



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**

Facultad de Ciencias Químico Biológicas

Facultad de Medicina

Unidad de Investigación Especializada en Microbiología

**Maestría en Ciencias Biomédicas**



**Infección por *Helicobacter pylori*, expresión de miR-411-5p, miR-548d-3p, miR-892c y gastroquina-1 en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PRESENTA:**

QBP. Sandra Ines Lorenzo Nazario

**Directora de tesis**

Dra. Gloria Fernández Tilapa

**Co-directora**

Dra. Dinorah Nashely Martínez Carrillo

**Asesor externo**

Dr. Oscar Peralta Zaragoza

Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México. Enero 2019

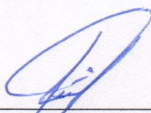


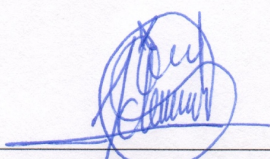
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

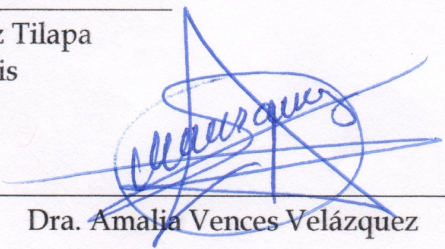
ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

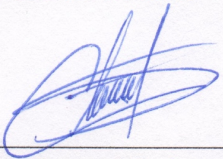
En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 03 días del mes de diciembre de dos mil dieciocho se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Infección por *Helicobacter pylori*, expresión de miR-411-5p, miR-548d-3p, miR-892c y gastroquina-1 en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico", presentada por la alumna Sandra Inés Lorenzo Nazario, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

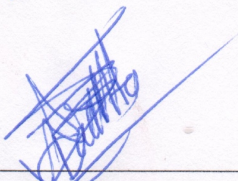
El Comité Tutorial

  
Dra. Gloria Fernández Tilapa  
Dirección de tesis

  
Dra. Dinorah Nashely Martínez Carrillo  
Codirección de tesis

  
Dra. Amalia Vences Velázquez

  
Dr. Eduardo Castañeda Saucedo

  
Dr. Oscar Peralta Zaragoza

Vo. Bo

Vo. Bo

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación Clínica y Laboratorio de Investigación en Biomoléculas de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero (UAGro).

Bajo la dirección de:

Dra. Gloria Fernández Tilapa

Codirección de:

Dra. Dinorah Nashely Martínez Carrillo

Asesoría externa de:

Dr. Oscar Peralta Zaragoza

Y con la asesoría de:

Dr. Eduardo Castañeda Saucedo

Dra. Amalia Vences Velázquez

La investigación se realizó con financiamiento otorgado por el CONACYT al proyecto 258433, en la convocatoria de Investigación Científica Básica 2015-01 y con recursos otorgados por el Programa de Fortalecimiento de la Calidad Educativa (PFCE-SEP-2017) de la Secretaría de Educación Pública al cuerpo Académico Agentes Infecciosos y Cáncer (Consolidado, UAGro-CA194).

Durante el periodo en que cursó la Maestría en ciencias Biomédicas la Q.B.P. Sandra Ines Lorenzo Nazario recibió la beca (No. 777741) del 01 de septiembre de 2016 al 31 de agosto de 2018 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) del Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).

Los experimentos se realizaron en el equipo adquirido a través del proyecto Apoyo al fortalecimiento de la infraestructura científica y tecnológica: Adquisición de infraestructura científica para la creación del laboratorio de Investigación en Biomoléculas, para el fortalecimiento del estudio *in vitro* de la relación agente infecciosos y cáncer. IFNR-2016-01, Clave 261186, financiado por el CONACyT en la convocatoria 2016.

Este trabajo se realizó en colaboración con el Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega” en la ciudad de Acapulco, Gro, Unidad Especializada en Gastroenterología Endoscopía en la ciudad de Chilpancingo y el Instituto de Investigaciones Médico Biológicas de la Universidad Veracruzana.

Agradecemos la participación del Dr. Iván Cruz del Carmen, Dr. Reyes Betancourt Linares, Dr Salomón Reyes Navarrete y del Dr. José María Remes Troche, así como del personal de enfermería que asistió durante la toma de biopsia.

## *Dedicatorias*

*A Dios, por permitirme la dicha de contar con toda mi familia durante este proceso, ya que la familia es un pilar esencial en la vida. Por rodearme con buenos amigos en la maestría, conocidos y compañeros en el laboratorio. Por brindarme la fortaleza e ímpetu requerido, gracias Dios por permitirme dar este gran paso y concluirlo. A la vida, por todos los obstáculos presentados en este proceso, porque como bien se sabe; cuando las cosas son sencillas muchas veces pasan desapercibidas.*

*A mis queridos padres, gracias infinitas por todo el apoyo brindado, por confiar en mí, comprenderme, escucharme y cuidar de mí. Gracias por haberme acompañado en esta etapa de mi vida. Los amo*

*A mis hermanos, gracias por todos los momentos compartidos y formar parte de mi vida.*

*A mis sobrinos: Sina, Karen, Jonas, Jaxziri y ahora también a Luna Mayte y a todos mis otros sobrinos peques porque compartir momentos con ellos siempre fue muy reconfortante, verlos jugar y ver como se apoyaban unos a otros e incluso en los juegos, me hacía muy feliz y hacía que me olvidara de otras cosas de la vida. Los quiero mucho, me encantaría que nunca crecieran, que siempre fueran peques para poder conservar esa chispa que los caracteriza 😊*

## ***Agradecimientos***

A mi directora de Tesis, ***Dra Gloria Fernández Tilapa***, de no haber entrado a la maestría no hubiese tenido la dicha de conocer y tratar a una gran persona y sobre una gran investigadora como lo es usted, gracias por sus enseñanzas, por motivarme a dar siempre lo mejor de mí, y sobre todo por sus exigencias y llamadas de atención, que muchas veces fueron de gran ayuda, admiro mucho su forma de ser. Considero que no es una tarea nada fácil tener que ser exigente, pero gracias a personas como usted es que reciba mis más sinceros agradecimientos, por sus grandes ense

A mi co-directora la ***Dra. Dinorah Nashely Martínez Carrillo***, gracias por todo el tiempo brindado para revisar y corregir el escrito, los ensayos y también por motivarme durante este proceso.

Al ***Dr. Eduardo Castañeda Saucedo***, muchísimas gracias, porque creo que desde que eligió ser sínodo de mi comité empezó a estar muy al pendiente del trabajo, los resultados, el escrito y la discusión. Es usted una persona a la cual admiro y respeto, doctor en verdad muchísimas gracias por todo el apoyo brindado, porque lo veía en los pasillos de la escuela y casi era seguro que me iba a preguntar, ¿cómo vas?, ¿cuándo platicamos?, sus aportes durante el proyecto fueron de gran ayuda para la mejora de este, gracias por ser un buen amigo, que supo brindarme palabras de aliento cuando le decía no doctor es que no sale, es que pasó esto y me decía: qué bueno que obtuviste esos resultados, eso es parte de tu formación académica y son cosas que suceden.

A mi apreciado asesor externo el ***Dr. Oscar Peralta Zaragoza***, dr, gracias por el tiempo brindado, por haber estado presente en ***todos*** mis seminarios, aunque eso implicaba viajar, por sus grandes aportes al trabajo y sobre todo por haber tenido esa disponibilidad a pesar de tener otras actividades, considero yo más importantes y finalmente quiero agradecer por los conocimientos compartidos.

A la ***Dra. Amalia Vences Velázquez*** quien estuvo al pendiente de mí, durante la maestría, ya que aparte de ser mi sínodo fue mi tutora, Dra muchas gracias por preocuparse por mí, por los resultados del proyecto y gracias por sus aportes que contribuyeron a una mejora del trabajo.

A **Regi** por todo el apoyo brindado durante este proceso.

A **Dul** por escucharme, comprenderme, darme ánimo en todo este tiempo y por su gran y apreciada amistad, te quiero mucho amiga.

A **Leilany**, por escucharme, haberme soportado durante las clases, por haberme tenido paciencia, por sus enseñanzas y todos los momentos compartidos. Te llevo en mi corazón ☺ ah y también te quiero.

A **Lau** y a **Os** por todos los momentos compartidos y las pláticas, los quiero mucho.

A los chicos del laboratorio de Bacter, Fer, Adrián, Migue, David, Magdis, Yoli, Alma, Saris (porque desde hace un buen rato ya eres de Bacter je je) y Gaby (por tus enseñanzas y conocimientos compartidos, también por darte un tiempo para ensayar contigo mis presentaciones) por todos los momentos compartidos. También al Dr. Adolfo por recibirnos en su laboratorio.

A **Dianita** por el apoyo brindado en el Laboratorio de Investigación clínica.

A **ju ju** por todas esas pláticas, comentarios, sugerencias y todos los momentos compartidos.

**Pao**, sabes que eres una gran personita y muy especial, dichosa yo por conocer a una persona tan genial como lo eres tú, gracias por apoyarme en este proceso y sobre todo por compartir tus conocimientos de bioestadística ☺ te quiero.

**Ángel**, recibe mi más profundo y sincero agradecimiento por muchas cosas, entre ellas por haberme motivado a incursionar al proceso de selección para la maestría, tus enseñanzas, regaños, apoyo, comprensión y cariño brindado, también por tolerarme je je. ☺ Por todos los buenos y no tan gratos momentos compartidos ja, ja, ja.

Y gracias a todas aquellas personas que de alguna u otra forma contribuyeron en mi proceso de aprendizaje.

**Infección por *Helicobacter pylori*, expresión de  
miR-411-5p, miR-548d-3p, miR-892c y  
gastroquina-1 en pacientes con gastritis crónica  
y cáncer gástrico**



# Índice

<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
I. Resumen.....	I
II. Abstract .....	II
III. Introducción .....	1
IV. Materiales y métodos .....	3
V. Resultados.....	6
VI. Discusión .....	13
VII. Conclusiones .....	16
VIII. Referencias.....	17

## I. Resumen

**Introducción:** La infección por *H. pylori* es uno de los principales factores de riesgo para la carcinogénesis gástrica. *H. pylori* puede modificar el nivel de expresión de proteínas y de miRNAs. GKN1 es una proteína específica de la mucosa gástrica que se encuentra disminuida cuando hay infección por *H. pylori* y está ausente en cáncer gástrico. Los mecanismos involucrados en la inactivación o disminución de GKN1 aún no están totalmente esclarecidos, y se ha sugerido que su disminución podría ser mediada por miRNAs. El objetivo de este estudio fue determinar si la infección por *H. pylori* se relaciona con cambios en la expresión de miR-411-5p, miR-548d-3p y miR-892c e indagar si existe correlación entre la expresión de estos miRNAs y el mRNA de *GKN1*. **Metodología:** Se incluyeron 21 muestras de pacientes con gastritis crónica, 5 de cáncer gástrico y 3 de pacientes con mucosa gástrica normal. La expresión del mRNA de *GKN1*, de miR-411-5p, miR-548d-3p y miR-892c se realizó por RT-qPCR y mediante Western blot se determinó la expresión de GKN1. **Resultados:** La prevalencia general de infectados por *H. pylori* fue de 37.9%, el 55.17% de los participantes fueron mujeres (16/29), la mediana de edad fue de 58 (51-57) años. La expresión de GKN1 fue mayor en los pacientes con gastritis crónica en comparación con cáncer gástrico. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de los miRNAs entre los pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. **Conclusión:** No se encontró correlación entre el nivel de expresión del mRNA de *GKN1* y la expresión de miR-411-5p, miR-548d-3p y miR-892c en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico con y sin infección por *H. pylori*.

**Palabras claves:** *H. pylori*, miRNAs, GKN1, gastritis crónica, cáncer gástrico.

## II. Abstract

**Introduction:** *H. pylori* infection is the main risk factor for the gastric carcinogenesis. *H. pylori* can modify the expression levels of miRNAs and of proteins. GKN1 is a protein specific tissue that is decreased when there *H. pylori* infection and this absent in gastric cancer. The mechanisms involved in the inactivation or decrease of *GKN1* still are not fully clarified and it has been suggested that its regulation could be mediated for miRNAs. The objective of this study it was determine if the *H. pylori* infection it is related to changes modified the expression of miR-411-5p, miR-544a and miR-892c and inquire if correlation exist between the expression of those miRNAs and *GKN1* mRNA. **Methodology:** Twenty-one samples from patients with chronic gastritis were included, five from gastric cancer and three with normal gastric mucosa. The mRNA expression of *GKN1*, of miR-411-5p, miR-548d-3p and miR-892c was determined by RT-qPCR and the expression of GKN1 by Western blot. **Results:** The general prevalence of infected by *H. pylori* was of 37.9%, the 55.17% were women (16-29), the age median it was of 58 (51-57) years. GKN1 expression was major in chronic gastritis patients in comparison with gastric cancer. It not found significant differences in the miRNAs expression between chronic gastritis and gastric cancer patients. **Conclusion:** It was not found correlation between the expression levels of mRNA of *GKN1* and the expression of miR-411-5p, miR-548d-3p and miR-892c in chronic gastritis and gastric cancer patients with and without *H. pylori* infection.

Key words: *H. pylori*, miRNAs, *GKN1*, chronic gastritis, gastric cancer.

### III. Introducción

El cáncer gástrico es la quinta malignidad más frecuente y la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo (Ferlay *et al.*, 2012). *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es el principal agente etiológico asociado al cáncer gástrico (Correa *et al.*, 2011). *H. pylori* induce modificaciones en la expresión de proteínas que participan en la homeostasis gástrica y se ha observado que esta bacteria modifica la expresión de microRNAs (Yang *et al.*, 2012 and Yang *et al.*, 2016). Los miRNAs son RNA pequeños, no codificantes que regulan post-transcripcionalmente la expresión de genes humanos, y funcionan como oncogenes o supresores de tumor al inducir la degradación o inhibir la traducción del mRNA blanco (Nana-Sinkam *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2017). Un número creciente de evidencias sugieren que la expresión de los miRNAs es tejido-tiempo específico y que los perfiles de expresión son diferentes en tejido normal y tejido tumoral (Dos-Santos *et al.*, 2010). En biopsias de tejido con cáncer gástrico y de mucosa gástrica no neoplásica de pacientes con infección por *H. pylori* se encontró un perfil de expresión de miRNAs diferente (Matsushima *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014; Cadamuro *et al.*, 2014; Chang *et al.*, 2015; Link *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2017). Además de las modificaciones en la expresión de miRNAs, en pacientes infectados por *H. pylori*, así como en mucosa gástrica inflamada por causas no relacionadas con la infección por *H. pylori*, también se han encontrado alteraciones en el nivel de expresión de genes que participan en la homeostasis gástrica. Mediante un análisis proteómico se identificaron proteínas con expresión diferencial en biopsias de pacientes con y sin infección por *H. pylori*; gastroquina-1 (GKN1) se encontró con expresión disminuía notablemente en pacientes infectados en comparación con mucosa gástrica sin infección por *H. pylori* (Nardone *et al.*, 2007). GKN1 es una proteína que pertenece a la familia de gastroquinas (GKNs), se expresa casi exclusivamente en estómago y se propone como supresor de tumor debido a que es un regulador importante de la homeostasis gástrica; está involucrada en la reposición de la capa de células epiteliales de la superficie del lumen gástrico, en el mantenimiento de la integridad de la mucosa y en la proliferación y diferenciación celular. En líneas celulares de cáncer gástrico

induce apoptosis, inhibe la proliferación celular, la migración e invasión (Rippa *et al.*, 2010; Yoon *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2016; Altieri *et al.*, 2017; Yoon *et al.*, 2018).

La expresión de GKN1 está disminuida en muestras de mucosa gástrica infectada por *H. pylori* y está ausente en adenocarcinoma gástrico. La desregulación de GKN1 es uno de los eventos que conducen al desarrollo de cáncer. Los pacientes con menor expresión de GKN1 tienen mayor riesgo de presentar patologías gástricas severas. Los mecanismos que modulan el silenciamiento de la expresión de GKN1 en cáncer gástrico aún no están totalmente esclarecidos (Yoon *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2016; Altieri *et al.*, 2017). Altieri *et al.*, (2017) reportaron que la trimetilación de la lisina 9 en la histona 3 (H3K9triMe) del promotor de *GKN1* se asocia con la disminución de la expresión del mRNA de *GKN1*, pero no con la disminución de GKN1 a nivel de proteína, por lo cual sugieren que la inactivación de GKN1 se esté llevando a cabo a nivel post-transcripcional, probablemente por miRNAs.

No se ha estudiado la participación de miRNAs en la regulación de la expresión de *GKN1*. Mediante un análisis *in silico* realizado por nuestro grupo de trabajo, se encontró que el mRNA de *GKN1* es un blanco probable de miR-411-5p, miR-548d-3p y miR-892c. El objetivo de esta investigación fue analizar la relación entre la expresión de miR-411-5p, miR-548d-3p y miR-892c con la expresión del mRNA de *GKN1* en biopsias de pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico con y sin infección por *H. pylori*.

#### IV. Materiales y métodos

##### Población

Se incluyeron 29 pacientes con diagnóstico endoscópico y/o histopatológico de gastritis crónica, cáncer gástrico o mucosa gástrica normal. Todos los participantes fueron sometidos a estudio endoscópico en el Instituto Estatal de Cancerología Arturo Beltrán Ortega en Acapulco, Guerrero, México, en el Hospital General “Dr. Raymundo Abarca Alarcón”, en la Unidad Especializada en Gastroenterología Endoscopia, en Chilpancingo, Guerrero o en el Instituto de Investigaciones Médico Biológicas de la Universidad Veracruzana. Ninguno de los pacientes había recibido tratamiento con medicamentos antiinflamatorios no esteroideos, antiácidos o cualquier antibiótico dos meses previos a la toma de muestra. Los participantes o sus familiares firmaron un consentimiento informado y respondieron un cuestionario acerca de hábitos alimenticios, factores sociodemográficos, historia familiar de gastritis o cáncer gástrico, consumo de alcohol y hábito tabáquico. Este proyecto fue aprobado por el comité de bioética de la Universidad Autónoma de Guerrero y de los hospitales participantes.

##### Endoscopia e histología

La endoscopia fue realizada después de una noche de ayuno con un procesador de video y video gastroscopio (Fujinon, Wayne, NJ USA). De todos los pacientes se obtuvieron dos biopsias del antro o cuerpo gástricos, dependiendo del sitio de lesión. A los pacientes con cáncer gástrico, se les tomaron dos biopsias del sitio del tumor y dos del tejido adyacente al cáncer. Una biopsia de cada sitio fue fijada inmediatamente en formalina (10%) para la examinación histológica y otra fue colocada en Trizol para el diagnóstico de *H. pylori*, la expresión de los miRNAs, del mRNA y proteína de GKN1. Las biopsias se mantuvieron a -20°C hasta su procesamiento.

Obtención de RNA total y RT-qPCR para el transcrito *GKN1*, miR-411-5p, miR-548d-3p y miR-892c.

El RNA total de las biopsias se hizo con el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del RNA se determinó usando un NanoDrop 2000 (NanoDrop Technology, Madison,

WI, USA). Para la expresión de los miRNAs, la transcripción reversa se hizo a partir de 5 ng de RNA total. La expresión de miR-411-5p (No. Ensayo: 001610), miR-548d-3p (No. Ensayo: 001605) y miR-892c-5p (No. Ensayo: 470966\_mat) se midió por ensayos TaqMan miRNA (Applied Biosystems, Pleasanton, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La medición se hizo en el sistema PCR tiempo real 7500 Fast (Applied Biosystems, Pleasanton, CA, USA). La expresión de *GKN1* (No. Ensayo: Hs00219734) se cuantificó con el kit TaqMan RNA-to-CT 1 Step Kit (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania). La expresión relativa de los miRNAs y de *GKN1* se calculó con el método comparativo  $2^{-\Delta\text{ct}}$ , normalizados con la expresión de los genes constitutivos *RNU44* (No. Ensayo: 001094) y *GAPDH* (No. Ensayo: Hs99999905\_m1), respectivamente.

#### Western blotting para GKN1

Las proteínas totales se obtuvieron siguiendo la metodología descrita por Likhite & Warawdekat., (2011) y se cuantificaron por el método de ácido bincinónico (ThermoFisher Scientific, Rockford, USA). Se cargaron 20 µg de proteínas totales en un gel de poliacrilamida al 14%. La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con 5% de leche sin grasa por 1 h a 37°C en agitación constante. Para la inmunodetección se usaron los anticuerpos primario anti-GKN1 mouse (Abnova, Tapeí, Taiwan,) dilución 1:30000, anti-GADPH mouse (6C5, sc-32233, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) dilución 1:1000 y el anticuerpo secundario de ratón acoplado a peroxidasa (sc-2371, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), dilución 1:30000. Las bandas de las proteínas se revelaron con el kit de detección quimioluminiscente Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, CA, USA). Las imágenes se captaron mediante el sistema de documentación ChemiDoc (Biorad, CA, USA) y se analizaron con el software Image Lab (Bio-Rad, versión 5.2.1).

#### Análisis estadístico

El análisis estadístico se hizo con el software GraphPad Prim. Se obtuvieron frecuencias absolutas y relativas de las variables cualitativas y las diferencias se calcularon con la prueba exacta de Fisher. De las variables cuantitativas se reportó media ± DE o mediana y rango intercuartilo. Mediante la prueba t de Student o Mann-Whitney se compararon dos medias o medianas, respectivamente, y con la

prueba de ANOVA o Kruskal-Wallis se compararon más de dos medias o medianas, respectivamente. La correlación entre la expresión del mRNA de *GKN1* y los miRNAs se calculó usando el coeficiente de correlación de Spearman. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.



## V. Resultados

### Población e infección por *H. pylori*

Se incluyeron 21 muestras de pacientes con diagnóstico endoscópico y/o histopatológico de gastritis crónica, 5 de cáncer gástrico y 3 muestras de mucosa gástrica normal. El 55.17% (16/29) de los participantes fueron mujeres. El promedio de edad fue de 55 (con un rango de 16-90) años. El 37.9% (11/29) de los pacientes fueron positivos a la infección por *H. pylori* (Tabla 1).

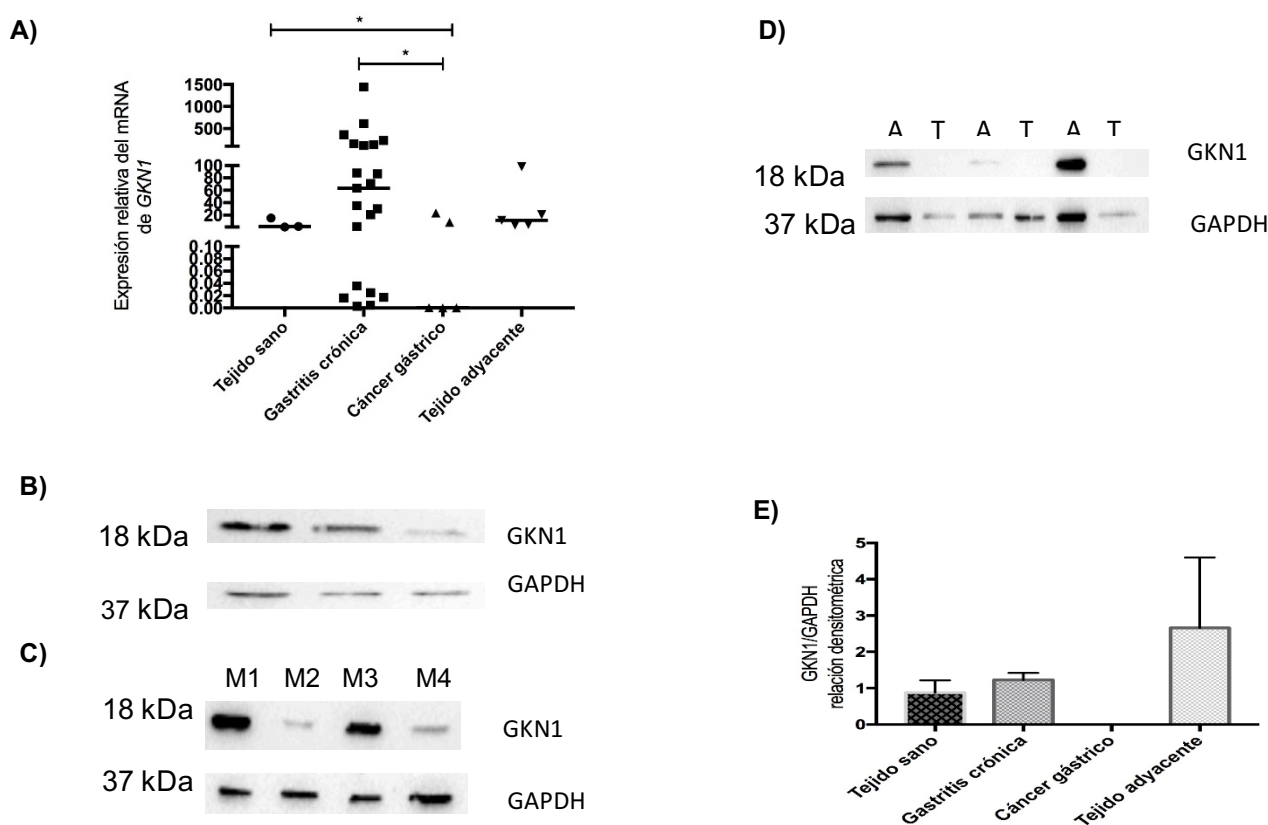
**Tabla 1. Características clínico-patológicas e infección por *H. pylori* en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico**

Características	Infección por <i>H. pylori</i>		Valor de p
	Positivo n= 11	Negativo n= 18	
<b>Edad [Mediana (Rango); años]</b>	58(52-69)	59(30-64)	0.95 <sup>3</sup>
<b>Género n (%)</b>			
Femenino	7 (63.64)	9 (50)	0.47 <sup>ψ</sup>
Masculino	4 (36.36)	9 (50)	
<b>Diagnóstico endoscópico o histológico</b>			
Mucosa gástrica normal	-	3	
Gastritis crónica	9	12	
Cáncer gástrico			
Difuso	2	1	
Intestinal	-	2	
<b>Grado de diferenciación del cáncer</b>			
Moderado	1	1	
Bien diferenciado	-	1	
Pobremente diferenciado	-	1	
No específica	1	-	

<sup>3</sup> Prueba de Mann-Whitney; <sup>ψ</sup> Prueba de X<sup>2</sup>.

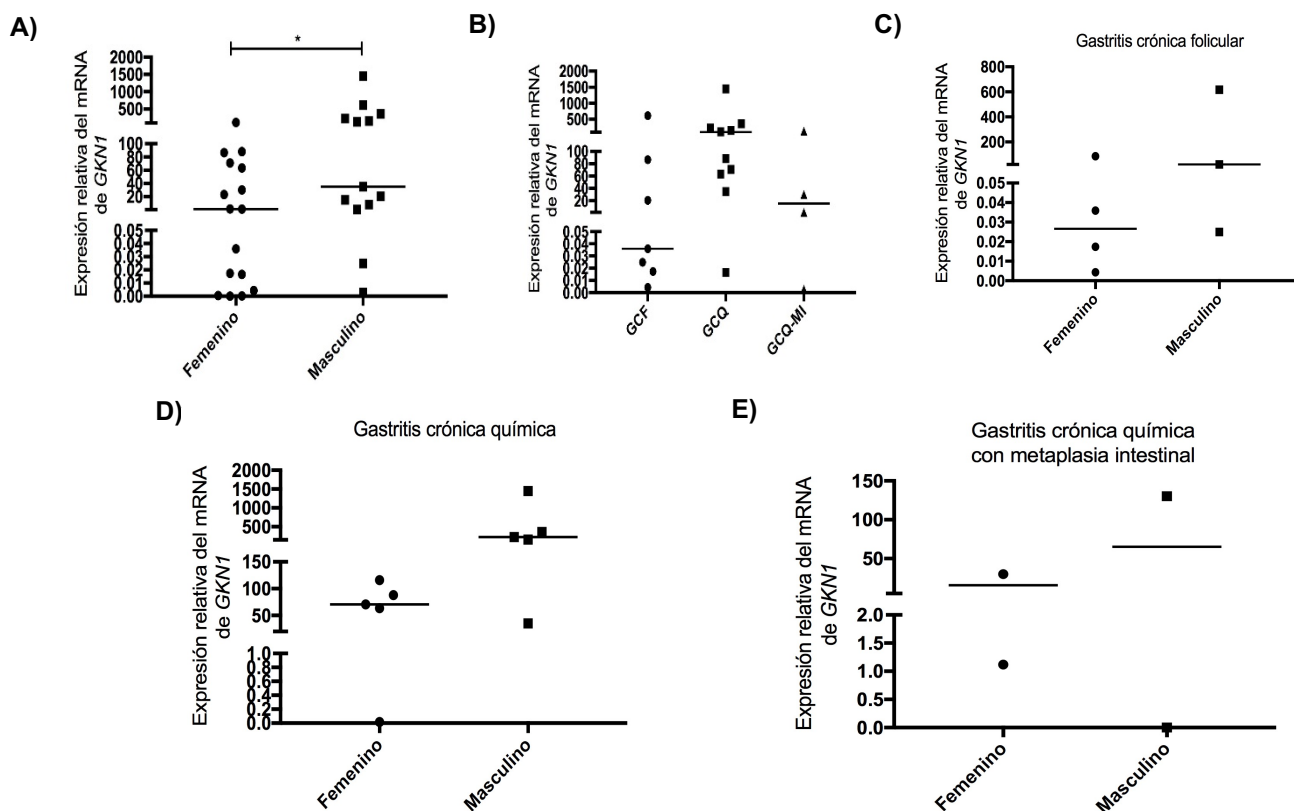
## Expresión de GKN1 en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico

El mRNA de *GKN1* se expresa diferencialmente entre los tres grupos de pacientes ( $p=0.042$ ; Figura 1A). Entre los pacientes con gastritis crónica, la expresión del mRNA de *GKN1* fue significativamente mayor en comparación con los enfermos de cáncer gástrico ( $p=0.013$ , Figura 1A). La expresión de la proteína GKN1 fue mayor en los pacientes con gastritis crónica en comparación con la encontrada en tejido gástrico normal (Figura 1B-C). En los pacientes con cáncer gástrico no se detectó la proteína (Figura 1D).



**Figura 1. Expresión relativa del mRNA de *GKN1* y nivel de proteína en tejido gástrico.** A) Nivel de mRNA de *GKN1* determinado por RT-qPCR en muestras de tejido sano, gastritis crónica y cáncer gástrico; B, C y D) Expresión de GKN1 en mucosa gástrica normal, pacientes con gastritis crónica y con cáncer gástrico, respectivamente. E) Análisis densitométrico de la expresión de GKN1 M= muestra, A= Tejido adyacente al tumor, T= Cáncer gástrico. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

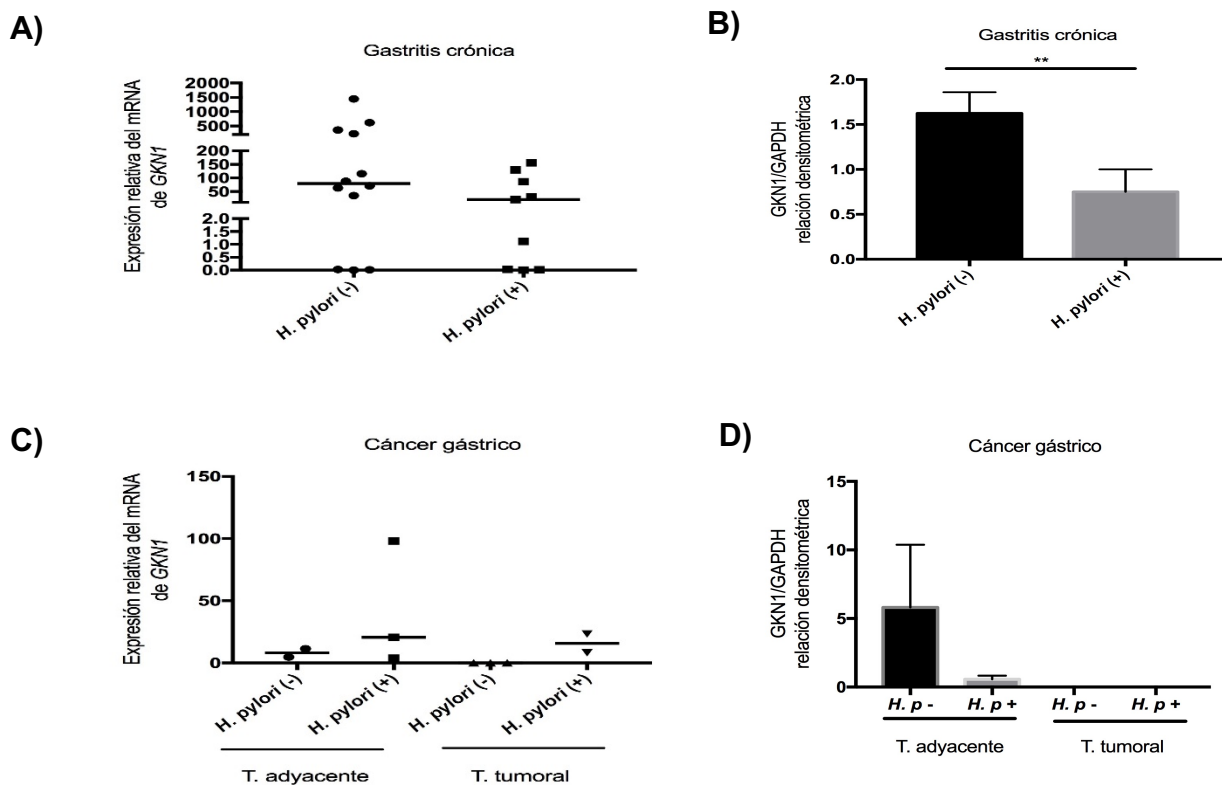
La expresión del mRNA de *GKN1* estuvo significativamente disminuida en las mujeres en comparación con los hombres ( $p=0.046$ ; Figura 2A). De los 21 casos de gastritis crónica el 47.62% (10/21) tenían gastritis crónica química, el 33.33% (7/21) gastritis crónica folicular y el 19.05% (4/21) gastritis crónica química con metaplasia intestinal. El nivel de transcrito de *GKN1* fue menor entre los pacientes con gastritis crónica folicular en comparación con los que tenían gastritis crónica química ( $p=0.087$ ; Figura 2B). La expresión del mRNA de *GKN1* fue menor entre las mujeres que padecían cualquier tipo de gastritis crónica (Figura 2C-E).



**Figura 2. Expresión del mRNA de *GKN1* por género y tipo de gastritis.** A) Nivel de mRNA de *GKN1* en tejido gástrico. B) mRNA de *GKN1* por tipo de gastritis: gastritis crónica folicular (GCF), gastritis crónica química (GCQ) y gastritis crónica química con metaplasia intestinal (MI). C-E) nivel del mRNA de *GKN1* en pacientes del género femenino y masculino, clasificados por tipo de gastritis.

### Expresión de GKN1 e infección por *H. pylori*

La expresión del mRNA y de proteína de GKN1 fue mayor en la mucosa gástrica de pacientes con gastritis crónica sin infección por *H. pylori* en comparación con los infectados (Figura 3A y 3B). En cáncer gástrico, el nivel de transcrito de *GKN1* fue mayor entre los *H. pylori*-positivos. En pacientes con cáncer gástrico, GKN1 sólo se detectó en el tejido adyacente al tumor y su expresión fue mayor entre los *H. pylori*-negativos (Figura 3C y 3D).



**Figura 3. Expresión de GKN1 en mucosa gástrica de pacientes con gastritis crónica o con cáncer gástrico con y sin infección por *H. pylori*.** A y C) Nivel de mRNA de *GKN1* en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico, respectivamente. B y D) Cuantificación densitométrica de GKN1 normalizada con GAPDH.

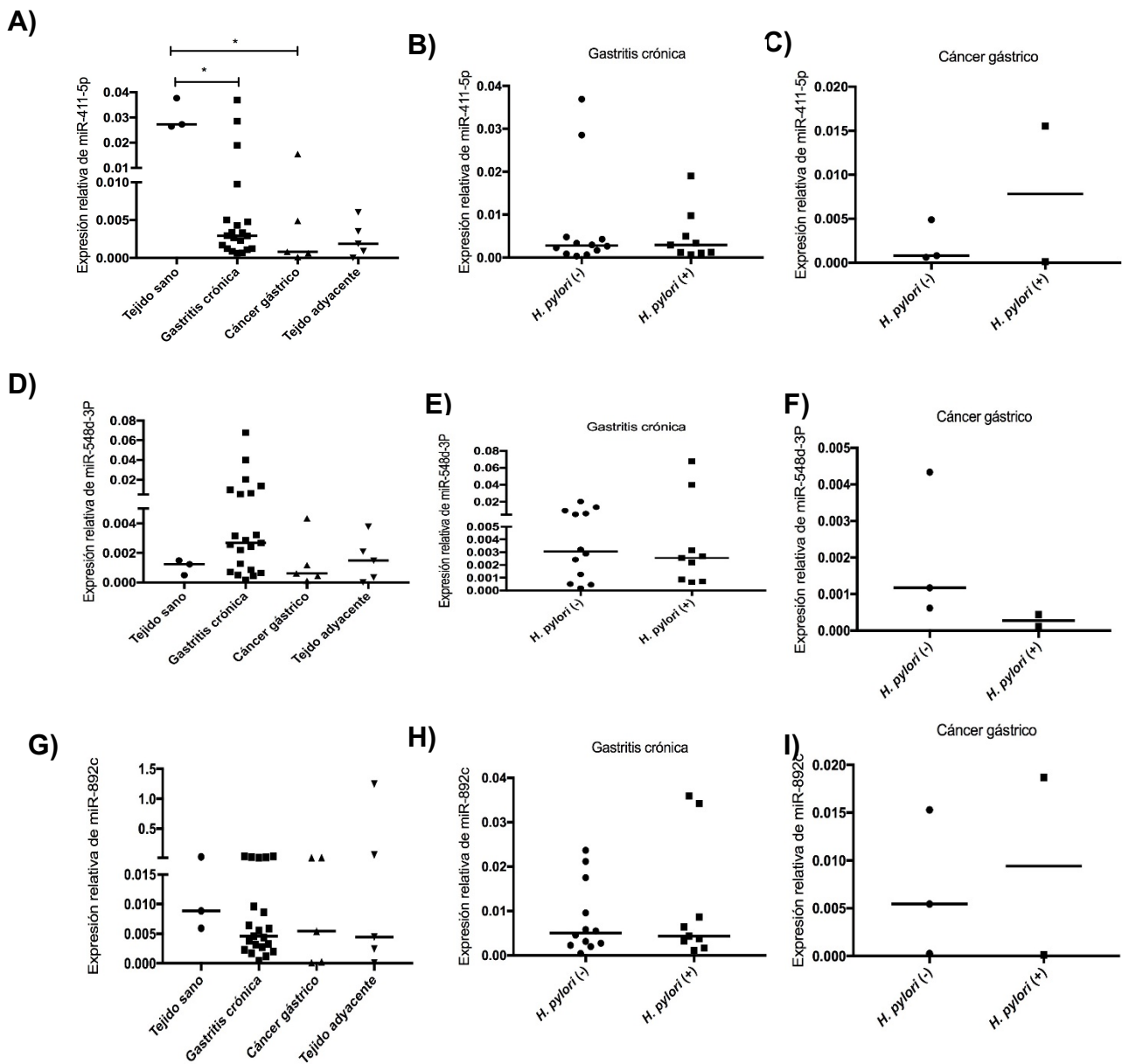
### **Expresión de miR-411-5p, miR-548d-3p y miR-892c en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico con y sin infección por *H. pylori***

No se encontraron diferencias significativas en la expresión de miR-548d y miR-892c entre los pacientes con gastritis crónica en comparación con los de cáncer gástrico. La expresión de miR-411-5p fue menor entre los pacientes con gastritis crónica en comparación con los sujetos sanos ( $p=0.012$ ). La expresión de miR-411-5p fue significativamente diferente entre los pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico en comparación con los sujetos sanos ( $p= 0.048$ ; Figura 4A).

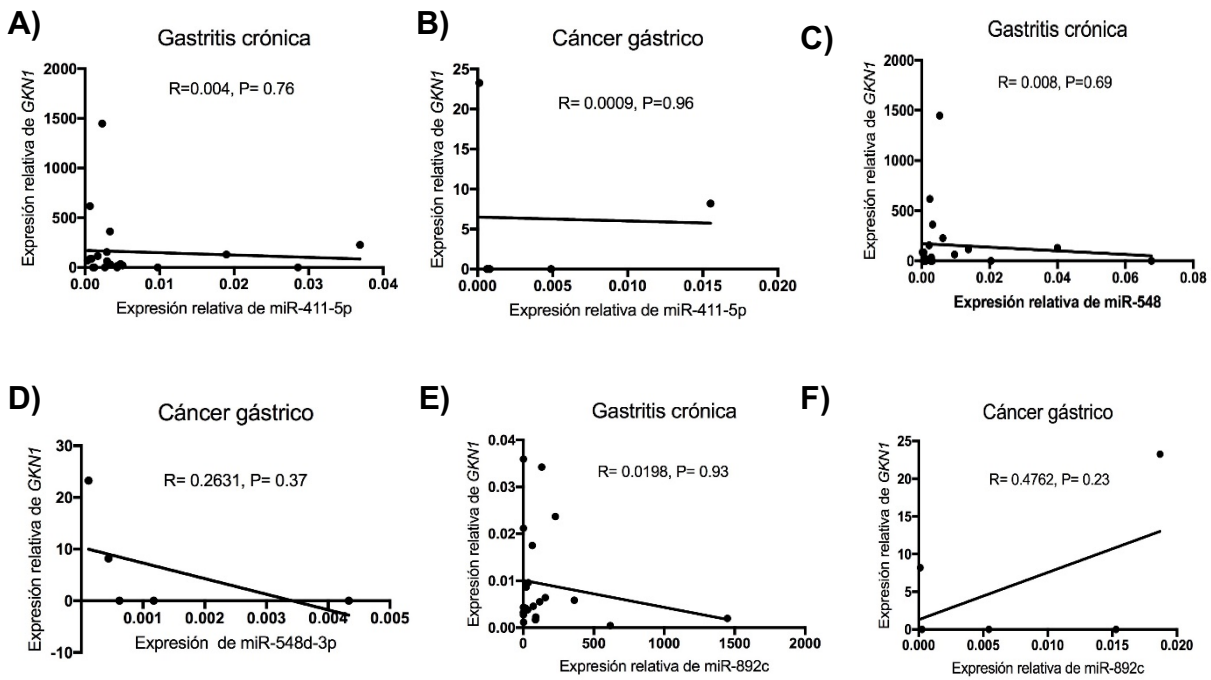
No se observaron cambios en los niveles de expresión de miR-411-5p, miR-548d-3p y miR-892c entre los pacientes con gastritis crónica o con cáncer gástrico *H. pylori*-negativos y *H. pylori*-positivos, (Figura 4).

### **Relación entre la expresión de miRNAs y el nivel de transcrito de *GKN1* en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico**

La expresión de miR-411-5p, miR-548d-3p y miR-892 no se relaciona con el nivel de mRNA de *GKN1* en los pacientes con gastritis crónica o con cáncer gástrico, (Figura 5).



**Figura 4. Nivel de expresión de miR-411-5p, miR- 548d-3p y miR-892c en mucosa gástrica de pacientes con gastritis crónica o cáncer gástrico, con y sin infección por *H. pylori*.** A-C) Expresión de miR-411-5p en muestras de mucosa gástrica normal, gastritis crónica y cáncer gástrico medida por RT-qPCR. En pacientes con gastritis crónica o con cáncer gástrico el nivel de miRNAs se distribuyó entre infectados y sin infección por *H. pylori*, respectivamente. D-F) La expresión de miR-548d-3p se midió en muestras de mucosa gástrica sana, con gastritis crónica y con cáncer gástrico. En pacientes con gastritis crónica o cáncer gástrico los pacientes se agruparon en infectados y sin infección por *H. pylori*. G-I) Expresión de miR-892c en mucosa gástrica sana, gastritis crónica y cáncer gástrico. En gastritis crónica y cáncer gástrico se graficaron los niveles de mRNA en pacientes infectados y sin infección por *H. pylori*.



**Figura 5. Relación entre la expresión de miR-411-5p, miR-548d-3p, miR-892c y *GKN1* en mucosa gástrica.** A) Relación entre el nivel de miR-411-5p y mRNA de *GKN1* en gastritis crónica y B) Cáncer gástrico. C) Relación entre el nivel de expresión de miR-548d-3p y mRNA de *GKN1* en gastritis crónica y D) Cáncer gástrico. E) Relación entre el nivel de expresión de miR-892c y con el transcrito de *GKN1* en gastritis crónica y F) Cáncer gástrico.

## VI. Discusión

GKN1 es una proteína específica del estómago, que desempeña un papel importante en la renovación de la mucosa gástrica. Gkn1 disminuye en pacientes con infección por *H. pylori* y en tejido con cáncer gástrico (Menheniott *et al.*, 2013; Yoon *et al.*, 2014). En este estudio, se evaluó la expresión de miR-411-5p, miR-548d-3p, miR-892c y GKN1 en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico. Este es el primer trabajo en el que se analiza la expresión de estos miRNAs, GKN1 y su relación con la infección por *H. pylori*.

Se encontró que el mRNA de *GKN1* se expresa diferencialmente en mucosa gástrica normal, con gastritis crónica y con cáncer gástrico ( $p=0.042$ ). La expresión de GKN1 fue mayor en el nivel de mRNA y de proteína, en pacientes con gastritis crónica. En el grupo de cáncer gástrico no se detectó GKN1 a nivel de proteína. Estos hallazgos están en acuerdo con lo reportado por Shiozaki *et al.*, (2001), Nardone *et al.*, (2007), Mao *et al.*, (2012) y Guo *et al.*, (2014) quienes encontraron disminución progresiva en la expresión de GKN1 a partir de lesiones precancerosas y ausencia en pacientes con cáncer gástrico. La mayor expresión de GKN1 entre los pacientes con gastritis crónica podría explicarse por el hecho de que, al haber daño en la mucosa gástrica causado por la inflamación, GKN1 ejerce su función protectora promoviendo la restitución y la proliferación de las células epiteliales gástricas. De esta forma GKN1 modula la reparación de la integridad de la mucosa gástrica (Toback *et al.*, 2003; Baus-Loncar *et al.*, 2007). Por otro lado, la baja o nula expresión de GKN1 a nivel de mRNA y proteína, puede ser el resultado del daño crónico de la mucosa gástrica, lo que provoca una pérdida y/o sustitución de glándulas del epitelio gástrico (Carrasco *et al.*, 2012), en consecuencia, no habrá células de la mucosa gástrica superficial que expresen GKN1 (Menheniott *et al.*, 2013).

La expresión del mRNA de *GKN1* fue menor en las mujeres en comparación con los hombres ( $p=0.046$ ). Estos hallazgos sugieren que las hormonas femeninas podrían estar involucradas en la disminución de la expresión del mRNA de *GKN1*. Hasta donde es de nuestro conocimiento, no se ha descrito la influencia de las



hormonas sexuales sobre la expresión de GKN1, sin embargo, algunos estudios han propuesto que los estrógenos pueden tener un efecto protector en el desarrollo del cáncer gástrico (Lindblad *et al.*, 2004; Chandanos *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2016; Nie *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2018), sin embargo, el mecanismo subyacente a este efecto no está claro. El estrógeno actúa sobre las células a través de sus receptores intracelulares que regulan la expresión de sus genes blanco; se ha reportado que el estrógeno estimula la expresión de proteínas Trefoil (TFF) en el estómago. Las TFF juegan un papel clave en la protección de la mucosa, inducen la restitución del epitelio gástrico después del daño y la reparación de la mucosa (Lindblad *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2016). Al igual que las TFF, GKN1 es una proteína involucrada en el mantenimiento de la integridad de la mucosa gástrica, por lo que es probable que los estrógenos tengan un efecto parecido al que se ha descrito para las proteínas Trefoil. Por otro lado, es probable que, en las mujeres, la expresión del mRNA de *GKN1* esté influida por el estatus hormonal. El promedio de edad en este grupo fue de 56 años y, considerando que la menopausia puede iniciar a los 45 años, estas mujeres podrían tener bajos niveles de estrógenos y en consecuencia la expresión de GKN1 disminuiría. Se requieren de otros estudios para determinar si los estrógenos están involucrados en la regulación de la expresión de GKN1.

Por otro lado, la expresión del mRNA de GKN1 fue menor en pacientes con gastritis crónica folicular en comparación con pacientes con gastritis crónica química ( $p=0.087$ ). A pesar de que las diferencias no fueron significativas, el nivel de expresión de GKN1 en este grupo de pacientes, está en acuerdo con los hallazgos histopatológicos. Se ha reportado que la gastritis crónica folicular es causada por *H. pylori* y se caracteriza por tener mayor actividad inflamatoria (Shimatani *et al.*, 2005), a diferencia de esta, la gastritis crónica química se da por el uso de AINES, o por otros daños químicos y la infiltración inflamatoria crónica que se presenta es de bajo grado. El nivel de mRNA de *GKN1* fue menor en aquellos pacientes cuyo diagnóstico histopatológico refería metaplasia intestinal, lo que se explica por la sustitución de células de la mucosa gástrica por células con fenotipo intestinal en el tejido con metaplasia (Rugge *et al.*, 2011).

La infección por *H. pylori* juega un papel importante en la carcinogénesis gástrica (Goral., 2016). La expresión del mRNA de *GKN1* en pacientes con gastritis crónica son similares a los reportados previamente en mucosa gástrica infectada por *H. pylori*. Se ha reportado que la expresión del mRNA de *GKN1* es menor en mucosa infectada, en comparación con la mucosa gástrica sin *H. pylori*. En pacientes con cáncer gástrico, *GKN1* se encuentra disminuida o ausente (Nardone *et al.*, 2008 y Guo *et al.*, 2014). En pacientes con cáncer gástrico se encontró mayor expresión del mRNA de *GKN1* entre los positivos a la infección por *H. pylori*, resultado que está en desacuerdo con la información publicada. No podemos descartar la probabilidad de que la ausencia de infección se deba a que se tomó solo una biopsia de cada paciente para hacer la detección del DNA de *H. pylori*. El sistema Sydney recomienda usar 4 biopsias para el diagnóstico de infección por *H. pylori*, a fin de evitar resultados falsos negativos (Dixon *et al.*, 1997). Por otra parte, también es probable que la infección no se haya detectado debido a que la zona de la mucosa de donde se obtuvo la biopsia no tuviera la densidad bacteriana requerida para su detección y que, en consecuencia, se hayan registrado resultados falsamente negativos a la infección (Stolte and Meining., 2001; Goral., 2016).

Este es el primer estudio en el que se analiza la expresión de miR-548d-3p y miR-892c en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico, la expresión de los tres miRNAs se encontró disminuida y no se observaron cambios con respecto a la infección por *H. pylori*. Los datos encontrados de la expresión de miR-892c difieren con lo reportado por Hasegawa *et al.*, (2018), quienes reportaron que este miRNA estaba sobreexpresado en muestras de pacientes con cáncer de próstata. La expresión de los miRNAs es tiempo-tejido específica (Guo *et al.*, 2014), lo que explica estas diferencias. Por otro lado, en la presente investigación se encontró que la expresión de miR-411-5p fue significativamente menor en pacientes con gastritis crónica en comparación con los de mucosa normal. No se encontraron cambios en el nivel de expresión de los miRNAs en pacientes con gastritis crónica y cáncer gástrico infectados con *H. pylori*, lo cual sugiere que, *H. pylori* no induce cambios en la expresión de estos miRNAs.

## **VII. Conclusiones**

Los resultados indican que *H. pylori* no modifica la expresión de miR-411-5p, miR-548d-3p, miR-892c y que la expresión de estos miRNAs no se correlaciona con el nivel de transcrito de *GKN1* tanto en pacientes con gastritis crónica o con cáncer gástrico. La expresión del mRNA de GKN1 es mayor en el género masculino.

## VIII. Referencias

**Agarwal, V.**, Bell, G-W., Nam, J-W., and Bartel, D. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *e-LIFE*. 1-38.

**Altieri, F.**, Di stadio, C-S., Federico, A., Miselli, G., De Palma, M., Rippa, E., *et al.* (2017). Epigenetic alterations of gastrokine 1 gene expression in gastric cancer. *Oncotarget*. 1-13.

**Baus-Loncar, M.**, Lubka, M., Pusch, C.M., Otto, W.R., Poulson, R., and Blin, N. (2007). Cytokine regulation of the Trefoil factor family finding protein GKN2 (GDDR/TFIZ1/blottin) in human gastrointestinal epithelial cells. *Cellular physiology and biochemistry*. 20:193-204.

**Carrasco, G.**, and Corvalan, A-H. (2012). *Helicobacter pylori*-induced chronic gastritis and assessing risks for gastric cancer. *Gastroenterology research and practice*. 2013; 1-9.

**Companioni, O.**, Sanz-Anquela, J-M., Pardo, M-L., Puigdecamet, E., Noneli, L, García, N., *et al.* (2017). Gene expression study and pathway analysis of histological subtypes of intestinal metaplasia that progress to gastric cancer. *Plos one*, 1-18.

**Cheng, X.J.**, Lin, C.J., and Tu, S.P. (2016). Etiology and prevention of gastric cancer. *Gastrointest Tumors*. 3:25-36.

**Choi W.S.**, Seo H.S., Song K.Y., Yoon J.H., Kim O., Nam S.W. *et al.* (2013). Gastrokine 1 expression in the human gastric mucosa is closely associated with the degree of gastritis and DNA methylation, *Journal of gastric cancer*.13 (4): 239

**Chomczynski, P.**, and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. 162, 156-159.

**Ferlay, J.**, Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., *et al.* (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*.136 (5)

**Ferreira, M.R.**, Machado, J.C., and Figueiredo, C. (2014). Clinical relevance of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes in gastric carcinoma. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*.28: 1003-1015.

**GLOBOCAN/International** Agency for Research on Cancer. World Health Organization. GLOBOCAN (2012). Disponible en: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx). Consultado el 28 de Octubre del 2016.

**GLOBOCAN/International** Agency for Research on Cancer. World Health Organization. GLOBOCAN (2012). Disponible en: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx). Consultado el 30 de Octubre del 2016.

**Goral, V.** (2016). Etiopathogenesis of gastric cancer. *Biomed research international*. 2017; 1-6.

- Guo, X-Y.**, Dong, L., Qin, B., Jiang, J., and Shi, A-M. (2014). Decreased expression of gastrokine 1 in gastric mucosa of gastric cancer patients. *World Journal of Gastroenterology*. 28;20(44):16702-16706.
- Hasegawa, T.**, Glavich, G-J., Pahuski, M., Short, A., Semmes, O-J., Yang, L., et al. (2018). Characterization and evidence of the miR-888 cluster as a novel cancer network in prostate. *Molecular cancer research*. 1-37.
- Hayashi, Y.**, Tsuji, M., Wang, J., Kondo, J., Akasaka, Y-J., and Li, W. (2013). CagA mediates epigenetic regulation to attenuate let-7 expression in *Helicobacter pylori*-related carcinogenesis. *Gut*. 62: 1536-1546.
- Karimi, P.**, Islami, F., Anandasabapathy, S., Freedman, ND. and Kamangar, F. (2014). Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. *Cancer Epidemiology Biomarkers Preventions*; 23: 700-713.
- Khadir, M-E.**, Boukhris, S-A., Benajah, D-A., Rhazi, K-E., Ibrahimi, A., Abkari, M-E., et al. (2017). *VacA* and *CagA* status as biomarker of two opposite end outcomes of *Helicobacter pylori* infection (gastric cancer and duodenal ulcer) in a Moroccan population. *Public Library of Science one*.1-14.
- Kim, O.**, Yoon, J.H., Choi, W.S., Ashktorab, H., Smoot, D.T., Nam, S.W., et al. (2014). GKN2 contributes to the homeostasis of gastric mucosa by inhibiting GKN1 activity. *Journal of Cellular Physiology*. 762-768.
- Kim, O.**, Yoon, J.H., Chol, W.S., Ashktorab, H., Smoot, D.T., Nam, S.W., et al. (2016). Gastrokine 1 inhibits gastrin-induced cell proliferation. *Gastric Cancer*. 19: 381-391.
- Kim, S-M.**, Min, B-H., Lee, J., An, J-Y., Lee, J-H., Sohn, T-S., et al. (2018). Protective effects of female reproductive factors on Lauren intestinal-type gastric adenocarcinoma. *Yonsei medical journal*. 59 (1):28-34.
- Lamb, A.**, and Chen, L-F. (2013). Role of the *Helicobacter pylori*-induced inflammatory response in the development of gastric cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*. 114:491-497.
- Likhite, N.**, and Warawdekar, U-M. (2011). A unique method for isolation and solubilization of proteins after extraction of RNA from tumor tissue using trizol. *Journal of Biomolecular technique*. 22:37-44.
- Lindblad, M.**, Ye, W., Rubio, C., and Lagergren, J. (2004). Estrogen and risk gastric cancer: a protective effect in a nationwide cohort study of patients with prostate cancer in Sweden. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*. 13(12) 2203-2207.
- Link, A.**, Kupcinskis, J., Wex, T., and Malfertheiner, P. (2012). Macro-role of microRNA in gastric cancer. *Digestive diseases*. 30:255-267.
- Mao, W.**, Chen J., Peng T-L., Yin X-F., Chen L-Z. and Chen M-H. (2012c). Role of trefoil factor 1 in gastric cancer and relationship between trefoil factor 1 and gastrokine 1. *Oncology Reports*. 28: 1257-1262.
- Mao, W.**, Chen J., Peng T-L., Yin X-F., Chen L-Z. y Chen M-H. (2012b). Downregulation of gastrokine-1 in gastric cancer tissues and restoration of its expression induced gastric cancer cells to apoptosis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 31:49.

- Menheniott, TR.,** Kurklu, B., and Giraud, AS. (2013). Gastrokines: stomach-specific proteins with putative homeostatic and tumor suppressor roles. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology.* 304: G109–G121.
- Nardone, G.,** Martin, G., Rocco, A., La Monica, G., Rippa, E., Caruso, F., *et al.*, (2008).Molecular expression of Gastrokine 1 in normal mucosa and in *Helicobacter pylori*-related preneoplastic and neoplastic gastric lesions. *Cancer Biology & Therapy.*7 (12); 1890-1895.
- Nardone, G.,** Rippa, E., Martin, G., Rocco, A., Siciliano, RA., Fiengo, A., *et al.* (2007). Gastrokine 1 expression in patients with and without *Helicobacter pylori* infection. *Digestive and liver disease.* 39(2):122–9.
- Nie, X.,** Xie, R., and Tuo, B. (2018). Effects of estrogen on the gastrointestinal tract. 63 (3): 583-596 *Digestive diseases and sciences.* 63(3):583-596.
- Noto, J-M.,** and Peek. R-M. (2012). The role of microRNAs in *Helicobacter pylori* pathogenesis and gastric carcinogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology.* 1:1-19.
- Park, J.Y.,** Karsa L.V., Herrero R. (2014). Prevention strategies for gastric cancer: A global perspective. *Clinical Endoscopy.* 47: 478-489.
- Rippa, E.,** La, Monica, G., Allocca, R., Romano, M.F., De Palma M., and Arcari P. (2011). Overexpression of gastrokine 1 in gastric cancer cells induces Fas-mediated apoptosis. *Journal Cellular Physiology.* 226(10):2571–8
- Rossi, A-F.,** Cadamuro, A-C., Périco, J-M., Leite, K-R., Severino, F-E., Reis, P-P., *et al.* (2016). Interaction between inflammatory mediators and miRNAs in *Helicobacter pylori* infection. *Cellular microbiology.* 18 (10), 1444-1458.
- Rugge, M.,** Pennelli, G., Piloizzi, E., Fassan, M., Ingravallo, G., Russo, V., *et al.* (2011). Gastritis: the histology report. *Digestive and liver disease.* 43S: S373-S384.
- Schetter, A-J.,** Heegaard, N-H., and Harris, C-C. (2010). Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis.*Vol. 31, 37-49.
- Shimizu, T.,** Marussawa, H., Watanabe, N., and Chiba, T. (2015). Molecular pathogenesis of *Helicobacter pylori*- related gastric cancer. *Gastroenterology Clinical N American.* 1-13.
- Shiozaki, K.,** Nakamori, S., Tsujie, M., Okami, J., Amamoto, H., Nagano, H., *et al.* (2001). Human stomach-specific gene, CA11, is down-regulated in gastric cancer. *International journal of oncology.* 19: 701-707.
- Toback, G-F.,** Walsh-Reitz, M-M., Musch, M-W., Chang, E-B., Del Valle., J., Ren., H., *et al.* (2003). Peptide fragments of AMP-18, a novel secreted gastric antrum mucosal protein, are mitogenic and motogenic. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology.* 285:G344-G353.
- Wagih, H.M.,** El-Ageery, S.M., and Alghaithy, A.A. (2015). A study of RUNX3, E-cadherina and  $\beta$ -catenina in CagA-positive *Helicobacter pylori* associated chronic gastritis in Sauri patients. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* 19: 1416-1429.
- Walsh-Reitz, M.M.,** Huang, E.F., Musch, MW., Chang, E.B., Martin, T.E., Kartha, S., *et al.* (2005). AMP-18 protects barrier function of colonic epithelial cells: role of tight junction proteins. *American Journal Physiology Gastrointest Liver Physiology* 289:G163–G171.

- Wang, F.**, Meng, W., Wang, B., and Qiao, L. (2014). *Helicobacter pylori*- induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer letters*. 345: 196-202.
- Wang, Z.**, Butler, L-M., Wu, A-H., Koh, W-P., Jin, A., Wang, R., et al. (2016). Reproductive factors, hormone use and gastric cancer risk: the Singapore chinese health study. *International journal of cancer*. 138; 2837-2845.
- Wu, WKK.**, Lee, CW., Cho, CH., Fan, D., Wu, K., Yu, et al. (2010). MicroRNA dysregulation in gastric cancer: a new player enters the game. 29, 5761-5771.
- Xing, R.**, Li, W., Cui, J., Zhang, J., Kang, B., Wang, Y., et al. (2012). Gastrokine 1 induces senescence through p16/Rb pathway activation in gastric cancer cells. *Gut*. 64:43–52.
- Yang, Y-J.**, and Sheu, B-S. (2016). Metabolic interaction of *Helicobacter pylori* infection and gut microbiota. *Microorganisms*. 4:2-10.
- Yang, Z-M.**, Chen, W-W., and Wang, Y-F. (2012). Gene expression profiling in gastric mucosa from *Helicobacter pylori*-infected and uninfected patients undergoing chronic superficial gastritis. *Public Library of Science one*. 4: 1-12.
- Yong-zheng, X.**, Wan-li, M., Ji-ming, M., and Xue-qun, R. (2015). Receptor for activated protein kinase C 1 suppresses gastric tumor progression through nuclear factor-kB pathway. *Indian journal of cancer*. 3: E172-5
- Yoon, J-H.**, Choi, W-S., Kim, O., Choi, S-S., Lee, E-K., Nam, S-W., et al. (2015). NKX6.3 controls gastric differentiation and tumorigenesis. *Oncotarget*. 6 (29): 28425-24839.
- Yoon, J-H.**, Choi, W.S., Kim, O., Choi, B.J., Nam, S.W., Lee, J.Y., et al. (2016). Gastrokine 1 inhibits gastric cancer cell migration and invasion by downregulating RhoA expression. *Gastric Cancer*. 1-10.
- Yoon, J-H.**, Kang, YH., Choi, YJ., Park, IS., Nam, SW., Lee, JY., et al. (2011a). Gastrokine 1 functions as a tumor suppressor by inhibition of epithelial-mesenchymal transition in gastric cancers. *Journal Cancer Research Clinical Oncology*.137(11):1697–704.
- Yoon, JH.**, Song, J.H., Zhag, C., Jin, M., Hwi Kang, Y., Suk, W.N., et al.(2011b). Inactivation of the Gastrokine 1 gene in gastric adenomas and carcinomas. *Journal of Pathology*. 223:618-625.
- Yu, B-Q.**, Su, L-P., Li, J-F., Cai, Q., Yan, M., Chen, X-H., et al. (2012). microRNA expression signature of gastric cancer cells relative to normal gastric mucosa. *Molecular medicine reports*. 6: 821-826.
- Zhang, Z.**, Li, Z., and Zang A. (2014). MicroRNA and signaling pathways in gastric cancer. *Cancer gene therapy*.21, 305-316.
- Zhu, Y.**, Jiang, Q., Lou, Q., Ji, X., Wen, Z., Wu, Z., et al. (2012). MicroRNAs Up-regulated by CagA of *Helicobacter pylori* induce intestinal metaplasia of gastric epithelial cells. *Plos One*. 7: 1-10.

