

Expertos Invitados

PATOGENIA GENETICA DEL CANCER COLORRECTAL. ACTUALIZACION



**Columnista Experto de SIIC
Dr. John P. Lynch**

Assistant Professor. Specialization field: Gastroenterology, Filadelfia, EE.UU.

Cada año fallecen cerca de 60 000 hombres y mujeres por cáncer colorrectal en los Estados Unidos, por lo cual es la segunda causa principal de muerte por cáncer. El estudio *Global Burden of Disease* estimó que en el año 2000 el cáncer de colon fue responsable del fallecimiento de cerca de medio millón de personas en el mundo.¹ Debido a estas cifras, esta neoplasia ha sido el centro de atención de intensas investigaciones. La investigación clínica básica realizada durante tres décadas ha arrojado ideas extraordinarias en cuanto a la base genética del cáncer colorrectal que ya han comenzado a tener influencia en el cuidado y atención de los pacientes. En los tres años que han transcurrido desde que revisamos este aspecto para *Hematology/Oncology Clinics of North America*,² hemos observado diversos avances, como la instauración de terapias de quimioprevención aprobadas para pacientes con poliposis adenomatosa familiar (PAF),³⁻⁵ el reconocimiento de un nuevo síndrome de cáncer de colon familiar –la poliposis adenomatosa MYH (PAM)–,⁶⁻⁹ la adopción de nuevas modalidades de pesquisa para el cáncer de colon¹⁰⁻¹¹ y el empleo de terapéuticas biológicas novedosas dirigidas hacia esta neoplasia.¹² Este trabajo recopila los conceptos principales de nuestro estudio previo e informa sobre los avances importantes ocurridos desde su publicación.

Conceptos de tumorigénesis colorrectal

Secuencia adenoma-carcinoma

La mayoría de los cánceres colorrectales de los seres humanos surgen de masas displásicas pero no malignas en el colon, llamadas adenomas.^{2,13-16} Los pólipos adenomatosos se forman en el colon cuando los mecanismos que regulan la renovación del epitelio se interrumpen o desorganizan.² En los adenomas, estos mecanismos normales se van interrumpiendo progresivamente a medida que su tamaño y el grado de displasia se incrementan. La secuencia adenoma-carcinoma describe esta progresión desde la mucosa normal hasta el carcinoma invasivo y está bien avalada por numerosos estudios patológicos, epidemiológicos, clínicos observacionales y en animales.^{2,13-16}

Los focos crípticos aberrantes (FCA) son lesiones microscópicas que se cree son el paso intermedio entre la mucosa colónica normal y el pólipo adenomatoso.¹⁷⁻¹⁹ La mayoría de los FCA son hiperplásicos (65% a 95%), aunque en una proporción significativa son displásicos y similares a los adenomas.^{20,21} El análisis genético de los FCA identificó mutaciones que se observan típicamente en los pólipos adenomatosos.^{17,20,22-28} Debido a que se considera que los FCA son las lesiones precursoras más tempranas en la progresión hacia el cáncer de colon se los está empleando como biomarcadores tempranos para neoplasia, tanto en estudios en animales como en seres humanos.

La carcinogénesis colónica es un proceso progresivo

Las herramientas de la biología molecular ayudaron a establecer que la carcinogénesis colónica es un proceso escalonado.^{2,14,29,30} En cada paso del proceso se adquieren mutaciones somáticas o epigenéticas en el ADN celular. Es más probable que los fenómenos de mutación sean silentes, o que sean perjudiciales para la supervivencia de la célula, en vez de promover la neoplasia.

Sin embargo, algunas mutaciones activan vías promotoras del crecimiento (por ejemplo oncogenes) o inactivan supresores tumorales y vías apoptóticas.^{31,32} Estas clases de mutaciones aportan una ventaja en la supervivencia, lo que conduce a la expansión clonal y a la formación de una masa.^{33,34} En una revisión fundamental sobre las características sobresalientes del cáncer, Hanahan y Weinberg³² describieron seis características cardinales necesarias para la carcinogénesis, como la autosuficiencia en las señales proliferativas, la insensibilidad a las señales antiproliferativas, la evasión de las señales apoptóticas normales, el automantenimiento de la angiogénesis, la invasión tisular y metástasis, y finalmente, el potencial ilimitado de duplicación. De esta manera, es la combinación de las mutaciones del ADN y la selección natural la que básicamente conduce a la evolución de un clon celular que ha adquirido estas seis características y que han sido exitosas para la transformación en una célula cancerosa.^{33,34} Hanahan y Weinberg sugirieron además que las células cancerosas podrían adquirir estas características esenciales a través de vías temporal y mecánicamente distintivas. Esto pareció sugerir un gran grupo de vías posibles por las cuales un colonocito podría alcanzar su transformación neoplásica. Esto difirió marcadamente de una hipótesis previa de Fearon y Vogelstein,³⁵ quienes en 1990 sugirieron que los pasos hacia la carcinogénesis eran limitados; que ciertas mutaciones en los genes eran adquiridas con frecuencia y en un orden específico. Desde entonces numerosos estudios han avalado y mejorado posteriormente el modelo de Vogelstein.^{2,30} A pesar de su amplia aceptación, este modelo no puede explicar las diferencias considerables que se reconoce que existen entre los cánceres. Quizás una síntesis de estos modelos puede probar ser el mejor abordaje (figura 1). En numerosos estudios se vio que la invasión del tejido es una característica tardía de la carcinogénesis del colon, mientras que el incremento de la proliferación y la reducción de la apoptosis se observan con frecuencia en forma temprana en los FCA.^{24-26,28,36-39}

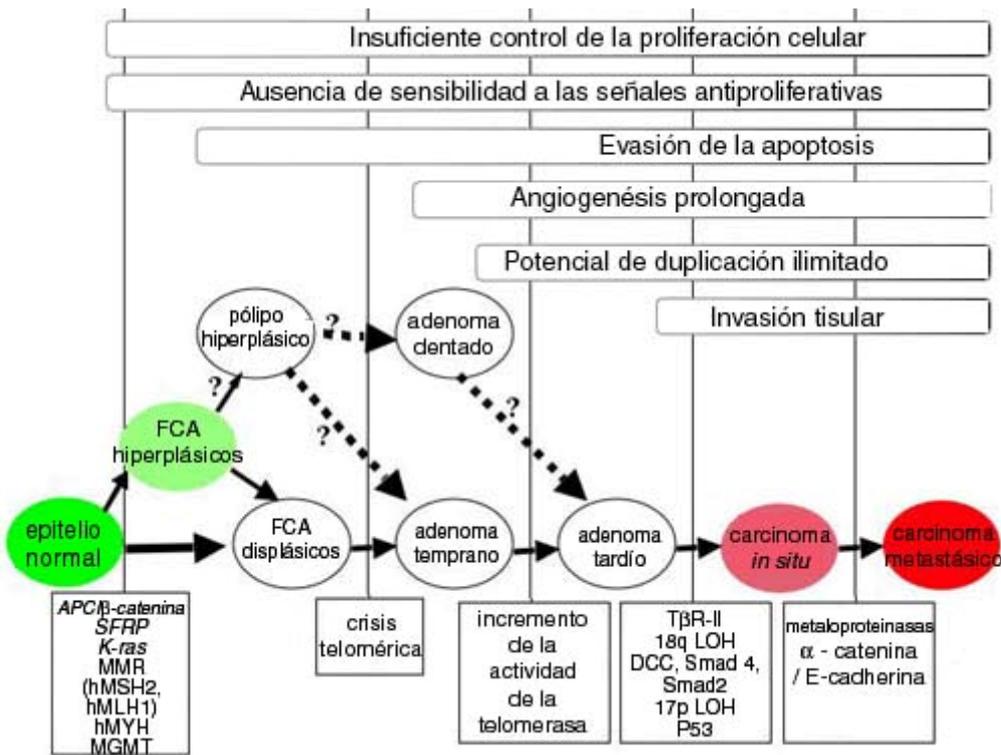


Figura 1.

Progresión escalonada hacia la carcinogénesis del colon humano. Según las características morfológicas, la progresión desde la mucosa colónica normal hasta el carcinoma aparece en forma de un patrón bastante predecible. Los focos crípticos aberrantes (FCA) displásicos son los precursores más tempranos; sin embargo, datos recientes sugieren que los pólipos y los FCA hiperplásicos podrían progresar hacia FCA displásicos y adenomas. Además, diversos fenómenos genéticos se pueden observar con frecuencia en pasos similares de la vía. La inestabilidad genética, con inclusión de los defectos en CIN, MIN y BER, y la mutagénesis epigenética se presentan, de manera característica, durante el estadio inicial de la progresión y proveen un entorno permisivo para que las células adquieran mutaciones adicionales, lo que provoca la adquisición de caracteres necesarios para la transformación carcinogénica. Durante esta progresión, diversas vías de regulación y de señalización son blancos frecuentes en cualquiera de sus niveles, lo que puede alterar su expresión o función. Estas vías incluyen, entre otras, la Wnt/APC/β-catenina, BMP/TGF-β/SMAD, Src, y K-ras.

La angiogénesis y el potencial de duplicación ilimitado se hallan por lo general incrementados en

los pólipos tempranos a tardíos.⁴⁰⁻⁴² En resumen, la transformación neoplásica es un proceso escalonado en el cual las mutaciones del ADN y la selección clonal resultan en la evolución de una célula que expresa las características comunes a todas las células cancerosas.

Síndromes familiares de cáncer de colon

El estudio de los síndromes familiares de cáncer de colon y la identificación de las mutaciones genéticas transmisibles han sido de gran utilidad para nuestra comprensión del proceso de la carcinogénesis colónica. Con frecuencia se ha hallado que los genes identificados en los síndromes de cáncer familiares estaban mutados o silenciados en los cánceres colónicos esporádicos.^{30,43-45} Mientras que el síndrome familiar de cáncer transmisible, la poliposis adenomatosa familiar (PAF) y el síndrome de cáncer de colon no polipoide (SCCNP) representan sólo el 5% de todos los cánceres de colon, la identificación de las mutaciones transmisibles predisponentes aportó luz sobre los genes cuya mutación es fundamental para la aparición de cánceres colónicos esporádicos.^{30,43} Más recientemente, se describió un nuevo síndrome de poliposis en los seres humanos, la poliposis adenomatosa MYH (PAM), y se identificaron las bases genéticas para diversos trastornos familiares asociados con cáncer colorrectal (tabla 1). Cuando se examinan minuciosamente, se puede notar en estos síndromes familiares el predominio de diversas vías de señalización o regulatorias: Wnt/APC/ β -catenina, TGF- β /BMP, falta de concordancia del ADN y mecanismos de reparación y escisión de bases. Todos los cánceres de colon familiares y esporádicos tendrán alteraciones significativas en al menos uno de estos mecanismos regulatorios y de señalización.

TABLA 1. Síndromes familiares asociados con predilección por el cáncer de colon en seres humanos

Nombre del síndrome	Gen Afectado	Vías regulatoria o de señalización alteradas
<i>PAF</i>	APC ¹¹⁹	vía de señalización WNT/APC/ β -catenina
<i>SCCNP</i>	hMLH1, hMSH2 menos frecuente: hMSH6 and hPMS2 ^{58,76}	Vía de reparación del ADN discordante
<i>PAM</i>	hMYH ⁶⁻⁸	Vía de excisión y reparación de bases
<i>Peutz-Jeghers</i>	STK11/LKB1 ¹²⁰⁻¹²²	Serina-Treonina-Quinasa, informada como reguladora de múltiples vías como proliferación, apoptosis mediada por p53, y señales Wnt-, TGF- β -, y Ras-
<i>Poliposis Juvenil</i>	HBMPRIA, MAD4/SMAD4 ^{123,} ¹²⁴	Vía de señalización TGF- β /BMP

Aunque estas vías son el blanco frecuente de fenómenos mutagénicos durante la carcinogénesis colorrectal no se las encuentra en todas las neoplasias. En consecuencia, deben existir otros mecanismos alternativos, todavía no reconocidos o no completamente comprendidos, para la progresión neoplásica del epitelio colónico.⁴⁶⁻⁵³ Los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal tienen riesgo de cáncer de colon a través de una vía alternativa, cáncer asociado a la

colitis (CAC).⁵⁴⁻⁵⁷ Estas vías alternativas son importantes desde el punto de vista clínico y probablemente ampliarán nuestro conocimiento de la génesis tumoral. Sin embargo, nos concentraremos en el resto de los mecanismos de inestabilidad genética observados en la mayoría de los carcinomas colorrectales familiares y esporádicos.

Inestabilidad genética y epigenética

Aunque la acumulación de mutaciones somáticas del ADN es la fuerza de conducción detrás de la progresión al cáncer, la inestabilidad genética es con frecuencia la característica del medio que da lugar a estos eventos mutagénicos críticos.^{33,58-60} La inestabilidad genética ha sido observada en las etapas más tempranas de la tumorigénesis, los FCA.^{22,28,61} Ahora reconocemos que existen diversas formas distintivas de inestabilidad genética.^{58,59,62} En el presente, nuestra comprensión de estas formas es limitado; a medida que aprendemos más, será más probable que su importancia se incremente para los modelos de cáncer colorrectal.

La vasta mayoría de los tumores en los seres humanos son aneuploides. La aneuploidía está marcada por la pérdida o ganancia de cromosomas completos, un fenotipo descrito como inestabilidad cromosómica (INC).⁵⁹ La pérdida de heterocigocidad (PDH) está asociada con este fenotipo; es la pérdida de un alelo de un gen. Así, solamente una copia de un gen necesita estar mutada somáticamente con la pérdida del alelo de tipo salvaje por la PDH. Las anomalías cromosómicas de los tumores con INC también incluyen la amplificación génica y la translocación cromosómica. Si bien las causas de la INC son desconocidas, en los últimos años se han logrado avances significativos en el tema. Sin lugar a dudas, el daño de los puntos de control del ADN desempeña un papel en este proceso.^{60,63,64} Más aun, la proteína APC, además de su papel central en la PAF y en la carcinogénesis esporádica, está involucrada en la segregación cromosómica.^{65,66} El trabajo realizado más recientemente sobre la investigación del mantenimiento de los telómeros en células normales, así como de la supervivencia y multiplicación de las células neoplásicas aportó nuevas ideas hacia otro mecanismo potencial para explicar las inestabilidades observadas en los cánceres con INC.⁴² Los telómeros son complejos nucleoproteicos en los extremos de los cromosomas que funcionan para mantener la extremidad de éstos.^{42,67} También funcionan para limitar el número absoluto de divisiones celulares. La actividad de la telomerasa en los adultos está limitada a los linfocitos activados, células germinales y células germinales tisulares. En ausencia de actividad de la telomerasa, los telómeros se acortan progresivamente con cada división celular. Después de un número limitado de divisiones, los telómeros quedan acortados de manera crítica y son inestables e inducen la apoptosis celular o la senescencia.^{42,68} Este período que provoca el acortamiento de los telómeros se denomina "crisis telomérica". Si los puntos de control fallan, y si no son seguidos por senescencia o apoptosis, se observa inestabilidad cromosómica grave, con características similares a las observadas en las neoplasias humanas, como puentes cromosómicos, translocaciones no recíprocas, amplificación génica y rearrreglos cromosómicos complejos.^{42,69} Los estudios de pólipos colónicos y de cánceres humanos hallaron que la actividad de la telomerasa es baja y que la longitud de los telómeros estaba acortada en pólipos de tamaño pequeño a moderado. La actividad de la telomerasa está incrementada en los pólipos grandes y en los cánceres colorrectales,^{70,71} lo que permite un potencial duplicativo ilimitado, un "sello" del cáncer. Asociados con la baja actividad de la telomerasa, los estudios de hibridación genómica comparativa (HGC) y los histológicos informaron incremento en las tasas de rearrreglos cromosómicos, translocaciones no recíprocas y puentes en la anafase observados en los pólipos adenomatosos.⁷² Por último, los estudios en animales transgénicos avalan esta hipótesis.

Los cánceres epiteliales espontáneos son infrecuentes en ratones salvajes y en ratones con mutación de p53, sin embargo en los ratones con esta mutación y deficientes en telomerasa existe un incremento notable de tumores epiteliales de mama, piel y tracto gastrointestinal. Además, estos cánceres se caracterizan por translocaciones no recíprocas y por otras anomalías citogenéticas asociadas con los tumores con INC.^{42,69,73,74} En conjunto, los estudios de tumores en seres humanos y los estudios en transgénicos sugieren que la crisis telomérica puede ser un mecanismo importante que provoca INC en cánceres con INC.

Quizá la mejor comprendida de las inestabilidades genéticas involucradas en la progresión del cáncer de colon sea el error en la determinación de la compatibilidad (RD).⁷⁵⁻⁷⁷ El sistema de RD reconoce las incompatibilidades base a base y los apareamientos desiguales de inserción/delección que tienen lugar con la duplicación del ADN y con la recombinación homóloga. Estos errores deben ser corregidos antes de la duplicación del ADN, porque de otra manera las mutaciones pasarían a las células hijas. Segmentos cortos repetitivos de ADN, conocidos como microsatélites, son vulnerables a este tipo de error. En células con deficiencia por RD, con frecuencia estos sitios se encuentran mutados.^{58,59,76} Este tipo de inestabilidad genética se conoce como inestabilidad de

microsatélites (INM o IMS). Los genes que contienen estas secuencias repetitivas en sus regiones de codificación son particularmente susceptibles a la inactivación de mutaciones durante la duplicación del ADN en neoplasias con IMS.⁷⁸⁻⁸¹ Los cánceres con IMS, a diferencia de los tumores con INC, tienden a ser diploides o casi diploides.^{59,76} La INM puede aparecer tanto en cánceres de colon familiares como esporádicos, aunque los mecanismos responsables son bastante diferentes. El síndrome de Lynch (SCCNP) es un síndrome familiar de cáncer de colon con transmisión dominante^{75,82,83} y se caracteriza por la aparición del tumor a una edad temprana (media de 45 años) y tasas elevadas de neoplasias extraintestinales,^{75,82,84} como estómago, ovario, uréter, pelvis renal, cerebro (principalmente glioblastoma multiforme – también conocido como síndrome de Turcot-),⁸⁵ intestino delgado, sistema hepatobiliar y piel (neoplasia de las glándulas sebáceas: síndrome de Muir-Torre).⁸⁶ Se observa inactivación de mutaciones en líneas germinales en hMLH1 o hMLH2 en casi el 60% de las familias con SCCNP, y estas mutaciones de las líneas germinales también fueron descritas, aunque con una frecuencia menor, para hPMS1, hPMS2, hMSH6 y hMLH3.⁸⁷⁻⁹³ En contraste, en tumores esporádicos con INM, son infrecuentes las mutaciones somáticas en hMLH1, hMSH2 y hPMS2.^{94,95} Con mayor frecuencia, los niveles proteicos de hMLH1 están marcadamente disminuidos por un silenciamiento específico del gen por hipermetilación de los promotores.^{96,98} Tomadas en conjunto, las formas familiares y esporádicas de INM representan cerca del 15% al 20% de los cánceres de colon.⁵⁹

Las bases del ADN se alteran continuamente por especies químicamente reactivas, desaminaciones hidrolíticas, metilaciones de guanina y alquilaciones. Esto puede llevar a la desigualdad en el apareamiento de los nucleótidos y a las mutaciones de transversión de bases (G → A o C → T) durante la duplicación del ADN si no se corrigen.⁹⁹ La vía de la reparación de escisión de bases (REB) es responsable de la identificación de estas bases con modificaciones químicas y de la iniciación de su reparación. Estas mutaciones de base única son con frecuencia silentes, sin embargo si tienen lugar en secuencias críticas de codificación pueden provocar mutaciones sin sentido. Las primeras pueden ser inactivadoras (por ejemplo en APC) o activadoras (por ejemplo, Ras).^{8,99,100} Las mutaciones sin sentido provocan acortamientos prematuros de la proteína si se encuentran dentro de la secuencia de codificación y son típicamente inactivadoras. Diversos componentes de la vía de REB han sido recientemente involucrados en la patogénesis de la carcinogénesis colorrectal, como MED1 (MBD4), MGMT y hMYH.^{6-8,51,52,99,101-103}

Mientras que las inestabilidades genéticas cromosómicas y microsatélites tienden a ser recíprocamente exclusivas, los defectos de escisión y reparación de bases pueden observarse en cánceres INC+ y INM+, así como en un pequeño subgrupo de cánceres que son INC-/INM-.^{51,52,99} MED1(MBD4) es una glucosilasa involucrada en la reparación de las desaminaciones de las metilcitosinas. Se halla con frecuencia mutada por la INM en tumores INM+.^{102,104} Por el contrario, las mutaciones de la línea germinal hMYH están asociadas con un nuevo síndrome familiar atenuado de cáncer de colon que se asemeja a la PAF, ahora denominado PAM (poliposis adenomatosa MYH).⁶⁻⁸ Estos pacientes presentan, como característica, desde 15 a más de 100 pólipos, con una edad promedio de presentación a partir de los 40 años. Resulta sorprendente que la transmisión sea autosómica recesiva, con una penetrancia del cáncer de al menos el 50%.^{6,8} Los tumores de colon asociados con PAM son diferentes de los esporádicos y de los que están vinculados con PAF. Son diploides o casi diploides, y estables desde el punto de vista genético a nivel cromosómico y microsatelital. Además, se caracterizan por tasas frecuentes de mutaciones de transversión G → T, lo que provoca la inactivación de APC y la activación de *K-ras*.^{6-8,100} La inactivación de MYH también se asoció, recientemente, con la patogénesis del cáncer de colon esporádico.¹⁰³ La metilguanina metil transferasa (MGMT) es otra enzima reparadora del ADN y un componente de la vía de REB.^{51,52} La MGMT elimina las lesiones alquilantes de O⁶-metilguanina, las cuales, si no se corrigen, pueden resultar en mutaciones de transición G → A. Las transiciones G → A son una causa frecuente de mutaciones *K-ras*.

En cánceres esporádicos, el gen *MGMT* está con frecuencia silenciado por la hipermetilación del promotor,^{51,52,99} en particular en aquellos con fenotipos INC- e INM-. En resumen, la reparación de las bases químicamente modificadas del ADN es una función fundamental que puede ser una fuente importante de inestabilidad genética en células en las cuales estas vías se hallan interrumpidas.

Por último, la regulación epigenética de la expresión génica mostró desempeñar un papel importante en la carcinogénesis y puede ser el episodio crítico que conduce a la progresión en un subgrupo de cánceres de colon esporádicos.¹⁰⁵⁻¹¹⁰ Los mecanismos epigenéticos incluyen la metilación del ADN, el sello (*imprinting*) del gen, la acetilación de las histonas, y son con frecuencia empleados para el silenciamiento de los genes y para la represión de la transcripción viral y de los

trasposones. Los dinucleótidos CpG están presentes en los promotores de muchos genes y están destinados a la metilación por una clase de enzimas conocidas como metiltransferasas del ADN.^{108,109,111} Una vez que fueron metilados, una familia de proteínas que se conoce como MBDs (del inglés *methyl-CpG binding domain proteins* [proteínas ligadoras de metil-CpG]) se unen a los dinucleótidos CpG metilados y reclutan otros factores para formar un complejo que altera la conformación del ADN y de la cromatina hacia una configuración más estable y silente. Mientras que la metilación CpG es en sí mutagénica (la desaminación de la metil- citosina puede provocar transiciones de los nucleótidos de C por T si no se corrigen), se cree que el silenciamiento de los genes supresores de los tumores y de la reparación del ADN mediante la hipermetilación del promotor puede ser el mecanismo predominante que promueve la carcinogénesis.¹⁰⁶ En el cáncer de colon, p16^{Ink4a} </SU^{P>}(regula la actividad de ciclina D), MLH1 (un gen RD), p14ARF</SU^{P>} (reguladora en más de la actividad de p53), APC, y O6-MGMT (que repara las mutaciones de guanina a adenosina), han sido identificadas como blancos comunes para el silenciamiento mediante la metilación de promotores.^{96,98,112-115} Ya que la mayoría de los cánceres de colon tendrán algún grado de hipermetilación de promotores, un subgrupo tendrá un grado elevado de esta hipermetilación en varios supresores tumorales simultáneamente. Se ha propuesto que este subgrupo constituye una vía separada para la tumorigénesis colorrectal, llamada isla CpG del fenotipo metilador (CIMP, por sus siglas en inglés [CpG island methylator phenotype]).^{105,116-118} Los tumores CIMP+ son típicamente diploides o casi diploides (INC-), y pueden ser INM+ (debido a la inactivación de hMLH1) o pueden tener la REB alterada debido a la reducción de los niveles de MGMT. Más aun, el fenotipo CIMP+ parece estar presente típicamente en adenomas dentados y en pólipos hiperplásicos grandes. La caracterización clínica y molecular de este fenotipo es un área de activas investigaciones.

Sinopsis

Desde la última vez que revisamos este tema se lograron grandes avances en relación con la comprensión de la carcinogénesis colorrectal. Quizá lo más interesante sea que mejoramos la idea que teníamos acerca de los mecanismos que gobiernan la inestabilidad genética y su papel en la progresión neoplásica.

Continuamos creyendo que esta progresión neoplásica tiene lugar en un número limitado de vías, en las cuales se hallan inactivados supresores tumorales específicos o los oncogenes están activados en una secuencia bastante definida.

Con la continuidad de las investigaciones veremos cambios sorprendentes en la forma de prevenir, diagnosticar y tratar esta enfermedad mortal.

Los autores no manifiestan "conflictos de interés".

BIBLIOGRAFÍA

1. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 2001; 37 Suppl 8:S4-66.
2. Lynch JP, Hoops TC. The Genetic Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Hematology - Oncology Clinics of North America* 2002; 16(4):1-36.
3. Meyskens FL, Jr. Chemoprevention of FAP with sulindac. *Curr Oncol Rep* 2002; 4(6):463.
4. Phillips RK, Wallace MH, Lynch PM, Hawk E, Gordon GB, Saunders BP, et al. A randomised, double blind, placebo controlled study of celecoxib, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, on duodenal polyposis in familial adenomatous polyposis. *Gut* 2002; 50(6):857-60.
5. Asano TK, McLeod RS. Non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) and Aspirin for preventing colorectal adenomas and carcinomas. *Cochrane Database Syst Rev* 2004(2):CD004079.
6. Sampson JR, Dolwani S, Jones S, Eccles D, Ellis A, Evans DG, et al. Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet* 2003; 362(9377):39-41.
7. Jones S, Emmerson P, Maynard J, Best JM, Jordan S, Williams GT, et al. Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C->T:A mutations. *Hum Mol Genet* 2002; 11(23):2961-7.
8. Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, Heinemann K, Fidalgo P, Phillips RK, et al. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med* 2003; 348(9):791-9.
9. Halford SE, Rowan AJ, Lipton L, Sieber OM, Pack K, Thomas HJ, et al. Germline mutations but not somatic changes at the MYH locus contribute to the pathogenesis of unselected colorectal cancers. *Am J Pathol* 2003; 162(5):1545-8.
10. Pineau BC, Paskett ED, Chen GJ, Espeland MA, Phillips K, Han JP, et al. Virtual colonoscopy using oral contrast compared with colonoscopy for the detection of patients with colorectal polyps. *Gastroenterology* 2003; 125(2):304-10.
11. Mak T, Laloo F, Evans DG, Hill J. Molecular stool screening for colorectal cancer. *Br J Surg* 2004; 91(7):790-800.
12. Diaz-Rubio E. New chemotherapeutic advances in pancreatic, colorectal, and gastric cancers. *Oncologist* 2004; 9(3):282-94.
13. Kim EC, Lance P. Colorectal polyps and their relationship to cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1997; 26(1):1-17.

Colección Trabajos Distinguidos, Serie Gastroenterología, Volumen 8, Número 5

14. Carethers JM. The cellular and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1996; 25(4):737-54.
15. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1993; 329(27):1977-81.
16. Winawer SJ, Zauber AG, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Stewart ET, et al. The National Polyp Study. Design, methods, and characteristics of patients with newly diagnosed polyps. The National Polyp Study Workgroup. *Cancer* 1992; 70(5 Suppl):1236-45.
17. Takayama T, Katsuki S, Takahashi Y, Ohi M, Nojiri S, Sakamaki S, et al. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Med* 1998; 339(18):1277-84.
18. Roncucci L, Pedroni M, Vaccina F, Benatti P, Marzona L, De Pol A. Aberrant crypt foci in colorectal carcinogenesis. Cell and crypt dynamics. *Cell Prolif* 2000; 33(1):1-18.
19. Tudek B, Bird RP, Bruce WR. Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods. *Cancer Res* 1989; 49(5):1236-40.
20. Nucci MR, Robinson CR, Longo P, Campbell P, Hamilton SR. Phenotypic and genotypic characteristics of aberrant crypt foci in human colorectal mucosa. *Hum Pathol* 1997; 28(12):1396-407.
21. Siu IM, Pretlow TG, Amini SB, Pretlow TP. Identification of dysplasia in human colonic aberrant crypt foci. *Am J Pathol* 1997; 150(5):1805-13.
22. Heinen CD, Shivapurkar N, Tang Z, Groden J, Alabaster O. Microsatellite instability in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res* 1996; 56(23):5339-41.
23. Pedroni M, Sala E, Scarselli A, Borghi F, Menigatti M, Benatti P, et al. Microsatellite instability and mismatch-repair protein expression in hereditary and sporadic colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 2001; 61(3):896-9.
24. Shivapurkar N, Huang L, Ruggeri B, Swalsky PA, Bakker A, Finkelstein S, et al. K-ras and p53 mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors from colon cancer patients. *Cancer Lett* 1997; 115(1):39-46.
25. Shpitz B, Bomstein Y, Shalev M, Liverant S, Kaufman Z, Klein E, et al. Oncoprotein coexpression in human aberrant crypt foci and minute polypoid lesions of the large bowel. *Anticancer Res* 1999; 19(4B):3361-6.
26. Takayama T, Ohi M, Hayashi T, Miyayoshi K, Nobuoka A, Nakajima T, et al. Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 2001; 121(3):599-611.
27. Smith AJ, Stern HS, Penner M, Hay K, Mitri A, Bapat BV, et al. Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res* 1994; 54(21):5527-30.
28. Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, Schuebel KE, Markowitz SD, Dong Chen W, et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet* 2004; 36(4):417-22.
29. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; 9(4):138-41.
30. Chung DC. The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology* 2000; 119(3):854-65.
31. Ponder BA. Cancer genetics. *Nature* 2001; 411(6835):336-41.
32. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1):57-70.
33. Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol* 1999; 9(12):M57-60.
34. Muto T, Bussey HJ, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1975; 36(6):2251-70.
35. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61(5):759-67.
36. Shiozawa J, Ito M, Nakayama T, Nakashima M, Kohno S, Sekine I. Expression of matrix metalloproteinase-1 in human colorectal carcinoma. *Mod Pathol* 2000; 13(9):925-33.
37. Adachi Y, Yamamoto H, Itoh F, Hinoda Y, Okada Y, Imai K. Contribution of matrilysin (MMP-7) to the metastatic pathway of human colorectal cancers. *Gut* 1999; 45(2):252-8.
38. Vermeulen SJ, Bruyneel EA, Bracke ME, De Bruyne GK, Vennekens KM, Vlemminckx KL, et al. Transition from the noninvasive to the invasive phenotype and loss of alpha-catenin in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1995; 55(20):4722-8.
39. Portera CA, Jr., Berman RS, Ellis LM. Molecular determinants of colon cancer metastasis. *Surg Oncol* 1998; 7(3-4):183-95.
40. Zhang X, Gaspard JP, Chung DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res* 2001; 61(16):6050-4.
41. Kaklamanis L, Kakolyris S, Koukourakis M, Gatter KC, Harris AL. From hyperplasia to neoplasia and invasion: angiogenesis in the colorectal adenoma-carcinoma model. *Adv Exp Med Biol* 2000; 476:249-66.
42. Sharpless NE, DePinho RA. Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. *J Clin Invest* 2004; 113(2):160-8.
43. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87(2):159-70.
44. Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997; 386(6627):761, 763.
45. Chung DC, Rustgi AK. DNA mismatch repair and cancer. *Gastroenterology* 1995; 109(5):1685-99.
46. Jass JR, Biden KG, Cummings MC, Simms LA, Walsh M, Schoch E, et al. Characterisation of a subtype of colorectal cancer combining features of the suppressor and mild mutator pathways. *J Clin Pathol* 1999; 52(6):455-60.
47. Hasegawa H, Ueda M, Watanabe M, Teramoto T, Mukai M, Kitajima M. K-ras gene mutations in early colorectal cancer ... flat elevated vs polyp-forming cancer. *Oncogene* 1995; 10(7):1413-6.
48. Olschwang S, Slezak P, Roze M, Jaramillo E, Nakano H, Koizumi K, et al. Somatic acquired genetic alterations in flat colorectal neoplasias. *Int J Cancer* 1998; 77(3):366-9.
49. Saitoh Y, Waxman I, West AB, Popnikolov NK, Gatalica Z, Watari J, et al. Prevalence and distinctive biologic features of flat colorectal adenomas in a North American population. *Gastroenterology* 2001; 120(7):1657-65.
50. Yashiro M, Carethers JM, Laghi L, Saito K, Slezak P, Jaramillo E, et al. Genetic pathways in the evolution of morphologically distinct colorectal neoplasms. *Cancer Res* 2001; 61(6):2676-83.
51. Jass JR, Whitehall VL, Young J, Leggett BA. Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology* 2002; 123(3):862-76.
52. Jass JR. Hyperplastic polyps and colorectal cancer: is there a link? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2(1):1-8.
53. Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(14):9433-8.
54. Hofseth LJ, Khan MA, Ambrose M, Nikolayeva O, Xu-Welliver M, Kartalou M, et al. The adaptive imbalance in base excision-repair enzymes generates microsatellite instability in chronic inflammation. *J Clin Invest* 2003; 112(12):1887-94.
55. Guo HH, Loeb LA. Tumbling down a different pathway to genetic instability. *J Clin Invest* 2003; 112(12):1793-5.
56. Walsh S, Murphy M, Silverman M, Odze R, Antonioli D, Goldman H, et al. p27 expression in inflammatory bowel disease-associated neoplasia. Further evidence of a unique molecular pathogenesis. *Am J Pathol* 1999; 155(5):1511-8.
57. Itzkowitz SH. Inflammatory bowel disease and cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1997; 26(1):129-39.
58. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23(1-2):11-27.
59. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396(6712):643-9.
60. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997; 386(6625):623-7.
61. Augenlicht LH, Richards C, Corner G, Pretlow TP. Evidence for genomic instability in human colonic aberrant crypt foci. *Oncogene* 1996; 12(8):1767-72.
62. Breivik J, Gaudernack G. Genomic instability, DNA methylation, and natural selection in colorectal carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 1999; 9(4):245-54.
63. Murray AW. The genetics of cell cycle checkpoints. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5(1):5-11.

Colección Trabajos Distinguidos, Serie Gastroenterología, Volumen 8, Número 5

64. Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, et al. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 1998; 392(6673):300-3.
65. Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, et al. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* 2001; 3(4):433-8.
66. Kaplan KB, Burds AA, Swedlow JR, Bekir SS, Sorger PK, Nathke IS. A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nat Cell Biol* 2001; 3(4):429-32.
67. Chan SR, Blackburn EH. Telomeres and telomerase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004; 359(1441):109-21.
68. Stewart SA, Weinberg RA. Telomerase and human tumorigenesis. *Semin Cancer Biol* 2000; 10(6):399-406.
69. Artandi SE, Chang S, Lee SL, Alson S, Gottlieb GJ, Chin L, et al. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* 2000; 406(6796):641-5.
70. Engelhardt M, Drullinsky P, Guillem J, Moore MA. Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 3(11):1931-41.
71. Plentz RR, Wiemann SU, Flemming P, Meier PN, Kubicka S, Kreipe H, et al. Telomere shortening of epithelial cells characterises the adenoma-carcinoma transition of human colorectal cancer. *Gut* 2003; 52(9):1304-7.
72. Hermesen M, Postma C, Baak J, Weiss M, Rapallo A, Sciuotto A, et al. Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology* 2002; 123(4):1109-19.
73. Rudolph KL, Millard M, Bosenberg MW, DePinho RA. Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nat Genet* 2001; 28(2):155-9.
74. Chin L, Artandi SE, Shen Q, Tam A, Lee SL, Gottlieb GJ, et al. p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* 1999; 97(4):527-38.
75. Nagy R, Sweet K, Eng C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene* 2004; 23(38):6445-70.
76. Peltomaki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10(7):735-40.
77. Kolodner RD, Marsischky GT. Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9(1):89-96.
78. Huang J, Papadopoulos N, McKinley AJ, Farrington SM, Curtis LJ, Wyllie AH, et al. APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(17):9049-54.
79. Miyaki M, Iijima T, Kimura J, Yasuno M, Mori T, Hayashi Y, et al. Frequent mutation of beta-catenin and APC genes in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 1999; 59(18):4506-9.
80. Parsons R, Myeroff LL, Liu B, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, et al. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res* 1995; 55(23):5548-50.
81. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997; 275(5302):967-9.
82. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(4):261-8.
83. Lynch HT, Smyrk T, Lynch J. An update of HNPCC (Lynch syndrome). *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 93(1):84-99.
84. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116(6):1453-6.
85. Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, et al. The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med* 1995; 332(13):839-47.
86. Kruse R, Rutten A, Lamberti C, Hosseiny-Malayeri HR, Wang Y, Ruelfs C, et al. Muir-Torres phenotype has a frequency of DNA mismatch-repair-gene mutations similar to that in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families defined by the Amsterdam criteria. *Am J Hum Genet* 1998; 63(1):63-70.
87. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HT, Watson P, et al. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 1996; 2(2):169-74.
88. Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Yasuno M, et al. Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 1997; 17(3):271-2.
89. Akiyama Y, Sato H, Yamada T, Nagasaki H, Tsuchiya A, Abe R, et al. Germ-line mutation of the hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. *Cancer Res* 1997; 57(18):3920-3.
90. Huang J, Kuismanen SA, Liu T, Chadwick RB, Johnson CK, Stevens MW, et al. MSH6 and MSH3 are rarely involved in genetic predisposition to nonpolyposis colon cancer. *Cancer Res* 2001; 61(4):1619-23.
91. Kolodner RD, Tytell JD, Schmeits JL, Kane MF, Gupta RD, Weger J, et al. Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families. *Cancer Res* 1999; 59(20):5068-74.
92. Liu T, Yan H, Kuismanen S, Percepe A, Bisgaard ML, Pedroni M, et al. The Role of hPMS1 and hPMS2 in Predisposing to Colorectal Cancer. *Cancer Res* 2001; 61(21):7798-802.
93. Wu Y, Berends MJ, Sijmons RH, Mensink RG, Verlind E, Kooi KA, et al. A role for MLH3 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 2001; 29(2):137-8.
94. Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, Willson JK, Parsons RE, Jen J, et al. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet* 1995; 9(1):48-55.
95. Ma AH, Xia L, Littman SJ, Swinler S, Lader G, Polinkovsky A, et al. Somatic mutation of hPMS2 as a possible cause of sporadic human colon cancer with microsatellite instability. *Oncogene* 2000; 19(18):2249-56.
96. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(12):6870-5.
97. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 1997; 57(5):808-11.
98. Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, et al. Allelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(15):8698-702.
99. Jiricny J, Marra G. DNA repair defects in colon cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13(1):61-9.
100. Lipton L, Halford SE, Johnson V, Novelli MR, Jones A, Cummings C, et al. Carcinogenesis in MYH-associated polyposis follows a distinct genetic pathway. *Cancer Res* 2003; 63(22):7595-9.
101. Petronzelli F, Riccio A, Markham GD, Seeholzer SH, Stoerker J, Genuardi M, et al. Biphasic kinetics of the human DNA repair protein MED1 (MBD4), a mismatch-specific DNA N-glycosylase. *J Biol Chem* 2000; 275(42):32422-9.
102. Riccio A, Aaltonen LA, Godwin AK, Loukola A, Percepe A, Salovaara R, et al. The DNA repair gene MBD4 (MED1) is mutated in human carcinomas with microsatellite instability. *Nat Genet* 1999; 23(3):266-8.
103. Kambara T, Whitehall VL, Spring KJ, Barker MA, Arnold S, Wynter CV, et al. Role of inherited defects of MYH in the development of sporadic colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2004; 40(1):1-9.
104. Bader S, Walker M, Hendrich B, Bird A, Bird C, Hooper M, et al. Somatic frameshift mutations in the MBD4 gene of sporadic colon cancers with mismatch repair deficiency. *Oncogene* 1999; 18(56):8044-7.
105. Kondo Y, Issa JP. Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23(1-2):29-39.
106. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3(6):415-28.

107. Grady WM, Markowitz SD. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002; 3:101-28.
108. Tycko B. Epigenetic gene silencing in cancer. *J Clin Invest* 2000; 105(4):401-7.
109. Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 2000; 16(4):168-74.
110. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10(7):687-92.
111. Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* 2001; 20(24):3139-55.
112. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61(8):3225-9.
113. Esteller M, Sparks A, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, et al. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res* 2000; 60(16):4366-71.
114. Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Watkins DN, et al. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 2000; 60(9):2368-71.
115. Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 2000; 24(2):132-8.
116. Rashid A, Shen L, Morris JS, Issa JP, Hamilton SR. CpG island methylation in colorectal adenomas. *Am J Pathol* 2001; 159(3):1129-35.
117. Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N, Issa JP. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(2):710-5.
118. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(15):8681-6.
119. Fearhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 2001; 10(7):721-33.
120. Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, et al. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 1998; 391(6663):184-7.
121. Jenne DE, Reimann H, Nezu J, Friedel W, Loff S, Jeschke R, et al. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet* 1998; 18(1):38-43.
122. Dong SM, Kim KM, Kim SY, Shin MS, Na EY, Lee SH, et al. Frequent somatic mutations in serine/threonine kinase 11/Peutz-Jeghers syndrome gene in left-sided colon cancer. *Cancer Res* 1998; 58(17):3787-90.
123. Howe JR, Roth S, Ringold JC, Summers RW, Jarvinen HJ, Sistonen P, et al. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science* 1998; 280(5366):1086-8.
124. Zhou XP, Woodford-Richens K, Lehtonen R, Kurose K, Aldred M, Hampel H, et al. Germline mutations in BMPR1A/ALK3 cause a subset of cases of juvenile polyposis syndrome and of Cowden and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndromes. *Am J Hum Genet* 2001; 69(4):704-11.

PREVALENCIA DE LA INFECCION POR *HELICOBACTER PYLORI* EN COMUNIDADES DE LA ETNIA WARAO DEL ESTADO DELTA AMACURO, VENEZUELA



Columnista Experta de SIIC
Dra. Diana Ortiz Princz

Biólogo. Investigador en el área de inmunología de las enfermedades infecciosas y parasitarias, Caracas, Venezuela

Introducción

Helicobacter pylori coloniza aproximadamente el 50% de la población mundial, y menos del 20% de los individuos infectados pueden llegar a contraer enfermedades gastroduodenales. Las enfermedades gastroduodenales asociadas con *H. pylori* se presentan mayormente en adultos. Sin embargo, es usual que la infección se adquiera durante la infancia¹ y es posible que las respuestas humoral y de la mucosa en ese momento puedan determinar más tarde parcialmente el curso natural de la infección.²

Se sugiere que la mayoría de los individuos adquieren la infección en la niñez y predominantemente son infectados otros miembros de la familia.^{3,4} Cuando se adquiere la bacteria, ésta puede persistir en el hábitat gástrico por décadas. Durante ese tiempo puede sufrir considerables evoluciones genéticas, que podrían facilitar la persistencia de la bacteria en el ecosistema gástrico del huésped, incluyendo cambios en el ambiente que intervengan en la colonización de *H.*

pylori.⁵ Cepas de *H. pylori* aisladas de individuos relacionados han sido genéticamente diferentes, de manera que pueden ser consideradas "cuasiespecies".⁶

A nivel mundial se ha informado que en poblaciones infantiles la prevalencia de *H. pylori* varía del 10% al 80%.^{2,7} Las prevalencias más bajas se observaron en poblaciones del norte y del este de Europa, Japón y otras poblaciones de Asia. Las prevalencias altas fueron bien documentadas en la India y Bangladesh y en ciudades de África y América latina.²

En un estudio en el que se examinó la prevalencia por etnias, el incremento se observó en grupos inmigrantes de regiones de alta prevalencia y en grupos étnicos que están en riesgo, de bajo nivel socioeconómico.^{8,9}

Diversos factores de riesgo de la infección por *H. pylori*, como el incremento en la edad, el bajo nivel socioeconómico y educativo, la raza, el hacinamiento en la vivienda, migraciones desde regiones de alta prevalencia, antecedentes de parientes infectados por *H. pylori*, indicadores de mal estado nutricional, y el consumo de agua y vegetales sin la higiene adecuada fueron bien documentados en el incremento de esta infección.^{2,10,11}

Pocos estudios examinaron la incidencia de infección por *H. pylori* en niños, posiblemente debido a las dificultades de realizar pruebas invasivas en grupos de esta edad que realmente no lo requieran; por otro lado, los estudios en comunidades indígenas se dificultan por lo complicado de su acceso –tanto físico como cultural– y el mantenimiento de la logística para la continuidad de las investigaciones. El objetivo de este trabajo fue evaluar la prevalencia de *H.*

pylori en niños y adultos de comunidades indígenas del estado Delta Amacuro, en Venezuela.

Materiales y métodos

Poblaciones estudiadas

Se evaluaron 98 niños de ambos sexos de edades comprendidas entre 1 y 14 años (7 ± 3.37 años) y 32 mujeres adultas (33.96 ± 13.77 años) de dos comunidades indígenas de la etnia warao del municipio Pedernales, estado Delta Amacuro (tabla 1). Este estado tiene un clima tropical lluvioso y suelos pantanosos del tipo hidromórfico tropical, sus comunidades de recolectores se encuentran dispersas a lo largo de las riberas del Delta del Orinoco, viven principalmente de la cacería y la pesca.

Tabla 1. Edad y sexo de grupos de niños de dos comunidades indígenas del estado Delta Amacuro.

Comunidad	Sexo femenino	Sexo masculino	Edad ($\bar{x} \pm DE$)
Isla Misteriosa (n = 38)	48%	52%	$5.5 \pm 3.03^*$
Playa Sucia (n = 60)	47%	53%	7.9 ± 3.26
Isla Misteriosa y Playa Sucia (n = 98)	48%	52%	7 ± 3.37

* $p < 0.001$.

El protocolo de estudio fue aprobado por la comisión ética del Instituto de Biomedicina, Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela, y por las autoridades competentes del estado Delta Amacuro.

Las características de la población de estudio fueron comparadas con valores obtenidos de individuos venezolanos no indígenas, no infectados por *H. pylori* que viven en condiciones higiénicas adecuadas.

Determinación serológica de IgG anti-H. pylori

La determinación de anticuerpos IgG específicos fue realizada utilizando un kit inmunoenzimático comercial (Pyloriset EIA-G) de Orion. Se leyó la placa en un espectrofotómetro a 405 nm y las unidades de densidad óptica fueron extrapoladas en una gráfica de papel semilogarítmico, usando como referencia los calibradores suministrados por el kit, obteniendo así los resultados expresados en títulos de anticuerpos, tomando como positivos aquellos títulos mayores o iguales a 300.

Determinación de IgA secretora específica anti-H. pylori en saliva

La IgA secretora específica anti-*H. pylori* en saliva se determinó utilizando la técnica de ELISA estandarizada en nuestro laboratorio. Para ello se recolectó la saliva de cada sujeto directamente en su boca. Las muestras se conservaron en tubos Vacutainer con etilendiaminatetraacético (EDTA) a -20°C hasta su uso en el ensayo. Se sensibilizó la placa de poliestireno (Nunc MaxiSorp) con el antígeno de *Helicobacter pylori* ($2.5 \mu\text{g}$ por pozo) diluido en coating buffer pH 9.6, 2 horas a 37°C . Se bloquearon las uniones inespecíficas con PBST-BSA 0.5% 2 horas a 37°C , luego se incubaron las muestras de saliva durante una hora a 37°C a una dilución 1/10 con PBST-BSA 0.5%. Se utilizó como conjugado una anti-IgA marcada con peroxidasa (SIGMA) diluida 1/1 000 en PBST-BSA 0.5% incubándose a 37°C por una hora y, por último, se revelaron los resultados con ortofenilenodiamina (SIGMA), leyendo la absorbancia a 492 nm. Se consideraron positivos aquellos valores obtenidos por encima de 0.300 unidades de densidad óptica, este punto de corte fue obtenido en trabajos anteriores.¹²

Preparación de antígeno de H. pylori

El antígeno crudo fue preparado a partir de cinco cepas aisladas de pacientes con úlcera duodenal (UD) e infección por *H. pylori* confirmada por los cuatro criterios convencionales.¹³ Las cepas

aisladas de *H. pylori* se sembraron en los medios de cultivo apropiados y la recolección de los microorganismos se realizó agregando 2 ml de PBS estéril a las placas de agar y cosechando las bacterias mediante un rastrillo; las bacterias cosechadas se centrifugaron a 2 000 rpm para obtener el sedimento celular, el cual se lavó 2 veces con PBS; las células se someten a 5 ciclos de sonicación de 30 segundos cada uno, luego las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm en una centrífuga de Eppendorf y en el sobrenadante se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry.¹⁴ Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (10%) al sonocado celular para visualizar las bandas proteicas, para lo cual se diluyó en buffer muestra (0.06M Tris HCL, pH 6.8, 2% SDS, a 0% glicerol, 5% de 2-mercaptoetanol, 0.001% de azul de bromofenol).

Determinación de IgA secretora total en saliva

Para determinar anticuerpos IgA secretores totales en saliva se utilizó la técnica de ELISA descrita previamente.¹²

Determinación de antígenos de *H. pylori* en heces

Para la determinación de antígenos de *H. pylori* en materia fecal se utilizó un método de diagnóstico cualitativo inmunoenzimático comercial (Kit Premier Platinum HpSA); la placa se leyó a una absorbancia de 450 nm. Aquellas muestras cuyos valores de absorbancia fueron menores a 0.140 se consideraron negativas; entre 0.140 y 0.160, ambiguas, y positivas aquellas mayores o iguales a 0.160.

Análisis de la calidad del agua

Se tomaron muestras de agua del río en las zonas de consumo y uso por parte de los habitantes de cada comunidad y se examinaron para la determinación de sólidos totales y análisis microbiológico según los métodos estándar para el análisis de agua de la Asociación Americana de Salud Pública.¹⁵

Análisis estadístico

Se calcularon las medias geométricas y desviaciones estándar de los títulos de anticuerpos específicos de IgG, así como de los valores de IgA secretora total y específica. Las comparaciones entre los diferentes grupos se realizaron mediante la prueba *t* de Student y las diferencias entre proporciones se compararon aplicando la prueba de ji al cuadrado (χ^2).

Resultados

Con respecto a los valores inmunológicos estudiados en el grupo de niños, se encontró un 38% de seroprevalencia al evaluar anticuerpos IgG séricos anti-*H.*

pylori, encontrándose títulos altamente positivos de este anticuerpo (828 ± 583), que fueron significativamente más elevados en la comunidad de Playa Sucia que en Isla Misteriosa ($p < 0.0001$).

La media de los valores detectados de IgA secretora total medida en la saliva de los niños de ambas comunidades fue de 0.64 ± 0.25 UDO; los niveles detectados de este anticuerpo fueron significativamente más elevados ($p < 0.001$) en los niños de la comunidad de Playa Sucia que en los de la comunidad de Isla Misteriosa; sin embargo, los niveles de IgA secretora anti-*H. pylori* en saliva fueron homogéneos y positivos en ambos grupos (0.47 ± 0.22 UDO). Por otra parte, al evaluar la presencia de antígenos de *H. pylori* en heces se encontró 95% de positividad en los niños de Isla Misteriosa, en contraste con 10% en el grupo de Playa Sucia (tabla 2).

Tabla 2. Valores inmunológicos de grupos de niños de dos comunidades del estado Delta Amacuro.

Comunidad	IgAs total (UDO)	IgAs anti- <i>H. pylori</i> (UDO)	IgG anti- <i>H. pylori</i> (% de positividad / títulos)	Antígenos <i>H. pylori</i> en heces (% de positividad)
Isla Misteriosa (n = 38)	0.50 ± 0.25	0.48 ± 0.25	21% (518 ± 246)	^a 95%
Playa Sucia (n = 60)	0.73 ± 0.19	0.47 ± 0.19	38% ^b (978 ± 657)	10%
Isla Misteriosa y Playa Sucia (n = 98)	0.64 ± 0.25	0.47 ± 0.22	38% (828 ± 583)	55%
^c Valores de referencia	1.05 ± 0.13	0.116 ± 0.103	- (135 ± 52)	-

^a $p < 0.001$; ^b $p < 0.0001$; ^c valores obtenidos de niños venezolanos no indígenas no infectados y con adecuadas condiciones higiénicas.

Al estudiar el grupo de mujeres adultas se encontró 84% de seropositividad para IgG específica con una media de títulos elevados ($2\ 288 \pm 2\ 005$); además, se detectaron niveles elevados de IgA secretora total (0.82 ± 0.32 UDO) y los valores de IgA secretora específica *anti-H. pylori* en saliva (0.57 ± 0.21 UDO) fueron significativamente más altos ($p < 0.05$) que en adultos no infectados por *H. pylori*.

Los antígenos en heces no pudieron ser evaluados en este grupo.

El estudio de anticuerpos con respecto a la edad mostró un progresivo aumento de los niveles de IgA secretora total y específica *anti-H. pylori* (figura 2), medidos en saliva, así como de títulos de anticuerpos específicos de IgG (figura 1a, 1b). La seroprevalencia se incrementa con la edad, observándose los títulos más elevados a los 40 años, edad a partir de la cual comienzan a descender. Se observó una clara tendencia al aumento proporcional de los niveles de IgA secretora total con respecto a la edad; la IgA secretora específica *anti-H.pylori* también aumenta progresivamente con la edad y parece permanecer estable a partir de los 35 años (figura 2).

Figura 1a. Títulos de IgG anti-*H. pylori* de acuerdo con la edad.

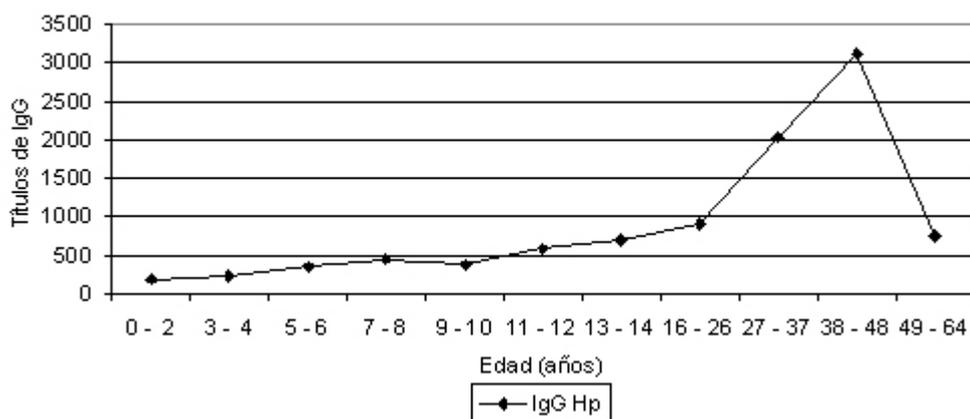


Figura 1b. Seroprevalencia de Ig anti-*H. pylori* de acuerdo con la edad.

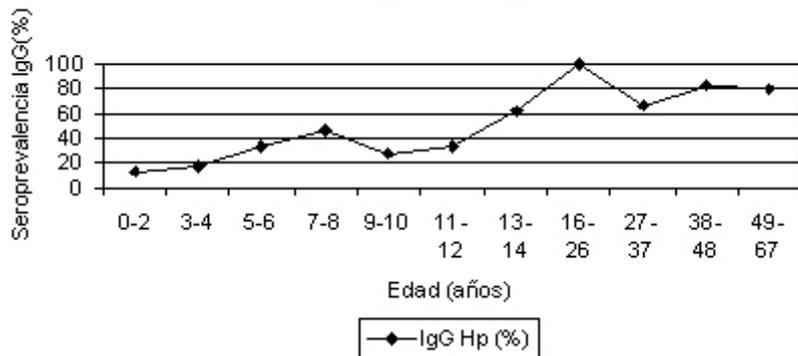
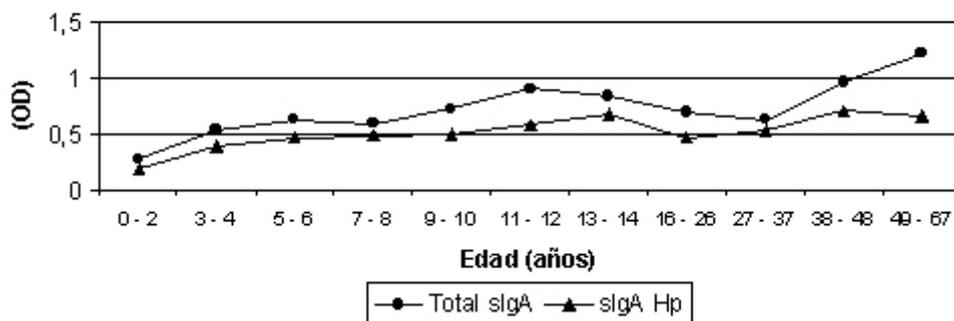


Figura 2. Niveles de IgA secretora total y específica anti-*H. pylori* en saliva, de acuerdo con la edad.



Por otra parte, el estudio de calidad del agua mostró, en la población de Isla Misteriosa, mayor cantidad de sólidos disueltos, suspendidos y sedimentables (mg/l) (figura 3) que en Playa Sucia, además de un significativo mayor número probable de coliformes (figura 4).

Figura 3. Sólidos totales y disueltos en comunidades del estado Delta Amacuro.

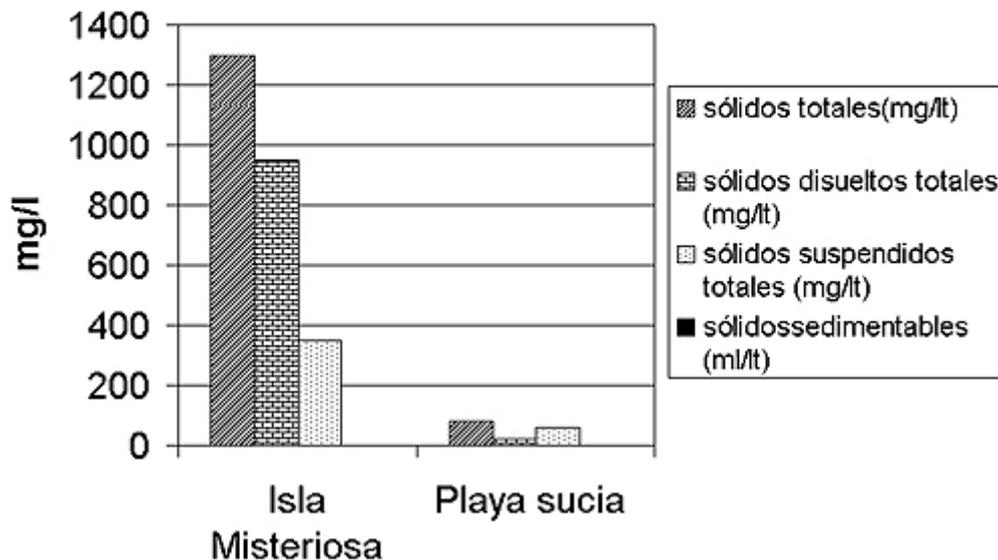


Figura 4. Análisis bacteriológico de la calidad del agua en comunidades del estado Delta Amacuro.



Discusión

En nuestro país existe una alta prevalencia de infección por *H. pylori* en poblaciones adultas e infantiles.^{12,16} A pesar de que muchas investigaciones informaron la prevalencia de infección por esta bacteria, los estudios realizados en poblaciones infantiles indígenas son escasos. Los títulos de IgG específica anti-*H. pylori* de los niños evaluados en las comunidades del estado Delta Amacuro fueron elevados con respecto a los valores normales. No se reflejó ninguna diferencia entre la seroprevalencia de ambas comunidades. La seroprevalencia encontrada es similar a la informada en otras poblaciones rurales infantiles de nuestro país^{12,16} y de otros países.¹⁷⁻¹⁹ Esto es importante ya que se comunicó que los títulos altos están probablemente asociados con el posible desarrollo de carcinoma gástrico comparados con los títulos bajos.²⁰ Por otra parte, la media de los niveles de IgA secretora total detectados fueron más bajos que los encontrados en grupos de niños de otras comunidades rurales no indígenas de Venezuela²¹ y también significativamente más bajos que en niños sanos sin ninguna patología gástrica. En la inmunidad de las mucosas, anticuerpos IgA secretores locales desempeñan un papel primordial en la protección contra antígenos foráneos.²² Además, las deficiencias en la producción de estos anticuerpos podría ser un indicador de daño del tejido de la mucosa. Tomando en cuenta que las condiciones higiénicas, ambientales y socioeconómicas en las que se desenvuelven estos niños son deficientes, y que están permanentemente expuestos a infecciones que comprometen la mucosa gástrica, es posible que existan alteraciones en la inmunidad de la

mucosa gastrointestinal que generen deficiencias en la producción de IgA secretora o que inhiban la exposición de antígenos lumbinales por las células Th2 que favorecen la respuesta de anticuerpos IgA positivamente seleccionada,²³ de manera que alteraciones en los mecanismos de regulación de la respuesta inmune podrían dirigirla hacia un proceso de inflamación crónica de la mucosa. Por otro lado, es posible que exista algún efecto de susceptibilidad de la etnia.

No se encontraron diferencias en los niveles de IgA secretora específica anti-*H.*

pylori entre ambas comunidades; sin embargo, los valores están por encima del punto de corte establecido en ensayos anteriores,²¹ lo cual evidencia el desarrollo de una respuesta inmune local específica a través de la producción de anticuerpos IgA secretores anti-*H. pylori*, ya que se informó que durante la infección se incrementan los niveles de anticuerpos locales y específicos contra *H. pylori*.^{24,25}

Al comparar ambas comunidades encontramos que el promedio de edad de los niños de la comunidad de Playa Sucia fue mayor, éste podría ser uno de los aspectos que explique que los niveles de IgA secretora total y los títulos de IgG anti-*H. pylori* sean significativamente mayores que los encontrados en los niños de Isla Misteriosa, ya que el desarrollo de la respuesta inmune de memoria y los títulos de anticuerpos aumentan progresivamente con la edad.¹⁰ Además, encontramos mayor porcentaje de niños con antígenos de *H.*

pylori en heces en la comunidad de Isla Misteriosa, lo cual sugiere probablemente que hay más niños con infección reciente en esta población.

Las condiciones ambientales pueden influir de manera significativa en el estado de salud de las personas, modulando la respuesta inmune,²¹ y altas tasas de la infección están asociadas con bajo nivel socioeconómico, alta densidad de la población y condiciones higiénicas inadecuadas.²⁶ Los estudios de calidad del agua realizados en esta evaluación reflejaron que en la comunidad de Isla Misteriosa el agua tiene mayor cantidad de agentes contaminantes, como colonias de coliformes y sólidos totales. Si bien es cierto que las dos comunidades estudiadas pertenecen a la etnia warao y sus características geográficas son similares, debe tomarse en cuenta que Playa Sucia es una comunidad organizada a través de un programa piloto llevado a cabo por la Dirección Regional de Saneamiento Ambiental del Ministerio de Salud y Desarrollo Social de Venezuela, desde 1998, donde se han llevado a cabo políticas que mejoran las condiciones de la vivienda y saneamiento ambiental; además, en esta comunidad las viviendas están construidas en el suelo paralelo a la ribera del río; por el contrario, en la comunidad de Isla Misteriosa las condiciones higiénicas y sanitarias son muy deficientes, las viviendas son palafitos construidos a orillas del río, donde abundan estancamientos de agua y formas pantanosas que proporcionan condiciones óptimas para el desarrollo de microorganismos y otros agentes infecciosos generando una fuente permanente de infección para sus habitantes. Aunque las vías de transmisión de *H. pylori* no están bien establecidas, modos de transmisión fecal-oral y oral-oral han sido bien sugeridos²⁷ y la transmisión intrafamiliar es importante en la adquisición de la infección.^{28,29} *Helicobacter pylori* ha sido cultivado a partir de vómito, saliva y heces diarreicas.³⁰

Los resultados de este estudio indican que estas comunidades presentan una alta prevalencia de infección por *H. pylori* y que las condiciones higiénicas pueden influir en la prevalencia de la infección, incrementando así el riesgo de ocasionar daños en la mucosa gastrointestinal, dirigiendo el curso de la infección.

Es importante continuar estudios en este tipo de comunidades donde las infecciones son recurrentes y el daño a la mucosa gastrointestinal puede convertirse en un problema crónico que genera permanentemente un reto inmunológico, por lo tanto, los datos obtenidos en esta investigación pueden ser importantes para diseñar y ejecutar medidas epidemiológicas locales y estudiar el desarrollo de la respuesta inmune en distintos grupos étnicos.

Los autores no manifiestan "conflictos de interés".

BIBLIOGRAFÍA

1. Wotherspoon A, Doglioni C, Diss T, Pan I, Moschini A, de Boni M, Isaacson P 1993. Regression of primary low-grade B-Cell gastric lymphoma of mucosal-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. Lancet 342:575-577.
2. Torres J, Pérez-Pérez G, Goodman K, Atherton J, Gold B, Harris P, Madrazo de la Garza A, Guarner J, Muñoz O 2000. A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. Archives of Medical Research 31:431-469.
3. Brenner, H et al. 1999. Active infection with *Helicobacter pylori* in healthy couples. Epidemiol. Infect. 122:91-95.
4. Rothenbacher D, Bode G, Berg G, Knajer U, Gonser T, Adler G, Brenner H 1999. *Helicobacter pylori* among preschool

- children and their parents: evidence of parent-child transmission. *J Infect Dis* 179:398-402.
5. Falk PG, Syder A, Guruge J, et al. 2000. Theoretical and experimental approaches for studying factors defining the *Helicobacter pylori*-host relationship. *Trends Microbiol.* 8:321-329.
 6. Covacci A, Falkow S, Berg D, Rappouli R. 1997. Did the inheritance of a pathogenicity island modify the virulence of *H. pylori*? *Trends Microbiol* 5:205-208.
 7. Vaira D, Miglidi M, Mule P, Holton J, Menegatti M, Vergura M, Biasco G, Corte R, Logan RP, Barbar L 1994. Prevalence of peptic ulcer in *Helicobacter pylori* positive blood donors. *Gut* 35:309-312.
 8. Ma J, You W, Gail MH, Zhang L, Blot WJ, Chang Y, Jiang J, Liu W, Hu Y, Brown LM, Xu G, Fraumeni JF. *Helicobacter pylori* in a longitudinal study of New Zealanders at ages 11 and 21. *Aust N Z J Med* 1998; 28:585.
 9. Vorobjova T, Grünberg H, Oona M, Maaroos HI, Nilsson I, Walström T, Covacci A, Uibo R 2000. Seropositivity to *Helicobacter pylori* and CagA protein in schoolchildren of different ages living in urban and rural areas in southern Estonia. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 12:97.
 10. Graham DY, Malaty HM, Evans DG, Evans DJ, Klein PD, Adam E. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. Effect of age, race, and socioeconomic status. *Gastroenterology* 1991; 100:1495- 501.
 11. Smoat BL, Kelly PW, Taylor DN 1994. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of US Army recruits. *Am J Epidemiology* 193:513-9.
 12. Ortiz D, Daoud G, Daoud N, Cavazza ME, Urrestarazu MI, Rodríguez N, Correnti M, Avila M. 2001. Evaluación de los niveles de IgA secretora en saliva de niños con *Helicobacter pylori*. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría* 65:44-49.
 13. Chacón E, Correnti M, Salma N, Serrano N, Piñero R, Cavazza M, Urrestarazu M. (1995). Ensayo inmunoenzimático para el serodiagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori*. *Gen*, 49, 208-211.
 14. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
 15. American Public Health Association (1995). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA-AWWA-WAF.
 16. Piñero R, Plasencio A, Avila M, Urrestarazu MI, Serrano N, Correnti M, Cavazza ME 2000. *Helicobacter pylori* en niños de "El Clavo", una población rural venezolana. *Gen revista de la Sociedad Venezolana de Gastroenterología* 54:12-17.
 17. Bode G, Rothenbacher D, Brenner H, Adler G. (1998). Variation in the ¹³C- urea breath test value by nationality in *Helicobacter pylori*-infected children. *Scand Journal Gastroenterology* 33:468-472.
 18. Elitsur Y, Short JP, Neace C. (1998). Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in children from urban and rural West Virginia. *Dig Dis Sci* 43:773-778.
 19. Torres J, Leal Herrera Y, Pérez Pérez G, Gómez A, Camorlinga Ponce M, Cedillo Rivera R, Tapia Conyer R, Muñoz O. 1998. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J Infect Dis* 178:1089-94.
 20. Fujioka N, Fahey MT, Hamada GS. 2001. Serological immunoglobulin G antibody titers to *H. pylori* in Japanese Brazilian and non-Japanese Brazilian gastric cancer patients and controls in Sao Paulo. *Jpn J Cancer Res* 92:829-835.
 21. Ortiz D, Cavazza ME, López T, Avila M, Lecuna V, Correnti M, Perrone M 2000. Determinación de los niveles de IgA secretora específica anti-*Helicobacter pylori* en saliva en población venezolana. *Enfermedades infecciosas y microbiología X Congreso de la Asociación Panamericana de Infectología* 21:38.
 22. Goto T, Nishizono A, Fujioka T, Ikewai J, Mifune K, Nasu M. 1999. Local secretory immunoglobulin A and post-immunization gastritis correlate with protection against *Helicobacter pylori* infection after oral vaccination of mice. *Infect Immun* 67:2531-2539.
 23. Ernest PB, Song F, Klimpel GR, Haeblerle KB, Bamford SE, Crowe G, Ye G, Reyes VE. (1999). Regulation of the mucosal immune response. *Am. J. Trop. Med* 60(4):2-9.
 24. Taylor DE, Blazer MJ 1991. The Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. *Epidemiol Rev* 13:42-59.
 25. Wyatt JI, Rathbone BJ 1988. Immune Response of the Gastric Mucosa to *Campylobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol Suppl* 142:44-49.
 26. Mitchell H, Mégraud F. 2002. Epidemiology and diagnosis of *H. pylori* infection. *Helicobacter* 7:8-16.
 27. Grubel P, Huang L, Masubuchi N, Stutzenberger F, Cave D. (1998) Detection of *Helicobacter pylori* DNA in houseflies (*Musca domestica*) on three continents. *The Lancet.* 352:788-789.
 28. Miyazaki, Kato M, Takata T, Une H. 2002 Intrafamilial transmission of *Helicobacter pylori*: the association between a parent and offspring with respect to the presence of anti-CagA antibody. *J Infect Chemother* 8:70-75.
 29. Taneike I, Tamura Y, Shimizu T, Yamashiro Y, Yamamoto T. 2001. *Helicobacter pylori* intrafamilial infections: Change in source of infection of a child from father to mother after eradication therapy. *Clin Diagn Laboratory Immunol* 8:731-739.
 30. Smith K, Parsonnet J 1998. In *Bacterial Infections of humans: Epidemiology and control*, Evans AS and Brachman PS, Eds. 337-353.