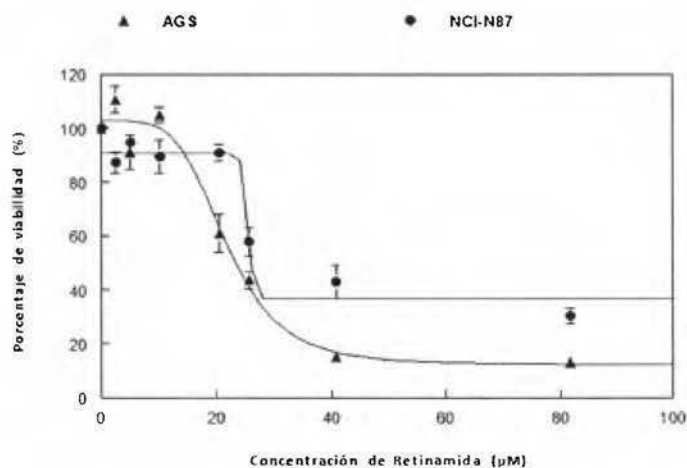


Figura 10. Curva de citotoxicidad obtenidas mediante el ensayo MTT del retinoide sintético Retinamida sobre las células de cáncer gástrico por un período de 48 horas. Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos realizados independientemente \pm error estándar.

3. Desarrollo de un modelo de carcinogénesis *in vivo* en ratas Wistar por administración de N-metil-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidina (MNNG)

Con el objetivo de estandarizar un modelo de carcinogénesis *in vivo* en el estómago de ratas, se trataron intragástricamente 7 ratas macho Wistar con el agente mutagénico MNNG, mientras que a otras 3 ratas se les administró únicamente agua como control. Durante el período en estudio no se presentó la muerte prematura de ninguna de las ratas y no se reportaron alteraciones importantes en su peso en relación con las ratas a las que solamente se les administró agua (Figura 11).

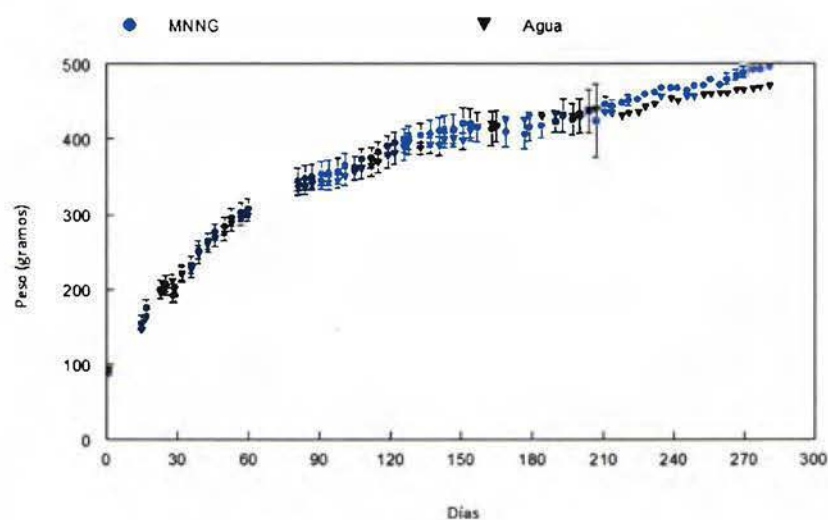


Figura 11. Peso promedio de las ratas tratadas con MNNG y agua. Los dos grupos experimentales mantuvieron pesos similares a lo largo del experimento, lo cual sugiere la ausencia de estrés asociado al MNNG

Las ratas se sacrificaron en grupos de 2 o 3 ratas y los estómagos se analizaron cada 6-8 semanas después de la última dosis de MNNG con el objetivo de seguir la evolución de la patología. Después de 40 semanas de iniciado el experimento, se pudieron detectar lesiones a nivel microscópico por medio de la tinción con hematoxilina-eosina, y también se observaron lesiones a nivel macroscópico (Figura 12).

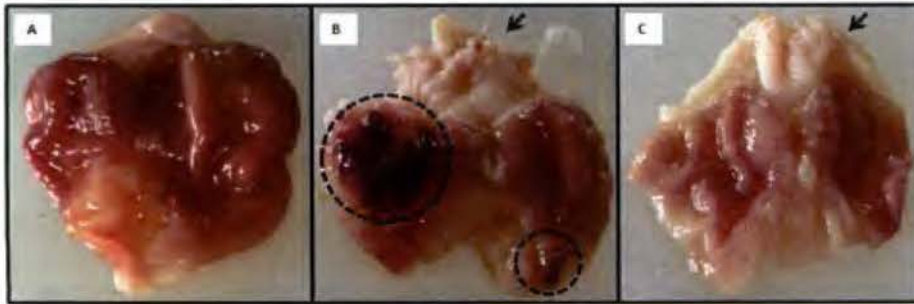


Figura 12. Estudio macroscópico de los estómagos de: (A) rata control y (B y C) ratas expuestas al agente inductor de tumores MNNG por un período de 8 meses. Con la flecha se señala la presencia de protuberancias asociadas a la aparición de carcinomas escamosos, las cuales no se observan en el estómago control. Se resaltan en círculo dos zonas con lesiones necróticas.

Los primeros estómagos se analizaron a las 14 semanas de iniciado el experimento, este período demostró ser muy corto para la aparición de lesiones asociadas con algún evento proliferativo temprano, como por ejemplo, el aumento de grosor de la mucosa (hiperplasia), lesiones erosivas o ulceraciones (Figura 13).



Figura 13. Mucosa gástrica del estómago de una rata (A) control y (B) una rata tratada con MNNG a la semana 14 de iniciado el tratamiento. En ambos casos se observa una mucosa íntegra y sin diferencia en el grosor de la misma (H & E 50X).

De manera interesante 8 semanas después (semana 22), se observó la aparición de lesiones en el epitelio escamoso de las dos ratas analizadas. En uno de los estómagos (Figura 14C) se pudo detectar hiperplasia de la mucosa gástrica y en particular una

ulceración importante con un alto grado de componente inflamatorio, así como la invasión del epitelio escamoso en la submucosa. En el segundo estómago igualmente se pudo observar una hiperplasia difusa del epitelio escamoso e hiperqueratosis (aumento en el grosor de la capa de queratina), así como la invasión del epitelio escamoso hacia la submucosa, todas estas lesiones muy comunes en el carcinoma escamoso (Figura 14B y 14D). Este diagnóstico fue validado por el Dr. Juan Alberto Morales del Departamento de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

La aparición de tumores en el epitelio escamoso fue un hallazgo recurrente en todos los estómagos analizados a partir de la semana 22. Por otro lado, para este momento se descartó alguna alteración evidente en el epitelio glandular.

Para la semana 33 de iniciado el experimento, se estudiaron dos estómagos de las ratas tratadas, se observaron lesiones en el epitelio escamoso, las cuales fueron más evidentes que en los estómagos analizados anteriormente, además fue posible detectar un compromiso de la mucosa gástrica glandular y un importante infiltrado inflamatorio localizado en la submucosa gástrica de los dos estómagos (Figura 15). Sin embargo, una de las dos ratas resultó más afectada, ya que en este estómago se pudo observar que parte del epitelio gástrico tenía una importante cantidad de células inflamatorias y fue reemplazado por un tejido con características de epitelio intestinal, en un proceso conocido como metaplasia intestinal (Figura 15 E y 15F).

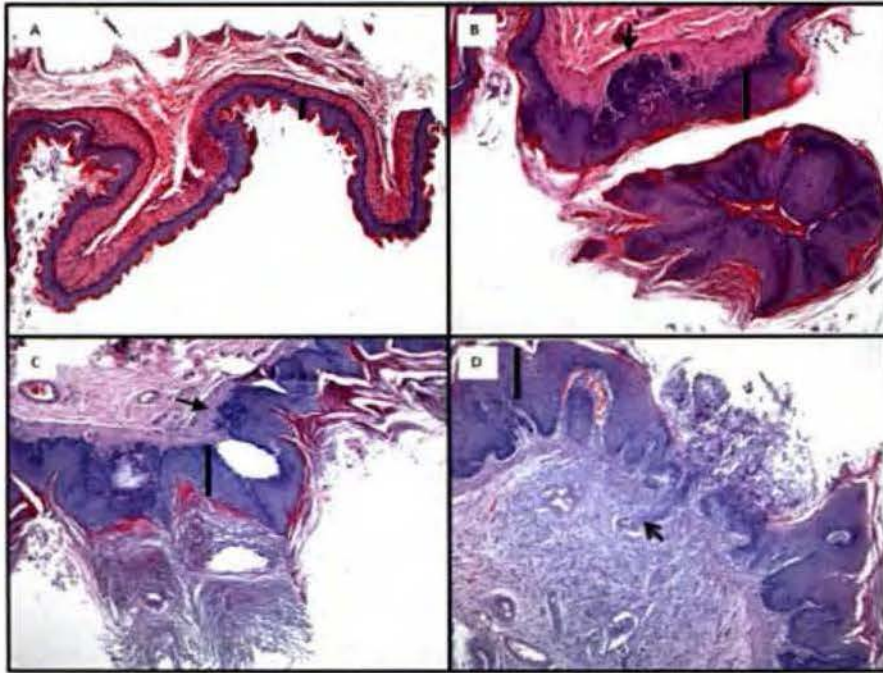


Figura 14. Efecto de la exposición intragástrica a MNNG por 22 semanas. (A) Epitelio plano estratificado queratinizado correspondiente a una rata control. (B y C) Carcinomas escamosos con hiperplasia e hiperqueratosis. (D) Carcinoma escamoso y ulceración en el epitelio escamoso, con presencia de infiltrado inflamatorio. Las flechas resaltan la invasión de queratina en la submucosa y las barras verticales evidencian la diferencia en el grosor del epitelio queratinizado entre un estómago de una rata control y otro tratado con MNNG (H & E 100X).

Finalmente a las 40 semanas de iniciado el experimento, se compararon dos estómagos a los que se les administró intragástricamente el agente químico y un estómago que no fue inducido. Si bien es cierto las observaciones a nivel macroscópico ya sugerían la presencia de lesiones en los tejidos queratinizado y glandular del estómago (figura 12), fue el análisis histológico el que permitió confirmarlo.

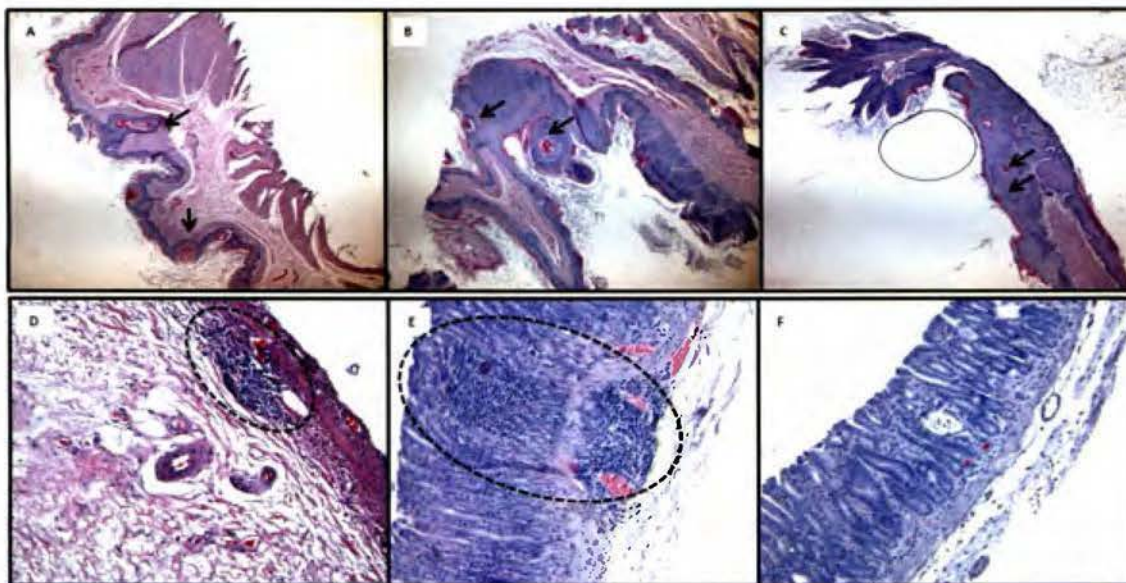


Figura 15. Estómagos de ratas tratadas con MNNG por 33 semanas. (A), (B) y (C) Carcinoma escamoso con presencia de perlas de queratina (flechas) (H & E 50X). (D) y (E) Inflamación en la mucosa y submucosa (F) Presencia de un epitelio con características similares al epitelio intestinal (H & E 200X) Las figuras A, B, E y F corresponden a un mismo estómago, mientras que C y D muestra el otro estómago analizado.

El análisis del estómago de la rata que no recibió el MNNG fue esencial, ya que permitió confirmar la ausencia de lesiones en el epitelio queratinizado del estómago no glandular. En la figura 16A se puede observar que este epitelio conserva un grosor normal y no se observa ningún infiltrado inflamatorio o compromiso en la integridad de la membrana. Por otro lado, en el epitelio glandular únicamente se observó un leve infiltrado inflamatorio sin signos de atipia, por lo cual no podría descartarse que ésta sea producto de la edad avanzada de la rata (Figura 16B).



Figura 16. Estómago de una rata sin exposición a MNNG (semana 40). Se resalta un leve infiltrado inflamatorio en la submucosa gástrica (A) Epitelio queratinizado con apariencia normal. (B) Muy leve infiltrado inflamatorio en la mucosa del estómago glandular. (C) Epitelio glandular sin evidencia de alteraciones (H & E 200X).

En los dos estómagos inducidos con el MNNG, a las 40 semanas se pudo detectar la presencia de carcinomas escamosos, uno de ellos histológicamente presentó características de un tumor bien diferenciado, similar a lo que se había observado en los estómagos analizados anteriormente, sin embargo en el segundo caso, se encontraron células en anillo de sello. La presencia de estas células sugiere que este tumor corresponde a un carcinoma escamoso con metaplasia mucinosa, el cual histológicamente se considera un tumor pobremente diferenciado (Figura 17A y 17B). Sin embargo, lo más destacable fue el análisis del epitelio glandular de estos estómagos, donde se pudo observar zonas con glándulas compuestas por células atípicas y pleomórficas, sugerentes de la presencia de tumores en el epitelio glandular de los estómagos tratados con MNNG. En ninguno de los casos se detectó invasión de estas células a la submucosa, por lo que estos tumores se clasifican como adenomas. En ambos casos se pudo apreciar la dilatación de las glándulas y la desorganización en la arquitectura normal del tejido, así como la presencia de núcleos picnóticos (Figura 17).

Estómago 1

Estómago 2

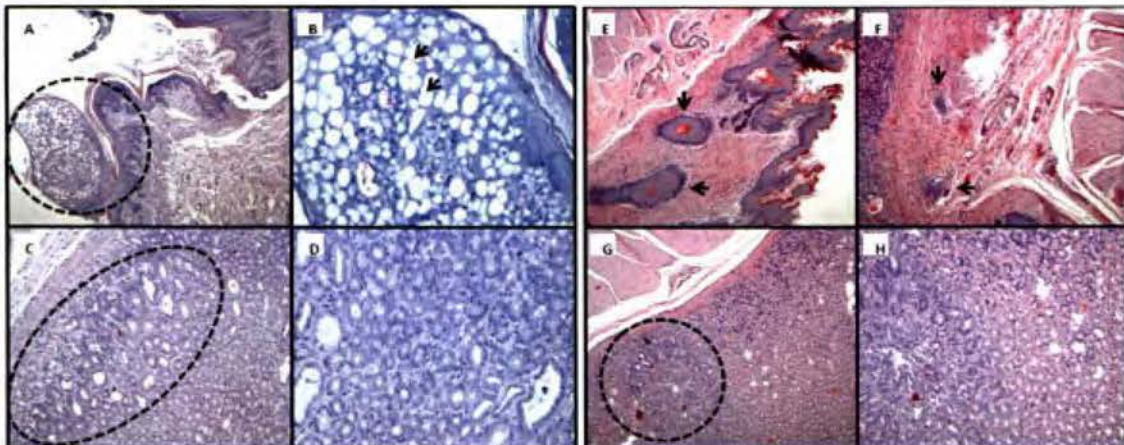


Figura 17. Estómagos de dos ratas tratadas con MNNG a la semana 40 de iniciado el experimento. (A) Carcinoma escamoso pobremente diferenciado (H & E 100X). (B) Mismo tumor a mayor aumento, se resalta con flechas la presencia de células en anillo de sello (H & E 400X). (E) Carcinoma escamoso bien diferenciado y (F) inflamación en la submucosa del epitelio escamoso. (C) y (G) Adenomas en la mucosa gástrica (H & E 200X). (D) y (H) Imágenes de los tumores a mayor resolución (H & E 400X).

Adicionalmente se realizó la tinción por inmunohistoquímica del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). Como se puede observar en la figura 18 existe una correlación entre la zona de atipia en el epitelio glandular y un aumento en la proliferación propio de las lesiones neoplásicas, evidenciado por una mayor presencia del antígeno de proliferación.

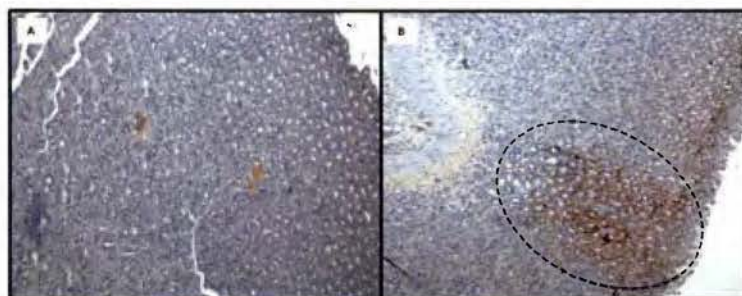


Figura 18. Tinción por inmunohistoquímica de PCNA en un estómago tratado con MNNG por 40 semanas. (A) Control negativo de la tinción sin la presencia del anticuerpo (B) El aumento en la tinción se asocia a zonas con marcada atipia y dilatación glandular (100X)

3. Desarrollo de modelos de carcinogénesis *in vivo* en ratas Wistar por la infección con *Helicobacter pylori* y la administración de N-metil-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidina (MNNG)

Para la realización de este segundo modelo se contó con un número inicial de 20 ratas, de las cuales 10 fueron infectadas con *H. pylori* de dos cepas diferentes, 5 con la cepa CagA+ y las 5 restantes con la cepa CagA-, de las cuales el 100% sobrevivió hasta el final del experimento. Las otras 10 ratas, a las cuales se les inoculó la bacteria y el MNNG presentaron una respuesta diferente en la sobrevivencia, 4 murieron, 2 pertenecientes al grupo infectado con la cepa CagA+ y las 2 restantes al grupo CagA-. En relación al peso de las ratas durante las 30 semanas que duró el experimento, los cuatro grupos presentaron pesos muy similares entre sí. El único punto donde se observó una alteración en el peso de los cuatro grupos fue a los 15 días de haber sido inoculados con la bacteria, esta disminución fue significativa en todos los grupos con excepción de las ratas inoculadas únicamente con la bacteria CagA+ ($p < 0,05$) (Figura 19).

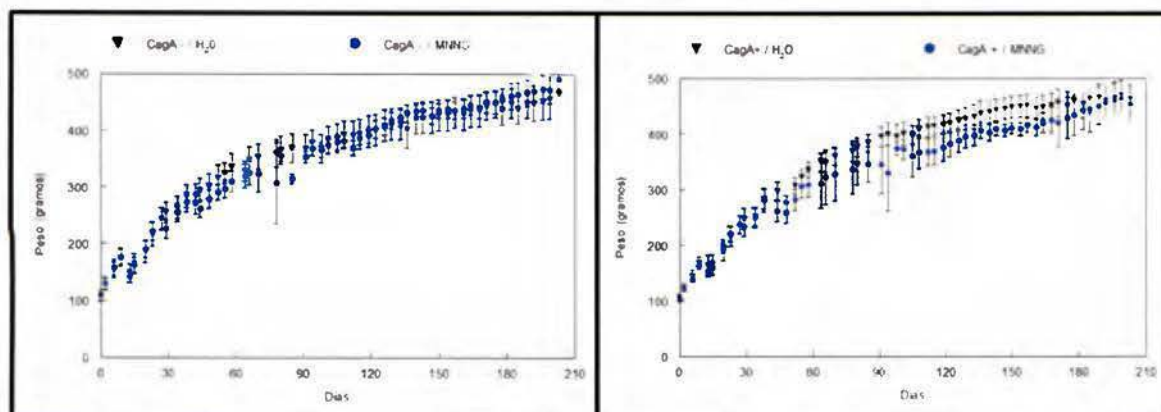


Figura 19. Determinación del peso promedio de las ratas inoculadas con *H. pylori* e inducidas con MNNG. Se observa un comportamiento similar entre los cuatro grupos.

Los modelos animales más utilizados para estudiar los efectos de la infección con *H. pylori* han sido en ratones y en gerbos, pero no se tiene evidencia de su capacidad de colonización en el estómago de ratas. Por tanto el primer objetivo fue determinar si las 2 cepas de bacteria lograban colonizar la mucosa gástrica. Con este fin se realizaron tres ensayos distintos: la medición de la actividad ureasa de la bacteria, la detección de ADN bacteriano en el moco gástrico y finalmente se intentó visualizar en cortes histológicos del estómago. Todas las pruebas se realizaron después de sacrificar los animales a las 30 semanas de iniciados los tratamientos.

Para la prueba rápida de ureasa se trabajó con un estómago de cada grupo experimental en el caso de los estómagos inoculadas únicamente con la bacteria, mientras que en el caso de los estómagos a los que adicionalmente se les administró MNNG se contó con dos órganos por grupo. Se tomaron dos secciones por cada estómago, correspondientes al cuerpo y antro. En ninguno de los seis estómagos analizados se observó en un plazo de 1 hora el cambio de color de la solución amarillo pálido de urea a un color rojizo, por lo que se consideraron resultados negativos en cuanto a la presencia de la bacteria (resultados no mostrados).

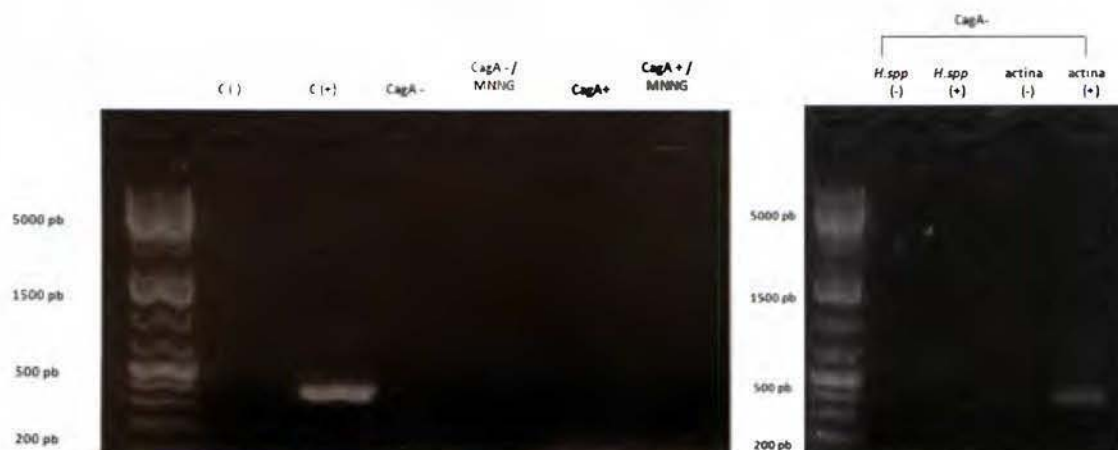


Figura 20. Resultado de la amplificación de secuencias de ADN de *H. pylori*. C (-): control negativo, C (+): control positivo. *H.spp* (-) ausencia y *H.spp* (+) presencia de iniciadores para el género *Helicobacter*. Actina (-) ausencia y Actina (+) presencia de iniciadores para la proteína actina.

En segunda instancia, se realizó una prueba de PCR con secuencias iniciadoras que permiten amplificar una secuencia correspondiente a *Helicobacter spp.* Con este fin, se raspó el moco de los estómagos de las ratas y se procedió a la extracción del ADN. Como se puede observar en la figura 20, no se detectó la presencia de ADN de la bacteria en los estómagos de las ratas inoculadas con la bacteria (con y sin MNNG). La única muestra donde se detecta una banda, corresponde al control positivo donde se corrió un plásmido control que expresa la secuencia de interés. Sin embargo, este análisis no fue posible realizarlo con todos los estómagos de las ratas, por lo que se seleccionó un estómago perteneciente a cada grupo, con excepción de los estómagos en los que solamente se inoculó la bacteria, donde se realizó en dos especímenes. Para verificar que en efecto se contaba con material genético en las muestras extraídas de las ratas se realizó la amplificación de un control con actina.

La visualización de las bacterias en el tejido por medio de la microscopía ha sido considerada la técnica más efectiva para el diagnóstico de la infección y en el caso de la tinción de Giemsa tiene la ventaja de ser una técnica sencilla, con alta sensibilidad y bajo costo (Ricci, 2007). Esta tinción es específica para regiones ricas en las bases nitrogenadas adenina y timina, por lo que permite detectar diferentes agentes patógenos como los parásitos del género *Plasmodium* responsables de la malaria, ciertos hongos y bacterias espiroquetas como las de la especie *Helicobacter spp.* (Figura 21). En este ensayo, se realizó ésta tinción en un mínimo de 2 estómagos representativos de cada grupo experimental y al analizar el total de los tejidos, en ninguno de los casos se pudo detectar la presencia de la bacteria

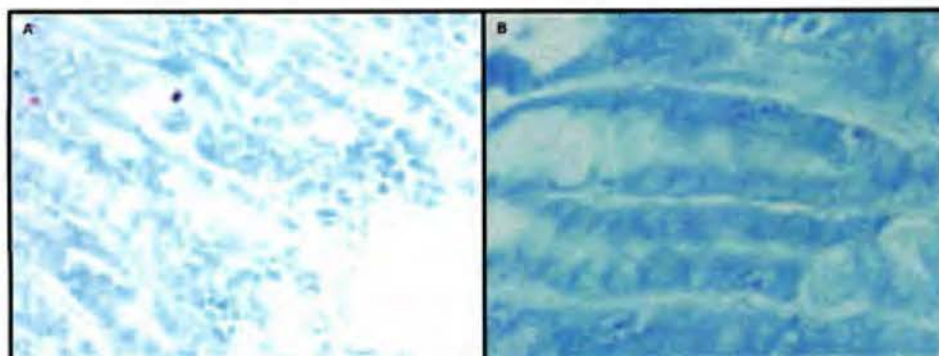


Figura 21. Tinción de Giemsa en estómagos de rata inoculadas con *H. pylori*. En ninguna de las dos imágenes se observa la presencia de *H. pylori*. (A) Superficie de la mucosa, 400X. (B) Lumen de las glándulas, objetivo de inmersión.

Se realizaron tinciones de hematoxilina y eosina en los estómagos de las ratas a las que solamente se les administró la bacteria, así como en los que se les indujo la formación de tumores y fueron sacrificadas en la semana 30 de iniciado el experimento. En el primer caso, como era de esperar no se observaron lesiones en el epitelio gástrico producto de la acción de la bacteria. Por otro lado, las ratas que además recibieron el agente químico MNNG presentaron lesiones principalmente en el epitelio escamoso, y una ligera inflamación en el epitelio glandular, concordando con lo visto en el ensayo de inducción química en el mismo período de análisis. Como se puede observar en la figura 22, en el epitelio escamoso se observa la invasión del estrato córneo en las capas más profundas de la mucosa. Cabe destacar que en uno de los estómagos analizados, se detectó una zona con metaplasia de las células mucosas.

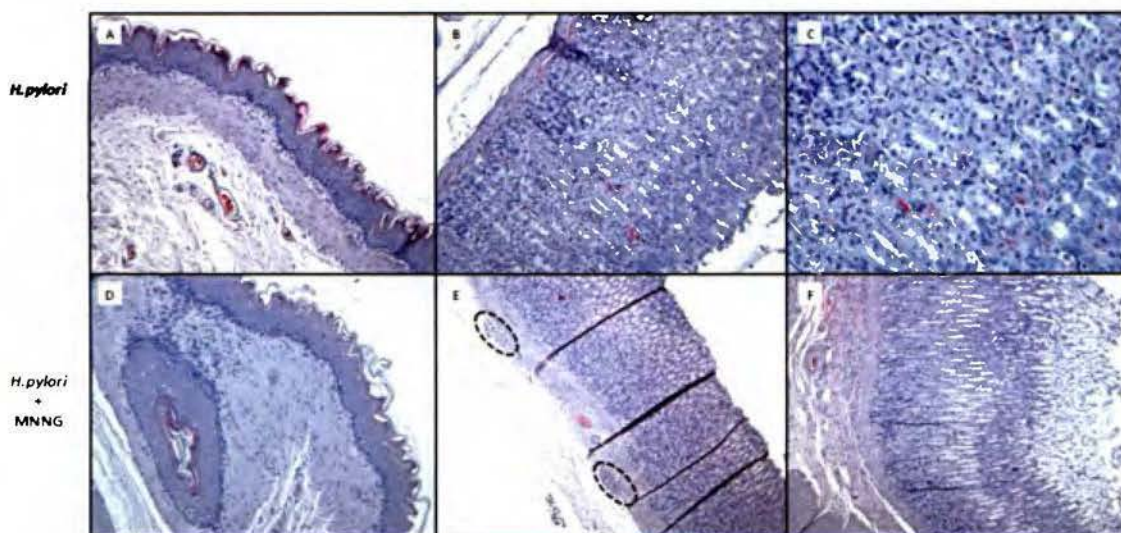


Figura 22. Histología de estómagos de rata inoculadas con únicamente *H. pylori* y la bacteria en conjunto con MNNG. (A) Epitelio escamoso con apariencia normal de una rata a la que se le administró únicamente *H. pylori* (H & E 200X). (B) y (C) Epitelio glandular de una rata a la que se le administró únicamente *H. pylori* (H & E 200X y 400X, respectivamente). (D) Carcinoma escamoso en un estómago de rata tratada con *H. pylori* y MNNG. (E) Epitelio glandular con leve inflamación en rata inducida con *H. pylori* y MNNG (H & E 100X) y (F) Metaplasia de células mucinosas en la mucosa gástrica (H & E 100X).

Discusión

Los modelos tridimensionales de cultivo celular representan una gran herramienta en el estudio de la proliferación, muerte, metabolismo y diferenciación celular debido a su habilidad de reproducir de una manera acertada algunas de las propiedades que se observan *in vivo* en los tumores sólidos, como por ejemplo la heterogeneidad celular y la resistencia multicelular (Ivascu y Kubbies, 2006).

Se ha demostrado que tanto la forma como el microambiente celular determinan la expresión génica y por tanto el comportamiento biológico de las células (Mueller-Klieser, 2000). Los sistemas de cultivo tridimensional por su complejidad, permiten conservar la capacidad morfológica, reorganización histológica y el mantenimiento de las actividades funcionales así como los patrones de expresión génica (Kelm et al, 2002). Así mismo, se ha observado que líneas tumorales que crecen en estructuras tridimensionales pueden adquirir alguna forma de resistencia multicelular clínicamente relevante a drogas inductoras de apoptosis, simulando la quimioresistencia que se ha observado en tumores sólidos (Friedrich et al, 2009).

Previamente se ha observado, que la formación de esferoides es dependiente del tipo de células, ya que no todas tienen la capacidad de formar estructuras homogéneas y compactas. De hecho, las células normales no suelen crecer como esferoides, y dentro de las células tumorales existen líneas celulares incapaces de formarlos (Mueller-Klieser, 2000). En este ensayo se pudo determinar que las dos líneas celulares de cáncer gástrico, AGS y NCI-N87 presentan un comportamiento muy diferente cuando se les impide adherirse a un sustrato. Mayer y colaboradores, previamente ya habían reportado que por medio de la técnica de recubrimiento líquido, las células AGS formaban agregados multicelulares inestables que no correspondían a esferoides (Mayer et al, 2001); por lo que se procuró investigar si estas células formarían estructuras más compactas por medio de la técnica de gota colgante. Como se muestra en los resultados, con la línea celular AGS únicamente se obtuvieron agregados celulares fácilmente dispersables ante la

manipulación física (Figura 3). Caso contrario, ocurrió con las células NCI-N87, las cuales siempre formaron esferoides independientemente de la técnica empleada. Sin embargo, debido a la facilidad metodológica de la técnica de recubrimiento líquido sobre el ensayo de la gota colgante, se escogió la primera para la estandarización del modelo tridimensional.

Este comportamiento desigual entre los dos tipos de células en términos de la formación de esferoides, podría ser mediado por diferencias en la expresión de proteínas presentes en las uniones intercelulares. Las adhesiones intercelulares son mediadas en gran parte por la familia de proteínas de la E-cadherina, y en segunda instancia por las uniones estrechas y las uniones comunicantes. La E-cadherina es una glicoproteína transmembrana de 120 kDa que se localiza predominantemente en el borde lateral de las células y se asocia con el citoesqueleto contráctil. Esta molécula tiene un papel importante en la adhesión homotípica entre células y en la organización y mantenimiento de la estructura tisular, y se ha demostrado que cambios pequeños en su expresión son suficientes para causar la pérdida de la adhesión entre células (Mayer et al, 1993). De manera interesante, se ha reportado previamente la carencia de E-cadherina funcional en las células de cáncer gástrico AGS, ya que se ha establecido la presencia de una mutación que genera la síntesis de una forma truncada no funcional de esta proteína (Oliveira et al, 2009). Se sugiere entonces que ésta podría ser una de las razones por las cuales no se pudieron obtener esferoides con estas células con ninguna de las técnicas empleadas. Por otro lado, las células NCI-N87 de cáncer gástrico proveniente de una metástasis hepática, presentan la expresión más fuerte y el mayor número de células positivas para E-cadherina en un estudio realizado en un panel de cinco líneas celulares de cáncer gástrico, (Mayer et al, 2001). Se ha observado que la expresión de esta proteína *in vivo* puede ser modulada, ya que una vez que las células metastásicas han salido del tumor primario y llegan al hígado, se da la reexpresión de la E-cadherina (Mayer et al, 1993).

Otra diferencia a considerar entre las dos líneas celulares empleadas es el tipo histológico del tumor que representan, ya que las células AGS corresponden a un carcinoma gástrico difuso, mientras que las células NCI-N87 a un carcinoma gástrico intestinal. Estos datos *in vitro* correlacionan con análisis *in vivo* que han demostrado que los tumores gástricos de estirpe histológica intestinal muestran una expresión fuerte y homogénea de la proteína E-cadherina, mientras que en los tumores de tipo difuso no se observa expresión evidente, se ha sugerido la metilación del promotor del gen que codifica para esta proteína (CDH1) como una de los eventos involucrados en la génesis del cáncer gástrico difuso hereditario (Rodríguez-Sanjuan et al, 2006).

Además de la diferencia en la expresión de la E-cadherina entre las células AGS y NCI-N87, Burgermeister y colaboradores (2007) han demostrado diferentes niveles de ARNm de la proteína Caveolina-1 entre las dos líneas celulares. El nivel de expresión de esta proteína es moderado en las células NCI-N87, mientras que las células AGS no la presentan del todo. La Caveolina-1 es una proteína estructural con una gran diversidad de funciones, promoviendo señales de supervivencia y crecimiento en células que no se encuentran ancladas a la matriz, y junto con las cadherinas organiza los contactos célula-célula en las uniones adherentes de las células epiteliales (Burgermeister et al, 2007).

El hecho que las células AGS no formaran esferoides presentó una limitación para evaluar la resistencia de las dos líneas celulares a agentes con potencial anti-tumoral en este modelo, por lo que se procedió entonces a realizar estos análisis en células cultivadas en monocapa. Los agentes empleados para este fin fueron dos retinoides naturales, el ácido retinoico todo trans (ATRA) y el ácido retinoico-13 cis, y un tercer agente, el 4-hidroxifenil-retinamida, el cual es un retinoide de origen sintético previamente utilizado en ensayos clínicos (Singletary et al, 2002). Adicionalmente, las células fueron tratadas con la doxorubicina con el fin de probar la resistencia de las células a una droga conocida y que se emplea como agente quimioterapéutico en la práctica clínica para el tratamiento de varios tipos de tumores, incluyendo el cáncer gástrico (Zhang et al, 2011).

Los retinoides comprenden los metabolitos y análogos naturales y sintéticos de la vitamina A. Este grupo de moléculas cumplen funciones muy importantes en el desarrollo embrionario, el sistema visual y reproductivo, formación de hueso, hematopoyesis, metabolismo, diferenciación, proliferación y apoptosis (Sun y Lotan, 2002 y Noy, 2010). Clásicamente se han considerado compuestos muy prometedores en la prevención y tratamiento de tumores y desde la década de 1980 se ha asociado la deficiencia de vitamina A en animales experimentales con una mayor incidencia en la aparición de tumores (Sun y Lotan, 2002). Posteriormente, se han realizado más estudios en los cuales se ha observado que los retinoides pueden tener una acción supresora en una amplia gama de tumores, como por ejemplo en: piel, mama, cavidad oral, pulmón, próstata, vejiga, hígado y páncreas (Tang y Gudas, 2011).

Debido a que la actividad transcripcional del ácido retinoico puede inhibir el crecimiento celular por medio del arresto en el ciclo celular y/o apoptosis, este ha sido utilizado como agente farmacológico en la terapia de distintos tumores. El caso más exitoso, ha sido el empleo de ATRA en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda, mientras que el ácido retinoico-13-cis ha sido efectivo en el tratamiento de linfomas cutáneos y leucemias mielocíticas crónicas (Ortiz et al, 2002 y Noy, 2010). Sin embargo, a pesar de los resultados pre clínicos y clínicos promisorios, debido a que su efecto tiende a ser reversible no se ha podido extender su uso de manera más general, por lo que se requieren tratamientos continuos que tienden a generar resistencia a la droga y efectos adversos ocasionados por la toxicidad de los retinoides (Tang y Gudas, 2011). Por tanto se ha recurrido a la síntesis de retinoides sintéticos como la retinamida, la cual presenta un grupo N-4-hidroxifenil en lugar del carboxilo final del ATRA. Esta modificación se traduce en un aumento en la eficacia del agente y una disminución en los efectos tóxicos (Bushue y Wan, 2010).

En el caso específico del cáncer gástrico, no existe mucha evidencia sobre un papel protector o terapéutico de los retinoides, sin embargo en dos estudios se demostró que el

retinoide ATRA tiene un efecto citotóxico sobre distintas líneas celulares de cáncer gástrico, sin embargo la respuesta obtenida resultó ser muy variable entre las células (Shyu et al, 1995 y Liu et al, 2001). En el presente estudio, el tratamiento por 48 horas con los retinoides naturales ATRA y ácido retinoico-13-cis, permitió observar diferencias importantes en la susceptibilidad de las células a la acción de estos agentes, ya que para ambos tratamientos las células provenientes de la metástasis hepática probaron ser muy resistentes. Por otro lado, las células AGS sí fueron sensibles a la acción de las dos drogas, siendo mayor la toxicidad alcanzada por el ATRA en relación con el ácido retinoico-13-cis, con valores de IC_{50} de 51,74 μ M y 65,32 μ M, respectivamente. Previamente, Arce y colaboradores también habían observado diferentes grados de susceptibilidad de las dos líneas celulares de cáncer de hígado HepG2 y Hep3B a los retinoides ATRA y el ácido retinoico-13-cis. Los autores determinaron que la respuesta al ATRA fue mayor en las células HepG2, mientras que las células Hep3B fueron más sensibles a la acción del ácido retinoico-13-cis (Arce et al, 2005). La diferencia en el efecto de los retinoides en las dos líneas celulares de cáncer gástrico, podría ser producto de la expresión de la proteína reguladora TP53, ya que previamente se ha asociado una mayor resistencia a los efectos de los retinoides con un mayor grado de inestabilidad genética y expresión de TP53 mutado. (Lippman et al, 1995). En las células AGS no se han reportado mutaciones en el gen que codifica para esta proteína, mientras que en las células NCI-N87 se ha sugerido la presencia de mutaciones génicas que desencadenan la producción de una proteína anormal (Ashktorab et al, 2003 y Mattioli et al, 2007).

Cuando las dos líneas celulares de cáncer de estómago fueron tratadas con el retinoide sintético retinamida, se pudo observar que tanto las células provenientes de la metástasis hepática como del tumor gástrico primario fueron sensibles a la acción de esta droga, y basándose en los valores de IC_{50} , no se observó una diferencia significativa en el efecto en ambas células ($p > 0,05$). Previamente se había reportado que la retinamida es capaz de inducir apoptosis independientemente de la acción de TP53 (O'Donnell et al, 2002), por lo que esto podría explicar porque en ambas líneas celulares la respuesta fue

similar. Adicionalmente, se ha reportado que tanto el ATRA como el ácido retinoico-13-cis tienen efectos inhibitorios sobre el crecimiento celular mediante la regulación de la transcripción génica a través de la unión con el receptor nuclear RAR- α , mientras que en el caso de la retinamida se ha planteado que en ciertas células esta podría tener un efecto dependiente del receptor RAR- γ ó efectos independientes del mismo (Ortiz et al, 2002 y Forman et al, 2004). En este último caso, se ha demostrado que la retinamida es capaz de inducir apoptosis por la vía intrínseca, producto de un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno y segundos mensajeros lipídicos (Bushue y Wan, 2010). Liu y colaboradores han reportado la ausencia de los receptores RAR- γ en las células AGS (Liu et al, 2001), por lo tanto, es probable que la acción de la retinamida sea independiente de la vía clásica de los receptores de ácido retinoico y que se deba a la inducción de apoptosis por estrés a nivel mitocondrial.

Actualmente existen varios estudios clínicos en fase II y fase III que analizan el efecto del ATRA, el ácido retinoico-13-cis y la retinamida en el tratamiento de una serie de tumores tan variados como linfomas, melanomas, glioblastomas, neuroblastomas, tumores de cabeza y cuello, cáncer de mama, vejiga y pulmón, entre otros (Bushue y Wan, 2010). Además estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado un efecto sinérgico de los retinoides con otros agentes quimioterapéuticos, lo cual permitiría disminuir la dosis necesaria de estos para mantener la eficacia. Esta nueva estrategia de sensibilización con retinoides también se encuentra en estudio en ensayos clínicos (Raffoux et al, 2010; Grauer et al, 2011; Hojka-Osinka et al, 2012 y Pili et al, 2012).

Finalmente, se pudo observar que las células NCI-N87 cultivadas tanto en monocapa como en esferoides, fueron resistentes a la acción del agente quimioterapéutico doxorubicina, mientras que en el caso de las células AGS, la doxorubicina fue la droga que presentó mayor toxicidad a menores concentraciones ($IC_{50} = 0,33 \mu M$). La doxorubicina actúa directamente sobre el ADN, intercalándose entre los pares de bases. Algunos otros mecanismos que podrían mediar su efecto tóxico son la

inhibición de las enzimas topoisomerasa II y citocromo *c* oxidasa, así como la formación de radicales libres (Zhang et al, 2011). Estudios previos han reportado un efecto tóxico *in vitro* de la doxorubicina sobre las células NCI-N87 y AGS, sin embargo en este estudio las células NCI-N87, fueron tratadas por un período de 96 horas, período mayor que el que se empleó en este estudio. En el caso de la línea celular AGS, se ha reportado un efecto pro-apoptótico de la doxorubicina debido a que induce la activación de las caspasas 3 y 8, y aumenta la expresión de la proteína Bid y del receptor de Fas ligando (Gong et al, 2004 y Chen et al, 2007).

En el experimento con los esferoides de células NCI-N87 se obtuvo un resultado similar, ya que no se observó una disminución significativa en el diámetro de los esferoides tratados a las concentraciones más elevadas y más bien a la concentración máxima de droga administrada se observó un incremento, lo cual podría deberse a la pérdida en la cohesión de las células que conforman el esferoide, lo cual es imposible de determinar mediante la técnica empleada para cuantificar viabilidad celular. Si bien existe evidencia experimental sobre drogas con un efecto sobre los modelos tridimensionales que no actúan sobre células crecidas en monocapa, usualmente se trata de sustancias cuyo blanco específico son moléculas que se expresan únicamente en condiciones particulares que solo se reproducen en un modelo tridimensional (Barbone et al, 2008), y este no pareciera ser el caso de la doxorubicina.

Con el objetivo de continuar con el desarrollo de modelos representativos que permitan en un futuro estudiar la patogénesis del cáncer gástrico, se estandarizó un modelo *in vivo* utilizando el agente carcinogénico MNNG inoculado oralmente en ratas. Adicionalmente se intentó también desarrollar otro modelo para evaluar el efecto de *H. pylori* en el desarrollo del cáncer gástrico.

Si bien existen diferentes modelos químicos en animales en los cuales se han empleado algunos agentes como el benzo(a)pireno, el 3-metilcolantreno y el 2-acetilaminofluorano para la inducción de cáncer gástrico (Tsukamoto et al, 2007), el

diseño que ha resultado más exitoso ha sido por medio de la inducción con el agente alquilante MNNG. Este agente se ha utilizado como un carcinogénico gástrico en ratas desde finales de la década de 1960, y su acción se ha podido reproducir en varias especies animales como los hurones y gerbos, pero no así en los ratones, los cuales parecieran ser resistentes a la acción del agente químico (Sugimura y Fujimura, 1967; Fox et al, 1993; Shimizu et al, 1999 y Tokieda et al, 1999).

Una de las principales razones por la cual este modelo ha sido ampliamente validado en las ratas Wistar, es por la semejanza que se observa entre las lesiones en los estómagos de los animales y los tumores gástricos en humanos (Mirrish, 1975 y Tsukamoto et al, 2007). Otro factor importante a favor de este modelo, es una posible relación con la etiología del cáncer gástrico en humanos, producto de la exposición a compuestos carcinogénicos similares al MNNG a través de la presencia de nitritos en la dieta y el ambiente ácido en el estómago (Arivazhagan et al, 2000).

Manikandan y colaboradores, han demostrado que la administración intragástrica de MNNG, induce a la formación de tumores en el epitelio escamoso de los roedores, los cuales pueden ser detectados en la semana 26 de iniciado el experimento (Manikandan et al, 2008 y Manikandan et al, 2010). En el presente estudio se pudo determinar la aparición de carcinomas escamosos a partir de la semana 22 del ensayo, y estas lesiones se caracterizaron por la proliferación del epitelio con pérdida de la diferenciación celular, anaplasia y evidencia de invasión localizada con numerosas perlas de queratina (Figura 15). Previamente, se ha establecido que la administración intragástrica del MNNG favorece la aparición de tumores en el epitelio queratinizado del estómago no glandular, ya que esta porción del estómago tiene una función de depósito, por lo que la exposición del agente carcinogénico es más prolongada y se da una mayor interacción entre este y la mucosa gástrica, mientras que cuando la administración del MNNG se da por vía oral tiende a predominar una mayor incidencia de tumores en el epitelio glandular (Shirai et al, 1982, Frantz et al, 1991). En este experimento, la incidencia de carcinomas escamosos

después de la semana 22 fue del 100%, lo cual coincide con lo que se ha reportado previamente en la literatura (Manikandan et al, 2008 y Manikandan et al, 2010). En su mayoría los tumores fueron muy bien diferenciados y solamente en uno de los estómagos analizados se observó un carcinoma escamoso pobremente diferenciado, con la presencia de epitelio escamoso con metaplasia mucinosa.

Los tumores en el estómago glandular de las ratas son muy similares a los que se observan en los humanos (Frantz et al, 1991 y Takasu et al, 2007). La aparición de tumores en esta zona se ha reportado principalmente en ensayos en los cuales la administración del agente carcinógeno se da en el agua por un período que puede variar desde las 16 a las 26 semanas y los tumores son detectables a partir de la semana 50 (Tatematsu et al, 1983 y Yano et al, 1999). Sin embargo, en este estudio, se logró la detección inicial de tumores en la región antral del estómago a las 40 semanas desde el inicio de la inoculación del MNNG. Cabe destacar que en los estudios reportados, los adenocarcinomas invadieron la submucosa, mientras que este ensayo los tumores se mantuvieron localizados en el epitelio de la mucosa sin invasión a otros estratos. No obstante, esto podría alcanzarse aumentando el tiempo del estudio, o incluso se podría aumentar la dosis administrada, ya que el comportamiento en el crecimiento de los animales tratados y no tratados fue muy similar, por lo que se ha considerado que cuando esto ocurre, la toxicidad de la droga o agente administrado no es muy evidente (Johnson, 1981). Aún así, este modelo ofrece ventajas sobre los modelos en los que se da la administración del MNNG por vía oral (en el agua), ya que en estos últimos, se presenta una gran variabilidad en cuanto a la incidencia de los tumores (Wang et al, 2009). En este experimento si bien el número de ratas empleadas fue pequeño, las lesiones que se presentaron tanto en el estómago glandular como en el estómago no glandular, fueron muy similares entre todos los animales estudiados.

Una de las posibles razones que podrían explicar la eficacia del experimento en la inducción tumores, es la condición de las ratas empleadas, ya que éstas no se

mantuvieron en condiciones estrictas que garantizaran la ausencia de microorganismos patógenos en los animales. Sumi y Miyakawa fueron los primeros en demostrar una mayor respuesta al MNNG en animales que son mantenidos en condiciones convencionales y no libres de patógenos, por lo que se ha propuesto un papel importante de la microflora en el estómago de las ratas (Sumi y Miyakawa, 1981).

Debido a que los estudios epidemiológicos han confirmado una asociación entre la presencia de *H. pylori* y el cáncer gástrico, un abordaje interesante era evaluar los efectos generados únicamente por la infección de *H. pylori* y desarrollar también un modelo que en el futuro permitiera estudiar el efecto combinado de la bacteria y el MNNG en la carcinogénesis en el estómago de ratas.

Si bien es cierto que muchos animales han sido eficazmente infectados con *H. pylori* y esto ha permitido estudiar la patogénesis de la infección, en muy pocos casos se ha logrado reproducir la patología que ocurre en el ser humano. En general, en los animales de laboratorio que no han sufrido modificaciones genéticas, la infección por *H. pylori* solamente ha logrado acelerar el desarrollo de tumores inducidos con agentes químicos. Sin embargo, la bacteria por sí sola no ha sido capaz de inducir cáncer gástrico (Krueger et al, 2011). La única excepción ha sido en el caso de los gerbos de Mongolia, ya que se ha descrito que son fácilmente colonizados por *H. pylori* y como consecuencia desarrollan gastritis atrófica, metaplasia intestinal, y carcinomas y adenocarcinomas gástricos (Tatematsu et al, 1998 y Tokieda et al, 1999). Sin embargo, este modelo es controversial, ya que desde el año 1998 en que los grupos de investigación de Honda y Watanabe reportaron la inducción de adenocarcinomas bien diferenciados en los estómagos de los gerbos, múltiples estudios posteriores no han podido tener resultados reproducibles, ya que los patrones histológicos y de incidencia han sido sumamente variables (Tsukamoto et al, 2007). Además, desde el punto de vista experimental la calidad de los estudios se ha visto limitada por la falta de anticuerpos diseñados en contra de esta especie; y debido al hecho de que no hay cepas genéticamente caracterizadas de

gerbos se ha observado mucha variación en los resultados de los estudios (Kim et al, 2011).

Tomando en cuenta lo anterior, se consideró relevante el desarrollo de un modelo diferente al anterior para estudiar el resultado de la infección con *H. pylori* en ratas, ya que no se encontraron reportes previos en la literatura. Otro de los aspectos importantes a considerar en este estudio fue la posibilidad de contar con cepas de *H. pylori* previamente caracterizadas molecularmente y que se encuentran presentes en la población costarricense.

Después de las 30 semanas que comprendió el estudio, se procedió al análisis histológico de los estómagos inoculados con *H. pylori* y de manera paralela se realizó la evaluación de la colonización en estómago por medio de tres metodologías distintas. En ninguno de los estómagos inoculados con *H. pylori* fue posible detectar la presencia de la bacteria. Cabe destacar que tanto la prueba rápida de la ureasa como la tinción de Giemsa no son pruebas específicas para la detección de *H. pylori*, pero se usan de manera rutinaria para la evaluación de *H. pylori* gástrico (Soylu et al, 2008). Por otra parte, la detección por medio de PCR de secuencias correspondientes al ADN de la bacteria, si es una prueba más específica y confirmatoria. Por medio del análisis histológico de los estómagos analizados se pudo observar que en los grupos que únicamente habían sido inoculados con la bacteria, los estómagos no presentaron alteraciones histológicas que hicieran sugerir algún efecto de *H. pylori* sobre la mucosa gástrica, esto se observó en los animales inoculados con las dos cepas de la bacteria (CagA+ y CagA-). En los dos grupos restantes que correspondían a los estómagos de las ratas que fueron tratadas con el MNNG (con la bacteria) se observó que todos los estómagos habían desarrollados carcinomas escamosos e inclusive en uno de ellos se pudo detectar alteraciones en el epitelio glandular en forma de metaplasia intestinal, lo cual concuerda con lo visto anteriormente en el modelo de inducción química de cáncer gástrico.

Son varios los factores que pudieron haber influido en la ausencia de detección de *H. pylori* en los estómagos analizados. En primera instancia, es muy importante recalcar que los animales infectados no se encontraban en condiciones libres de patógenos, se ha reportado en ensayos previos en ratones que la colonización de la bacteria en estas condiciones es temporal, mientras que en animales libres de patógenos esta sí es persistente (Karita et al, 1994). Es posible que por la presión selectiva, se hubiera generado una competencia entre diferentes microorganismos por la interacción con las células gástricas y sus receptores, así como por el acceso a nutrientes (Ortiz-Herrera et al, 2010). Además se ha reportado un efecto inhibitorio sobre la colonización y el crecimiento de *H. pylori* por parte de lactobacilos, los cuales abundan en todo el tracto gastrointestinal de los roedores (Chen et al, 2012). Se ha propuesto que la presencia de estos bacilos se asocia con la disminución en la secreción de ácido gástrico mediado por la gastrina (Takahashi et al, 2011).

Un segundo factor importante a considerar es el origen de la cepa de la bacteria empleada, ya que proviene directamente de aislamientos de estómagos humanos sin pasar previamente por estómagos de animales. Estudios previos en ratones y gerbos en los que se ha logrado la infección persistente de *H. pylori*, se ha utilizado una cepa de la bacteria conocida como SS1 (Sidney Strain), la cual fue aislada de un paciente con enfermedad de úlcera péptica y ha sido previamente adaptada al ratón. Se ha descrito que el mecanismo de adaptación en ratones se asocia a una reducción en la capacidad de las cepas adaptadas a inducir la secreción de las citoquinas IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ y TNF- α , permitiéndoles colonizar la mucosa gástrica induciendo una leve respuesta inmune (Philpott et al, 2002). Recientemente, se describió la colonización por parte de la cepa SS1 de *H. pylori* en el estómago de ratas Sprague-Dawley, sin embargo su efecto fue analizado únicamente en el esófago de los animales y no en el estómago (Liu et al, 2011). En relación a lo anterior, es muy importante tomar en cuenta que incluso en animales como los gerbos que son más fácilmente colonizables y utilizando la cepa de *H. pylori* SS1, la tasa de infección que se logra no es del 100%, por lo que el empleo de cantidades muy

pequeñas de animales podrían dificultar aún más la detección de la bacteria en la mucosa gástrica (Shimizu et al, 1999 y Tokieda et al, 1999). Además, estudios en los cuales se han infectado gerbos con *H. pylori* y sus estómagos son inducidos con MNNG, se ha observado una actividad inhibitoria del MNNG sobre el crecimiento de la bacteria, llegando incluso a la erradicación de la bacteria en la mitad de los animales (Shimizu et al, 1999).

Otro factor importante a tomar en cuenta, es el tiempo que transcurre entre la inoculación de *H. pylori* y la determinación de la presencia de la bacteria, ya que estudios previos han demostrado mediante mediciones histológicas y serológicas que la tasa de infección por *H. pylori* disminuye con el tiempo (Shimizu et al, 1999 y Krueger et al, 2011). Por tanto, no podría descartarse que si la tasa de infección inicial fue muy baja, esta disminuyera aún más en el transcurso del tiempo hasta hacerse indetectable. Sin embargo, el análisis histológico no evidenció lesiones morfológicas sugerentes de la presencia de *H. pylori*.

De acuerdo a los resultados obtenidos con los experimentos realizados *in vivo* y lo expuesto anteriormente, el desarrollo de un modelo de infección con *H. pylori* en ratas podría ser muy útil para el estudio del cáncer gástrico y de la respuesta inflamatoria asociada al desarrollo de este tumor. Sin embargo, primero se deben optimizar ciertas condiciones como por ejemplo la adaptación de la cepa de la bacteria a emplear y el número de animales que se requiere para un estudio más completo.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en la presente investigación son muy valiosos ya que permiten sentar las bases para posteriores estudios relacionados con el desarrollo y tratamiento del cáncer gástrico.

En primera instancia, se logró desarrollar un modelo tridimensional *in vitro* con células obtenidas de tumores gástricos, el cual permitirá analizar de manera más representativa lo que ocurre *in vivo*, como por ejemplo la resistencia del tumor a ciertos tratamientos potenciales, así como también los mecanismos de tumorigenicidad. Sin embargo como se pudo observar en este estudio, no todas las células tumorales son capaces de formar estas estructuras, lo cual representó una limitante para la realización de estudios comparativos entre los dos tipos de líneas celulares empleadas en este proyecto.

Con la intención de investigar novedosas opciones terapéuticas para el cáncer gástrico en un futuro, también se intentó desarrollar una serie de modelos de inducción de tumores en estómagos de ratas Wistar, empleando el agente químico MNNG y la bacteria *H. pylori*, cada uno de manera individual y en conjunto. De acuerdo con los resultados obtenidos, en el único caso en que se logró observar la aparición de tumores fue en el modelo de inducción empleando MNNG, ya que en el período de estudio se pudo observar claramente la aparición de tumores en el epitelio escamoso y en menor cantidad, la presencia de adenomas en el estómago glandular. En el caso de los modelos de inducción de la carcinogénesis por medio de la inoculación intragástrica con *H. pylori* de manera exclusiva o en conjunto con MNNG, no fue posible demostrar una eficiente colonización de la bacteria, sin embargo, se debe considerar como uno de los principales inconvenientes la falta de análisis en etapas más tempranas del ensayo, ya que no se puede descartar que la bacteria pudo haber colonizado la mucosa gástrica y luego por la misma evolución de la infección no fuera posible identificarla en las etapas finales del trabajo, sobre todo tomando en cuenta que los animales no estaban en condiciones libres

de patógenos. Para estudios posteriores sería recomendable trabajar con animales en condiciones asépticas, así como realizar los análisis para determinar la colonización durante las primeras semanas de inoculación de las bacterias, y analizar la presencia de la bacteria a partir de biopsias de los estómagos y no solo del moco gástrico.

La comparación en cuanto a resistencia a tratamientos pro-apoptóticos de células cancerígenas obtenidas de un tumor primario y una metástasis, permitió demostrar que las células metastásicas NCI-N87 fueron más resistentes a sufrir muerte celular que las células AGS obtenidas del tumor primario de estómago, por lo que se debe considerar la existencia de diferencias en vías de señalización que podrían tener importantes repercusiones en términos del manejo terapéutico de los tumores metastásicos. En el caso del retinoide sintético retinamida, esta fue la única droga que tuvo un importante efecto citotóxico sobre las dos líneas celulares, por lo que sería un potencial tratamiento efectivo para los tumores gástricos primarios y metastásicos.

Perspectivas Futuras

1. Continuar con el desarrollo del cultivo tridimensional de células con la intención de evaluar la capacidad de otras líneas celulares de cáncer gástrico de formar esferoides, y de esta manera poder realizar análisis comparativos posteriores de citototoxicidad que permitan ser un paso más confiable hacia los ensayos *in vivo*.
2. En el caso de las células NCI-N87, las cuales sí forman esferoides, sería muy interesante evaluar un posible efecto citotóxico del retinoide sintético retinamida, el cual demostró tener un efecto importante en la viabilidad de estas células cultivadas en monocapa.
3. Estudiar en cultivos en monocapa el mecanismo mediante el cual la retinamida induce la apoptosis en las dos líneas celulares analizadas, esto permitiría determinar diferencias a nivel molecular que podrían ser importantes desde el punto de vista terapéutico entre tumores gástricos primarios y metastásicos. Así mismo sería valioso identificar otros posibles mecanismos de acción de la droga, como por ejemplo la muerte celular por autofagia, esto en comparación con retinoides de origen natural que también se utilizan como tratamiento de otros tumores y que fueron probados en este estudio.
4. Por medio del modelo *in vivo* de inducción de tumores con el agente MNNG, se cuenta con una gran herramienta que permitiría evaluar la administración de diversas sustancias con una potencial acción terapéutica sobre el cáncer gástrico.
5. Es muy importante optimizar el modelo de inducción de cáncer gástrico con la administración de *H. pylori*, ya que este es un agente que se postula de gran importancia para el desarrollo de estos tumores en nuestro país. Para lograr esto será esencial poder contar con cepas de la bacteria que ya se encuentren adaptadas a esta especie de roedor, o incluso de acuerdo a lo descrito en la literatura, evaluar si la cepa bacteriana SS1, la cual ha sido adaptada en ratones, puede colonizar los estómagos de las ratas Wistar. Así mismo se deben seguir las recomendaciones mencionadas anteriormente en las cuales se busca mejorar el diagnóstico de la colonización bacteriana en tejido completo.

6. Finalmente debido a la heterogeneidad de la respuesta inmune sería importante trabajar con una mayor cantidad de animales, de manera que los resultados arrojen conclusiones más robustas, desde un punto de vista estadístico, así como también estandarizar marcadores de tumorigenicidad utilizando no solo criterios morfológicos sino también bioquímicos y moleculares. Esto porque los modelos en ratas son tan largos, que muchas veces solo permiten observar lesiones pre-neoplásicas y no tumores totalmente formados o metastásicos, por lo que es sumamente difícil comparar la eficiencia de tratamientos específicos cuando no se cuenta con criterios cuantificables a un nivel celular más fino.

A todos estos aspectos mencionados se les dará seguimiento en futuros estudios de doctorado y a través de las tesis de maestría de otros estudiantes, ya que es muy escasa la investigación en cáncer que se hace en modelos in vivo en el país y tomando en cuenta lo poco que se puede realizar en estos momentos en investigación con seres humanos, pasa a ser de gran importancia el desarrollo de nuevos modelos in vivo para poder estudiar diversos aspectos de la medicina molecular del cáncer.

Bibliografía

- Al-Akwaa AM, Siddiqui N, Al-Mofleh IA (2004). Primary gastric lymphoma. *World Journal of Gastroenterology* 10: 5-11.
- Amman PM, Eichmüller SB, Schmidt J, et al (2011). Regulation of gene expression by retinoids. *Current Medicinal Chemistry* 18: 1405-1412.
- Arce F, Gätjens-Boniche O, Vargas E, et al (2005). Apoptotic events induced by naturally occurring retinoids ATRA and 13-*cis* retinoic acid on human hepatoma cell lines Hep3B and Hep G2. *Cancer Letters* 229: 271-281.
- Arivazhagan S, Balasenthil S y Nagini S (2000). Modulatory effect of garlic and neem leaf extracts on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) induced oxidative stress in Wistar rats. *Cell Biochemistry and Function* 18: 17-21.
- Ashktorab H, Ahmed A, Littleton, et al (2003). p53 and p14 increase sensibility of gastric cells to *H.pylori*-induced apoptosis. *Digestive Diseases and Sciences* 48: 1284-1291.
- Balmain A y Harris CC (2000). Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. *Carcinogenesis* 21: 371-377.
- Bando E, Yonemura Y, Takeshita Y, et al (1999). Intraoperative lavage for cytological examination in 1297 patients with gastric carcinoma. *American Journal of Surgery* 178: 256-262.
- Barbone D, Yang TM, Morgan JR, et al (2008). Mammalian target of rapamycin contributes to the acquired apoptotic resistance of human mesothelioma multicellular spheroids. *Journal of Biological Chemistry* 283: 13021-13030.
- Barr, H (2007). Gastric tumors. *Medicine* 35: 216-219.
- Beltrami AP, Ceselli D y Beltrami CA (2009). Pluripotency rush: Molecular cues for pluripotency, genetic reprogramming of adult stem cells, and widely multipotent adult cells. *Pharmacology and Therapeutics* 124: 23-30.
- Ben-Khelifa H y Sabbagh LC (2002). Gastric lymphoma: Is the worldwide incidence rising? *Gastrointestinal Endoscopy* 56: 955-956.

- Bernstein CN, McKeown I, Embil JM, et al (1999). Seroprevalence of *Helicobacter pylori*, incidence of gastric cancer, and peptic ulcer-associated hospitalizations in a Canadian Indian population. *Digestive Diseases and Sciences* 44: 668-674.
- Binato M, Schmidt KM, Volkweis BS, et al (2008). Mouse Model of diethylnitrosamine-Induced Gastric Cancer. *Journal of Surgical Research* 148: 152-157.
- Bishop JM (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64: 235-248.
- Boettner B y Van Aelst L (2002). The RASputin effect. *Genes and Development* 16: 2033-2036.
- Burgermeister E, Xing X, Röcken C, et al (2007). Differential expression and Function of Caveolin-1 in human gastric cancer progression. *Cancer Research* 67: 8519-8526.
- Burkill GJ, Badran M, Al-Muderis O, et al (2003). Malignant gastrointestinal stromal tumor: distribution, imaging features, and pattern of metastatic spread. *Radiology* 226: 527-532.
- Bushue N y Wan YJY (2010). Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Advanced drug Delivery Reviews* 62: 1285-1298.
- Cai X, Carlson J, Stoicov C, et al (2005). *Helicobacter felis* eradication restores normal architecture and inhibits gastric cancer progression in C57BL/6 mice. *Gastroenterology* 128: 1937-1952.
- Camacho LH (2003). Clinical applications of retinoids in cancer medicine. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 17: 98-114.
- Canöz Ö, Belenli O, Patiroglu TE (2002). General Features of Gastric Carcinomas and Comparison of HSP70 and NK cell Immunoreactivity with Prognostic Factors. *Pathology Oncology Research* 8: 262-269.
- Cappetta A, Lonardi S, Pastorelli D, et al (2012). Advanced gastric cancer (GC) and cancer of the gastro-oesophageal junction (GEJ): focus on targeted therapies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 81: 38-48.
- Catalano V, Labianca R, Beretta GD, et al (2009). Gastric cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 71: 127-164.

- Cervantes A, Rosello S, Roda D, et al (2008). The treatment of advanced gastric cancer: current strategies and future perspectives. *Annals of Oncology* 19: v103-v107.
- Chan AOO, Luk JM, Hui WM, et al (1999). Molecular biology of gastric carcinoma: From laboratory to bedside. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 14: 1150-1160.
- Chen SH, Lin KY, Chang CH, et al (2007). Aloe-emodin-induced apoptosis in human gastric carcinoma cells. *Food and Chemical Toxicology* 45: 2296-2303.
- Chen X, Liu XM, Tian F (2012). Antagonistic activities of lactobacilli against *Helicobacter pylori* growth and infection in human gastric epithelial cells. *Journal of Food Science* 77: M9-14.
- Cheng H, Wang J, Zhang CA (2003). Clinicopathologic study of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma in gastroscopic biopsy. *World Journal of Gastroenterology* 9: 1270-1272.
- Choi IJ, Kim JS, Kim JM, et al (2003). Effect of inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 pathway on apoptosis and bcl-2 expression in *Helicobacter pylori* infected AGS cells. *Infection and Immunity* 71: 830-837.
- Chow J, Norng M, Zhang J, et al (2007). TRPV6 mediates capsaicin-induced apoptosis in gastric cancer cell-Mechanisms behind a possible new "hot" cancer treatment. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773: 565-576.
- Chung YS, Yamashita Y, Inoue T (1997). Continuous infusion of 5-fluorouracil and low dose cisplatin infusion for the treatment of advanced and recurrent gastric adenocarcinoma. *Cancer* 80: 1-7.
- Chusteka Z (2009). ASCO 2009: Herceptin in gastric cancer- Practice changing data. *Medscape Conference Coverage of: American Society of Clinical Oncology (ASCO) 45th Annual Meeting*.
- Chyou PH, Nomura AMY, Hankin JH, et al (1990). A Case – Cohort Study of Diet and Stomach Cancer. *Cancer Research* 50: 7501-7504.
- Cichoz-Lach H, Kasztelan-Szczerbinska B, Slomka M (2008). Gastrointestinal stromal

- tumors: epidemiology, clinical picture, diagnosis, prognosis and treatment. *Pol Arch Med Wewn* 118: 216-221.
- Cohen SM y Ellwein LB (1991). Genetic errors, cell proliferation and carcinogenesis. *Cancer Research* 51: 6493-6505.
- Colombo N, Formelli F, Cantù MG, et al (2006). A phase I-II preoperative biomarker trial of fenretinide in ascitic ovarian cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 15:1914-1919.
- Correa P (1992). Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process- First American Cancer Society Award lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Research* 52: 6735-6740.
- Crew KD y Neugut AI (2004). Epidemiology of upper gastrointestinal malignancies. *Seminars in Oncology* 31: 450-464.
- Cunningham D, Allum WH, Stenning SP (2006). Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *The New England Journal of Medicine* 355: 11-20.
- Dai Z, Gao J, Ji Z, et al (2009). Matrine induces apoptosis in gastric carcinoma cells via alteration of Fas/FasL and activation of caspase-3. *Journal of Ethnopharmacology* 123: 91-96.
- Dassen AE, Lemmens VEPP, van de Poll-Franse LV, et al (2010). Trends in incidence, treatment and survival of gastric adenocarcinoma between 1990 and 2007: A population-based study in Netherlands. *European Journal of Cancer* 46: 1101-1110.
- De Magalhaes DM, de Almeida RP, Borges IE (2010). *Helicobacter pylori* virulence factors as tools to study human migrations. *Toxicon* 56: 1193-1197.
- Drebber U, Baldus SE, Nolden B, et al (2008). The overexpression of c-met as a prognostic indicator for gastric carcinoma compared to p53 and p21 nuclear accumulation. *Oncology Reports* 19: 1477-1483,
- El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, et al (2000). Interleukin -1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 404: 398-402.

- El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, et al (2006). Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology* 124: 1193-1201.
- Farinha P y Gascoyne RD (2005). Molecular pathogenesis of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 23: 6370-6378.
- Fayad W, Brnjic S, Berglind D, et al (2009). Restriction of cisplatin induction of acute apoptosis to a subpopulation of cells in a three-dimensional carcinoma culture model. *International Journal of Cancer* 125: 2450-2455.
- Fenaux P, Chomienne C y Degos L (2001). Treatment of acute promyelocytic leukaemia. *Best Practice and Research Clinical Haematology* 14: 153-174.
- Ferlay J, Shin HR, Forman D, et al (2010). GLOBOCAN 2008, Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase No 10 (Internet). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponible en <http://globocan.iarc.fr>, accesada en 13/05/2012.
- Folgado Alberto S, Sánchez P, Oliveira M, et al (2008). Gastrointestinal stromal tumors – a retrospective study of 43 cases. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* 100: 696-700.
- Ford AC (2011). Chemoprevention for gastric cancer. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology* 25: 581-592.
- Forman MR, Hursting SD, Umar A, et al (2004). Nutrition and cancer prevention: A multidisciplinary perspective on human trials. *The Annual Review of Nutrition* 24: 233-254.
- Formelli F, Camerini T, Cavadini E, et al (2003). Fenretinide breast cancer prevention trial: Drug and retinol plasma levels in relation to age and disease outcome. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 12: 34-41.
- Fox JG, Wishnok JS, Murphy JC, et al (1993). MNNG-induced gastric carcinoma in ferrets infected with *Helicobacter mustelae*. *Carcinogenesis* 14: 1957-1961.
- Frantz JD, Betton G, Cartwright ME, et al (1991). Proliferative lesions of the non-glandular

- and glandular stomach in rats. En *Guides for Toxicologic Pathology STP/ARP/AFIP*, Washington, DC.
- Friedrich J, Seidel C, Ebner R, et al (2009). Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nature protocols* 4: 309-324.
- Fulda S, Los M, Friesen C, et al (1998). Chemosensitivity of solid tumor cells *in vitro* is related to activation of the CD95 system. *International Journal of Cancer* 76: 105-114.
- Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, et al (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death and Differentiation* 14: 1237-1266.
- Gong SJ, Jin CJ, Rha SY, et al (2004). Growth inhibitory effects of trastuzumab and chemotherapeutic drugs in gastric cancer cell lines. *Cancer Letters* 214: 215-224.
- Goodman JI y Watson RE (2002). Mechanism involved in carcinogenesis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 42: 501-525.
- Grauer O, Pascher C, Hartmann C, et al (2011). Temozolomide and 13-cis retinoic acid in patients with anaplastic gliomas: a prospective single-arm monocentric phase-II study (RNOP-05). *Journal of Neurooncology* 104: 801-809.
- Gravalos C y Jimeno A (2008). HER 2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Annals of Oncology* 19: 1523-1529.
- Gu Q, Wang JD, Xia HHX, et al (2005). Activation of the caspase-8/Bid and Bax pathways in aspirin –induced apoptosis in gastric cancer. *Carcinogenesis* 26: 541-546.
- Gunassekaran GR, Kalpana Deepa Priya D, Gayathri R, et al (2011). *In vitro* and *in vivo* studies on antitumor effects of gossypol on human stomach adenocarcinoma (AGS) cell line and MNNG induced experimental gastric cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 411: 661-666.
- Han SU, Kim YB, Joo HJ, et al (2002). *Helicobacter pylori* infection promotes gastric carcinogenesis in a mice model. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 17: 253-261.
- Hanahan D y Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.

- Hanahan D y Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144: 646-669.
- Handkiewicz-Junak D, Roskosz J, Hasse-Lazar, et al (2009). 13-cis-retinoic acid re-differentiation therapy and recombinant human thyrotropin-aided radioiodine treatment of non-Functional metastatic thyroid cancer: a single-center, 53-patient phase 2 study. *Thyroid Research* 2:8 doi:10.1186/1756-6614-2-8
- Hatakeyama M (2009). *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Journal of Gastroenterology* 44: 239-248.
- Hatok J, Babusikova E, Matakova T, et al (2009). In vitro assays for the evaluation of drug resistance in tumor cells. *Clinical and Experimental Medicine* 9: 1-7.
- Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, et al (2002). Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *PNAS* 99: 14428-14433.
- Hirayama FS, Takagi H, Kusuhara E, et al (1996). Induction of gastric ulcer and intestinal metaplasia in Mongolian gerbils infected with *Helicobacter pylori*. *Journal of Gastroenterology* 31: 755-757.
- Hojka-Osinska A, Ziolo E, Rapak A (2012). Combined treatment with fenretinide and indomethacin induces AIF-mediated, non-classical cell death in human acute T-cell leukemia Jurkat cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 419: 590-595.
- Holian O, Wahid S, Atten MJ, et al (2002). Inhibition of gastric cancer cell proliferation by resveratrol: role of nitric oxide. *American Journal of Gastrointestinal and Liver Physiology* 282: G809-G816.
- Houghton J, Bloch LM, Goldstein M, et al (2000). In vivo disruption of the Fas pathway abrogates gastric growth alterations secondary to *Helicobacter* infection. *The Journal of Infectious Diseases* 182: 856-864.
- Houghton J y Wang TC (2005). *Helicobacter pylori* and gastric Cancer: A new paradigm for inflammation-associated epithelial cancers. *Gastroenterology* 128: 1567-1578.

- Huang JQ y Hunt RH. (2000) Review article: *Helicobacter pylori* and gastric cancer the clinician's point of view. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 14 (Supl 3): 48-54.
- Huang JQ, Zheng GF, Sumanac K, et al (2003). Meta-analysis of the relationship between *cagA* seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology* 125: 1636-1644.
- Huff J (1999). Chemicals associated with tumours of the kidney, urinary bladder and thyroid gland in laboratory rodents from 2000 US National Toxicology Program/National Cancer Institute bioassays for carcinogenicity. *IARC Scientific Publications Series* 147: 211-225.
- Inoue K, Nakane Y, Kogire M, et al (2012). Phase II trial of preoperative S-1 plus cisplatin followed by surgery for initially unresectable locally advanced gastric cancer. *European Journal of Surgical Oncology* 38: 143-149
- Ishida M, Gomyo Y, Tatebe S, et al (1996). Apoptosis in human gastric mucosa, chronic gastritis, displasia and carcinoma: Analysis by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin neck end labeling. *Virchows Archives* 428: 229-235.
- Ishii HH, Gobé GC, Pan W, et al (2002). Apoptosis and cell proliferation in the development of gastric carcinomas: Associations with c-myc and p53 protein expression. *Journal of gastroenterology and Hepatology* 17: 966-972.
- Ivascu A y Kubbies M (2006). Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *Journal of Biomolecular Screening* 11: 922-932.
- Iwasaki R, Watanabe S, Otaka K, et al (1997). The role of the cytoskeleton in migration and proliferation of a cultured human gastric cancer cell line using a new metastasis model. *Cancer Letters* 119: 191-199.
- Jacks T y Weinberg RA (2002). Taking the study of cancer cell survival to a new dimension. *Cell* 111: 923-925.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, et al (2007). Cancer Statistics, 2007. *CA A Cancer Journal for*

Clinicians 57: 43-66.

- Johnson AM (1981). Analysis of animal weight gains in chronic toxicity studies. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 7: 307-316.
- Joossens JV, Hill MJ, Elliott P, et al (1996). Dietary salt, nitrate and stomach cancer mortality in 24 countries. *International Journal of Epidemiology* 25: 494-504.
- Karita M, Li Q, Cantero D, et al (1994). Establishment of a small animal model for human *Helicobacter pylori* infection using germ-free mouse. *American Journal of Gastroenterology* 89: 208-213.
- Kato I, Vivas J, Plummer M, et al (2004). Environmental factors in *Helicobacter pylori*-related gastric precancerous lesions in Venezuela. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 13: 468- 476.
- Khan N, Afaq F y Mukhtar H (2007). Apoptosis by dietary factors: the suicide solution for delaying cancer growth. *Carcinogenesis* 28: 233-239.
- Kim SS, Ruiz VE, Carroll JD, et al (2011). *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of gastric cancer and gastric lymphoma. *Cancer Letters* 305: 228-238.
- Klaunig JE y Kamedulis LM (2004). The role of oxidants stress in carcinogenesis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 44: 239-267.
- Koga R, Yamamoto J, Ohyama S, et al (2007). Liver resection for metastatic gastric cancer: Experience with 42 patients including eight long term survivors. . *Japanese Journal of Clinical Oncology* 37: 836-842.
- Kolenko VM, Uzzo RG, Bukowski R, et al (2000). Caspase-dependent and –independent death pathways in cancer therapy. *Apoptosis* 5: 17-20.
- Kountouras J, Zavos C y Chatzopoulos D, et al (2005). Apoptotic and anti-angiogenesis strategies in liver and gastrointestinal malignancies. *Journal of Surgical Oncology* 90: 249-259.
- Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D, et al (2008). New aspects of *Helicobacter pylori* infection involvement in gastric oncogenesis. *Journal of Surgical Research* 146: 149-158.

- Kranzer K, Eckhardt A, Aigner M, et al (2004). Induction of maturation and cytokine release of human dendritic cells by *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity* 72: 4416-4423.
- Krueger S, Roessner A y Kuester D (2011). Murine models of *H. pylori*-induced gastritis and gastric adenocarcinoma. *Pathology-Research and Practice* 207: 599-607.
- LaRue KEA, Khalil M y Freyer JP (2004). Microenvironmental regulation of proliferation in multicellular spheroids is mediated through differential expression of cyclin dependent kinase inhibitors. *Cancer Research* 64: 1621-1631.
- Lee A, Fox JG, Otto G, et al (1990). A small animal model of human *Helicobacter pylori* active chronic gastritis. *Gastroenterology* 99: 1315-1323.
- Lee Y (2008). Induction of apoptosis by S-allylmercapto-L- cysteine, a biotransformed garlic derivative, on a human gastric cancer cell line. *International Journal of Molecular Medicine* 21: 765-770.
- Li HL, Cai X, Fan X, et al (2007). Fas Ag-Fas L coupling meads to ERK1/2-mediated proliferation of gastric mucosal cells. *American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology* 249: 263-275.
- Lippman SM, Shin DM, Lee JJ, et al (1995). p53 and retinoid chemoprevention of oral carcinogenesis. *Cancer Research* 55: 16-19.
- Liu S, Wu Q, Chen ZM, et al (2001). The effect pathway of retinoic acid through regulation of retinoic acid receptor α in gastric cancer cells. *World Journal of Gastroenterology* 7: 662-666.
- Liu FX, Wang WH, Wang J, et al (2011). Effect of *Helicobacter pylori* infection on Barrett's Esophagus and esophageal adenocarcinoma formation in a rat model of chronic gastroesophageal reflux. *Helicobacter* 16: 66-77.
- Lohrum M, Stunnenberg HG y Logie C (2007). The new frontier in cancer research: Deciphering cancer epigenetics. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 1450–1461.
- Manikandan P, Letchoumy V, Prathiba D, et al (2008). Combinatorial chemopreventive

- effect of *Azadirachta indica* and *Ocimum sanctum* on oxidant-antioxidant status, cell proliferation, apoptosis and angiogenesis in a rat forestomach carcinogenesis model. *Singapore Medical Journal* 49: 814-822.
- Manikandan P, Murugan RS, Priyadarsini RV, et al (2010). Eugenol induces apoptosis invasion and angiogenesis in a rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG. *Life Sciences* 86: 936-941.
- Marrelli D, Roviello F, De Stefano A, et al (2004). Risk factors for liver metastases after curative surgical procedures for gastric cancer: A prospective study of 208 patients treated with surgical resection. *The Journal of the American College of Surgeons* 198: 51-58.
- Mattioli E, Vogiatzi, Sun A, et al (2007). Immunohistochemical analysis of pRb2/p130, VEGF, EZH2, P53, P16^{INK4A}, p27^{KIP1}, p21^{WAF1}, Ki-67 expression patterns in gastric cancer. *Journal of Cellular Physiology* 210: 183-191.
- Mayer B, Johnson JP, Leitl F, et al (1993). E-Cadherin Expression in primary and metastatic gastric cancer: Down-Regulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration. *Cancer Research* 53: 1690-1695.
- Mayer B, Klement G, Kaneko M, et al (2001). Multicellular gastric cancer spheroids recapitulate growth pattern and differentiation phenotype of human gastric carcinomas. *Gastroenterology* 121: 839-852.
- Mazzio EA y Soliman KFA (2009). In vitro screening for the tumoricidal properties of international medicinal herbs. *Phytotherapy Research* 23: 385-398.
- Mijic A, Ferencic Z, Belicza M, et al (1998). Apoptosis in human gastric polyps and adenocarcinomas: A stereological analysis. *Hepatogastroenterology* 45: 684-690.
- Minchinton AI y Tannock IF (2006). Drug penetration in solid tumors. *Nature Reviews Cancer* 6: 583-592.
- Mingchao M, Devereux TR, Stockton P, et al (2001). Loss of E-cadherin expression in gastric intestinal metaplasia and later stage p53 altered expression in gastric carcinogenesis. *Experimental and Toxicology Pathology* 53: 237-246.

- Ministerio de Salud de Costa Rica (2010). Memoria Institucional 2010. Capítulo 4, Apartado 2: Mortalidad por grandes grupos de causas. Pp. 40-48.
- Mirrish SS (1975). Formation of N-nitroso compounds chemistry kinetics and *in vivo* occurrence. *Toxicology and Applied Pharmacology* 31: 325-351.
- Mora D (2003). Evolución de algunos aspectos epidemiológicos y ecológicos del cáncer gástrico en Costa Rica. *Revista Costarricense de Salud Pública* 12: 7-17.
- Mueller-Klieser W (2000). Tumor biology and experimental therapeutics. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 36: 123-139.
- Mukhopadhyay P, Rajesh M, Haskó G, et al (2007). Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. *Nature Protocols* 2: 2295-2301.
- Nakanishi H, Yasui K, Ikehara Y, et al (2005). Establishment and characterization of three novel human gastric cancer cell lines with differentiated intestinal phenotype derived from liver metastasis. *Clinical and Experimental Metastasis* 22: 132-137.
- Nardone G (2003) Review article: Molecular basis of gastric carcinogenesis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 17 (Supl 2): 75-81.
- Nishino Y, Inoue M, Tsuji I, et al (2006). Tobacco smoking and gastric cancer risk: An evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese population. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 36: 800-807.
- Nishiyama M y Wada S (2009). Docetaxel: its role in current and future treatments for advanced gastric cancer. *Gastric Cancer* 12: 132-141.
- Noy N (2010). Between death and survival: Retinoic acid in regulation of apoptosis. *The Annual Review of Nutrition* 30: 201-217.
- O'Donnell PH, Guo WX, Reynolds CP, et al (2002). N-(4-hydroxyphenyl) retinamide increases ceramide and is cytotoxic to acute lymphoblastic leukemia cell lines, but not to non-malignant lymphocytes. *Leukemia* 16: 902-910.
- Ogura K, Maeda, S, Nakao M, et al (2000). Virulence factors of *Helicobacter pylori*

- responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. *The Journal of Experimental Medicine* 192: 1601-1609.
- Ohtsu A (2008). Chemotherapy for metastatic gastric cancer: past, present, and future. *Journal of Gastroenterology* 43: 256-264.
- Oliveira MJ, Costa AM, Costa AC, et al (2009). CagA associates with c-Met, E-Cadherin, and p120-Catenin in a multiproteic complex that suppresses *Helicobacter pylori*-induced cell invasive phenotype. *The Journal of Infectious Diseases* 200: 745-755.
- Oliveira PA, Colaco A, Chaves R, et al (2007). Chemical carcinogenesis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 79: 593-616.
- Ortiz MA, Bayon Y, Lopez-Hernandez FJ, et al (2002). Retinoids in combination therapies for treatment of cancer mechanisms and perspectives. *Drug Resistance Updates* 5: 162-175.
- Ortiz-Herrera M, Camorlinga-Ponce M, López-Corella E, et al (2010). Study of simultaneous experimental colonization of *Meriones unguiculatus* (Mongolian gerbils) by cagPAI+ and cagPAI- strains of *Helicobacter pylori*. *Microbes and Infection* 12: 607-614.
- O'Rourke JL y Lee a (2003). Animal models of *Helicobacter pylori* infection and disease. *Microbes and Infection* 5: 741-748.
- Parekh P y Rao KVK (2007). Overexpression of cyclin D1 is associated with elevated levels of MAP kinases, Akt and Pak1 during diethylnitrosamine-induced progressive liver carcinogenesis. *Cell Biology International* 31: 35-43.
- Park SY, Cho SJ, Kwon H, et al (2005). Caspase-independent cell death by allicin in human epithelial carcinoma cells: involvement of PKA. *Cancer Letters* 224: 123-132.
- Parsonnet J, Hansen S, Rodríguez L, et al (1994). *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Lymphoma. *New England Journal of Medicine* 330: 1267-1271.
- Peek Jr RM (2008). *Helicobacter pylori* infection and disease: from humans to animal models. *Disease Models and Mechanisms* 1: 50-55.
- Peek Jr RM y Blaser MJ (2002). *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract

- adenocarcinomas. *Nature Reviews Cancer* 2: 28-37.
- Peek Jr RM, Fiske C y Wilson KT (2010). Role of innate immunity in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancy. *Physiological Reviews* 90: 831-858.
- Peter ME, Legembre P y Barnhart BC. Does CD95 have tumor promoting activities?
Biochim Biophys Acta 1755: 25-36.
- Philpott DJ, Belaid D, Troubadour JM, et al (2002). Reduced activation of inflammatory responses in host cells by mouse-adapted *Helicobacter pylori* isolates. *Cellular Microbiology* 4: 285-296
- Pili R, Salumbides B, Zhao M, et al (2012). Phase I study of the histone deacetylase inhibitor entinostat in combination with 13-cis retinoic acid in patients with solid tumours. *British Journal of Cancer* 106: 77-84.
- Pitot HC, Hikita H, Dragan L, et al (2000). Review article: the stages of gastrointestinal carcinogenesis application of rodent models to human disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 14 (Supl 1): 153-160.
- Raffoux E, Cras A, Recher C, et al (2010). Phase 2 clinical trial of 5-azacitidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in patients with high-risk acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. *Oncotarget* 1: 34-42.
- Ricci C (2007). Diagnosis of *Helicobacter pylori*: Invasive and non-invasive tests. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology* 21: 299-313.
- Riley LK, Franklin CL, Hook RR, et al (1996). Identification of murine *helicobacters* by PCR and restriction enzyme analyses. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 942-946.
- Rivera F, Veba-Villegas ME y López-Brea MF (2007). Chemotherapy of advanced gastric cancer. *Cancer Treatment Reviews* 33: 315-324.
- Rodríguez-Sanjuan JC, Fontalba A, Mayorga M, et al (2006). A novel mutation in the E-cadherin gene in the first family with hereditary diffuse gastric cancer reported in Spain. *European Journal of Surgical Oncology* 32 1110-1113.
- Rowinsky EK (2004). The ERBB Family: Targets for therapeutic development against cancer

- and therapeutic strategies using monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors. *Annual Reviews Medicine* 55: 433-457.
- Sakamoto J, Matsui T y Kodera Y (2009). Paclitaxel chemotherapy for the treatment of gastric cancer. *Gastric Cancer* 12: 69-78.
- Santini MT y Rainaldi G (1999). Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology* 67: 148-157.
- Sarkar FH y Li Y (2004). Cell signaling pathways altered by natural chemopreventive agents. *Mutation Research* 555: 53-64.
- Sasaki N, Morisaki, Hashizume K, et al (2008). Nuclear factor kappa B p65 (Rel A) transcription factor is constitutively activated in human gastric carcinoma tissue. *Clinical Cancer Research* 7: 4136-4142.
- Schultz SS y Lucas PA (2006). Human stem cells isolated from adult skeletal muscle differentiate into neural phenotypes. *Journal of Neuroscience Methods* 152: 144-155.
- Selbach M, Moese S, Hauck CR, et al (2002). Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 6775-6778.
- Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, et al (2009). Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* 138: 822-829.
- Shang J, Peña AS (2005). Multidisciplinary approach to understand the pathogenesis of gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology* 11: 4131-4139.
- Shimazu T, Tsuji I, Inoue M, et al (2008). Alcohol drinking and gastric cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese population. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 38: 8-25.
- Shimizu N, Inada K, Nakanishi H, et al (1999). Helicobacter pylori infection enhances glandular stomach carcinogenesis in Mongolian gerbils treated with chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 20: 669-676.
- Shirabe K, Shimada M, Matsumata T, et al (2003). Analysis of the prognostic factors for

- liver metastasis of gastric cancer after hepatic resection: a multi-institutional study of the indications for resection. *Hepatogastroenterology* 50: 1560-1563.
- Shirai T, Imaida K, Fukushima S, et al (1982). Effects of NaCl, Tween 60 and low dose of N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on gastric carcinogenesis of rats given a single dose of M-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis* 3: 1419-1422.
- Shyu RY, Jiang SY, Huang SL, et al (1995). Growth regulation by all-trans-retinoic acid and retinoic acid receptor messenger ribonucleic acids expression in gastric cancer cells. *European Journal of Cancer* 31: 237-243.
- Sierra R (2002). Cáncer gástrico, epidemiología y prevención. *Acta Médica Costarricense* 44: 55-61.
- Siewert JR, Bottcher K, Roder JD, et al (1993). Prognostic relevance of systemic lymph node dissection in gastric carcinoma. *British Journal of Surgery* 80: 1015-1018.
- Singletary SE, Atkinson EN, Hoque A, et al (2002). Phase II clinical trial of N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide and tamoxifen administration before definitive surgery for breast neoplasia. *Clinical Cancer Research* 8: 2835-2842.
- Smalley KSM, Lioni M y Herlyn M (2006). Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Animal* 42: 242-247.
- Song G, Ouyang G, Mao Y, et al (2009). Osteopontin promotes gastric cancer metastasis by augmenting cell survival and invasion through Akt-mediated HIF-1a up-regulation and MMP9 activation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13: 1706-1718.
- Soylu A, Ozkara S, Alis H, et al (2008). Immunohistochemical testing for Helicobacter Pylori existence in neoplasms of the colon. *BMC Gastroenterology* doi:10.1186/1471-230X-8-35.
- Stanbridge EJ (1990). Human tumor suppressor genes. *Annual Review of Genetics* 24: 615-657.
- Steadman K, Stein WD, Litman T, et al (2008). PolyHEMA spheroids are an inadequate model for the drug resistance of the intractable solid tumor. *Cell Cycle* 7: 818-829.
- Suarez F, Lortholary O, Hermine O, et al (2006). Infection-associated lymphomas derived

- from marginal zone B cells: a model of antigen-driven lymphoproliferation. *Blood* 107: 3034-3044.
- Sue-Ling HM, Johnston D, Martin IG, et al (1993). Gastric cancer: a curable disease in Britain. *British Medical Journal* 307: 591-596.
- Sugimura T y Fujimura S (1967). Tumour production in glandular stomach of rat by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Nature* 216: 943-944.
- Sugimura T y Terada M (1998). Experimental chemical carcinogenesis in the stomach and colon. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 28: 163-167.
- Sugiyama A, Maruta F, Ikeno T, et al (1998). *Helicobacter pylori* infection enhances N-Methyl-N-nitrosourea-induced stomach carcinogenesis in the mongolian gerbil. *Cancer Research* 58: 2067-2069.
- Sumi Y y Miyakawa M (1981). Comparative studies on the production of stomach tumors following the intubation of several doses of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in germ-free and conventional newborn rats. *Gann Japanese Journal of Cancer Research* 72: 700-704.
- Sun SY y Lotan R (2002). Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 41: 41-55.
- Sutherland RM (1988). Cell and environment interactions in tumor microregions: The multicell spheroid model. *Science* 240: 177-184.
- Takahashi H, Nakano Y, Matsuoka T, et al (2011). Role of indigenous lactobacilli in gastrin-mediated acid production in the mouse stomach. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 6964-6971.
- Takasu S, Tsukamoto T, Ushijima T, et al (2007). Cyclin D1 overexpression in N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced rat gastric adenocarcinomas. *Experimental and Toxicologic Pathway* 59: 171-175.
- Tang XH y Gugas LJ (2011). Retinoids, retinoic acid and cancer. *The Annual Review of Pathology: Mechanism of Disease* 6: 345-364.
- Tarso L, Meyer FS, Cioato MG (2011). Experimental model of gastric carcinogenesis with

- N-methyl-N-nitrosourea for F344 rats and C3H mice is valid for Wistar rats? *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva* 24: 55-58.
- Tatematsu S, Furihata C, Katsuyama T, et al (1983). Independent Induction of Intestinal Metaplasia and Gastric Cancer in Rats Treated with N-Methyl-N--nitrosoguanidine. *Cancer Research* 43: 1335-1341.
- Tatematsu M, Yamamoto M, Shimizu N, et al (1998). Induction of glandular stomach cancers in *Helicobacter pylori*-sensitive Mongolian gerbils treated with N-Methyl-N-nitrosourea and N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in the drinking water. *Japanese Journal of Cancer Research* 89: 97-104.
- Thelen A, Jonas S, Benckert C, et al (2008). Liver resection for metastatic gastric cancer. *EJSO the Journal of Cancer Surgery* 34: 1328-1334.
- Tokieda M, Honda S, Fujioka T, et al (1999). Effect of *Helicobacter pylori* infection on the N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in Mongolian gerbils. *Carcinogenesis* 20: 1261-1266.
- Trosko JE, Chang CC, Upham BL, et al (2004). Ignored hallmarks of carcinogenesis: Stem cells and cell-cell communication. *The New York Academy of Sciences* 1028: 192-201.
- Trosko JE (2009). Review paper: Cancer stem cells and cancer nonstem cells: from adult stem cells or from reprogramming of differentiated somatic cells. *Veterinary Pathology* 46: 176-193.
- Tsamandas AC, Kardamakis D, Tsiamalos P, et al (2009). The potential role of Bcl-2 expression, apoptosis and cell proliferation (Ki-67 expression) in cases of gastric carcinoma and correlation with classic prognostic factors and patient outcome. *Anticancer Research* 29: 703-710.
- Tsukamoto T, Mizoshita T y Tatematsu M (2007). Animal models of Stomach Carcinogenesis. *Toxicologic Pathology* 35: 636-648.
- Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, et al (2001) *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *New England Journal of Medicine* 345: 784-789.

- Velmurugan B, Mani A y Nagini S (2005). Combination of S-allylcysteine and lycopene induces apoptosis by modulating Bcl-2, Bax, Bim and caspases during experimental gastric carcinogenesis. *European Journal of Cancer Prevention* 14: 387-393.
- Wang TC, Dangler CA, Whary MT (2000). Synergistic interaction between hypergastrinemia and *Helicobacter* infection in a mouse model of gastric cancer, *Gastroenterology* 118: 36-47.
- Wang TC, Fox JG y Giraud AS. The Biology of Gastric Cancers. Springer Science +Business Media, LLC. New York, USA. 2009, Pp 336-339.
- Ward MH y López-Carrillo L (1999) Dietary factor and the risk of gastric cancer in Mexico city. *American Journal of Epidemiology* 149: 925-932.
- Wartenberg M, Gronczynska S, Bekhite MM, et al (2005). Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular prostate tumor spheroids by hyperthermia and reactive oxygen species. *International Journal of Cancer* 113: 229-240.
- Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Trosko JE, et al (2007). Expression of the embryonic transcription factor Oct4 in canine neoplasms: A potential marker for stem cell subpopulations in neoplasia. *Veterinary Pathology* 44: 893-900.
- Weller M, Gorlia T, Cairncross JG, et al (2011). Prolonged survival with valproic acid use in the EORTC/NCIC temozolomide trial for glioblastoma. *Neurology* 77: 1156-1164.
- Wesolowski R, Lee C y Kim R (2009). Is there a role for second-line chemotherapy in advanced gastric cancer? *The Lancet Oncology* 10: 903-912.
- Whitworth JM, Londoño-Joshi AI, Sellers LC, et al (2011). The impact of novel retinoids in combination with platinum chemotherapy on ovarian cancer stem cells. *Gynecologic Oncology* doi:10.1016/j.ygyno.2011.12.425
- Xia HHX y Talley NJ (2001). Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: implications in gastric carcinogenesis. *The American Journal of Gastroenterology* 96: 16-26.
- Yamaoka Y (2010). Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nature*

Reviews Gastroenterology & Hepatology 7: 629-641.

Yano H, Tatsuta M, Iishi H, et al (1999). Attenuation by *d*-limonene of sodium chloride-enhanced gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-Nitrosoguanidine in Wistar rats. *International Journal of Cancer* 82: 665-668.

Yonemura Y, Bandou E, Kawamura T, et al (2006). Quantitative indicators of peritoneal dissemination of gastric cancer. *The European Journal of Cancer Surgery* 32: 602-606.

Zhang H, Fang DC, Lan CH, et al (2007). *Helicobacter pylori* infection induces apoptosis in gastric cancer cell through the mitochondrial pathway. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 22: 1051-1056.

Zhang X, Peng X, Yu, W, et al (2011). Alpha-tocopheryl succinate enhances doxorubicin-induced apoptosis in human gastric cancer cells via promotion of doxorubicin influx and suppression of doxorubicin efflux. *Cancer Letters* 307: 174-181.

Zheng C, Zhou Q, Wu F, et al (2009). Semaphorin3F down-regulates the expression of Integrin $\alpha_v\beta_3$ and sensitizes multicellular tumor spheroids to chemotherapy via the Neuropilin - 2 receptor in vitro. *Chemotherapy* 55: 344-352.