

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
PROGRAMA REGIONAL DE MAESTRÍA EN BIOLOGÍA**

**ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES IL-1B, IL-1RN,  
IL-10 Y p53 CON EL RIESGO DE CÁNCER GÁSTRICO EN UNA  
POBLACIÓN DE ALTO RIESGO DE COSTA RICA**

**Tesis sometida a la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología  
para optar al grado de Magíster Scientiae**

**Warner Alpízar Alpízar**

**Ciudad Universitaria Rodrigo Facio**

**Costa Rica**

**2004**

## Dedicatoria

Esta tesis está dedicada a mis padres, María Elieth y Miguel Angel y a mis hermanas Silvia y Karen. Gracias a sus sacrificios y a su apoyo incondicional en todo momento, salí adelante con este proyecto de vida. Gracias por reír conmigo, gracias por llorar conmigo, gracias por estar conmigo...

## Agradecimientos

Este trabajo fue posible gracias al apoyo de muchas personas, que en algún momento aportaron algo en especial, desde conocimiento intelectual o simplemente un bonito instante que me alegró el alma para mantenerme firme en mis metas y llegar al final de este trabajo:

*Rafaela Sierra:* Te agradezco infinitamente el haber creído en mí. Gracias por haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto contigo, por compartir conmigo tus conocimientos y experiencia, por enseñarme que para alcanzar el éxito hay que trabajar honestamente y dar el máximo esfuerzo. Porque más que mi tutora eres un gran ser humano y un ejemplo a seguir.

*Patricia Cuenca:* Gracias por el gran aporte científico que has hecho para que este proyecto sea hoy una realidad. Además te agradezco por transmitirme ese espíritu de lucha y la gran calidad humana que tienes.

*Clas Une:* Gracias por la colaboración y aporte científico que has brindado en este proyecto. Tu aporte ha sido muy importante.

A *Marco Vinicio Alvarado*, miembro de mi comité de tesis, por participar en la revisión del documento, así como por la asesoría y ayuda que me brindó.

Al Doctor *Guillermo Pérez Pérez* le agradezco enormemente el haberme recibido en su laboratorio en la Universidad de Nueva York. Gracias a él, este trabajo resultó aun mejor de lo que en algún momento yo esperaba. Guillermo: Además del aporte científico que hiciste a mi trabajo, haber estado en tu laboratorio me permitió conocer la “gran manzana” y eso es una experiencia inolvidable. Gracias por tanta amabilidad y por la gran calidad humana con que me trataste.

A *Fernando Morales* por la colaboración en la selección de la muestra a partir de las bases de datos, en la cuantificación del ADN y en la estandarización de las técnicas utilizadas en el laboratorio. Además por alegrarme la vida con sus “chistes” y por comentar conmigo los partidos de fútbol todos lunes por las mañanas.

A *Georgina Gómez* por su colaboración en la recolección de muestras en el Hospital Max Peralta de la Ciudad de Cartago, por su apoyo en todo momento y amistad.

A *mi familia*, desde mis abuelos, tíos, primos, padres, hermanas, en fin todos porque su apoyo ha sido enorme. Porque en todo momento estuvieron muy pendientes de mí. Han sido una de mis mayores motivaciones para dar lo mejor de mí en este proyecto. El recibimiento que me hicieron al regresar de Francia quedará guardado para siempre en mi mente y mi corazón...

A *Melissa y Andrey*, mis grandes amigos y compañeros de casi la mayoría de los cursos de la maestría. Su ayuda, compañerismo, apoyo incondicional y su amistad han sido sumamente importantes para sacar este proyecto a flote. Les agradezco la paciencia que me tuvieron cuando estudiábamos juntos... ¡cuanto sufrimos y nos estresamos...! Al final, todo salió bien...

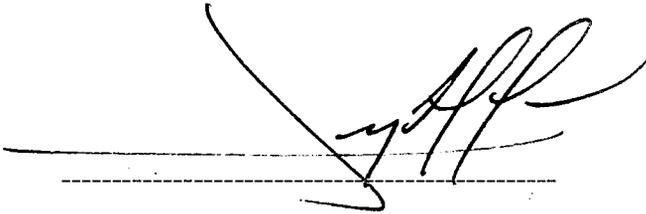
A los del 5, *Fernando Ortiz, Auxiliadora, Rebeca y Zaida* por la colaboración que de una u otra forma me brindaron en el trabajo de laboratorio. Además por hacer del trabajo de laboratorio más ameno con sus ocurrencias, bromas, comentarios y ante todo por su amistad y apoyo incondicional durante todo este tiempo.

A *todos mis verdaderos amigos*, gracias por el apoyo brindado durante este tiempo de mis estudios de maestría, las fiestas y las salidas o las visitas que me hicieron, eliminaron mucho estrés que en algunos momentos tuve.

Al personal del INISA y del Centro de Detección Temprana de Cáncer Gástrico del Hospital Max Peralta por su colaboración y facilidades brindadas.

Esta investigación fue realizada con ayuda económica del Ministerio de Ciencia y Tecnología, el Consejo Nacional para Investigaciones Científicas Tecnológicas y la Organización Panamericana de la Salud. También recibió financiamiento de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (N° proyecto: 742-A2-142), el Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad de Costa Rica y el Centro de Cooperación Científica de la Embajada de Francia.

Esta tesis fue aceptada por la comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Magíster Scientiae

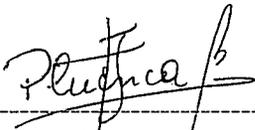


Representante de la de Decana  
Sistema de Estudios de Posgrado



MSc. Rafaela Sierra Ramos

Directora de Tesis



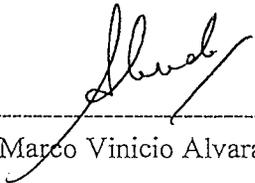
Dra. Patricia Cuenca Berger

Asesora



Dr. Clas Une

Asesor



Dr. Marco Vinicio Alvarado Aguilar

Asesor



Dra. Virginia Solís Alvarado

Directora SEP Biología



Warner Alpizar Alpizar

Candidato

## Indice

Dedicatoria	I
Agradecimientos	II
Hoja de aprobación	V
Indice	VI
Resumen	VII
Lista de Cuadros	IX
Lista de las abreviaturas	X
Introducción	1
Justificación del estudio	32
Objetivo general	34
Población y métodos	35
Resultados	42
Discusión	63
Conclusiones y recomendaciones	83
Bibliografía	86
Anexos	100

## Resumen

Alpizar Alpizar, Warner

Asociación de los polimorfismos de los genes IL-1B, IL-1RN, IL-10 y p53 con el riesgo de cáncer gástrico en una población de alto riesgo de Costa Rica.

Tesis Biología

W. Alpizar A., 2004.

112 h.: 0 il.- 104 refs.

El cáncer gástrico es un problema de salud pública a nivel mundial. Es el segundo cáncer más frecuente en el mundo, solo superado por el cáncer de pulmón. Varios factores aumentan el riesgo de desarrollar cáncer gástrico, entre ellos factores asociados a la dieta, la formación endógena de compuestos nitrosados, la predisposición genética y la infección por *Helicobacter pylori*. Muchos pueden ser los factores genéticos relacionados con una mayor susceptibilidad de desarrollar cáncer gástrico entre ellos algunas variantes polimórficas en el gen supresor de tumores p53, las cuales han sido asociadas con un aumento en el riesgo de desarrollar cáncer gástrico.

La respuesta del huésped ante la infección por *Helicobacter pylori*, juega un papel importante en el desarrollo del cáncer gástrico. Esta bacteria causa inflamación, la magnitud de ésta depende de la cepa bacteriana presente y de los mecanismos de reacción del hospedero en respuesta al patógeno. El mecanismo de respuesta involucra un complejo grupo de citoquinas entre ellas IL-1 $\beta$ , IL-1RN e IL-10. Los genes que codifican para estas proteínas son polimórficos. Algunos de estos polimorfismos han sido asociados con un mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico.

El objetivo de este estudio fue determinar la asociación de los polimorfismos de los genes IL-1B, IL-1RN, IL-10 y p53 con el cáncer gástrico y lesiones gástricas en una población en alto riesgo de Costa Rica. Para ello, se analizaron muestras de sangre periférica de 58 pacientes diagnosticados con cáncer gástrico, 99 individuos sin sospechas de cáncer gástrico según el diagnóstico por rayos X (serie gastroduodenal de doble contraste), 41 pacientes clasificados histológicamente como grupos I y II de

acuerdo con la clasificación japonesa. El análisis se llevó a cabo a partir del ADN extraído de leucocitos. La determinación de los polimorfismos se llevó a cabo mediante PCR convencional, PCR-RFLP, y pirosecuenciación.

No se encontró asociación de los polimorfismos IL-1B-31, IL-1B-511, IL-10-592, IL-10-819 e IL-10-1082 con el riesgo de desarrollar cáncer gástrico en la población estudiada. Para IL-1B+3954, se determinó que las personas con el genotipo heterocigota para el alelo T presentan un mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico (OR 3.7; IC 95% 1.34-10.2;  $p=0.007$ ). Para el polimorfismo del gen IL-1RN se observó que las personas portadoras del genotipo heterocigota para el alelo 2, presentan un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (OR 2.94; IC 1.09-7.93;  $p=0.03$ ).

Las frecuencias de los alelos que han sido relacionados con un aumento de la respuesta proinflamatoria, son más altas en la población total aquí estudiada que en otras poblaciones. Esto podría deberse a que individuos con una mayor respuesta proinflamatoria podrían haber sido favorecidos por procesos de selección natural en respuesta a presiones selectivas ambientales como el caso de las infecciones bacterianas, las cuales son muy frecuentes en países tropicales como Costa Rica.

De acuerdo con los resultados obtenidos será necesario llevar a cabo estudios con un mayor tamaño de muestra, con muestras representativas de la población costarricense y con muestras de regiones de alto y bajo riesgo.

CÁNCER GÁSTRICO; POLIMORFISMOS; INTERLEUCINA-1B;  
INTERLEUCINA-1RN; INTERLEUCINA-10; P53; HAPLOTIPOS;  
*HELICOBACTER PYLORI*.

Director de la investigación: MSc. Rafaela Sierra Ramos  
Escuela de Biología

## Lista de los cuadros

	Pag.
<b>Cuadro 1:</b> Características generales de la población de estudio	44
<b>Cuadro 2:</b> Valores de la prueba $\chi^2$ para la determinación del equilibrio de Hardy- Weinberg en los grupos controles de los casos de cáncer gástrico y pacientes dispépticos	45
<b>Cuadro 3:</b> Frecuencias genotípicas para los polimorfismos de <i>IL-1B</i> e <i>IL-1RN</i>	47
<b>Cuadro 4:</b> Frecuencias genotípicas para los polimorfismos de <i>IL-10</i> y <i>p53</i>	48
<b>Cuadro 5:</b> Frecuencias alélicas para los polimorfismos de los genes <i>IL-1B</i> , <i>IL-1RN</i> , <i>IL-10</i> y <i>p53</i>	49
<b>Cuadro 6:</b> Frecuencias haplotípicas estimadas y coeficientes de desequilibrio de ligamiento en la población de estudio	51
<b>Cuadro 7:</b> Odd Ratios e intervalos de confianza al 95% de la asociación de los polimorfismos de <i>IL-1B</i> e <i>IL-1RN</i> con cáncer gástrico y dispepsias	55
<b>Cuadro 8:</b> Odd Ratios e intervalos de confianza al 95% de la asociación de los polimorfismos de <i>IL-10</i> y <i>p53</i> con cáncer gástrico y dispepsias	57
<b>Cuadro 9:</b> Odd Ratios e intervalos de confianza al 95% bajo un modelo multivariado de regresión logística de la asociación de los polimorfismos de <i>IL-1B</i> , <i>IL-1RN</i> , <i>IL-10</i> y <i>p53</i> con cáncer gástrico y dispepsias	58
<b>Cuadro 10:</b> Odd Ratios e intervalos de confianza al 95% de la asociación de los polimorfismos de <i>IL-10</i> y <i>p53</i> al comparar el grupo de casos cáncer gástrico versus el grupo de pacientes dispépticos	60
<b>Cuadro 11:</b> Odd Ratios e intervalos de confianza al 95% bajo un modelo multivariado de regresión logística de la asociación de los polimorfismos de <i>IL-1B</i> , <i>IL-1RN</i> , <i>IL-10</i> y <i>p53</i> al comparar al grupo de cáncer gástrico versus el grupo de pacientes dispépticos	61
<b>Cuadro 12:</b> Frecuencias y valores de Odd Ratios e intervalos de confianza al 95%, para la asociación de 1 o más polimorfismos de <i>IL-1B</i> , <i>IL-1RN</i> , <i>IL-10</i> y <i>p53</i> con cáncer gástrico	63
<b>Cuadro 13.</b> Frecuencias y valores de Odd Ratios e intervalos de confianza al 95% para la asociación de 1 o más polimorfismos de <i>IL-1B</i> , <i>IL-1RN</i> , <i>IL-10</i> y <i>p53</i> con dispepsias.	63

## Lista de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Arg: Arginina

gl: grados de libertad

IC: Intervalo de confianza

IL-1: Interleucina-1

IL-10: Interleucina-10

IL-1 $\beta$ : Interleucina-1 beta

IL-1B: gen de la interleucina-1 beta

IL-1Ra: receptor antagonista de la interleucina-1

IL-1RN: Gen del receptor antagonista de la interleucina-1

OR: razón de riesgo (odd ratio)

p: probabilidad

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Pro: Prolina

RFLP: Polimorfismos del largo de los fragmentos de restricción

VNTR: Repeticiones en tándem de número variable

**Descriptores:**

Cáncer gástrico, polimorfismos, interleucina-1B, interleucina-1RN, Interleucina-10, p53, haplotipos, *Helicobacter pylori*.

**Introducción.****El cáncer gástrico en el mundo.**

El cáncer es uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial. Este hecho se ha traducido en un gran interés por esclarecer su etiología, así como identificar los factores de riesgo que inciden en su desarrollo, con el fin de prevenirlo. Lo anterior ha sido difícil hasta la fecha, dada su complejidad, por tanto constituye un reto para la comunidad científica mundial. Algunos tipos de cáncer son más frecuentes que otros y tienen mayor impacto sobre la salud pública, uno de ellos es el cáncer gástrico (Boyle 1997, Parkin *et al.* 1999).

Las tasas ajustadas de cáncer gástrico han ido disminuyendo en la mayoría de los países a nivel mundial por razones aun desconocidas. Esta disminución es más drástica en los países más desarrollados, que en la actualidad poseen las tasas de incidencia más bajas del mundo (Parkin *et al.* 1999). Sin embargo el número absoluto de casos de cáncer gástrico ha ido en aumento a través de los años, debido al envejecimiento de la población (Muñoz 1998). En el año 1980, este era el más común de todos los cánceres a nivel mundial, con un promedio de aproximadamente 669400 casos nuevos diagnosticados, lo cual correspondía al 10,5% de todos los cánceres (Statdländer *et al.* 1999). En el año 1985 ocurrieron alrededor de 755000 casos nuevos, 900000 en 1990 y alrededor de un millón en 1995 (Boyle 1997, Muñoz 1998). Actualmente, el cáncer gástrico es el segundo más frecuente en el mundo (representa el 8.7% de todos los casos

de cáncer registrados a nivel mundial) después del cáncer de pulmón (Ferlay *et al.* 2000).

Las tasas de incidencia y mortalidad presentan variaciones geográficas entre los países del mundo y entre regiones de un mismo país (Sierra *et al.* 1989, Webb *et al.* 1994, Statdländer *et al.* 1999). Asimismo, las tasas de incidencia y mortalidad son más altas en hombres que en mujeres (Parkin *et al.* 1999). También se presentan diferencias por edad, condición socioeconómica y dieta, entre otros (Parsonnet, 1993, McCulloch 1996, Statdländer *et al.* 1999).

#### **Tipos de cáncer gástrico.**

Existen varios tipos de cáncer gástrico, los dos más frecuentes son el cáncer gástrico de tipo intestinal y el cáncer gástrico de tipo difuso. Estos dos subtipos de cáncer tienen diferente etiología y comportamiento biológico. El cáncer gástrico de tipo intestinal, es el más común a nivel mundial, predomina en regiones geográficas de alto riesgo, se origina principalmente en la región gástrica del antro y se caracteriza porque hay una adhesión celular bien definida (Parsonnet 1993). Es originado a partir de una secuencia de lesiones precursoras y se cree que atraviesa diferentes fases que van desde mucosa normal; luego gastritis superficial (infiltración en la mucosa de linfocitos o células plasmáticas, acompañado de algunos cambios en el tejido epitelial); seguido de gastritis crónica atrófica (atrofia de las glándulas secretoras de ácido acompañado de inflamación crónica); posteriormente metaplasia intestinal (aparición de pequeños parches de tejido semejantes al epitelio intestinal dentro del estómago); displasia (células con una alta actividad mitótica, pérdida de polaridad y pleomorfismos nucleares) y por último cáncer gástrico de tipo intestinal (Correa 1992). En algunos casos no se llega hasta la fase final de esta serie de eventos, ya que el proceso podría detenerse en alguna

de las fases, e incluso hasta podría ser reparada la lesión (Correa *et al.* 1990). Este tipo de cáncer se presenta en edad avanzada, con mayor frecuencia a partir de los cincuenta años y es más frecuente en hombres que en mujeres (Ferlay *et al.* 2000).

El cáncer gástrico de tipo difuso, generalmente involucra las regiones del fundus y cardia del estómago, carece de adhesión celular (se forman infiltrados celulares o células neoplásicas dispersas ya sea de una sola célula o en pequeños grupos). Tiene una incidencia relativamente constante, sin lesiones precancerosas identificables, se desarrolla más temprano en la vida y se cree que tiene un mayor componente genético asociado en comparación con el de tipo intestinal (Powell 1997).

#### Patogénesis de la enfermedad.

A través de la combinación de estudios epidemiológicos e investigaciones clínicas se ha formulado una hipótesis sobre la patogénesis de esta enfermedad. El primer paso en la serie de eventos, que podrían culminar en cáncer gástrico de tipo intestinal, es la irritación gástrica. Esta irritación podría ser causada por un agente ambiental, que desencadena la gastritis superficial y la gastritis atrófica, en ambas fases juega un papel muy importante la bacteria *Helicobacter pylori*. En la gastritis crónica atrófica aparece la hipoclorhidria, esto facilitaría el crecimiento de bacterias que habitan en las inmediaciones del estómago. Cuando se da un sobrecrecimiento de bacterias en el estómago, se da la conversión y síntesis de compuestos nitrogenados u oxigenados, altamente mutagénicos (producto del metabolismo de dichos organismos o de los mecanismos de defensa del hospedero en respuesta a la infección bacteriana), lo que causa metaplasia intestinal, displasia y en última instancia el cáncer gástrico (Correa 1992).

### **Factores de riesgo.**

Existen una serie de factores de riesgo de desarrollar cáncer gástrico entre ellos: la dieta (el bajo consumo de frutas y verduras y alto consumo de alimentos irritantes), la formación endógena de compuestos nitrosados, la predisposición genética que tengan las personas a desarrollarlo (lo cual puede ser el factor determinante) y la infección por *Helicobacter pylori* (Sierra *et al* 1993, Kuipers 1999, Correa 2003). Todos estos factores sumados, pueden desencadenar la secuencia de eventos histológicos que van desde una mucosa gástrica normal a gastritis crónica, atrofia gástrica, metaplasia intestinal, displasia y por último cáncer gástrico de tipo intestinal.

### **Factores de la dieta asociados con el cáncer gástrico.**

Algunas sustancias carcinógenas pueden estar presentes en las comidas, o ser introducidas o sintetizadas durante la preparación y preservación de los alimentos. Las comidas irritantes como los picantes, los encurtidos, los embutidos ricos en compuestos nitrosados, comidas con alto contenido de sal, alimentos almacenados en condiciones inadecuadas, aumentan el riesgo de desarrollar cáncer gástrico. El bajo consumo de frutas y verduras limita la obtención de antioxidantes, como por ejemplo los tocoferoles, el ácido ascórbico y el  $\beta$ -caroteno, entre otros, los cuales pueden ser utilizados por el organismo para eliminar, degradar o prevenir la formación de compuestos con propiedades carcinogénicas (Correa 1992, Parsonnet 1993).

### **Compuestos nitrosados**

Existen potentes mutágenos que causan la metilación de los ácidos nucleicos y las proteínas. Sustancias como nitrosaminas, N-nitro-N-nitrosoguanidina (potente mutágeno que causa la metilación de los ácidos nucleicos y proteínas), óxido nítrico

(producto de los macrófagos del sistema inmune ante infecciones bacterianas, que al acumularse puede provocar daño celular), entre otros. (Statdländer *et al.* 1999, El-Omar *et al.* 2000).

Los estudios en pacientes con gastritis crónica atrófica han demostrado que compuestos como las N-nitrosaminas son sintetizadas intragástricamente en estómagos colonizados por bacterias a partir de nitratos y nitritos mediante enzimas bacterianas (Sierra *et al.* 1993, El-Omar *et al.* 2000). Algunas bacterias como por ejemplo *Helicobacter pylori*, pueden producir compuestos nitrógenados de desecho, producto de su metabolismo, que bajo condiciones normales de la mucosa gástrica son eliminados. Conforme pasa el tiempo y la infección perdura, los sistemas fisiológicos de excreción de dichos compuestos se dañan, por lo que se produce acumulación de estos y en última instancia se traducen en daños severos en la hebra de ADN, alteraciones en el ciclo celular y eventualmente cáncer gástrico (Statdländer *et al.* 1999).

#### **Susceptibilidad genética.**

Los factores genéticos que aumentan la susceptibilidad de desarrollar cáncer gástrico pueden ser muchos. Se ha demostrado que la enfermedad puede estar presente en las familias a través dos o tres generaciones y las personas que tienen familiares con cáncer gástrico tienen un riesgo entre dos y tres veces mayor de desarrollarlo, en comparación con personas de la población general (Brenner *et al.* 2000). Sin embargo, los resultados de este tipo de estudios deben ser interpretados con cautela ya que poseen limitaciones metodológicas, puesto que los miembros de una misma familia además de tener el componente genético común, también comparten algunas costumbres, como por ejemplo los hábitos alimenticios, por lo que es muy difícil separar el componente genético del ambiental.

Las alteraciones genéticas son muy importantes en las diferentes etapas de la carcinogénesis y progresión del tumor y pueden diferir dependiendo del tipo histológico de cáncer gástrico. La investigación a nivel molecular ha revelado anomalías genéticas y epigenéticas que han sido relacionadas con el cáncer gástrico a nivel de activación de la telomerasa, inestabilidad genética, activación de oncogenes, inactivación de genes supresores de tumores, sobreexpresión de factores de crecimiento y citoquinas, anomalías en genes reguladores del ciclo celular y en genes de reparación del ADN (Tahara *et al.* 1996, Yasui *et al.* 2001). Uno de los fines de la búsqueda de alteraciones genéticas sería utilizarlas como marcadores moleculares efectivos en el diagnóstico de cáncer gástrico, de manera este sea más efectivo y se pueda establecer con certeza la fase en la que se encuentra la lesión, lo que facilitaría la detección temprana de cáncer gástrico así como de pacientes en alto riesgo de desarrollar dicha enfermedad (Tahara *et al.* 1996, Yasui *et al.* 2001).

Se ha observado actividad anormal de algunos genes que codifican para receptores o para factores de crecimiento entre ellos TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , PDGF, IGF y EGFR, de genes reguladores del ciclo celular como el caso de los genes CDK, los cuales parecen tener un papel preponderante en el desarrollo de cáncer gástrico al igual que la familia de genes bcl. También se han observado alteraciones en la estructura y función de múltiples oncogenes que han sido involucrados en el desarrollo y progresión del cáncer gástrico, lo que provoca su activación, tal es el caso de c-ki-ras, c-erbB-2, K-sam, hst/int-2, c-met y c-myc, ciclina E, p27, e inactivación de genes supresores de tumores como APC, DCC y RB1, así como de los genes que expresan adhesinas (E-caderina, P-caderina y  $\alpha$ -catenina), cuyos productos proteicos pueden funcionar como proteínas

supresoras de tumores. Estos se activan o inactivan en diferentes etapas del proceso de carcinogénesis (Tahara *et al.* 1996, McCulloch 1996, Powell 1997, Statdländer *et al.* 1999, Yasui *et al.* 2001).

La inestabilidad genética podría estar relacionada con el cáncer gástrico de tipo intestinal. Mutaciones somáticas en secuencias de microsatélites, producidas por errores en la replicación del ADN podrían traducirse en inestabilidad genética o bien, mutaciones en genes de la reparación del ADN mal apareado podrían también ser las causantes de inestabilidad (Tahara *et al.* 1996). En un estudio realizado por Tahara y colaboradores (1996), encontraron inestabilidad en una secuencia repetitiva CA en un 42% de adenomas gástricos y en un 33% de personas con metaplasia intestinal, ambas implicadas en el desarrollo de cáncer gástrico de tipo intestinal, por lo que concluyeron que la inestabilidad genética se presenta como un evento temprano en el proceso de carcinogénesis gástrica.

La actividad de la enzima telomerasa, la cual es una ribonucleoproteína que sintetiza la secuencia telomérica, es otra de las alteraciones que se ha detectado en células carcinogénicas. En células somáticas normales, los telómeros sufren acortamiento conforme ocurren las divisiones celulares, por lo tanto este proceso funciona como un reloj mitótico en el cual, a partir de cierto número de divisiones, la célula producto del proceso de amplificación clonal muere. En células carcinogénicas se ha observado una sobreexpresión de dicha enzima, por lo que no experimentan el proceso normal de acortamiento telomérico y no entran en el proceso de senescencia o en el mecanismo de apoptosis, lo cual se traduce en inmortalización celular. Esto ha sido reportado en tejido gástrico con metaplasia intestinal así como en cáncer gástrico, donde se han visto telómeros más cortos de los que se observarían en células normales de

mucosa gástrica (Tahara *et al.* 1996)

### **P53 y cáncer gástrico.**

Uno de los genes supresores de tumores más importantes es el gen p53. Este gen fue descrito en 1979 y fue el primer gen supresor de tumores en ser identificado. Inicialmente, fue descrito como un oncogen, sin embargo en posteriores estudios, llevados cabo a nivel genético y funcional, se descubrió su verdadera función como supresor de tumores. Tanto el gen como su producto proteico han llegado a ser el centro de intensa investigación, debido a que algunos estudios señalan que en más del 50 por ciento de todos los cánceres humanos la proteína p53 no es funcional como resultado de mutaciones en este gen (Levine 1997, Vogelstein *et al.* 2000).

p53 es una fosfoproteína de 393 aminoácidos, con peso molecular de 53kD. En su forma nativa dicha proteína es tetramérica, con 5 dominios estructurales y funcionales. Un dominio está relacionado con el proceso de activación transcripcional, un segundo dominio, específico de unión al ADN, un tercer dominio de tetramerización, otro dominio cuya función es el reconocimiento y unión a ADN dañado y un quinto dominio, rico en residuos del aminoácido prolina, el cual podría estar relacionado con procesos de señalización y activación de la transcripción (Walter y Levine 1996).

La proteína p53 actúa a nivel nuclear por lo que, normalmente, suele encontrarse acumulada en el núcleo en bajas concentraciones, debido a que posee una vida media corta (aproximadamente 20 minutos). Sin embargo, varios tipos de estrés celular pueden activar la transcripción de dicha molécula, lo cual resulta en un rápido aumento en los niveles de expresión de esta o bien, en una disminución en el proceso de degradación de la misma (Fenoglio-Preiser *et al.* 2003). Pero no solamente es necesario un aumento en los niveles de p53 para que ésta ejerza su función, además son necesarios cambios en la

conformación de la proteína, los cuales resultan en modificaciones tales como la adición o remoción de grupos fosfatos, acetil, glicosil, ribosa, entre otros (Vogelstein *et al.* 2000).

Existen varias vías para la activación de la proteína p53 que pueden responder a diversas formas de estrés celular. p53 puede activarse en respuesta a daños en la molécula de ADN, inducidos por factores como radiación ultravioleta o daños de origen químico, lo cual produce un rápido aumento en los niveles de p53 y en su activación como factor de transcripción. Una segunda forma de activación de p53 es en respuesta a la hipoxia celular de las células cancerosas, cuando la fuente de metabolitos necesarios para el crecimiento tumoral se convierte en un factor limitante. Esto activa diversos mecanismos que desencadenan el fenómeno de angiogénesis, lo cual es detectado como una señal de alerta por proteínas asociadas con la activación de p53. Un tercer mecanismo de activación de p53 se produce cuando las concentraciones celulares de ribonucleótidos caen por debajo de cierto valor umbral, lo cual es interpretado como señal de alerta por proteínas de ciertas vías de activación de p53 (Levine 1997, Vogelstein *et al.* 2000). Otra vía de activación de p53 está relacionada con la expresión de ciertos oncogenes, lo cual estimula la transcripción de genes como p14<sup>ARF</sup> y éste a través de una serie de eventos, induce la activación de p53 (Vogelstein *et al.* 2000). Por lo tanto, es claro que existen varias vías que pueden activarse de forma independiente o bien podrían, estar interconectadas y que en última instancia conducen a la activación de la proteína p53 ante una situación de estrés celular.

p53 ejerce su función como supresor de tumores mediante dos mecanismos de acción. Dicha proteína es un factor de transcripción que actúa regulando de forma negativa el ciclo celular en la fases de transición de G1 a S y de G2 a M, o bien

regulando de manera positiva la transcripción de algunos genes, cuya función está relacionada con la regulación del ciclo celular. Además, p53 desempeña un papel determinante en el proceso de muerte celular programada o apoptosis (Levine 1997). Por lo tanto, dicha proteína puede responder a múltiples señales de alarma celular incluyendo daños a nivel del ADN, perturbaciones en la regulación o el arresto del ciclo celular, (Walter y Levine 1996, Vogelstein *et al.* 2000, Fenoglio-Preiser *et al* 2003). p53 también desempeña un papel fundamental en la prevención de la transformación celular, controlando la proliferación de células potencialmente oncogénicas. Además, P53 actúa como un estabilizador genómico, así como un inhibidor de la angiogénesis (Fenoglio-Preiser *et al* 2003).

El gen p53 está localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13), se compone de 11 exones y es uno de los genes más comúnmente mutados en todos los tipos de tumores humanos. Las mutaciones para dicho gen producen, predominantemente, pérdida de la capacidad de unión de la proteína a la hebra de ADN, la inactivación de la misma, o bien, la inducción de cambios en su conformación (Hollstein *et al* 1991, Lane 1992). La pérdida de función de dicha proteína puede resultar en errores en el proceso de replicación del ADN, aumento en la inestabilidad genética, cambios en la ploidía y supervivencia de células con aumentos en su carga mutacional. Dicha pérdida de función puede ser el resultado de mutaciones, deleciones génicas bialélicas que producen la pérdida de la proteína de P53, así como de polimorfismos genéticos que provocan cambios de aminoácidos en la secuencia proteica (Fenoglio-Preiser *et al* 2003).

Se conocen regiones específicas del gen en las cuales se producen con mayor frecuencia mutaciones. Se ha observado que entre los exones número 5 y número 8 es

donde mas frecuentemente ocurren mutaciones, específicamente en los codones 175, 213, 245, 248, 273 y 282, y que dichas alteraciones en su mayoría corresponden a mutaciones de punto (cambios en un solo nucleótido). Ésta es la región del gen donde se concentran los aminoácidos más conservados. Además, predominan las transversiones sobre las transiciones (Hollstein *et al.* 1991, Hsieh *et al.* 1996, Tolbert *et al.* 1999). La mayoría de las mutaciones que se encuentran entre los exones 5 y 8 son somáticas es decir, generalmente son exclusivamente encontradas en ADN que ha sido extraído a partir de tejido tumoral. Se ha observado que si se compara contra ADN extraído de tejido no tumoral, adyacente al tumor, la mayoría de dichas mutaciones no son encontradas en este tejido, lo cual sugiere que dichos eventos se producen en las diferentes etapas del proceso de carcinogénesis (Hollstein *et al.* 1991, Hsieh *et al.* 1996).

p53 también presenta variantes polimórficas de línea germinal, es decir cambios en la secuencia del gen, que generalmente no son debidos a eventos de mutación. Uno de dichos sitios polimórficos está localizado en el exón número cuatro, específicamente en el codón 72 del gen (Shepherd *et al.* 2000). Dicho polimorfismo consiste en un cambio en una única base (guanina por citosina), lo cual da como resultado el cambio de un aminoácido en la secuencia de la proteína. Entonces, la presencia de los nucleótidos CGC en el codón 72 codifica para el aminoácido arginina (Arg), mientras que la presencia del codón CCC codifica para el aminoácido prolina (Pro). Dicho polimorfismo ha sido asociado con algunos tipos de cáncer como por ejemplo cáncer de pulmón y vejiga, entre otros (Oka *et al.* 1991, Wang *et al.* 1999, Fan *et al.* 2000).

Algunos estudios han encontrado asociación entre el polimorfismo del codón 72, en el exón cuatro del gen p53 con cáncer gástrico. La presencia del trinucleótido CCC, que codifica para prolina, en dicha posición ha sido asociada con un aumento en el

riesgo de desarrollar cáncer gástrico (Shepherd *et al.* 2000, Hiyama *et al.* 2002); Sin embargo podría existir diferencia en el riesgo de acuerdo al tipo histológico de cáncer gástrico, así como diferencias por sexo y grupo étnico (Tolbert *et al.* 1999, Shepherd *et al.* 2000, Hiyama *et al.* 2002). Igualmente, estas diferencias por sexo y grupo étnico han sido reportadas para otros tipos de cáncer (Wang *et al.* 1999). A pesar de esto dicha asociación no está del todo clara, por lo que se hace necesaria más investigación.

Estudios recientes han relacionado el polimorfismo del codón 72 de p53 con la sobrevida de los pacientes con cáncer gástrico. Se observó un aumento en la frecuencia del genotipo homocigoto para el trinucleótido CGC, que codifica para Arginina (Arg), asociado a un aumento en la edad de los pacientes de cáncer gástrico (Zhang *et al.* 2003). Además se observó en un estudio posterior, que pacientes con cáncer gástrico avanzado y que presentaban el genotipo heterocigota p53 Arg/Arg, presentaban una mayor sobrevida (Zhang *et al.* 2004). Esto podría atribuirse a que existen diferencias marcadas en la capacidad de inducir apoptosis y reprimir la transformación celular entre uno y otro genotipo del polimorfismo del codón 72 de p53 (Thomas *et al.* 1999).

Para el gen p53 se han reportado alteraciones en casos de metaplasia y displasia, así como en más del 60% de los casos de cáncer gástrico, independientemente del tipo histológico de cáncer (McCulloch 1996, Tahara *et al.* 1996, Powell 1997, Yasui *et al.* 2001,). Este gen está ampliamente relacionado con el proceso de apoptosis en cualquier tipo de tejido, incluyendo el epitelio intestinal, producido por cualquier estímulo patológico o fisiológico. Una de las vías apoptóticas en células del epitelio intestinal está asociada con un aumento en la expresión del oncogén c-myc y la expresión normal de p53. Cuando éste está mutado el proceso de apoptosis no ocurre de forma adecuada, por lo tanto se da una sobreexpresión de c-myc que, sumado a otros factores,

desencadena el proceso de carcinogénesis (Wong *et al.* 1999); Así mismo, variantes de un nucleótido asociadas a cambios en la secuencia de aminoácidos en la proteína p53, podría dar como resultado cambios en la estructura de dicha proteína, con lo cual se podría ver afectada de forma parcial o total la función que cumple dicha molécula en los procesos de regulación del ciclo celular y apoptosis, lo que en última instancia se podría traducir, junto con otros eventos, en el proceso de carcinogénesis gástrica (Thomas *et al.* 1999, Shepherd *et al.* 2000, Hiyama *et al.* 2002,).

#### *Helicobacter pylori* y cáncer gástrico.

La infección por *Helicobacter pylori* es considerada uno de los factores más importantes en el desarrollo del cáncer gástrico. En junio de 1994, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC), perteneciente a la Organización Mundial de la Salud, declaró a esta bacteria como un cancerígeno de primera clase, lo que la sitúa entre los agentes tumorales gástricos más peligrosos (Blaser 1996).

Fue aislada por incubación accidental a inicios de los años ochenta por el patólogo australiano Robin Warren y su colaborador Barry J. Marshal en el hospital Royal Perth, a partir de biopsias gástricas de pacientes con gastritis y úlcera péptica. Esta bacteria fue denominada inicialmente como *Campilobacter pyloridis* debido a su semejanza con otras bacterias del género *Campilobacter* que habitan el tracto gastrointestinal y posteriormente, después de una serie de revisiones, se le da el nombre de *Helicobacter pylori* (Blaser 1996). Actualmente, podemos catalogar a *H. pylori* como la causa de una de las infecciones bacterianas crónicas más extendidas en el mundo, debido a que la mitad de la población mundial está infectada con dicha bacteria (Blaser 1996, Covacci *et al.* 1999, El-Omar *et al.* 2000). Además, está presente en algún

momento de la etapa precancerosa, en cerca de un sesenta por ciento de los casos de cáncer gástrico (Kuipers 1999, Statdländer *et al.* 1999, Brenner *et al.* 2000).

En la mayoría de las personas (cerca del 70%) no causa síntomas, sin embargo quien porta esta bacteria presenta un riesgo entre dos y tres veces mayor de desarrollar cáncer gástrico (Blaser 1998, Kuipers *et al.* 1999). En general, la prevalencia de la infección es más alta en países en desarrollo, en los grupos de mayor edad y en los grupos con nivel socioeconómico bajo (Sierra 1992, Blaser 1996). La infección por *H. pylori* es adquirida principalmente en la niñez y frecuentemente los niños son infectados por las mismas cepas que infectan a uno de sus padres, esto hace suponer que la familia es la unidad central de transmisión para *H. pylori*. Una vez que el estómago es colonizado por la bacteria esta persiste por décadas o bien por toda la vida del hospedero. El modo de transmisión es desconocido, pero la hipótesis más aceptada es que este organismo, se transmite de manera directa de persona a persona por heces humanas, contenidos gástricos, o bien por equipo endoscópico contaminado (Covacci *et al.* 1999).

*H. pylori* es una bacteria gram-negativa, con forma de espiral que tolera ciertos niveles de acidez y además utiliza una variedad de estrategias para sobrevivir en el ambiente ácido del estómago. Por ser un organismo que logra sobrevivir por décadas en condiciones extremas y al igual que otras bacterias especializadas para sobrevivir en ambientes similares, *Helicobacter pylori* tiene un genoma pequeño (1.67 megabases), conteniendo solamente los genes realmente necesarios para la expresión de proteínas que participan en sus procesos metabólicos (Covacci *et al.* 1999). Esta bacteria, posee una enzima ureasa, la cual descompone la urea en dióxido de carbono y amoníaco y este último producto puede neutralizar la acidez gástrica; vive en la capa mucosa que recubre

la superficie del estómago, lo que le da cierta protección contra los ácidos que este órgano produce; puede nadar a través de estas secreciones mucosas gracias a la presencia de un flagelo, esto le permite alcanzar regiones estomacales donde el pH es más alto y adherirse fuertemente a las células epiteliales de dicha región; alcanzan picos de crecimiento óptimo con niveles de oxígeno hasta del 5% (propios de la capa mucosa del estómago) (Blaser 1996, Covacci *et al* 1999, Statdländer 1999).

*H. pylori* es una bacteria con una enorme diversidad genética. Dicha diversidad está en determinadas regiones del genoma bacteriano, de tal forma que algunas cepas pueden ser consideradas “cuasiespecies”. Entre las más conocidas están las variantes en la región que comprende el gen de la toxina VacA, así como de la región donde se encuentra el gen CagA. Sin embargo, el genoma completo de dicho organismo, por sí mismo, no es tan diverso. Estas diferencias sugieren la existencia de algunas cepas más virulentas que otras, aun cuando comparten muchas características estructurales y fisiológicas (Covacci *et al.* 1999). Esta gran diversidad es consecuencia del ancestro de la bacteria, su nicho en las diferentes poblaciones humanas, sus enormes números por hospedero colonizado (entre  $10^8$  y  $10^{10}$  organismos por estómago), su alta tasa de mutación y la facilidad con la que puede darse intercambio de genes entre las diferentes cepas bacterianas (Blaser 1998).

Los niveles de acidez en el estómago juegan un papel importante para la supervivencia, proliferación y colonización de la bacteria *H. pylori*. Así, una alteración en las condiciones de acidez que lleve a un aumento del pH a niveles de 4 o aún mayores, puede facilitar que la bacteria logre establecerse más fácilmente que bajo condiciones de pH normales y residir de forma permanente ahí (Statdländer *et al.* 1999).

El sistema inmune juega un papel importante ante la infección por la bacteria

*Helicobacter pylori*. Esta bacteria causa inflamación, la magnitud de esta depende de la cepa bacteriana presente y de los mecanismos de reacción del hospedero en respuesta al patógeno (Covacci *et al.* 1999, El-Omar *et al.* 2000). La respuesta inmune a *Helicobacter pylori* involucra a un complejo grupo de quimioquinas (IL-8), citoquinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) y citoquinas inmunosupresoras (IL-10) (Statdländer *et al.* 1999, El-Omar 2001).

La respuesta normal de un huésped ante infecciones bacteriales o de otros antígenos es la inflamación. Éste es un proceso que produce movimiento de fluidos y leucocitos de la sangre al tejido extravascular afectado por la infección. El aumento en la velocidad del flujo sanguíneo causa dolor, mientras que la acumulación de fluidos y células causa edema local además de dolor. Esta respuesta inflamatoria está fuertemente regulada por las citoquinas (Sharon 1998).

### **Citoquinas.**

Las citoquinas son péptidos o glicopéptidos secretados por células del hospedero, que influyen en el comportamiento de otras células cercanas (acción paracrina) o de las mismas células que las producen (acción autocrina) (Sharon 1998, Krakauer *et al.* 1999). Las citoquinas son proteínas de masa molecular relativamente pequeña (entre 8 y 25 kDal) que suelen estar formadas por una sola cadena de aminoácidos. Regulan una serie de procesos biológicos importantes tales como: el crecimiento celular, la activación celular, la inflamación, la inmunidad, la reparación tisular, la fibrosis, y la morfogénesis (Krakauer *et al.* 1999). El mensaje es variable y depende de la citoquina, de las células blanco, del tipo de receptor y del ambiente celular (Sharon 1998).

La acción de las citoquinas es similar a las hormonas. Ejercen su efecto por

unión a receptores específicos de la membrana celular, iniciando una señal de transcripción en el interior de las células que culmina con la transcripción de genes. De esta forma las citoquinas median la comunicación celular entre células productoras de citoquinas y sus células blanco (Sharon 1998). Las citoquinas también pueden intensificar o inhibir el efecto de otras citoquinas por lo que sus efectos pueden ser sinérgicos o antagonistas. Éstas son producidas y secretadas en pequeñas cantidades pero son capaces de inducir fuertes respuestas biológicas debido a la alta afinidad por sus receptores específicos y porque, generalmente, actúan a corta distancia de donde son producidas (Sharon 1998). Aunque las citoquinas son consideradas como una “familia”, este concepto es funcional y no estructural ya que estas no están relacionadas químicamente entre sí. De todas formas, existen parejas de citoquinas que comparten hasta un 30% de sus secuencias, éste es el caso de interleucina-1 $\alpha$  e interleucina-1 $\beta$  (Oppenheim *et al.* 2001).

### **Interleucinas.**

La denominación de interleucina se remonta al año 1981. En aquel momento fueron definidas como moléculas sintetizadas por los leucocitos y que también ejercían sus efectos sobre dichas células, sin embargo la investigación realizada ha demostrado que afectan muchos tipos de células y que algunas son sintetizadas por células diferentes a los leucocitos (Sharon 1998, Krakauer *et al.* 1999). Se conocen 29 vías de interleucinas, las principales células sobre las que ejercen sus efectos van desde células T y B, hasta los fibroblastos y células endoteliales (Oppenheim *et al.* 2001). Su acción sobre las células blanco es muy diferente, dependiendo del tipo de interleucina, por lo que pueden desencadenar un amplio repertorio de respuestas fisiológicas.

### Interleucina-1

Interleucina-1 (IL-1) es una citoquina pro-inflamatoria, producida por muchos tipos de células, entre ellas: keratinocitos, epitelio de la cornea, linfocitos, astrocitos, células endoteliales, neutrófilos, células del músculo liso, siendo monocitos y macrófagos los principales productores de IL-1 (Oppenheim *et al.* 2001). El nombre IL-1 abarca tres diferentes proteínas, IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  e IL-1Ra, las cuales son codificadas por genes diferentes (Sharon 1998). Dichas proteínas son sintetizadas como precursores de IL-1 y, a través de modificaciones postraduccionales, son procesadas a sus formas activas (Dinarello 1996). Las tres son moléculas de bajo peso molecular (Siders *et al.* 1993).

Las tres proteínas IL-1 se unen a dos tipos específicos de receptores, receptor de IL-1 tipo I y receptor de IL-1 tipo II (IL-1RI e IL-RII). Estos receptores se pueden encontrar en dos formas, en la membrana plasmática de las células blanco sobre las que ejercen su efecto, unidos a través de una región de transmembrana, o bien se pueden encontrar libres en la circulación sanguínea y linfática, los cuales son producidos por proteólisis enzimática de la forma unida a membrana por lo que se conocen como receptores solubles para IL-1 (IL-1sI e IL-1sII). Dichos receptores son codificados por genes diferentes, a pesar de eso comparten bastante homología estructural. Sin embargo, sólo IL-1RI es capaz de producir señales de activación de la transcripción, mientras que IL-RII, así como las formas solubles de ambos tipos de receptores actúan como moléculas “señuelos”, dado que IL-1 $\alpha$  así como IL-1 $\beta$  son capaces de unirse a dichos tipos de receptores con alta afinidad pero no se da activación de la transcripción (Dinarello 1996).

El efecto de IL-1 en la expresión génica puede darse de dos formas, ya sea

iniciando el mecanismo de transcripción o bien, estabilizando el ARNm de una variedad de genes. La citoquina IL-1 es capaz de aumentar la expresión de varios genes, entre ellos la familia de genes de IL-1, así como de otras citoquinas inflamatorias, factores de crecimiento de linfocitos, factores estimuladores de colonias y factores de crecimiento mesenquimales entre otras. Asimismo, algunos genes de expresión constitutiva son suprimidos por IL-1. Por otro lado, IL-1 induce la transcripción de una gran variedad de genes relacionados con el proceso de inflamación entre los que podemos citar el gen que expresa la fosfolipasa-A<sub>2</sub> de tipo 2 y el gen que expresa ciclooxigenasa tipo 2 (COX-2) (Dinarello 1996)

Los genes que codifican para las proteínas IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  e IL-1Ra se encuentran agrupados en una región de 430Kb en el brazo largo del cromosoma 2 (Nicklin *et al.* 1994). El gen IL-1B (que codifica para la proteína IL-1 $\beta$ ) está localizado en la banda 2q14, ligado al gen IL-1A (que expresa IL-1 $\alpha$ ), que se encuentra en la banda 2q13. Ambos genes se componen de 7 exones, IL-1A no presenta en su región promotora una caja TATA, sino un motivo TACAA y una región intensificadora de señal (“enhancer”) 4,2 Kb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. La región promotora de IL-1B si presenta una caja TATA (Dinarello 1996).

El receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra) es una molécula endógena capaz de suprimir los procesos inflamatorios (Clay *et al.* 1996, Oppenheim *et al.* 2001). Este actúa como inhibidor para la activación de la transcripción y bloquea competitivamente la unión de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  a su receptor celular (Oppenheim *et al.* 2001). IL-1Ra se une al receptor de IL-1 por una semejanza estructural en los dominios de unión entre las dos proteínas, pero la unión es un poco diferente y esto hace que el receptor no sea activado

y que no se transmita una señal de transcripción. Por lo tanto, IL-1Ra controla los procesos inflamatorios, evitando que la respuesta inflamatoria ante algún tipo de infección sea excesiva y de esta forma pueda ser controlada, manteniéndose el balance adecuado (Dinarello 1996). El gen IL-1RN, que codifica para este receptor se encuentra en la misma región de IL-1B e IL-1A, en el brazo corto del cromosoma 2, en la banda q14.2 (Clay *et al.* 1996). Se ha determinado un grado moderado de desequilibrio de ligamiento entre estos tres genes (Cox *et al.*, 1998).

Recientemente, El-Omar y colaboradores (2000), Machado y colaboradores (2001), Tseng y colaboradores (2001) han estudiado el gen IL-1B, que codifica para la proteína pro-inflamatoria IL-1 $\beta$ , así como el gen IL-1RN, que codifica para su receptor proteico antagonista. Ambos genes son polimórficos. En el caso de IL-1B estos polimorfismos consisten de cambios de una sola base (transiciones citosina-timina) en regiones corriente arriba o corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción (Tseng *et al.* 2001). Para el gen IL-1RN, los polimorfismos presentan un número variable de repeticiones en tándem de un segmento de 86 pares de bases, en el intrón número dos de este gen (Tarlow *et al.* 1993). Se han encontrado diferencias significativas entre grupos étnicos en las frecuencias genotípicas de los polimorfismos, tanto del gen IL-1B como de IL-1RN (Tseng *et al.* 2001).

#### **Interleucina-1 y cáncer gástrico.**

Tanto El-Omar y colaboradores (2000) así como Machado y colaboradores (2001) han encontrado que algunos polimorfismos de los genes IL-1B e IL-1RN ( IL-1B-31C, IL-1B-511T e IL-1RN\*2) están asociados con un aumento en el riesgo de

desarrollar cáncer gástrico ya que pueden afectar la secreción de los ácidos gástricos en el estómago. Esto ha sido confirmado en estudios llevados a cabo en modelos animales, donde se ha observado que la inhibición en la secreción de ácidos gástricos está asociada a un aumento en los niveles de la proteína IL-1 $\beta$  o bien de mRNA IL-1 $\beta$  en la mucosa gástrica (Beales y Calam 1998, Takashima *et al.* 2001). Mas recientemente se ha confirmado la asociación de los polimorfismos de IL-1B e IL-1RN con el aumento en el riesgo de cáncer gástrico (Furuta *et al.* 2002, Rollinson *et al.* 2003, Zeng *et al.* 2003). Dichos polimorfismos pueden aumentar la expresión de la proteína IL-1 $\beta$ , con lo cual se produciría inhibición en la secreción de ácidos gástricos en el estómago.

A pesar de lo anterior, existe cierta controversia acerca del papel que pueden estar jugando los polimorfismos de IL-1B e IL-1RN en el desarrollo de cáncer gástrico. Algunas investigaciones llevadas a cabo en poblaciones asiáticas no han encontrado una asociación estadísticamente significativa de dichos polimorfismos con el riesgo de desarrollar cáncer gástrico (Kato *et al.* 2001, Lee *et al.* 2003, Wu *et al.* 2003). Por tanto, pareciera que la asociación de los polimorfismos de IL-1B e IL-1RN con cáncer gástrico podría variar dependiendo del grupo étnico, entre otros factores.

Recientemente se ha investigado el papel de los polimorfismos de IL-1B e IL-1RN en otros tipos de lesiones gástricas precancerosas. Furuta y colaboradores (2002) encontraron una asociación positiva para los polimorfismos del gen IL-1B con gastritis atrófica e hipoclorhidria, dos de las principales lesiones precursoras del proceso de carcinogénesis gástrica de tipo intestinal. También se ha observado una asociación positiva de dichos polimorfismos con el aumento de pH del jugo gástrico, así como con la disminución en los niveles de pepsinógeno I (PG I) en suero y en la proporción PG I/PG II (los niveles de pepsinógeno I y el valor de la razón PG I/PG II se ven reducidos,

de forma significativa con el aumento de la extensión y severidad de la inflamación y de la atrofia en la región del corpus). Sin embargo, los efectos de los polimorfismos de IL-1B se ven limitados a sujetos infectados con la bacteria *H. Pylori*, lo cual resalta la importancia de este organismo en el proceso de carcinogénesis gástrica (Furuta *et al.* 2002).

Estudios recientes han encontrado asociación altamente significativa de los polimorfismos de IL-1B e IL-1RN con el riesgo de úlcera duodenal. En este caso, se ha determinado que la presencia de los polimorfismos de IL-1B e IL-1RN, que aumentan el riesgo de desarrollar cáncer gástrico, están asociados con una disminución en el riesgo de desarrollar úlceras duodenales (García-González *et al.* 2001, García-González *et al.* 2003). La úlcera duodenal, se caracteriza por la presencia de gastritis, predominantemente en la región antral del estómago, así como de una excesiva secreción de ácido gástrico (Troost *et al.* 2003). De esta forma los polimorfismos de las interleucinas, cuyo efecto es aumentar la expresión de la proteína IL-1, podrían estar asociados con una disminución en el riesgo de desarrollar úlcera duodenal.

#### **Interleucina-1, *Helicobacter pylori* y cáncer gástrico.**

Se ha observado asociación entre la tasa de infección por *H. pylori* y algunos polimorfismos de IL-1B. Se ha determinado que los individuos que portan determinados polimorfismos en las posiciones -31 y -511 del gen IL-1B podrían ser más vulnerables de contraer dicha bacteria y que ésta logre colonizar y persistir, más fácilmente, en el estómago. Además, se observan diferencias en las frecuencias alélicas para esos polimorfismos, al comparar poblaciones de origen caucásico con individuos de origen asiático, lo anterior sugiere que algunos polimorfismos de IL-1B podrían estar marcando diferencias en cuanto a la vulnerabilidad para contraer *H. pylori* entre los diferentes

grupos étnicos (Hamajima *et al.* 2001).

Recientemente se ha encontrado asociación entre los polimorfismos de riesgo de los genes IL-1B-511 e IL-1RN, el tipo de cepa de *H. pylori* y cáncer gástrico. Así, sujetos que son portadores del genotipo IL-1B-511T/-31T y homocigotos para el alelo IL-1RN\*2, y que además presentan cepas bacterianas de los tipos vacA<sup>s1+</sup>, vacA<sup>m1</sup> y cepas cagA positivas, presentan un mayor riesgo de desarrollar carcinomas gástricos así como algunos tipos de lesiones gástricas precancerosas, tales como atrofia glandular o atrofia gástrica, metaplasia intestinal así como inflamación severa. Además, dichos estudios confirman que los genotipos de riesgo para IL-1B e IL-1RN, así como los genotipos bacterianos más virulentos, se encuentran más frecuentemente en pacientes con lesiones gástricas precancerosas avanzadas y cáncer gástrico, en comparación con individuos controles (Figueiredo *et al.* 2002, Rad *et al.* 2003). Estos estudios sugieren que existe una interacción sinérgica entre factores de virulencia bacterianos y polimorfismos de IL-1 que conducen a un mayor riesgo de desarrollar lesiones precancerosas severas y por lo tanto a aumentar el riesgo de desarrollar cáncer gástrico.

Algunos estudios indican que factores relacionados con el estilo de vida, en interacción con los polimorfismos de IL-1B e IL-1RN, podrían aumentar la probabilidad de infección por *H. pylori*. Factores como el fumado y el consumo de alcohol, sumado a la presencia de ciertos polimorfismos del gen IL-1B, han sido asociados con un aumento en el riesgo de infección por dicha bacteria lo cual podría aumentar el riesgo de desarrollar cáncer gástrico. Sin embargo, estos resultados no son del todo concluyentes debido a que han sido llevados a cabo en un solo grupo étnico por lo que se requiere mayor investigación (Hamajima *et al.* 2002, Uno *et al.* 2002). Existe algún grado de controversia al respecto (Rad *et al.* 2003).

Por otro lado, además de los polimorfismos de IL-1, existen polimorfismos funcionales en otras interleucinas pro inflamatorias o anti inflamatorias, los cuales podrían estar actuando de forma sinérgica con los polimorfismos de IL-1 y contribuyendo así con el aumento en el riesgo de desarrollar cáncer gástrico. Recientemente, se demostró que algunos polimorfismos en los genes que codifican para el factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , interleucina-10, sumados a los polimorfismos de riesgo IL-1, confieren un aumento aun mayor en el riesgo de desarrollar esta enfermedad. De manera que, si una persona posee entre tres y cuatro polimorfismos de riesgo de los genes anteriormente mencionados, el riesgo de desarrollar cáncer gástrico podría ser hasta 27 veces mayor (El-Omar *et al.* 2001, El-Omar *et al.* 2003).

Con base en los estudios llevados a cabo se ha formulado una hipótesis que explica el aumento en el riesgo de cáncer gástrico atribuible a algunos polimorfismos de IL-1 $\beta$  e IL-1RN. Los alelos de dichos genes, que han sido asociados con aumento en el riesgo de cáncer gástrico, se relacionan con un aumento en los niveles de expresión de la proteína IL-1 $\beta$ , la cual es el más potente inhibidor de la secreción de ácidos gástricos hasta ahora conocido (El-Omar 2001). Así, individuos que portan los genotipos anteriormente citados (IL-1B-511/-31/IL-1RN\*2), sobreexpresan IL-1 $\beta$  en respuesta a la infección por parte de la bacteria *Helicobacter pylori*, lo que desencadena una vigorosa respuesta inflamatoria, atrofia gástrica, e hipoclorhidria. Una disminución en la secreción de ácido podría facilitar la colonización de la bacteria *Helicobacter pylori*, así como de otras bacterias menos adaptadas a vivir en condiciones de acidez extrema (Furuta *et al.* 2002, Mccoll y El-Omar 2002). Lo anterior, puede causar daño severo en la mucosa gástrica, por la acumulación de toxinas bacterianas y otros productos que son

secretados durante el proceso de inflamación. Debido a que la disminución en la secreción de ácidos impide que dichos compuestos puedan ser eliminados de forma eficaz del estómago. Muchas de las sustancias acumuladas son peróxidos y compuestos nitrosos, conocidos agentes mutagénicos. En ese ambiente también se reducen los niveles de vitamina C, lo que facilita la producción de estos compuestos mutagénicos (Troost *et al.* 2003, El-Omar *et al.* 2000,). Estos compuestos causan la ruptura de genes importantes para la regulación del ciclo celular, la aparición de mutaciones que causan activación de oncogenes, inactivación de genes supresores de tumores, sobreexpresión de factores de crecimiento, anomalías en genes reguladores del ciclo celular, genes de reparación del ADN, entre otras anomalías y estos daños, en última instancia llevarían al cáncer gástrico (Mccoll y El-Omar 2002, Erns 1999). Estos polimorfismos actúan en etapas tempranas del proceso de carcinogénesis y cuando el organismo está infectado por *H. pylori* (Troost *et al.* 2003).

Además de los factores de riesgo anteriormente citados, existen otros factores genéticos relacionados con el proceso inflamatorio, con el mecanismo apoptótico, así como del genoma de *H. pylori*, los cuales podrían estar interactuando con los polimorfismos de IL-1B e IL-1RN. Este podría ser el caso de polimorfismos en los genes que codifican para las citoquinas IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, entre otras proteínas relacionadas con el mecanismo inflamatorio en respuesta a la infección por *H. pylori* (El-Omar *et al.* 2001, Peek y Blaser 2002).

### Interleucina-10 y el cáncer gástrico.

Interleucina-10 (IL-10) es una proteína perteneciente al grupo de las citoquinas. IL-10 es una potente citoquina inmunorreguladora, la cual es producida por una serie de líneas celulares tales como monocitos, células T, keranocitos, células B activadas, entre otras (principalmente células Th2). Esta proteína fue descrita como un factor inhibidor de la producción de citoquinas relacionadas con los mecanismos pro- inflamatorios, así como de las células involucradas en la respuesta pro- inflamatoria (células Th1), por lo que se denominó factor inhibidor de la síntesis de citosina (CSIF). Posteriormente se han descrito efectos inhibidores así como efectos estimuladores de dicha molécula en varios tipos de células (Yee *et al.*2001, Fickenscher *et al.*2002).

IL-10 forma parte de una familia de citoquinas, debido a que presenta gran similitud estructural con otras moléculas. Las cinco moléculas con similitudes estructurales con IL-10 son IL-19, IL-20, IL-24/MDA-7, IL-22IL-TIF e IL-26/AK155, sin embargo dichas proteínas presentan funciones y patrones de expresión muy diferentes a IL-10. Además, comparte una gran similitud con su homólogo en ratones (aproximadamente 73% de la secuencia es idéntica), así como con algunas proteínas de origen viral, tanto a nivel estructural así como funcional (Fickenscher *et al.*2002). Se cree que éstas IL-10 virales podrían haberse originado a partir de duplicación del gen que codifica para la IL-10 humana y haber sido incorporadas posteriormente, en el genoma de los diferentes virus que las portan (Moore *et al.* 2001).

IL-10 es una proteína de aproximadamente 178 aminoácidos, cuyo peso molecular es de aproximadamente entre 17 y 18 kDa. Presenta una estructura tridimensional muy similar a una familia de citoquinas conocidas como interferones. Al igual que estas, IL-10 es una proteína compuesta por dos dominios, exactamente

idénticos, unidos de forma no covalente (Moore *et al.* 2001); dichos dominios presentan forma de V y consisten de 6  $\alpha$  hélices, cuatro de éstas se originan de una subunidad y dos de la otra subunidad (Fickenscher *et al.* 2002).

IL-10 se une a un receptor en sus células blanco compuesto por dos subunidades, IL-10R1 e IL-10R2. IL-10R1 es una molécula de 578 aminoácidos y un peso molecular de entre 90 y 120 kDa. Esta subunidad presenta una alta afinidad por IL-10 y es expresada en la mayoría de las células hematopoyéticas. Sin embargo, es en monocitos activados donde IL-10R1 es mayoritariamente expresado, lo cual es consistente con el efecto inhibitorio que IL-10 ejerce en dichas células. Por su parte, IL-10R2 es una subunidad accesoria que contribuye con el aumento en la afinidad de unión de IL-10 a su receptor, además de contribuir en el proceso de señalización y activación de la cadena de proteínas corriente abajo en esta vía de señalización. Ambas moléculas pertenecen a la familia de los receptores de los interferones (Moore *et al.* 2001).

IL-10 modula la expresión de citocinas, así como de receptores de superficie celular en células principalmente de origen mielóide. IL-10 inhibe la producción de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, entre otras citoquinas (Moore *et al.* 2001). La inhibición de IL-1 y TNF es crucial para su actividad anti-inflamatoria, dado que dichas citocinas presentan actividades antagonistas a IL-10 respecto a su papel en los procesos inflamatorios. Por lo tanto, IL-10 tiene efectos muy importantes en los mecanismos inmunitarios y en las respuestas inflamatorias (Ismail *et al.* 2003). De esta forma, el efecto de IL-10 en el sistema inmune es la regulación de la respuesta inflamatoria, de tal forma que dicha respuesta no produzca efectos dañinos, por si misma, al organismo una vez que el mecanismo inmune es activado en respuesta ante un estímulo dado.

El gen de IL-10 está localizado en el brazo largo del cromosoma 1,

específicamente en la región q32. Dicho gen se compone de 5 exones y se expande cerca de 5.2 kb en el ADN genómico (OMIM 124092). La activación de la expresión de dicho gen da como resultado un transcrito de ARNm de aproximadamente 2kB. Este puede ser expresado en una variedad de células, anteriormente citadas, en respuesta a estímulos de diversos tipos, sin embargo la regulación de la expresión de este puede ser diferente dependiendo del tipo de célula en donde se exprese (Moore *et al.* 2001).

Se han descrito una serie de polimorfismos para el gen IL-10. Dichos polimorfismos se localizan principalmente en la región 5' del gen, corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción. En esta región se encuentran dos áreas microsateliticas, las cuales están compuestas por múltiples repeticiones en tándem de los dinucleótidos citosina y adenina. Estas dos regiones de microsatélites se encuentran a aproximadamente 1.2 kb y 4.0 kb del sitio de inicio de la transcripción (Eskdale *et al.* 1997). Además de los anteriormente citados, existen otras variantes polimórficas, las cuales consisten de cambios de un solo nucleótido en las posiciones -1082 (G/A), -819 (C/T) y -592 (C/A) respecto al sitio de inicio de la transcripción (Moore *et al.* 2001). Aunque dichas mutaciones se encuentran en regiones no codificantes del gen, estos pueden tener efecto significativo en los niveles de transcripción génica y por ende pueden alterar los niveles de expresión de la proteína (Bidwell *et al.* 1999).

Algunos de los polimorfismos de la región 5' del gen IL-10 han sido asociados con cambios en los niveles de transcripción. Así, algunas de las variantes en el número de repeticiones CA en los microsatélites anteriormente mencionados, han sido asociadas con un aumento en la secreción de la proteína IL-10 (Eskdale *et al.* 1998). De la misma forma, los cambios de un solo nucleótido en los sitios -1082, -819 y -592 también han sido asociados con aumento o disminución en la expresión de dicha proteína (Crawley *et*

al.1999). Dichos cambios en los niveles de expresión pueden tener repercusiones importantes en una serie de enfermedades, entre ellas enfermedades autoinmunitarias, infecciosas y varios tipos de cáncer, entre otras (Bidwell *et al.* 1999, Yee *et al.* 2001 Bocchio *et al.* 2002, Alamartine *et al.* 2003, Shin *et al.* 2003)

Recientemente los polimorfismos de la región promotora de IL-10 han sido asociados con aumento en el riesgo de cáncer gástrico. El-Omar y colaboradores han reportado que individuos portadores de genotipos asociados con la disminución en los niveles de expresión de IL-10 (IL-10-1082A, IL-10-819T y IL-10-592A), presentan un mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico (El-Omar *et al.* 2003). Wu y colaboradores (2003) han encontrado una asociación estadísticamente significativa entre dichos polimorfismos de la región promotora y el aumento en el riesgo de desarrollar cáncer gástrico en una población taiwanesa. De la misma forma, un estudio llevado a cabo en una población china ha reportado asociación de uno de estos polimorfismos de la región promotora de IL-10 y cáncer gástrico (Wu *et al.* 2002). En dichos estudios la infección por parte de la bacteria *H. pylori* juega un papel fundamental en el proceso de carcinogénesis. Además, dicha asociación podría variar dependiendo del tipo histológico de cáncer así como de la edad de aparición de dicha enfermedad, el grupo étnico y tipo de cepa de *H. pylori*, entre otros factores (Wu *et al.* 2002, El-Omar *et al.* 2003, Wu *et al.* 2003).

De esta forma, los polimorfismos de IL-10 que disminuyen la expresión de dicha proteína, junto con los polimorfismos de IL-1B asociados con una mayor expresión de la proteína IL-1 $\beta$ , en conjunto podrían estar involucrados con aumento en el riesgo de desarrollar cáncer gástrico. En ambos genes existen polimorfismos en la región promotora que tienen efecto funcional en lo que a niveles de expresión se refiere

(Eskdale *et al.* 1998, El-Omar *et al.* 2000, Moore *et al.* 2001). Así, polimorfismos IL-1B que aumentan la expresión de IL-1 $\beta$ , generan un aumento de la respuesta inflamatoria ante *H. pylori*, además de que este aumento en los niveles de dicha proteína también tendrá efectos notorios sobre la secreción de ácidos en el estómago dadas las conocidas propiedades de IL- $\beta$  como inhibidor de la secreción de ácido en dicho órgano (El-Omar 2001). Sumado a esto, la disminución en la producción de la proteína IL-10, encargada de inhibir la expresión de IL-1 $\beta$  mediante unión a receptores de membrana en los monocitos/macrófagos, principales productores de IL-1 $\beta$ , hace que el control de la expresión de IL-1 $\beta$  sea deficiente, esto tendría como efecto neto un aumento en la respuesta inflamatoria ante *H. pylori* así como mayores niveles de IL-1 $\beta$  en el estomago, lo cual podría traducirse en mayor daño en la mucosa gástrica (El-Omar *et al.* 2003, Ismail *et al.* 2003, Troost *et al.* 2003). Por la razón anterior, una combinación de polimorfismos de los genes IL-1B e IL-10 puede crear un perfil genético cuyo efecto neto sería una mayor expresión de IL-1B, lo cual se traduciría en un mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico.

### **Justificación.**

Costa Rica ocupa uno de los primeros lugares en incidencia y mortalidad por cáncer gástrico a nivel mundial (Sierra *et al.* 1993, Ferlay *et al.* 2000). Desde 1970, el cáncer gástrico es la causa de muerte por cáncer más frecuente en hombres y mujeres del país, sin considerar las diferencias que existen, en cuanto a las tasas de incidencia y mortalidad entre regiones geográficas y por sexo.

Existen marcadas diferencias en las tasas de incidencia de cáncer gástrico, entre las regiones geográficas que componen el país, a pesar de ser territorialmente pequeño (Sierra *et al.* 1989). Sin embargo, aunque podrían existir variantes en cuanto a las costumbres alimenticias entre los habitantes del país, éste podría no ser un factor determinante como para atribuirle las diferencias geográficas en las tasas de incidencia de dicho cáncer. Esto hace suponer que existen otros factores desconocidos, que podrían estar jugando un papel muy importante en estas diferencias regionales en las tasas de incidencia de dicha enfermedad en Costa Rica.

Sabemos que existen algunos genes en los que se producen alteraciones genéticas que han sido implicadas en el desarrollo del cáncer gástrico y que son o podrían ser utilizados como marcadores para la detección temprana o prevención de esta enfermedad; Sin embargo en lo que a cáncer gástrico respecta, en Costa Rica hasta la fecha solamente se ha realizado un estudio a nivel molecular con genes que pueden estar implicados en el proceso de carcinogénesis gástrica (González 2003). Este tipo de estudios son sumamente importantes puesto que algunas alteraciones o variantes genéticas podrían ser factores de riesgo determinantes en el desarrollo de cáncer gástrico en nuestra población. Además de esto, algunos genes podrían ser utilizados como una herramienta más, para identificar individuos en alto riesgo de desarrollar cáncer gástrico.

En Costa Rica, así como en otros países en desarrollo, un alto porcentaje de la población está infectada con la bacteria *Helicobacter pylori* desde etapas muy tempranas de la vida (Sierra *et al.* 1998). Éste es uno de los principales factores asociados al aumento del riesgo de desarrollar cáncer gástrico. A pesar de ello, la gran mayoría de la población no llega a desarrollarlo, por lo que podrían existir polimorfismos que estén produciendo diferencias en la expresión de genes que codifican para algunas proteínas del sistema inmune. Estas diferencias podrían llegar a ser importantes en la respuesta del hospedero contra la bacteria, lo que haría que algunas personas desarrollen cáncer y otras no.

El problema del cáncer gástrico en Costa Rica podría aumentar en los próximos años, debido al aumento en la población mayor de 60 años (grupo más susceptible). Con un aumento en la población de mayor riesgo podría también incrementar el número de casos de cáncer gástrico, lo anterior haría aun más grave el problema de salud pública que desencadena esta enfermedad, por lo que se hace necesario buscar estrategias nuevas, efectivas, sencillas, aceptadas por la población (no invasivas) y de bajo costo económico para la prevención y detección temprana. De esta forma, se podría identificar a las personas con mayor riesgo de desarrollar la enfermedad para intervenir previniéndola o detectándola en etapas tempranas. De esta manera, el riesgo de enfermarse en edades avanzadas sería el mínimo, con lo cual disminuiría el número de casos de cáncer gástrico y el número de muertes producidas por esta causa en el país.

Entre los años 1999-2000 se realizó un proyecto llamado “Marcadores biológicos para identificar sujetos en alto riesgo de cáncer gástrico” del Programa de Investigación de Cáncer del Instituto de Investigaciones en Salud y se llevó a cabo con personas que acudían al Centro de Detección Temprana del Cáncer Gástrico del Hospital Max Peralta

de la ciudad de Cartago. Como resultado de este estudio se cuenta con bases de datos que contienen información epidemiológica y clínica así como de material biológico. Esta información epidemiológica y clínica, así como el material biológico, son un valioso recurso para realizar estudios pilotos a nivel molecular, que sean de utilidad para determinar marcadores para la identificación de personas en alto riesgo de desarrollar esta enfermedad.

### **Objetivo general**

Determinar la asociación de algunos de los polimorfismos de los genes interleucina-1B, interleucina-1RN, interleucina-10 y p53 con el riesgo de cáncer gástrico y lesiones gástricas en una población en alto riesgo de Costa Rica.

### **Objetivos específicos.**

- Determinar los polimorfismos de los genes IL-1B, IL-1RN, IL-10 y P53 que están presentes en cada uno de los sujetos del estudio.
- Determinar las frecuencias de los polimorfismos de los genes IL-1B IL-1RN, IL-10 y P53 en la población de estudio.
- Establecer los posibles haplotipos que se podrían presentar entre los polimorfismos de los genes IL-1B, IL-1RN e IL-10.
- Comparar las frecuencias de los polimorfismos de IL-1B e IL-RN, IL-10 y P53 de los pacientes con cáncer gástrico con las de pacientes dispépticos y las del grupo control.
- Determinar la asociación de los polimorfismos y/o de los haplotipos de los genes IL-1B, IL-1RN, IL-10 y P53 con cáncer gástrico.

### **Población y métodos.**

La muestra del presente estudio es una submuestra de un proyecto mas amplio sobre “Marcadores para identificar sujetos en alto riesgo de cáncer gástrico”, coordinado por el Programa de Investigación en Cáncer del Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), Universidad de Costa Rica. En dicho proyecto participaron 1300 personas del Centro de Detección Temprana de Cáncer Gástrico del Hospital Max Peralta de Cartago. Se cuenta con material biológico (suero y leucocitos congelados, biopsias parafinadas), así como información epidemiológica y clínica de los participantes.

Este proyecto posee información sobre el diagnóstico de: rayos X (n=1143 personas), endoscópico (n=761 pacientes) e histopatológico (n=273 personas). El diagnóstico por rayos X y endoscopia fue realizado por una radióloga costarricense y una radióloga japonesa, ambas especializadas en serie gastroduodenal de doble contraste y utilizando equipo de alta tecnología. El diagnóstico histopatológico fue realizado por dos patólogos (un patólogo japonés y un patólogo costarricense) en forma independiente, ambos expertos en patología gástrica, siguiendo la clasificación japonesa (Japanese Research Society for Gastric Cancer 1995).

El protocolo de estudio fue aprobado por el consejo científico del INISA. Todas las personas participantes firmaron un documento, aceptando de esta forma participar en dicho estudio.

Para el presente estudio se seleccionó una muestra de 198 personas del proyecto “Marcadores biológicos para identificar sujetos en alto riesgo de cáncer gástrico”. Éstas fueron distribuidas en cuatro grupos:

- **Grupo A:** 58 pacientes diagnosticados con cáncer gástrico mediante diagnóstico histopatológico en el Centro de Detección de Cáncer Gástrico del Hospital Max Peralta.

- **Grupo B:** 58 personas que formaban parte del programa de detección temprana de cáncer gástrico y no eran sospechosas de presentar cáncer gástrico según el diagnóstico de rayos X (serie gastroduodenal de doble contraste).
- **Grupo C:** 41 pacientes que han sido diagnosticados histopatológicamente y se les había asignado al grupo I y II, de acuerdo con la clasificación japonesa. El grupo I son personas normales o con lesiones benignas que incluyen epitelio regenerativo producto de erosiones o úlceras y epitelio hiperplásico de lesiones polipoides sin atipia. Por su parte el grupo II muestra algún grado de atipia, como por ejemplo algunos tipos de erosiones y úlceras, pero que son diagnosticadas como benignas (Japanese Research Society for Gastric Cancer 1995). Estas personas fueron referidos a endoscopia por la sintomatología o por ser sospechosas de cáncer gástrico según el examen de rayos X. Además, el endoscopista decidió hacer biopsias de rutina. Para fines prácticos a este grupo lo nominaremos en el texto y gráficos como pacientes dispépticos.
- **Grupo D:** 41 personas que cumplen con los mismos criterios tomados en cuenta para el grupo B.

Según el protocolo del proyecto “Marcadores para identificar sujetos en alto riesgo de cáncer gástrico”, de cada uno de los sujetos se había tomado la información epidemiológica y clínica (diagnóstico endoscópico e histopatológico) así como dos muestras de sangre de 5 ml cada una. Dichas muestras fueron transportadas hasta el INISA, donde se procesaron. Se separaron el suero, plasma y los leucocitos en tubos eppendorf de 1,5 ml y se almacenaron en congeladores a  $-70^{\circ}\text{C}$ . En el presente estudio

se realizó la extracción del ADN, para lo cual se tomó un volumen de 500 µl del tubo que contenía los leucocitos y se llevó a cabo esta mediante el protocolo de extracción con proteinasa-k y fenol/cloroformo.

#### **Proceso de determinación de los polimorfismos de IL-1B.**

El proceso de determinación de los polimorfismos del gen IL-1B se llevó a cabo mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa para polimorfismos de restricción de diversos tamaños(PCR-RFLP). La amplificación del ADN se llevó a cabo a partir de 100 ng de ADN en un termociclador Gene Amp PCR System 2400 de Perkin

Elmer usando los siguientes iniciadores:

IL-1B-511 Forward: 5'- GCCTGAACCCTGCATACCGT-3'

Reverso: 5'- GCCAATAGCCCTCCCTGTCT-3'

IL-1B-31 Forward: 5'- AGAAGCTTCCACCAATACTC-3'

Reverso: 5'- AGCACCTAGTTGTAAGGAAG-3'

IL-1+3954 Forward: 5'- AATTTTGCCACCTCGCCTCA-3'

Reverso: 5'- CGGAGCGTGCAGTTCAGTGAT-3'

El volumen final de reacción fue de 20 µl, conteniendo 10 mM de tris-HCl pH 8.3, 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl, 200 µM de cada uno de los nucleótidos ( dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 80 ng de cada iniciador y 0.5 unidades de Taq polimerasa. Las condiciones de termociclaje fueron las siguientes: 94°C por 10 minutos; luego cinco ciclos de 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos; luego

30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos; luego 5 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos (El-Omar *et al.* 2000).

Los productos de PCR fueron digeridos mediante enzimas de restricción y separados por electroforesis, en geles de agarosa al 3% y teñidos con bromuro de etidio. La determinación del tamaño de los polimorfismos de IL-1B se hizo basándose en un marcador de peso molecular de 100 pb. Para la determinación de IL-1B+3954C-T se utilizó la enzima TaqI. E, el alelo C estaba presente si se observaban dos bandas de 86 y 66 pb, mientras el alelo T estaba presente si se observaba una banda de 152 pb. Los genotipos fueron los siguientes: T/T, una banda de 152 pb; T/C, tres bandas de 152, 86 y 66 pb; C/C, dos bandas de 86 y 66 pb. Para la determinación de IL-1-31T-C se usó la enzima AluI. El alelo C estaba presente si se observaba una banda de 239 pb, mientras que el alelo T estaba presente si se observaban dos bandas de 103 y 136 pb. Los genotipos eran los siguientes: C/C, una banda de 239 pb; C/T, tres bandas de 239, 136 y 103 pb; T/T, dos bandas de 136 y 103 pb. Por otra parte, la determinación de IL-1B-511C-T fue utilizada la enzima AvaI. Así, la presencia del alelo C estaba determinada por la presencia de dos bandas de 88 y 67 pb, mientras que el alelo T estaba presente si era observada una única banda de 155 pb. Los genotipos eran los siguientes: C/C, dos bandas de 88 y 67 pb; C/T, tres bandas de 155, 88 y 67 pb; T/T, una banda de 155 pb.

Además, se utilizó un método adicional para la determinación de los polimorfismos IL-1B-31T-C e IL-1B-511C-T, este método es conocido como pirosecuenciación y fue llevado a cabo como control de calidad para la metodología de PCR-RFLP. La determinación de dichos polimorfismos mediante pirosecuenciación fue llevada a cabo en el laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Escuela de Medicina

de la Universidad de New York (Pérez-Pérez *et al.* 2003).

#### Proceso de determinación de los polimorfismos de IL-1RN.

Para el gen IL-1RN, 100ng de ADN genómico fue amplificado bajo las condiciones mencionadas anteriormente para el gen IL-1B, con los iniciadores: Forward: 5'- CCCCTCAGCAAACTCC-3', Reverso: 5'- GGTCAGAAGGGCAGAGA-3. Los productos de la PCR para este gen fueron separados por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2,5% y teñidos con bromuro de etidio. Los alelos fueron determinados en base a un marcador de peso molecular de 100 pb, fueron codificados convencionalmente con base al número de repeticiones como sigue: alelo1=4 repeticiones(442 pb), alelo2=2 repeticiones (270pb), alelo3=5 repeticiones (528pb), alelo4=3 repeticiones (356 pb), alelo5=6 repeticiones (614 pb) (El-Omar *et al.* 2000). Para efectos de análisis estadístico y dada la baja frecuencia de los alelos 3, 4 y 5, este gen fue tratado como bialélico mediante la división de los diferentes alelos en las categorías de alelos largos, los cuales corresponden a todos los alelos que tienen tres o más repeticiones de 86 pares de bases (alelos1, 3, 4 y 5) y son denotados por la letra L y alelo corto, el cual corresponde al alelo 2 (Machado *et al.* 2001).

#### Proceso de determinación de los polimorfismos de IL-10.

La determinación de los polimorfismos de IL-10 (IL-10-1082G/A, IL-10-819C/T, IL-10-592C/A) fue llevada a cabo mediante el análisis de pirosecuenciación. Se utilizaron los siguientes iniciadores bajo las siguientes condiciones de amplificación:

IL-10-1082,

Forward: 5'-CACACACACACAAATCCAAGACAA- 3'

Reverso : 5' – GCTGGATAGGAGGTCCCTTACTTT-3'

INICIADOR INTERNO: forward 5' -CTTTGGGAAGGGGA-3'

Condiciones de amplificación: 95°C por 5 minutos, luego 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 45 segundos, seguido de un proceso de extensión final de 5 minutos a 72°C. El tamaño de fragmento a amplificar fue de 95 pb.

IL-10-819,

Forward: 5' - GGGTGAGGAAACCAAATTCTCA- 3'

Reverso : 5' - CATGACCCCTACCGTCTCTATTTTA-3'

INICIADOR INTERNO: reverso 5' -CAAAGTGGGACACAGAG- 3'

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95°C por 5 minutos, luego 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 59°C por 30 segundos y 72°C por 45 segundos y un proceso de extensión final de 5 minutos a 72°C. El tamaño de fragmento a amplificar fue de 109 pb.

IL-10-592,

Forward: 5'-GGTAAAGGAGCCTGGAACACATC - 3'

Reverso : 5' - CCAAGCAGCCCTTCCATTT-3'

INICIADOR INTERNO: reverso 5' - CTGGCTTCCTACAG- 3'

Condiciones de amplificación: Condiciones de amplificación: 95°C por 5 minutos, luego 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 45 segundos, posteriormente un proceso de extensión final de 5 minutos a 72°C. El tamaño de fragmento a amplificar fue de 86 pb

#### **Proceso de determinación de los polimorfismos de P53.**

La determinación de los polimorfismos del gen P53 fue llevada a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa para polimorfismos de restricción de diversos tamaños(PCR-RFLP). La amplificación del ADN se llevó a cabo a partir de 50 ng de

ADN. Se utilizaron los iniciadores:

Forward: 5'- TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA-3'

Reverso: 5' -TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC -3'

Cada reacción de PCR fue llevada a cabo en un volumen final de 50µl conteniendo 10pmol de cada iniciador, 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de cada dNTP, 1 unidad de *Taq* polimerasa y 100 ng de ADN. Las condiciones de termociclaje fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por un minuto y 72°C por un minuto y un ultimo paso de extensión final de 72°C por 5 minutos. El Producto final de amplificación era de 199 pb. Posteriormente se tomo un volumen de 10 µl y se sometió a un proceso de digestión con la enzima de restricción BstUI y posteriormente fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 2% y visualizados con bromuro de etidio. De esta, forma el alelo que presenta la secuencia CGC, la cual codifica para el aminoácido Arginina (Arg), era digerido produciendo dos bandas de 133 y 86 pb, mientras que el alelo cuya secuencia es CCC, que codifica para el aminoácido prolina (Pro), no es digerido por lo que se observó una banda de 199 pb. Los genotipos fueron los siguientes: CGC/CGC (Arg/Arg), dos bandas de 133 y 86 pb; CGC/CCC (Arg/Pro), tres bandas de 199, 133 y 86 pb; CCC/CCC (Pro/Pro), una única banda de 199 pb (Fan *et al.* 2000).

#### **Análisis estadístico.**

En el análisis estadístico, se usó la prueba de Chi-cuadrado para determinar las posibles diferencias en las frecuencia genotípicas entre casos, lesiones gástricas precancerosas tipo I y II, y controles, así como para la determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg en cada uno de los loci estudiados. Para la determinación de las frecuencias haplotípicas se utilizo el programa Estimating Haplotypes Frequencies (EH).

Por su parte, los coeficientes de desequilibrio de ligamiento  $D$  y  $D'$ , para determinar los posibles haplotipos que se podrían presentar entre los diferentes loci estudiados, fueron estimados por medio del programa GENEPOP. Además se utilizó la prueba de odd ratio y modelos de regresión logística condicional para determinar posibles asociaciones entre los polimorfismos estudiados y cáncer gástrico para lo cual se utilizó el paquete estadístico STATA versión 7.0 (Stata corporation).

## RESULTADOS.

### Características generales de la población de estudio.

El cuadro 1 muestra el promedio de edad, la distribución de individuos por sexo y el diagnóstico serológico positivo para *Helicobacter pylori* para cada uno de los grupos estudiados (Clas Une, comunicación personal). El grupo de casos de cáncer gástrico presentó la menor edad promedio, mientras que el grupo de mayor edad fue el de los controles para los pacientes dispépticos. La mayoría de los casos de cáncer gástrico así como de los pacientes dispépticos, en este estudio, fueron hombres, con una relación hombre: mujer de aproximadamente 4: 1. Un alto porcentaje de la población estudiada fueron positivos para la prueba de anticuerpos anti-*H. pylori* siendo el grupo de casos de cáncer gástrico, quienes presentaron el menor porcentaje de seropositividad con un 82, 8%. No se encontró diferencia entre el grupo de casos de cáncer gástrico y su grupo control en cuanto a la seropositividad para *H.pylori* (pearson  $\chi^2= 2.12$ ,  $p= 0.15$ , 2 gl). Tampoco se observó diferencias entre el grupo de pacientes dispépticos y su respectivo grupo control para la seropositividad por *H.pylori* (pearson  $\chi^2= 1.23$ ,  $p= 0.27$ , 2 gl). Debido al alto porcentaje de individuos con diagnóstico serológico positivo para dicha bacteria (87.4% de la muestra total), no se consideró esta variable dentro de los análisis estadísticos llevados a cabo.

**Cuadro 1.** Características generales de la población de estudio

Diagnóstico	Edad promedio (años)	Hombres n (%)	Mujeres n (%)	<i>H. pylori</i> + (%)
Con cáncer n= 58	59.8	46 (79.3)	12 (20.7)	48 (82.8)
No sospechos de cáncer <sup>a</sup> n=58	61.4	46 (79.3)	12 (20.7)	53 (91.4)
Dispépticos <sup>b</sup> n=41	64.3	33 (80.5)	8 (19.5)	37 (90.2)
No sospechos de cáncer <sup>a</sup> n=41	65.7	33 (80.5)	8 (19.5)	35 (85.4)
TOTAL	62.3	158 (79.8)	40 (20.2)	173 (87.4)

a Personas sin sospechas de cáncer gástrico según diagnóstico de rayos X

b Pacientes con diagnóstico histopatológico I y II según clasificación japonesa

Todos los polimorfismos IL-1B, así como los de IL-10 y p53 se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg en los grupos control. En el caso del locus IL-1RN a pesar de que no se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg, no se desvió significativamente de éste (cuadro 2).

Cuadro 2. Valores de la prueba  $\chi^2$  para la determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg en los grupos controles de los casos de cáncer gástrico y pacientes dispépticos.

GENOTIPO	Controles de casos <sup>a</sup>		Controles de dispépticos <sup>a</sup>	
	$\chi^2$	<i>p</i> (1gl)	$\chi^2$	<i>p</i> (1gl)
<i>IL-1B-31</i>	0.12	0.94	1.46	0.48
<i>IL-1B-511</i>	0.19	0.91	0.03	0.98
<i>IL-1B+3954</i>	0.55	0.76	1.20	0.55
<i>IL-1RN</i>		0.06		0.05
<i>IL-10-592</i>	0.28	0.87	3.1	0.21
<i>IL-10-819</i>	1.8	0.41	2.3	0.30
<i>IL-10-1082</i>	0.005	0.997	---	---
<i>P53</i>	1.8	0.39	0.25	0.88

<sup>a</sup> Personas sin sospecha de cáncer gástrico según diagnóstico de rayos X

Al comparar el método de PCR-RFLP versus pirosecuenciación, mediante los cuales se llevó a cabo la determinación de los polimorfismos de *IL-1B-511* e *IL-1B-31*, el 94% (164 de 174) de los datos coincidieron en la determinación de su genotipo, es decir su genotipo fue el mismo al llevar a cabo la determinación por una u otra metodología.

### Frecuencias genotípicas para los polimorfismos de IL-1B, IL-1RN, IL-10 y p53.

Los cuadros número 3 y 4 muestran las frecuencias genotípicas para los polimorfismos de los genes IL-1B, IL-1RN, IL-10 y p53. Para el polimorfismo IL-1B+3954 no se encontraron personas con el genotipo homocigota para el alelo T. Así mismo, la gran mayoría de las personas de la muestra total presentaba el genotipo A/A para el polimorfismo IL-10-1082, tan solo 2 individuos presentaban el genotipo heterocigoto A/G y ninguno presentaba el genotipo G/G.

Al comparar las frecuencias genotípicas del grupo de pacientes con cáncer con su grupo control no se encontraron diferencias significativas para los polimorfismos IL-1B-31 e IL-1B-511 del gen IL-1B. Tampoco se encontraron diferencias significativas para los polimorfismos del gen IL-10. De la misma forma, no se observó diferencia significativa entre casos de cáncer y sus controles para el polimorfismo del gen p53. Sin embargo, se observaron diferencias significativas para el polimorfismo IL-1B+3954 ( $\chi^2=10.3$ ,  $p=0.006$ ), así como para los polimorfismos del gen IL-1RN ( $\chi^2=6.4$ ,  $p=0.04$ ) entre los casos de cáncer y sus controles.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las frecuencias genotípicas de los polimorfismos IL-1B-31, IL-1B-511, IL-1B+3954, IL-10-592, IL-10-819, IL-10-1082 y p53 entre el grupo de pacientes dispépticos y sus respectivos controles. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes dispépticos y su grupo control para el gen IL-1RN ( $\chi^2=6.4$ ,  $p=0.04$ ) (cuadros 3 y 4).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los polimorfismos estudiados en los genes IL1B, IL-1RN, IL-10 y p53, al comparar las

frecuencias genotípicas de dichos polimorfismos entre el grupo de casos de cáncer gástrico y el grupo de pacientes dispépticos.

Cuadro 3. Frecuencias genotípicas para los polimorfismos de *IL-1B* e *IL-1RN*

GENOTIPO	TOTAL	CON CÁNCER	No sospechosos de cáncer <sup>a</sup>	DISPÉPTICOS <sup>b</sup>	No sospechosos de cáncer <sup>a*</sup>
<i>IL-1B-31</i>	n=182	n= 50	n= 50	n= 41	n= 41
C/C	49 (0.27)	14 (0.28)	18 (0.36)	11 (0.27)	6 (0.15)
C/T	91 (0.50)	22 (0.44)	23 (0.46)	22 (0.54)	24 (0.59)
T/T	42 (0.23)	14 (0.28)	9 (0.18)	8 (0.20)	11 (0.27)
<i>IL-B-511</i>	n=182	n= 50	n= 50	n= 41	n= 41
C/C	45 (0.25)	14 (0.28)	10 (0.20)	12 (0.29)	9 (0.22)
C/T	91 (0.50)	24 (0.48)	23 (0.46)	23 (0.56)	21 (0.51)
T/T	46 (0.25)	12 (0.24)	17 (0.34)	6 (0.15)	11 (0.27)
<i>IL-1B+3954</i>	n=172	n= 45	n= 45	n= 41	n= 41
C/C	123 (0.72)	25 (0.56)	37 (0.82)	32 (0.78)	29 (0.71)
C/T	49 (0.28)	20 (0.44)	8 (0.18)	9 (0.22)	12 (0.29)
T/T	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>IL-1RN</i>	n=171	n= 44	n= 45	n= 41	n= 41
1/1	85 (0.50)	21 (0.48)	28 (0.62)	15 (0.37)	21 (0.51)
1/2	51 (0.30)	17 (0.38)	9 (0.20)	15 (0.37)	10 (0.24)
1/3,4	15 (0.09)	2 (0.05)	4 (0.09)	5 (0.12)	4 (0.10)
2/2	17 (0.10)	2 (0.05)	4 (0.09)	5 (0.12)	6 (0.15)
2/3,4	3 (0.01)	2 (0.04)	0 (0.0)	1 (0.02)	0 (0.0)

<sup>a</sup> Personas sin sospechas de cáncer gástrico según diagnóstico de rayos X

<sup>b</sup> Pacientes con diagnóstico histopatológico I y II según clasificación japonesa

Cuadro 4. Frecuencias genotípicas para los polimorfismos de *IL-10* y *p53*

GENOTIPO	TOTAL	CON CÁNCER	No sospechosos de cáncer <sup>a</sup>	DISPÉPTICOS <sup>b</sup>	No sospechosos de cáncer <sup>a</sup>
<i>IL-10-592</i>	n= 169	n= 44	n= 44	n= 41	n= 40
C/C	67 (0.40)	21 (0.48)	18 (0.41)	15 (0.37)	13 (0.33)
C/A	86 (0.51)	20 (0.45)	21 (0.48)	21 (0.51)	24 (0.60)
A/A	16 (0.09)	3 (0.07)	5 (0.11)	5 (0.12)	3 (0.07)
<i>IL-10-819</i>	n= 171	n= 45	n= 45	n= 41	n= 40
C/C	75 (0.44)	25 (0.56)	18 (0.40)	18 (0.44)	14 (0.35)
C/T	80 (0.47)	16 (0.35)	24 (0.53)	17 (0.41)	23 (0.58)
T/T	16 (0.09)	4 (0.09)	3 (0.07)	6 (0.15)	3 (0.07)
<i>IL-10-1082</i>	n= 169	n= 45	n= 44	n= 41	n= 39
G/G	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
G/A	2 (0.01)	0 (0.0)	1 (0.02)	0 (0.0)	1 (0.3)
A/A	167 (0.99)	45 (1.0)	43 (0.98)	41 (1.0)	38 (0.97)
<i>P53</i>	n= 175	n= 47	n= 47	n= 40	n= 41
Arg/Arg	97 (0.55)	27 (0.57)	26 (0.55)	21 (0.52)	23 (0.56)
Arg/Pro	60 (0.35)	16 (0.34)	17 (0.36)	14 (0.35)	13 (0.32)
Pro/Pro	18 (0.10)	4 (0.09)	4 (0.09)	5 (0.13)	5 (0.12)

a Personas sin sospechas de cáncer gástrico según diagnóstico de rayos X

b Pacientes con diagnóstico histopatológico I y II según clasificación japonesa

Frecuencias alélicas para los polimorfismos de IL-1B, IL-1RN, IL-10 y p53.

El cuadro 5 muestra las frecuencias alélicas para los polimorfismos de los genes IL-1B, IL-1RN, IL-10 y p53. Para los polimorfismos IL-1B-31 e IL-1B-511, las frecuencias alélicas son muy similares entre uno y otro locus. Además, para estos mismos polimorfismos, las frecuencias del alelo T y del alelo C se encontraban presentes en la población de estudio casi en la misma frecuencia. Por otra parte para el polimorfismo IL-10-1082, la frecuencia del alelo A era de casi el 100%.

**Cuadro 5.** Frecuencias alélicas para los polimorfismos de los genes IL-1B, IL-1RN, IL-10 y p53

ALELO	FRECUENCIA	ALELO	FRECUENCIA
<i>IL-1B-31</i>		<i>IL-10-592</i>	
T	0.49	C	0.66
C	0.51	A	0.34
<i>IL-1B-511</i>		<i>IL-10-819</i>	
C	0.50	C	0.68
T	0.50	T	0.32
<i>IL-1B+3954</i>		<i>IL-10-1082</i>	
C	0.85	A	0.99
T	0.15	G	0.01
<i>IL-1RN</i>		<i>P53</i>	
1	0.68	Arg	0.73
2	0.27	Pro	0.27
3,4	0.05		

**Frecuencia haplotípicas y valores de desequilibrio de ligamiento para los polimorfismos de IL-1B IL-1RN e IL10.**

Existe un fuerte desequilibrio de ligamiento ( $D' \approx -0.92$ ) entre IL-1B-31 e IL-1B-511. Aproximadamente el 95% de los haplotipos inferidos correspondieron a la combinación IL-1B-31C/IL-1B-511T o bien IL-1B-31T/IL-511C (cuadro 6). También existe desequilibrio de ligamiento entre IL-10-592 e IL-10-819, aunque este caso no es tan fuerte como en el caso anterior, ( $D' \approx -0.62$ ). El 87% de los haplotipos inferidos correspondieron a la combinaciones IL-10-592A/IL-10-819T o IL-10-592C/IL-10-819C (cuadro 6). Es interesante hacer notar que no se observó desequilibrio de ligamiento entre dichos loci en el grupo de pacientes dispépticos. En este grupo específico de individuos, las frecuencias haplotípicas observadas eran muy similares a las que se esperarían bajo la suposición de no existencia de ligamiento ( $\chi^2=0.42$ , 1 gl).

No se determinó desequilibrio de ligamiento entre IL-B-511 e IL-1B+3954 o entre IL-1B-31 e IL-1B+3954. Tampoco se encontró desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos de IL-1B y los polimorfismos de IL1RN, a diferencia de lo reportado previamente por El-Omar y colaboradores (2000).

Dada la existencia de fuerte ligamiento entre los polimorfismos IL-1B-31 e IL-1B-511 así como entre IL-10-592 e IL-10-819, para los posteriores análisis multivariados de regresión logística se tomó en cuenta solamente a uno de cada par (IL-1B-511 e IL-10-592).

**Cuadro 6.** Frecuencias haplotípicas estimadas y coeficientes de disequilibrio de ligamiento en la población de estudio

GRUPO	LOCI	Haplotipo <sup>a</sup>				Desequilibrio		
		1-1	1-2	2-1	2-2	<i>D'</i>	$\chi^2$	<i>p</i>
Con cáncer n=58	<i>IL-1-31/IL-1-511</i>	0.020	0.480	0.500	0.000	-0.98	48.5	0.0001
	<i>IL-10-592/IL-10-819</i>	0.056	0.259	0.662	0.023	-0.81	26.8	0.0001
No sospechosos de cáncer n=58	<i>IL-1-31/IL-1-511</i>	0.050	0.538	0.378	0.032	-0.86	37.3	0.0001
	<i>IL-10-592/IL-10-819</i>	0.034	0.270	0.650	0.045	-0.71	23.1	0.0001
Dispépticos n=41	<i>IL-1-31/IL-1-511</i>	0.012	0.427	0.561	0.000	-0.99	40.6	0.0001
	<i>IL-10-592/IL-10-819</i>	0.213	0.156	0.430	0.201	---	---	---
No sospechosos de cáncer n=41	<i>IL-1-31/IL-1-511</i>	0.051	0.486	0.425	0.039	-0.92	35.3	0.0001
	<i>IL-10-592/IL-10-819</i>	0.000	0.372	0.628	0.000	-0.99	38.0	0.0001
Total n= 198	<i>IL-1-31/IL-1-511</i>	0.033	0.486	0.464	0.017	-0.91	157.4	0.0001
	<i>IL-10-592/IL-10-819</i>	0.071	0.264	0.606	0.060	-0.62	66.6	0.0001

<sup>a</sup>*IL-1B-31* e *IL-1B-511*: 1 corresponde al alelo C, 2 corresponde al alelo T

*IL-10-592*: 1 corresponde al alelo A, 2 corresponde al alelo C

*IL-10-819*: 1 corresponde al alelo C, 2 corresponde al alelo T

### Polimorfismos del gen *IL-1B* y el riesgo de cáncer gástrico.

No se encontró ninguna asociación de los polimorfismos IL-1B-31 e IL-1B-511 con el riesgo de cáncer gástrico en la población estudiada (cuadro 7). No se observó asociación de los homocigotos IL-1B-511TT ni de los heterocigotos IL-1B-511TC con cáncer gástrico. Tampoco se encontró asociación entre cáncer gástrico y los portadores del alelo T. De la misma forma, no se determinó asociación de los homocigotos IL-1B-31CC, ni de los heterocigotos IL-1B-31CT con cáncer gástrico en la población estudiada. Además, no se observó ningún tipo de asociación entre los portadores del alelo de riesgo C y dicha enfermedad. Posteriormente, y debido al fuerte desequilibrio de ligamiento entre los loci anteriormente citados, se decidió evaluar solamente el polimorfismo IL-1B-511 dentro de un modelo de regresión logística condicional de efectos fijos (cuadro 9). Aquí tampoco se encontró asociación de IL-1B-511 con el cáncer gástrico ni para el genotipo homocigoto, ni para el genotipo heterocigoto y tampoco para los portadores del alelo de riesgo.

Se observó una asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo IL-1B+3954 y cáncer gástrico (cuadro 7). Los individuos con el genotipo heterocigoto, IL-1B+3954T/C, presentaron un mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico (OR, 3.7). Bajo un modelo multivariado de regresión logística, la asociación es ligeramente no significativa (cuadro 9). Dicha asociación entre IL-1B+3954 y el aumento en el riesgo de desarrollar cáncer gástrico no ha sido reportada hasta la fecha.

### Polimorfismos del gen *IL-1RN* y el riesgo de cáncer gástrico.

Existe una asociación estadísticamente significativa entre el genotipo heterocigota *IL-1RN L\*2* y el riesgo cáncer gástrico (cuadro 7). Asimismo los portadores del alelo de riesgo (*IL-1RN\*2*), presentaron un ligero aumento en el riesgo de desarrollar cáncer gástrico (OR 2.25; IC 0.96-5.51;  $p=0.07$ ). Sin embargo, en el modelo multivariado de regresión logística, la asociación entre *IL-1RN L\*2* así como de los portadores para el alelo de riesgo y cáncer gástrico, no llegan a ser significativas (cuadro 9).

Se trató de evaluar la existencia de interacción entre *IL-1B+3954 T/C* y *IL-1RN L\*2* sin embargo, no fue posible observar si existe o no efecto de interacción entre ambos debido a limitaciones de tipo estadístico causadas por el tamaño de la muestra. Tan solo se puede decir que 12 de los 50 individuos del grupo de pacientes con cáncer, presentaban la combinación de los genotipos *IL-1B+3954T/--* y *IL-1RN 2\*--*, mientras que solamente un individuo del grupo control, presentada dicha combinación (datos no mostrados).

### Polimorfismos de los genes *IL-1B* e *IL-1RN* y el riesgo de dispepsias.

No se encontró asociación entre los polimorfismos del gen *IL-1B* y el grupo de pacientes dispépticos (cuadro 7). Tampoco se encontró asociación para ninguno de los tres polimorfismos de *IL-1B*, ni en su forma homocigota, ni en su forma heterocigota. Tampoco existía asociación entre los portadores del alelo de riesgo para ninguno de los polimorfismos con el grupo de pacientes dispépticos. De la misma forma no se encontró asociación entre los polimorfismos del gen *IL-1B* y ese mismo grupo bajo un modelo multivariado de regresión logística (cuadro 9).

No se observó asociación entre los polimorfismos del gen *IL-1RN* y el grupo de pacientes dispépticos (cuadros 7 y 9). No existe asociación entre el grupo de pacientes dispépticos y el genotipo homocigoto *IL-1RN2\*2*. En los individuos que presentaban el genotipo heterocigoto *IL-1RN L\*2*, la probabilidad de desarrollar una dispepsia podría ser mayor (cuadros 7 y 9). Cuando se tomó en cuenta, en una sola categoría, a los individuos con genotipo homocigoto *IL-1RN2\*2* y heterocigoto *IL-1RN L\*2* (portadores del alelo de riesgo) no se observó asociación entre las lesiones gástricas precancerosas y los portadores del alelo de riesgo.

**Cuadro 7.** Odd Ratios e intervalos de confianza al 95% de la asociación de los polimorfismos de *IL-1B* e *IL-1RN* con cáncer gástrico y dispepsias

GENOTIPO	Cáncer gástrico OR (95% IC)	p	Dispépticos OR (95% IC)	p
<i>IL-1B-31</i>				
T/T	1 (referente)		1 (referente)	
C/T	0.61 (0.22-1.73)	0.35	0.79 (0.27-2.36)	0.68
C/C	0.50 (0.16-1.53)	0.21	0.40 (0.10-1.61)	0.18
Portadores de C	0.56 (0.22-1.48)	0.24	0.66 (0.23-1.88)	0.43
<i>IL-B-511</i>				
C/C	1 (referente)		1 (referente)	
C/T	0.74 (0.27-2.03)	0.56	0.82 (0.29-2.36)	0.71
T/T	0.50 (0.16-1.55)	0.22	0.41 (0.10-1.61)	0.19
Portadores de T	0.64 (0.25-1.64)	0.35	0.68 (0.25-1.86)	0.45
<i>IL-1B+3954</i>				
C/C	1 (referente)		1 (referente)	
C/T	3.7 (1.34-10.2)	0.007	0.68 (0.25-1.86)	0.45
<i>IL-1RN</i>				
L/L	1 (referente)		1 (referente)	
L/2	2.94 (1.09-7.93)	0.03	2.0 (0.73-5.47)	0.17
2/2	0.70 (0.11-4.19)	0.69	1.04 (0.27-3.96)	0.95
Portadores IL-RN*2	2.25 (0.96-5.51)	0.07	1.64 (0.67-3.99)	0.27

### Polimorfismos de los genes *IL-10* y *p53* y el riesgo de cáncer gástrico.

No se observó ninguna asociación entre los polimorfismos de *IL-10* y cáncer gástrico en la población estudiada. Ninguno de los polimorfismos de dicho gen presentó asociación con cáncer gástrico ni en forma homocigota o en su forma heterocigota para el alelo de riesgo (cuadro 8). Debido a que existe ligamiento entre *IL-10-592* y *IL-10-819*, solamente se tomó en cuenta el locus *IL-10-592* para el análisis mediante regresión logística. Tampoco se encontró asociación entre dichos polimorfismos y cáncer gástrico bajo dicho modelo (cuadro 9).

No se encontró asociación entre el polimorfismo del codón 72 del gen *p53* y cáncer gástrico (cuadro 8). En la población aquí estudiada no se observó ninguna asociación, ni del genotipo homocigota, ni del genotipo heterocigota, para el alelo de riesgo (alelo Pro). Tampoco se obtuvo asociación al considerar como un solo grupo a todos los individuos que eran portadores del alelo Pro, con cáncer gástrico.

### Polimorfismos de los genes *IL-10* y *p53* y el riesgo de dispepsias.

No se observó asociación de los polimorfismos de los genes *IL-10* y *p53* con dispepsia (cuadros 8 y 9). Ninguno de los polimorfismos de los genes *IL-10* y *p53* que fueron estudiados presentó asociación con dispepsia, ni en forma homocigota o heterocigota para los alelos de riesgo. Tampoco se encontró asociación entre individuos portadores para los alelos de riesgo (genotipos homocigotos y heterocigotos en una misma categoría) para dichos polimorfismos y dispepsias.

Cuadro 8. Odd Ratios e intervalos de confianza al 95% de la asociación de los polimorfismos de *IL-10* y *p53* con cáncer gástrico y dispepsias

GENOTIPO	Cáncer gástrico OR (95% IC)	p	Dispépticos OR (95% IC)	p
<i>IL-10-592</i>				
C/C	1 (referente)		1 (referente)	
C/A	0.82 (0.34-1.98)	0.65	0.76 (0.29-1.97)	0.57
A/A	0.51 (0.10-2.53)	0.40	1.44 (0.28-7.44)	0.66
Portadores de A	0.76 (0.32-1.77)	0.52	0.83 (0.33-2.10)	0.70
<i>IL-10-819</i>				
C/C	1 (referente)		1 (referente)	
C/T	0.48 (0.20-1.18)	0.10	0.57 (0.22-1.49)	0.25
T/T	0.96 (0.19-4.91)	0.96	1.56 (0.32-7.53)	0.56
Portadores de T	0.53 (0.22-1.25)	0.14	0.69 (0.28-1.70)	0.42
<i>P53</i>				
Arg/Arg	1 (referente)		1 (referente)	
Arg/Pro	0.91 (0.38-2.17)	0.83	1.18 (0.45-3.10)	0.74
Pro/Pro	0.96 (0.22-4.31)	0.96	1.10 (0.27-4.38)	0.90
Portadores de Pro	0.92 (0.40-2.08)	0.84	1.16 (0.48-2.79)	0.75

**Cuadro 9.** Odd Ratios e intervalos de confianza al 95% bajo un modelo multivariado de regresión logística de la asociación de los polimorfismos de *IL-1B*, *IL-1RN*, *IL-10* y *p53* con cáncer gástrico y dispepsias

GENOTIPO	Cáncer gástrico OR (95% IC)	p	Dispépticos OR (95% IC)	p
<i>IL-B-511</i>				
C/C	1 (referente)		1 (referente)	
C/T	0.68 (0.18-2.62)	0.57	1.64 (0.44-6.06)	0.46
T/T	0.61 (0.17-2.22)	0.45	0.31 (0.07-1.37)	0.12
Portadores de T	0.63 (0.20-2.00)	0.43	0.69 (0.26-1.88)	0.47
<i>IL-1B+3954</i>				
C/C	(referente)		(referente)	
C/T	2.69 (0.98-7.43)	0.06	0.60 (1.69-2.16)	0.44
<i>IL-10-592</i>				
C/C	1 (referente)		1 (referente)	
C/A	0.83 (0.27-2.54)	0.74	0.61 (0.20-1.87)	0.39
A/A	0.40 (0.05-3.10)	0.38	1.29 (0.20-8.29)	0.79
Portadores de A	0.78 (0.28-2.13)	0.63	0.79 (0.28-2.24)	0.65
<i>IL-1RN</i>				
L/L	1 (referente)		1 (referente)	
L/2	2.23 (0.77-6.47)	0.14	3.16 (0.97-10.28)	0.06
2/2	1.26 (0.14-11.20)	0.84	1.18 (0.25-5.64)	0.83
Portadores de 2	2.53 (0.90-7.13)	0.08	1.77 (0.71-4.30)	0.22

**Polimorfismos de los genes *IL-10* y *p53* al comparar cáncer gástrico versus dispepsia.**

No se encontró ningún tipo de asociación al comparar el grupo de individuos con el riesgo de cáncer gástrico y el grupo de pacientes dispépticos para ninguno de los polimorfismos de los genes *IL-1B*, *IL-1RN*, *IL-10* y *p53* en la población estudiada (cuadro 10). Sin embargo, en el caso del polimorfismo *IL-1B+3954*, podría existir un aumento en el riesgo de desarrollar cáncer gástrico en individuos con el genotipo *IL-1B+3954C/T* en comparación con individuos de que portan el genotipo *IL-1B+3954C/C* (OR 2.17; IC 0.74-6.32). Al llevar a cabo el análisis mediante una modelo multivariado de regresión logística, tampoco se observó ninguna asociación de ningún tipo (cuadro 11). En el caso de *IL-1+3954* se observó la misma tendencia descrita anteriormente. Además para el gen *IL-1RN*, se observó que en los individuos con el genotipo *IL-1RN L\*2* el riesgo de cáncer gástrico podría ser mayor en comparación con individuos que presentan otros genotipos (OR 2.23; IC 0.77-6.47;  $p=0.14$ ).

**Cuadro 10.** Odd Ratios e intervalos de confianza al 95% de la asociación de los polimorfismos de *IL-10* y *p53* al comparar el grupo de casos cáncer gástrico versus el grupo de pacientes dispépticos

GENOTIPO	OR (95% IC)	<i>p</i>	GENOTIPO	OR (95% IC)	<i>p</i>
<i>IL-1B-31</i>			<i>IL-10-592</i>		
T/T	1 (referente)		C/C	1 (referente)	
C/T	0.56 (0.19-1.63)	0.28	C/A	0.52 (0.19-1.40)	0.19
C/C	1.83 (0.50-6.77)	0.36	A/A	0.47 (0.09-2.39)	0.34
<i>IL-B-511</i>			<i>IL-10-819</i>		
C/C	1 (referente)		C/C	1 (referente)	
C/T	0.73 (0.26-2.05)	0.54	C/T	0.62 (0.22-1.70)	0.35
T/T	1.67 (0.45-6.22)	0.44	T/T	0.60 (0.14-2.52)	0.48
<i>IL-1B+3954</i>			<i>P53</i>		
C/C	1 (referente)		Arg/Arg	1 (referente)	
C/T	2.17 (0.74-6.32)	0.15	Arg/Pro	1.27 (0.48-3.39)	0.62
<i>IL-1RN</i>			Pro/Pro		
L/L	1 (referente)		0.44 (0.07-2.64)	0.36	
L/2	1.30 (0.47-3.55)	0.61			
2/2	0.45 (0.07-2.80)	0.38			

Cuadro 11. Odd Ratios e intervalos de confianza al 95% bajo un modelo multivariado de regresión logística de la asociación de los polimorfismos de *IL-1B*, *IL-1RN*, *IL-10* y *p53* al comparar al grupo de cáncer gástrico versus el grupo de pacientes dispépticos.

GENOTIPO	OR (95% IC)	p
<i>IL-B-511</i>		
C/C	1 (referente)	
C/T	0.69 (0.18-2.62)	0.57
T/T	0.61 (0.17-2.22)	0.45
<i>IL-1B+3954</i>		
C/C	(referente)	
C/T	2.15 (0.79-5.89)	0.14
<i>IL-10-592</i>		
C/C	1 (referente)	
C/A	0.83 (0.27-2.54)	0.74
A/A	0.40 (0.05-3.10)	0.38
<i>IL-1RN</i>		
L/L	1 (referente)	
L/2	2.23 (0.77-6.47)	0.14
2/2	1.26 (0.14-11.20)	0.84

Interacciones entre los polimorfismos de los *IL-1B*, *IL-1RN*, *IL-10* y *p53* y el riesgo de cáncer gástrico.

Mediante un análisis de regresión logística, se trató de determinar el efecto que tenían posibles combinaciones de polimorfismos pro-inflamatorios del gen *IL-1B*, así como anti-inflamatorios del gen *IL-10* que resultaran en un fenotipo pro-inflamatorio- además del polimorfismo de *p53*- sobre el riesgo de desarrollar cáncer gástrico. No se encontró asociación entre cáncer gástrico y el portar más de un genotipo de riesgo, ya sea del gen *IL-1B*, del gen *IL-10*, de *p53*, o una combinación de estos (cuadro 12). Tampoco se observó asociación entre dispepsia y el portar más de un genotipo de riesgo ya sea del gen *IL-1B*, del gen *IL-10*, de *p53* o una combinación de estos (cuadro 13).

**Cuadro 12.** Frecuencias y valores de Odd Ratios e intervalos de confianza al 95% para la asociación de 1 o más polimorfismos de *IL-1B*, *IL-1RN*, *IL-10* y *p53* con cáncer gástrico

# POLIMORFISMOS	CASOS n=50	CONTROLES n=50	OR (95% IC)	<i>p</i>
0	33	27	1 (referente)	
1	3	5	0.20 (0.04-1.01)	0.05
2	11	13	0.91 (0.36-2.27)	0.84
3 o más	3	5	0.36 (0.07-2.02)	0.25

**Cuadro 13.** Frecuencias y valores de Odd Ratios e intervalos de confianza al 95% para la asociación de 1 o más polimorfismos de *IL-1B*, *IL-1RN*, *IL-10* y *p53* con dispepsias.

# POLIMORFISMOS	LESIONES n=41	CONTROLES n=41	OR (95% IC)	<i>p</i>
0	22	21	1 (referente)	
1	11	7	1.05 (0.33-3.35)	0.93
2	5	9	0.46 (0.14-1.55)	0.21
3 o más	3	4	2.76 (0.27-28.45)	0.39

## Discusión.

Costa Rica ocupa uno de los primeros lugares en incidencia y mortalidad por cáncer gástrico a nivel mundial según recientes estimaciones llevadas a cabo por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (Ferlay *et al.* 2000). Existen marcadas diferencias en las tasas de incidencia de cáncer gástrico, entre las regiones geográficas que componen el país, a pesar de ser territorialmente pequeño (Sierra *et al.* 1989). Algunos de los factores asociados con el riesgo de cáncer gástrico han sido estudiados en Costa Rica entre ellos, la formación endógena de compuestos nitrosados y la infección por *H. pylori* (Sierra *et al.* 1993, Morera-Brenes *et al.* 1994, Bartels *et al.* 1995, Sierra *et al.* 1998).

En este estudio, un alto porcentaje de la muestra total era seropositiva para la bacteria *Helicobacter pylori* (87%) por tal motivo esta variable no fue tomada en cuenta para ningún análisis estadístico. Estudios previos llevados a cabo en grupos de población de la misma área geográfica, han encontrado porcentajes muy similares de individuos positivos para *H. pylori* (Morera-Brenes 1994, Sierra *et al.* 1998). En Costa Rica un alto porcentaje de la población está infectada con dicha bacteria desde edades muy tempranas (Sierra *et al.* 1991). *H. pylori* es uno de los principales factores de riesgo de cáncer gástrico. El riesgo de desarrollar cáncer gástrico o algún tipo de lesión gástrica precancerosa es mayor en personas portadoras de dicho organismo (Kuipers *et al.* 1999). Además se ha llegado a determinar que algunas cepas de *H. pylori*, son más virulentas y han sido asociadas con un riesgo aun mayor de desarrollar cáncer gástrico (Covacci *et al.* 1999, Enroth, *et al.* 2000, Huang *et al.* 2003). Sin embargo la gran mayoría de personas que la portan, incluso desde etapas muy tempranas de su vida, nunca llegan a desarrollar cáncer gástrico (Blaser 1998). En la población de estudio no

se conocía el tipo de cepa de la bacteria, solamente se pudo determinar presencia o ausencia de esta a través de una prueba de anticuerpos séricos.

Las frecuencias alélicas para IL-1B-31 fueron 49 y 51%, mientras que para IL-1B-511 eran 50% para ambos alelos. Estas frecuencias difieren con las reportadas para poblaciones de origen caucásico de países como Portugal, Polonia, Alemania, Inglaterra y Estados Unidos, donde estas son de aproximadamente 33 y 67% para ambos polimorfismos (El-Omar *et al.* 2000, Machado *et al.* 2001, Tseng *et al.* 2001, Rad *et al.* 2003, Rollinson *et al.* 2003). Sin embargo, las frecuencias alélicas de la población de nuestro estudio, son semejantes a las encontradas en grupos poblacionales asiáticos de Japón, Korea y Taiwan donde éstas son de aproximadamente 47 y 53% en ambos polimorfismos (Hamajima *et al.* 2001, Tseng *et al.* 2001, Hwang *et al.* 2002, Lee *et al.* 2003). En el caso del polimorfismo IL-1B+3954, las frecuencias alélicas aquí reportadas difieren tanto de las reportadas para poblaciones caucásicas, como de las reportadas en poblaciones asiáticas. En este caso las frecuencias alélicas de la población aquí estudiada son 15 y 85 %, constituyen valores intermedios entre las reportadas en poblaciones caucásicas (24 y 76%) y las reportadas para grupos asiáticos (1 y 99 %) (Cox *et al.* 1998, El-Omar *et al.* 2000, Tseng *et al.* 2001, Zeng *et al.* 2003). En nuestro estudio, así como en estudios llevados a cabo en grupos asiáticos, la frecuencia de los alelos que han sido asociados con aumento en el riesgo de cáncer gástrico (IL-1B-511T, IL-1B-31C) son más altas en comparación con grupos de población caucásicos.

En este estudio se determinó que para los 2 alelos mas frecuentes (IL-1RN\*1 e IL-1RN\*2), las frecuencias fueron 68 y 27%, respectivamente. Estos valores son muy similares a los reportados para grupos poblacionales caucásicos, donde las frecuencias son de aproximadamente 74 y 24% respectivamente (Tarlow *et al.* 1993, Cox *et al.* 1998, El-Omar *et al.* 2000, Rad *et al.* 2003). Sin embargo los valores aquí reportados

difieren significativamente de lo reportado en poblaciones asiáticas donde la frecuencia de estos es de aproximadamente 93 y 5% respectivamente (Hamajima *et al.* 2001, Furuta *et al.* 2002, Hwang *et al.* 2002, Lee *et al.* 2003).

Las frecuencias alélicas para los polimorfismos IL-10-1082, IL-10-819 y IL-10-592, obtenidas en este estudio, son muy similares a las que han sido reportadas en algunos estudios llevados a cabo en poblaciones asiáticas (Shin *et al.* 2003, Wu *et al.* 2002, Wu *et al.* 2003). Sin embargo estas frecuencias difieren significativamente, de las que han sido reportadas por estudios realizados en poblaciones caucásicas (Yee *et al.* 2001, El-Omar *et al.* 2003). En este caso, las frecuencias reportadas para los polimorfismos del gen IL-10 en nuestro grupo de estudio, así como en grupos de origen asiático son más altas que las reportadas para grupos caucásicos.

Se observó un fuerte desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos IL-1B-31 e IL-1B-511 ( $D' = -0.92$ ), específicamente las combinaciones entre los alelos IL-1B-31C/IL-1B-511T o IL-1B-31T/IL-1B-511C, fueron quienes presentaron las más altas frecuencias haplotípicas de todas las posibles combinaciones. Lo anterior concuerda con lo reportado por algunos estudios llevados a cabo en diferentes lugares del mundo (El-Omar *et al.* 2000, Hamajima *et al.* 2001, Rad *et al.* 2003). No obstante, en dichos estudios se ha reportado que el desequilibrio de ligamiento entre ambos polimorfismos es de casi un 100%, lo cual difiere un poco del valor obtenido en este estudio. Recientemente un estudio llevado a cabo en China no encontró desequilibrio de ligamiento entre estos mismos polimorfismos (Zeng *et al.* 2003). Además del desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos anteriormente descritos, no se observó desequilibrio de ligamiento para ninguna otra combinación de polimorfismos de IL-1B o bien entre polimorfismos de IL-1B e IL-1RN, lo cual concuerda con lo reportado por Hwang y colaboradores (2002), pero difiere con lo reportado por otros

estudios en los que se ha descrito desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos IL-1B-31/IL-1B+3954, así como entre IL-1B-31/IL-1RN (El-Omar *et al.* 2000, Machado *et al.* 2001). Se sugiere que podrían existir diferencias significativas entre grupos étnicos, en cuanto a los patrones de ligamiento entre los diferentes polimorfismos de los genes IL-1B e IL-1RN (Tseng *et al.* 2001, Zeng *et al.* 2003)

De la misma forma se observó ligamiento para los polimorfismos del gen IL-10. Los polimorfismos IL-10-819 e IL-10-592 presentaban desequilibrio de ligamiento ( $D' = -0.62$ ). Las combinaciones que presentaron las mayores frecuencias haplotípicas fueron entre los alelos IL-10-592A/IL10-819T o IL-10-592C/IL-10-819C. Sin embargo, este valor de desequilibrio es relativamente bajo, dado que para estos mismos polimorfismos el desequilibrio de ligamiento reportado es cercano al 100% (El-Omar *et al.* 2003, Shin *et al.* 2003). También se ha reportado un fuerte ligamiento al tomar en cuenta los tres polimorfismos aquí estudiados (El-Omar *et al.* 2003). En nuestro caso, el polimorfismo IL-10-1082 no fue tomado en cuenta para el análisis de ligamiento dado que el 99% de la población total estudiada, presentaba el mismo genotipo. Se desconocen las razones de esta diferencia tan marcada en los valores de desequilibrio de ligamiento, entre lo aquí reportado con respecto a lo reportado por otros estudios, a pesar de que IL-10-592 e IL-10-819 están tan cercanos físicamente. Podría pensarse que el bajo tamaño de muestra de este estudio podría estar influyendo en el valor aquí obtenido.

Para los genes IL-1B e IL-10, las frecuencias alélicas asemejan mucho a las reportadas en poblaciones asiáticas -especialmente las frecuencias para IL-1B-31 e IL-1B-511- mientras que en el caso del gen IL-RN, las frecuencias alélicas de la población aquí estudiada, son muy similares a las observadas en grupos de población caucásica. Existe un componente genético mongoloide en las poblaciones amerindias, de las cuales la población de Costa Rica posee un importante aporte genético. De la misma forma, el

componente genético caucásico en esta población es también significativo (Morera *et al.* 2003). Por tanto podría sugerirse, que estas similitudes y diferencias en cuanto a las frecuencias alélicas de los polimorfismos de IL-1B y IL-1RN con estos grupos étnicos, podrían ser producto del proceso de mezcla genética entre los diferentes grupos étnicos que dieron origen a la población de Costa Rica. Sin embargo hay que tener en cuenta que otros factores también podrían estar influyendo en que existan tales similitudes o diferencias cuando se compara con otros grupos étnicos, como por ejemplo el tamaño de la muestra o la forma en que seleccionó dicha muestra.

Las frecuencias alélicas, de IL-1B-31, IL-1B-511 y los tres polimorfismos de IL-10, son más altas en nuestra población de estudio que en caucásicos pero similares a las poblaciones asiáticas. En el caso de IL-1RN la semejanza es con grupos caucásicos, mientras para IL-1B+3954 éstas representan un valor intermedio entre ambos grupos étnicos. Por lo cual, las frecuencias de los alelos relacionados con el fenotipo pro-inflamatorio son más altas en nuestra población de estudio que en otras poblaciones. La composición genética de la población costarricense es el resultado de una mezcla de diferentes grupos étnicos (Morera *et al.* 2003). Presiones selectivas, debidas a factores del ambiente, podrían haber favorecido el aumento en la respuesta pro-inflamatoria. Las regiones tropicales presentan gran diversidad biológica, tanto a nivel macro como micro. En los trópicos los microorganismos se desarrollan muy fácilmente debido a las condiciones favorables de temperatura, luz, humedad, entre otras. Lo anterior facilita la proliferación de muchos patógenos y con ello, el número de patologías producidas por estos son muchas y muy frecuentes. Hasta hace unas pocas décadas, éstas eran una de las principales causas de morbilidad y mortalidad infantil en países tropicales como Costa Rica (Mata 1985, Rosero-Bixby 1988). Lo anterior podría haber favorecido a individuos cuyo perfil genético, aumenta la respuesta pro-inflamatoria, lo cual podría

haber resultado ventajoso para la respuesta del hospedero ante diversos tipos de infecciones.

Las frecuencias alélicas para el polimorfismo del exón 4 del gen p53 eran 0.73 para el alelo Arg y 0.27 para el alelo Pro. Dichas frecuencias concuerdan con las reportadas en varios estudios en poblaciones caucásicas (Fan *et al.* 2000, Shepherd *et al.* 2000, Zhang *et al.* 2003, Zhang *et al.* 2004). Sin embargo, difieren un poco de las frecuencias que fueron reportadas por estudios llevados a cabo en Taiwán y Japón, donde la frecuencia del alelo asociado con el aumento en el riesgo de desarrollar varios tipos de cáncer (alelo Pro), es ligeramente más alta a la reportada por este estudio (Wuang *et al.* 1999, Hiyama *et al.* 2002, Kietthubthew *et al.* 2003). Entonces, a pesar de que existe algún grado de diferencia en cuanto a las frecuencias alélicas, entre los diferentes grupos étnicos para el polimorfismo del exón 4 del gen p53, esta diferencia está poco marcada.

No se encontró asociación entre los polimorfismos IL-1B-31 e IL-1B-511 y el riesgo de cáncer gástrico o dispepsias. Lo anterior difiere con la gran mayoría de estudios realizados en poblaciones de varios lugares del mundo. La mayoría de ellos han encontrado asociación significativa entre dichos polimorfismos y el riesgo de cáncer gástrico (El-Omar *et al.* 2000, Machado *et al.* 2001, Rollinson *et al.* 2003, Zeng *et al.* 2003). Algunos han encontrado que personas portadoras de los genotipos homocigoto y heterocigoto para el alelo T del polimorfismo IL-1B-511, presentan aumento en el riesgo de desarrollar cáncer gástrico. De la misma forma, cuando se toma en cuenta en una única categoría, a los individuos de genotipos homocigoto y heterocigoto (portadores del alelo IL-1B-511T), también se ha observado un aumento en el riesgo de cáncer gástrico (El-Omar *et al.* 2000, Machado *et al.* 2001, Figuereido *et al.* 2002, El-Omar *et al.* 2003). No obstante, en este estudio no se observó asociación para

dicho polimorfismo ni en forma homocigota, heterocigota, ni para los individuos portadores del alelo asociado al aumento en el riesgo de desarrollar cáncer gástrico.

Tampoco se observó asociación del polimorfismo IL-1B-31 con el riesgo de cáncer gástrico o dispepsias en el grupo de personas aquí estudiadas. Se ha reportado asociación para el polimorfismo IL-1B-31, tanto en su forma homocigota, heterocigota o individuos portadores del alelo C, con el riesgo de cáncer gástrico (El-Omar *et al.* 2000, Rollinson *et al.* 2003). Los primeros estudios que se llevaron a cabo en esta línea de investigación, tomaban en cuenta ambos polimorfismos (IL-1B-31 e IL-1B-511), sin embargo el hecho de que ambos están fuertemente ligados, hace poco informativo el trabajar con los dos a la vez (Furuta *et al.* 2002). En nuestro caso tomar en cuenta ambos polimorfismos, era muy importante por tratarse del primer estudio que se lleva a cabo en Costa Rica con los polimorfismos del gen IL-1B, era necesario determinar las frecuencias genotípicas, alélicas, haplotípicas, así como medir el desequilibrio de ligamiento entre dichos polimorfismos y de esta forma poder comparar los datos de la población costarricense con los de otras poblaciones a nivel mundial.

Varios estudios han reportado asociación de los polimorfismos IL-1B-31 e IL-1B-511 con mayor riesgo de desarrollar úlceras duodenales y gástricas, así como otros tipos de lesiones como atrofia gástrica y metaplasia intestinal (García-González *et al.* 2001, Furuta *et al.* 2002, García-González *et al.* 2003, Rad *et al.* 2003). Algunas de estas lesiones están directamente relacionadas o incluso pueden ser eventos importantes para desencadenar el proceso de carcinogénesis gástrica (Correa 1992, Hansson 2000, McColl y El-Omar 2002, Troost *et al.* 2003). En estos casos el riesgo de desarrollar alguna de las lesiones citadas anteriormente, puede estar asociado con ambos alelos, en cada uno de los polimorfismos, dependiendo de cómo se comportan y de los efectos que cada una de éstas tiene sobre la mucosa gástrica. En nuestro caso no se trabajó con

ningún tipo de úlcera, sin embargo en un futuro próximo se llevarán a cabo estudios con este tipo de lesiones, dado que se cuenta con el material y la información necesaria para realizar tales investigaciones.

Al igual que en nuestro caso, algunos estudios tampoco han encontrado asociación de los polimorfismos IL-1B-31 e IL-1B-511 con el riesgo cáncer gástrico. Estudios llevados a cabo en grupos de población asiática no han reportado asociación de los polimorfismos IL-1B-31 e IL-1B-511 con el riesgo de cáncer gástrico (Kato *et al.* 2001, Lee *et al.* 2003, Wu *et al.* 2003). Por el contrario hasta la fecha, todos los estudios llevados a cabo con poblaciones caucásicas han reportado asociación de dichos polimorfismos con cáncer gástrico. Lo anterior sugiere que el grupo étnico podría ser un factor importante, que debe tenerse en cuenta en los estudios relacionados con estos polimorfismos.

El no haber encontrado asociación de los polimorfismos IL-1B-31 e IL-1B-511 con el riesgo de cáncer gástrico o dispepsia en este estudio, podría ser debido a la composición genética de la población del país. Recordemos que la población de Costa Rica es producto de la mezcla de varios grupos étnicos, principalmente tres de estos aportaron un componente genético importante a nuestra población (caucásico, amerindio y africano), aun cuando existen algunas diferencias, en cuanto al porcentaje de cada uno de estos, entre las diferentes regiones geográficas de Costa Rica (Morera *et al.* 2003). Por tal motivo se hace necesario estudiar estos polimorfismos más a fondo en una muestra representativa de la población costarricense.

En Costa Rica existen diferencias significativas en cuanto a la incidencia de cáncer gástrico, entre las diferentes regiones, en que se divide el país. Estudios llevados a cabo por Sierra y colaboradores (1989) han demostrado que existen regiones de alto y bajo riesgo de cáncer gástrico, siendo la región central del país, la que posee la mayor

tasa de incidencia de cáncer gástrico mientras que las regiones costeras presentan las más bajas tasas de incidencia para dicha enfermedad. A pesar de que la prevalencia de *H. pylori* es similar en ambas regiones, la prevalencia de gastritis asociada a este organismo y de metaplasia intestinal, es mayor en habitantes de la región de alto riesgo que en individuos de regiones de bajo riesgo (Sierra *et al.* 1992). El grupo de personas que participaron en este estudio provenía de la región central. En dicho grupo, no se observó diferencia, en cuanto a las frecuencias genotípicas para los polimorfismos IL-1B-31 e IL-1B-511, entre el grupo de pacientes de cáncer gástrico y su grupo control, ni entre el grupo de pacientes dispépticos y su grupo control. Además las frecuencias de los alelos, que han sido asociados con aumento en el riesgo de dicha enfermedad, para ambos polimorfismos (alelo C para IL-1B-31 y alelo T para IL-1B-511) eran altas en la población aquí estudiada. Se desconocen los factores involucrados en esta marcada diferencia en las tasas de incidencia, sin embargo uno de los factores que podría ser causa de la diferencia en la incidencia entre las diferentes regiones geográficas podría ser el componente genético. Por lo tanto, las altas frecuencias de los alelos, asociados con aumento en el riesgo de desarrollar cáncer gástrico, para los polimorfismos IL-1B-31 e IL-1B-511 en el grupo total de individuos aquí estudiados, sugiere que este grupo de personas podría tener un mayor riesgo o una mayor predisposición genética de desarrollar cáncer gástrico debido a que estos provienen de una región geográfica de mayor riesgo. Entonces, las diferencias en las tasas de incidencia entre regiones de alto y bajo riesgo de cáncer gástrico podrían ser, en parte, explicadas con base en componente genético, de modo que en las regiones de alto riesgo de cáncer gástrico la población tenga mayor predisposición genética a desarrollar esta enfermedad, que en las poblaciones de regiones de baja incidencia. Esto también ha sido sugerido por un reciente estudio llevado a cabo en China (Zeng *et al.* 2003). En el futuro será necesario

estudiar grupos de población provenientes de las regiones de alto y bajo riesgo de cáncer gástrico del país.

El hecho de no haber encontrado asociación entre los polimorfismos IL-1B-31 e IL-1B-511 podría estar afectado, por el bajo tamaño de muestra utilizado en este estudio. Se contó solamente con 58 pacientes afectados de cáncer gástrico. El hecho de que el tamaño de la muestra puede provocar limitaciones en los modelos que fueron utilizados para el análisis de los datos, puede llevar a no determinar ninguna asociación. Otros estudios llevados a cabo en diversas latitudes para los polimorfismos del gen IL-1B, han utilizado tamaños de muestra mucho mayores (Furuta *et al.* 2002, El-Omar *et al.* 2003, Machado *et al.* 2003). En el futuro, será necesario llevar a cabo un estudio semejante con un número mayor de individuos.

La etiología del cáncer gástrico varía dependiendo del tipo histológico de cáncer así como de la localización de éste en el estómago (Correa 1992, Powell 1997, Yasui *et al.* 2001). La asociación de los polimorfismos IL-1B-31 e IL-1B-511 con el riesgo de cáncer gástrico puede variar dependiendo del tipo histológico o de la localización del cáncer en el estómago (Machado *et al.* 2001, El-Omar *et al.* 2003). En nuestro estudio no fue posible discriminar por el tipo histológico de cáncer, ni por la localización de éste, porque el tamaño de la muestra impedía realizar más estratificaciones, puesto que se producirían limitaciones en los modelos estadísticos al llevar a cabo el análisis de datos. Ésta podría ser una razón importante por la cual, no se encontró asociación de estos polimorfismos con el riesgo de cáncer gástrico en nuestro estudio. Para futuros estudios se deben tomar en cuenta ambas clasificaciones.

El polimorfismo IL-1B+3954, está asociado con el riesgo de cáncer gástrico en la población estudiada. Las personas que presentan el genotipo heterocigota IL-1B+3954 CT, presentan un mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico (OR 3.7; IC 95%

1.34-10.2;  $p=0.007$ ). Ésta es la primera vez que se reporta asociación de este polimorfismo con el riesgo de cáncer gástrico hasta la fecha. Anteriormente se ha reportado asociación de este polimorfismo con úlcera duodenal, sin embargo dicha asociación se observa solamente, cuando hay interacción del genotipo de riesgo de IL-1B+3954 (CC) con los genotipos de riesgo de los polimorfismos IL-1B-31, IL-1B-511 e IL-1RN (García-González *et al.* 2001, García-González *et al.* 2003). Algunos de los estudios llevados a cabo han tomado en cuenta dicho polimorfismo, sin embargo ninguno ha encontrado asociación de éste con el riesgo cáncer gástrico (El-Omar *et al.* 2000, Zeng *et al.* 2003). Se ha sugerido que la presencia del alelo T en la posición +3954 con respecto al sitio de inicio de la transcripción del gen podría tener un efecto protector contra el desarrollo de cáncer gástrico (El-Omar *et al.* 2000). En nuestro estudio, cuando se ajustó mediante un modelo de regresión logística multivariable, el valor de Odd Ratio se mantuvo alto, aunque era ligeramente no significativo (OR 2.69; intervalo de confianza al 95% 0.98-7.43;  $p=0.06$ ). Esto podría determinarse con mayor precisión si el tamaño de la muestra fuera mayor.

El aumento en el riesgo de cáncer gástrico asociado al polimorfismo IL-1B+3954 podría estar asociado a la presencia alelo T. La presencia del alelo T en este locus ha sido asociada con un aumento en la expresión de la proteína IL-1 $\beta$  (Tseng *et al.* 2001). Por lo tanto, personas que porten al menos un alelo T podrían expresar en mayores niveles la proteína IL-1 $\beta$ , en comparación con personas no portadoras de dicho alelo. El aumento en la expresión de ésta es la razón por la cual los polimorfismos del gen IL-1B han sido asociados con el aumento en riesgo de desarrollar cáncer gástrico, debido a las propiedades y efectos de dicha proteína en el mecanismo inflamatorio y en la mucosa gástrica (Dinarello 1996, El-Omar 2001). Entonces, si es el alelo T quien confiere este aumento en el riesgo de cáncer gástrico, se esperaría que personas que

porten el genotipo homocigoto para el alelo T, presenten un aumento en el riesgo de cáncer gástrico, con valores de Odd Ratio aun mayores que los reportados en este estudio para el genotipo heterocigoto. Sin embargo, en nuestro estudio no fue posible corroborar esto debido a que ninguna persona presentó el genotipo IL-1B+3954 TT.

En el caso de IL-1B+3954, al igual que para otros polimorfismos, la precisión en el diagnóstico histopatológico, la localización del cáncer en el estómago y determinación del tipo de cepa de *H. pylori*, ayudarían a esclarecer el papel que juega este polimorfismo en la etiología de esta enfermedad. Ya se está trabajando con estos factores, por lo que en futuros estudios que se lleven a cabo con estos mismos polimorfismos serán tomados en cuenta.

No se encontró asociación entre ninguno de los polimorfismos del gen IL-1B con dispepsia. El grupo de lesiones con que se trabajó en este estudio correspondía a un grupo de pacientes que habían sido referidos a gastroscopía y biopsia por ser sospechosos de cáncer gástrico, sin embargo el resultado de la biopsia reveló que dichos individuos presentaban lesiones grupo I y II según la clasificación japonesa. De acuerdo con esta clasificación dichas personas son normales o poseen lesiones muy leves, benignas, no neoplásicas, que incluso pueden involucionar fácilmente (Japanese Research Society for Gastric Cancer 1995). Por tales motivos este grupo podría considerarse, como un grupo control. Lo anterior podría ser la explicación por la cual al comparar dicho grupo con su grupo control no se observó asociación con los polimorfismos de IL-1B. Este es solo uno de los factores que podrían explicar el que no se haya determinado asociación, pues no se debe olvidar que factores relacionados con la composición genética de la población de nuestro país, el hecho de estar trabajando con individuos procedentes de una región de alto riesgo, el tipo de cepa de *H. pylori*, además de otros factores de riesgo, podrían también estar influyendo.

El riesgo de desarrollar cáncer gástrico podría ser mayor para los individuos heterocigotos o para portadores del alelo número 2 en el polimorfismo IL-1RN, aunque los valores de Odd Ratios son ligeramente no significativos (OR 2.94 y 2.25; IC 1.09-7.93 y 0.96-5.51 respectivamente). Algunos estudios han asociado al genotipo homocigota para dicho alelo con aumento en el riesgo de desarrollar cáncer gástrico (El-Omar *et al.*2000, El-Omar *et al.*2003, Machado *et al.*2003). Otros sin embargo, no han logrado establecer una asociación entre el polimorfismo de IL-1RN con dicha enfermedad (Lee *et al.*2003, Wu *et al.* 2003, Zeng *et al.* 2003). El gen IL-1RN codifica para una proteína capaz de unirse, con gran afinidad, al mismo receptor al que se une la proteína IL-1 $\beta$ , pero a diferencia de esta última, IL-1Ra no es capaz de activar mecanismos de transcripción, por lo que actúa como un inhibidor competitivo de IL-1 $\beta$ . Por lo tanto, IL-1Ra regula la activación del mecanismo inflamatorio, de forma que la respuesta inmunitaria no sea excesiva y no tenga efectos dañinos sobre el organismo (Dinarello 1996). Personas homocigotas para el alelo 2 podrían presentar una disminución en la expresión de la proteína IL-1Ra, puesto que se ha observado que individuos que portan este genotipo presentan una respuesta inmune más prolongada y severa que personas con otros genotipos (Witkin *et al.* 2002). Nuestro estudio sugiere que más que el genotipo IL-RN 2\*2, el solo hecho de portar el alelo 2 confiere un mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico, pues si bien es cierto que el genotipo homocigoto para dicho alelo se ha asociado con menor producción de la proteína IL-1Ra, esta disminución en la expresión podría ser significativa aun en personas que porten al menos una copia del alelo 2, en comparación con personas que no portan este alelo.

El hecho de haber encontrado asociación de heterocigotos para el alelo número 2 del polimorfismo de IL-1RN con el riesgo de cáncer gástrico y no haber observado

mayor riesgo en los individuos de genotipo homocigoto para ese mismo alelo puede deberse al tamaño de muestra. Solamente dos individuos del grupo de pacientes con cáncer gástrico presentaba el genotipo homocigoto IL-1RN2\*2, mientras que cinco individuos del grupo control presentaban este genotipo. Como se mencionó anteriormente otros grupos han reportado un aumento en el riesgo para individuos homocigotos para el alelo 2 pero no para el genotipo heterocigoto. Por esta razón se hace muy necesario corroborar la asociación aquí reportada en futuros estudios con un mayor tamaño de muestra, donde se esperaría mayor cantidad de individuos con el genotipo homocigoto para este alelo.

Se observó asociación del genotipo heterocigota para el alelo dos del polimorfismo del gen IL-1RN con el riesgo de desarrollar dispepsia. Personas que portan el genotipo IL-1RN 2\*-- podrían tener un mayor riesgo de desarrollar algún tipo de dispepsia en comparación con personas no portadoras de dicho alelo (OR 3.16; intervalo de confianza al 95% 0.97-10.28;  $p=0.06$ ). Se ha reportado asociación del genotipo homocigoto para el alelo 2 con úlceras duodenales y gástricas, así como con gastritis atrófica y metaplasia intestinal (Furuta *et al.* 2002, Zambon *et al.* 2002, García-González *et al.* 2003, Rad *et al.* 2003). Algunas de éstas patologías son consideradas como lesiones gástricas precancerosas, aunque su relación en el proceso neoplásico puede variar dependiendo del tipo de lesión. En el caso de las úlceras duodenales la asociación es contraria a la que se reporta para los otros casos, es decir, los alelos que han sido asociados con el riesgo de cáncer gástrico y lesiones gástricas precancerosas. En el caso de las úlceras duodenales, tienen un efecto protector. Recientemente, también se ha determinado asociación de este mismo genotipo (IL-1RN 2\*2) con otras lesiones gastroesofágicas, no relacionadas de forma directa con el proceso neoplásico de cáncer de estómago (Koivurova *et al.* 2003). Así los polimorfismos de IL-1RN, relacionados

con el aumento en la expresión de la proteína IL-1 $\beta$ , podrían estar confiriendo un mayor riesgo a desarrollar cáncer gástrico debido al efecto que esta proteína podría tener en etapas tempranas del proceso de carcinogénesis, etapas como la inflamación crónica que conduce a la atrofia gástrica e hipoclorhidria. Sin embargo se vuelve a hacer énfasis en el hecho de que más que el genotipo homocigoto para el alelo 2 del polimorfismo de IL-1RN, sería la presencia de ese alelo, lo que aumenta el riesgo de lesiones gástricas o cáncer gástrico como tal. Se insiste entonces en la necesidad de confirmar la asociación aquí obtenida en un mayor grupo de personas.

No se observó ningún tipo de asociación entre los polimorfismos de gen IL-10 con el riesgo de cáncer gástrico o dispepsia. Recientemente algunos estudios han reportado que la presencia de los alelos A, T y A en las posiciones -1082, -819 y -592 respecto al sitio de inicio de transcripción del gen IL-10, respectivamente, aumentan el riesgo de desarrollar cáncer gástrico (Wu *et al.* 2002, El-Omar *et al.* 2003, Wu *et al.* 2003). Dichas variantes disminuyen la expresión de la proteína anti-inflamatoria IL-10 (Turner *et al.* 1997). La disminución de IL-10, junto con el aumento de la proteína pro-inflamatoria IL-1 $\beta$ , da como resultado un fenotipo pro-inflamatorio, en respuesta a la bacteria *H. pylori*, lo cual tendría consecuencias importantes para la mucosa gástrica (El-Omar *et al.* 2003). Al igual que para los polimorfismos IL-B-31 e IL-1B-511, para los polimorfismos de IL-10 no se observaron diferencias significativas, en cuanto a las frecuencias genotípicas, entre casos y controles, ni entre el grupo de lesiones gástricas y sus controles. La frecuencia del alelo de riesgo para cada uno de los polimorfismos era alta en todos los grupos; por lo tanto el hecho de no haber observado asociación puede deberse a que la muestra total utilizada en este estudio proviene de una región de alto riesgo, probablemente con mayor predisposición genética, de desarrollar cáncer gástrico (como se explicó anteriormente). Sin embargo se debe tener en cuenta, que el no haber

encontrado asociación podría deberse a la falta de poder estadístico debido al tamaño de muestra. En el futuro se deben llevar a cabo estudios con mayor tamaño de muestra para confirmar los resultados aquí obtenidos; sin embargo se debe tener en cuenta que otros factores de riesgo podrían tener mayor peso en nuestra población, que los polimorfismos aquí estudiados.

No se encontró asociación entre el polimorfismo del codón 72, exón 4 del gen p53 con cáncer gástrico y lesiones gástricas precancerosas en el grupo aquí estudiado. Varios estudios han reportado asociación de dicho polimorfismo con varios tipos de cáncer, entre ellos cáncer gástrico (Oka *et al.* 1991, Fan *et al.* 2000, Shepherd *et al.* 2000, Hiyama *et al.* 2002). Así mismo, se ha sugerido que la presencia del alelo Arg para este polimorfismo podría tener relación con el aumento en la sobrevida de pacientes con cáncer gástrico (Zhang *et al.* 2003, Zhang *et al.* 2004). Muy pocos estudios se han llevado a cabo con este polimorfismo en relación con cáncer gástrico, sin embargo se ha reportado asociación de dicho polimorfismo con aumento en el riesgo de cáncer gástrico de tipo difuso (Hiyama *et al.* 2002). Sin embargo existe controversia al respecto (Wu *et al.* 2004). Recordemos que la etiología de ambos tipos de cáncer gástrico es muy diferente por lo que el componente genético involucrado en el desarrollo neoplásico podría variar (Parsonnet 1993, Yasui *et al.* 2001). En este estudio no fue posible discriminar por el tipo histológico del cáncer por las razones anteriormente mencionadas Sin embargo sería muy importante establecer si existe asociación de dicho polimorfismo con uno u otro tipo histológico de cáncer gástrico. Esto porque podría existir asociación con un tipo de cáncer gástrico pero con el otro no debido a las mismas diferencias que se presentan en el proceso de desarrollo entre uno y otro tipo.

Se desconoce el papel que podría estar jugando el polimorfismo del codón 72, exón 4 de p53 en el cáncer gástrico. Dicho polimorfismo ha sido asociado principalmente con cáncer de pulmón (Wang *et al.* 1999, Fan *et al.* 2000). La asociación reportada para este polimorfismo con el riesgo de cáncer gástrico en los diferentes estudios no es muy contundente, sumado a que existen muy pocos estudios, por lo que podría ser que este polimorfismo no tenga mayor efecto en el desarrollo de neoplasias gástricas. A pesar de que se conoce que el cambio de arginina (Arg) por prolina (Pro) en dicho codón tiene efecto sobre la función que cumple la proteína (Thomas *et al.* 1999), existen también otras variantes polimórficas en otras regiones del gen p53. Entonces, algunas de estas variantes polimórficas podrían tener mayor efecto en la función de dicha proteína y podrían estar más involucradas con el aumento en el riesgo de desarrollar cáncer gástrico. Se ha reportado que este gen se encuentra mutado en casi el 50 por ciento de todos los tipos de cáncer (Levine 1997), muchas de estas mutaciones ocurren en las diferentes etapas del proceso neoplásico, por lo que algunas de las mutaciones, *de novo*, que se producen podrían tener un efecto mucho mayor en el desarrollo del cáncer que las variantes polimórficas de línea germinal que han sido reportadas.

No se encontró asociación entre ninguno de los polimorfismos estudiados para los genes IL-1B, IL-1RN, IL-10 y p53 con el riesgo de cáncer gástrico cuando se comparó el grupo de pacientes con cáncer gástrico contra el grupo de pacientes dispépticos. Recordemos que estas lesiones fueron diagnosticadas como grupo I y II de acuerdo con el método de clasificación japonesa (Japanese Research Society for Gastric Cancer 1995). Estos grupos son considerados como normales o lesiones muy leves, que fácilmente involucran por lo que este grupo de individuos podría considerarse como grupo control. Este grupo de personas dispépticas provenía de la misma región de la que provenían tanto los casos como los controles con los que llevo a cabo este estudio,

entonces el hecho de no observar asociación entre ninguno de los polimorfismos para los genes estudiados podría atribuirse a las mismas razones que se explicaron anteriormente para los casos de cáncer gástrico.

El poseer uno, dos, tres o mas alelos de riesgo no produjo aumento en el riesgo de desarrollar cáncer gástrico o dispepsia. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que en algunos casos el número de personas que portaban ciertas combinaciones de alelos de riesgo era muy bajo para sacar algún tipo de conclusión debido a limitaciones en el modelo estadístico (por ejemplo el número de individuos que portaban un alelo de riesgo eran 3 pacientes con cáncer gástrico y 5 individuos de su grupo control). La combinación de alelos de riesgo, en los diferentes polimorfismos, da como resultado neto, un aumento en los niveles de expresión de IL-1 $\beta$ . La sobreexpresión de dicha proteína tiene consecuencias importantes en la mucosa gástrica, como la disminución en la secreción de ácido gástrico debido a las propiedades de dicha proteína como uno de los inhibidores más potente de la secreción de ácidos gástricos hasta ahora conocidos (El-Omar 2001).

Para que exista asociación de los polimorfismos de IL-1B, IL-1RN e IL-10 con el riesgo de cáncer gástrico, la infección por la bacteria *H. pylori* es fundamental, principalmente en las etapas tempranas de la carcinogénesis gástrica (Figueiredo *et al.* 2002, El-Omar *et al.* 2003). Por tratarse de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias importantes, la sobreexpresión de la proteína IL-1 $\beta$  junto a la disminución de la expresión de IL-10, tendría como resultado el aumento de la respuesta inflamatoria ante *H. pylori*. Las consecuencias del aumento en la expresión de IL-1 $\beta$  podrían ser una pérdida de función de las células secretoras de ácido de la mucosa gástrica (atrofia gástrica), con la consecuente hipoclorhidria, lo cual tendría como resultado un aumento en el pH. Esto haría del estómago un hábitat menos hostil para *H. pylori* así como para

otros microorganismos que ahora serían capaces de colonizar dicho órgano. Un aumento en el mecanismo inflamatorio y el aumento de organismos en el estómago llevaría a la acumulación de una serie de compuestos reactivos de oxígeno y nitrógeno, producto de la activación de la respuesta inmune o del metabolismo de las bacterias, con conocidas propiedades carcinogénicas, lo que aumentaría riesgo de desarrollar cáncer gástrico (El-Omar *et al.* 2000, Troost *et al.* 2003). Un 87% de los individuos aquí estudiados resultaron seropositivos para la prueba de anticuerpos contra *H. pylori*, sin embargo no conocemos los tipos de cepas presentes en este grupo de individuos. Tomando en cuenta que existen cepas más virulentas y que han sido asociadas con un mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico, será importante determinar las cepas de la bacteria presentes en nuestra población.

El cáncer gástrico es una enfermedad de etiología compleja y multifactorial. Los factores de riesgo y prevención involucrados pueden ser muchos, algunos incluso podrían aún no ser conocidos. Desconocemos también el peso que tiene cada uno de los factores de riesgo puede tener sobre el desarrollo de la enfermedad o si su peso pudiese variar entre grupos étnicos o entre regiones geográficas. Por tal motivo no podemos asegurar que los genes aquí estudiados estén directamente asociados con el riesgo de cáncer gástrico en nuestra población o bien, podría ser que estos tengan un papel importante para el desarrollo de la enfermedad, en algunos grupos étnicos mientras que para otros no. Será muy importante realizar más estudios con los polimorfismos de los genes aquí estudiados, con mejoras en el diseño metodológico y con muestras más numerosas y representativas en un futuro cercano. Si bien es cierto que dichos genes, y las proteínas que estos expresan poseen características y efectos importantes en la fisiología gástrica, lo cual los convierte en excelentes candidatos para estudios en donde se evalúe su posible asociación con el cáncer gástrico, estos no son los únicos

### Conclusiones y recomendaciones.

1. Las frecuencias alélicas para los polimorfismos IL-1B-31, IL-1B-511 y los tres polimorfismos del gen IL-10 son similares a las que han sido reportadas para poblaciones asiáticas, pero más altas que las reportadas en países caucásicos. En el caso del gen IL-1RN las frecuencias alélicas de la población estudiada son similares a las reportadas para poblaciones caucásicas y mucho más altas en comparación con las reportadas en países asiáticos. Para IL-1B+3954, las frecuencias alélicas de la población estudiada representan un valor intermedio entre las reportadas para estos dos grupos étnicos.
2. Las frecuencias de los alelos que han sido asociados con el aumento en el riesgo de cáncer gástrico son más altas en la población total de este estudio que en otras poblaciones del mundo. Esto podría deberse a que individuos con una mayor respuesta pro-inflamatoria podrían haber sido favorecidos por procesos de selección natural en el trópico en respuesta a presiones selectivas ambientales como el caso de las infecciones bacterianas, las cuales fueron, en décadas anteriores, una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en Costa Rica.
3. Las frecuencias alélicas del polimorfismo del codón 72 de p53 aquí obtenidas son similares a las reportadas para poblaciones caucásicas. En asiáticos estas frecuencias son ligeramente más altas que las aquí reportadas.

4. Existe un fuerte desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos IL-1B-31/IL-1B-511 ( $D' = -0.91$ ). El 97% de los haplotipos inferidos correspondían a la combinación de los alelos C/T o T/C. Estos resultados concuerdan con lo reportado en diferentes lugares del mundo independientemente del grupo étnico.
5. Existe desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos IL-10-592/IL-10-819 ( $D' = -0.62$ ). Este no es tan fuerte si se toma en cuenta que algunos estudios han reportado ligamiento cercano al 100% entre estos *loci*. En este estudio el 87% de los haplotipos inferidos correspondían a las combinaciones A/T o C/C.
6. No existe asociación de los polimorfismos IL-1B-31 e IL-1B-511, IL-10-592 e IL-10-819 con el riesgo de cáncer gástrico. Varios factores podrían explicar el no haber encontrado asociación, entre ellos el tamaño de la muestra y la forma en que seleccionó esta, no se discriminó por el tipo histológico y la localización anatómica del cáncer dentro del estómago, la composición genética de la población costarricense y el hecho de estar trabajando con un grupo de personas de una región de alto riesgo de desarrollar la enfermedad.
7. Existe asociación del polimorfismo IL-1B+3954 con el aumento en el riesgo de cáncer gástrico. Individuos con el genotipo heterocigota CT tienen un mayor riesgo de desarrollar esta enfermedad que individuos no portadores del alelo T. Esta asociación no ha sido reportada hasta la fecha.

8. Existe asociación del polimorfismo IL-1RN con el riesgo de cáncer gástrico. Individuos con el genotipo heterocigota para el alelo 2 tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico que individuos con cualquier otro genotipo. Individuos portadores del alelo 2 podrían tener un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad.
  
9. No existe asociación del polimorfismo del exón 4, codón 72 de p53 con el riesgo de cáncer gástrico. Existen muy pocos estudios que asocian este polimorfismo con aumento en el riesgo de esta enfermedad. Otros polimorfismos o mutaciones *de novo* en este gen podrían estar más relacionados con el riesgo de la misma.
  
10. Para determinar con mayor precisión la asociación de estos polimorfismos con cáncer gástrico en Costa Rica será necesario: A) determinar la frecuencia de los polimorfismos en la población general costarricense B) determinar si existen diferencias en las frecuencias de los polimorfismos entre las poblaciones de las regiones de alto y bajo riesgo, C) realizar un estudio caso-control con un mayor tamaño de muestra tomando en cuenta el tipo histológico de cáncer (difuso o intestinal) y la localización anatómica del mismo, D) realizar un estudio prospectivo en la población de Costa Rica en donde se estudien los polimorfismos aquí estudiados junto con otros factores de riesgo de cáncer gástrico

**Literatura citada.**

1. Alamartine, E., Berthoux, P., Mariat, C., Cambazard, F., Berthoux, F. 2003. Interleukin-10 promoter polymorphisms and susceptibility to skin squamous cell carcinoma after renal transplantation. *J. Invest. Dermatol.* 120:99-103.
2. Bartels, G., Herrera, A., Salas, P., Sierra, R., Lomonte, B. 1995. Antibodies to *Helicobacter pylori* in dyspeptic patients, asymptomatic adults, and children from Costa Rica. *APMIS* 103:428-432.
3. Beales, I., Calam, J. 1998. Interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  inhibit acid secretion in cultured rabbit parietal cells by multiple pathways. *Gut* 42; 227-234.
4. Bidwell, J., Keen, L., Gallagher, G., Kimberly, R., Huizinga, T., McDermott, M.F., Oksenberg, J., McNicholl, J., Pociot., F., Hardt, C., D'Alonso, S. 1999. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes and Immunity* 1: 3-19.
5. Blaser, M. 1996. Origen bacteriano de la úlcera de estómago. *Investigación y ciencia* (abril):54-59.
6. Blaser, M. 1998. *Helicobacter pylori* and gastric diseases. *BMJ* 316: 1507- 1510.
7. Bocchio, L., Boin, F., Zanardini, R., Popoli, M., Michelato, A., Bignotti, S., Battista, G., Gennarelli, M. 2002. Association between promoter polymorphic haplotypes of interleukin-10 gene and schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 51:480-484.
8. Boyle, P. 1997. Global burden of cancer. *Lancet* 349(suppl II):23-26.
9. Brenner, H., Arndt, V., Stürner, T., Stegmaier, C., Ziegler, H., Dhom, G. 2000. Individual and joint contribution of family history and *Helicobacter pylori* infection to the risk of gastric carcinoma. *Cancer* 88 (2): 274-279.

10. Clay, F., Tarlow, J., Cork, M., Cox, A., Nicklin, M., Duff, G. 1996. Novel interleukin-1 receptor antagonist exon polymorphisms and their use in allele-specific mRNA assessment. *Hum. Genet.* 97: 723-726.
11. Correa, P. 1992. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process First American Cancer Society Award Lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Research* 52:6735-6740.
12. Correa, P. 2003. Bacterial infections as a cause of cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 95(2):E3
13. Correa, P., Haenszel, W., Cuello, C., Zavala, D., Fontham, E., Zarama, G., Tannenbaum, S., Collazos, T., Ruiz, B. 1990. Gastric precancerous process in a high risk population: cohort follow up. *Cancer Res.* 50(15):4737-4740.
14. Covacci, A., Telford, J., Del Giudice, G., Parsonnet, J., Rappuoli, R. 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 284:1328-1333.
15. Cox, A., Camp, N., Nicklin, F., di Giovine, F., Duff, G. 1998. An analysis of linkage disequilibrium in the interleukin-1 gene cluster, using a novel grouping method for multiallelic markers. *Am. J. Hum. Genet.* 62:1180-1188.
16. Crawley, E., Kay, R., Sillibourne, J., Patel, P., Hutchinson, I., Woo, P. 1999. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotype of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Reum.* 42:1101-1108.
17. Dinarello, C. 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87 (6): 2095-2147.
18. El-Omar, E., Carrington, M., Chow, W., McColl, K., Bream, J., Young, H., Herrera, J., Lissouska, J., Yuan, C., Rothman, N., Lanyon, G., Martin, M.,

- Fraumeni, J., Rabkin, C. 2000. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 404; 398-406 (corrección publicada en *Nature* 2001; 412: 99).
19. El-Omar, E. 2001. The importance of interleukin-1 $\beta$  in *Helicobacter pylori* associated disease. *Gut* 48: 743-747.
  20. El-Omar, E., Chow, W., Gammon, M., Vaughan, T., Risch, H., Fraumeni, J. 2001. Pro-inflammatory genotype IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-10 increase risk of distal cancer but not of cardia or oesophageal adenocarcinomas (Abstract). *Gastroenterology* 120:A86.
  21. El-Omar, E., Rabkin, C., Gammon, M., Vaughan, T., Risch, H., Schroenberg, J., Stanford, J., Mayne, S., Goedert, J., Blot, W., Fraumeni Jr., J., Chow, W. 2003. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with pro-inflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology* 124: 1193-1201.
  22. Enroth, E., Kraaz, W., Engstrand, L., Nyrén, O., Rohan, T. 2000. *Helicobacter pylori* strain types and risk of gastric cancer: a case-control study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 9:981-985.
  23. Enrs, P. 1999. The role of inflammation in the pathogenesis of gastric cancer. *Aliment Pharmacol. Ther.* 13: 13-18.
  24. Eskadale, J., Kube, D., Tesch, H., Gallagher. 1997. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics* 46: 120-128.
  25. Fan, R., Wu, M., Miller, D., Wain, J., Kelsey, K., Weincke, J., Chistiani, D. 2000. The p53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention* 9: 1037-1042.

26. Fenoglio-Preiser, C., Wang, J., Stemmermann, G., Noffsinger, A. 2003. TP53 and gastric carcinoma: a review. *Human mutation* 21:258-270.
27. Ferlay, J., Bray, P., Pisani, P., Parkin, D. 2000. *Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide*. IARC press. Lyon. France.
28. Fickenscher, H., Hör, S., Küpers, H., Knappe, A., Wittmann, S., Sticht, H. 2002. The interleukin-10 family of cytokines. *Trends in immunology* 23(2):89-96.
29. Figueiredo, C., Machado, J., Pharoah, P., Seruca, R., Sousa, S., Carvalho, R., Capelinha, A., Quint, W., Caldas, C., van Doorn, L.J., Carneiro F., Sobrinho-Simoes. 2002. *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 94(22):1680-1687.
30. Furuta, T., El-Omar, E., Xiao, F., Shirai, N., Takashima, M., Sugimura, H. 2002. Interleukin-1 polymorphisms increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan. *Gastroenterology* 123: 92-105.
31. Garcia-Gonzalez, M., Lanas, A., Santolaria, S., Crusius, J., Serrano, M., Peña, A.S. 2001. The polymorphic IL-1B and IL-1RN genes in the aetiopathogenesis of peptic ulcer. *Clin. Exp. Immunol.* 125:368-375.
32. Garcia-Gonzalez, M., Lanas, A., Savelkoul, P., Santolaria, S., Benito, R., Crusius, J., Peña, A.S. 2003. Association of interleukin 1 gene family polymorphisms with duodenal ulcer disease. *Clin. Exp. Immunol.* 13:525-531.
33. González, A. 2003. Polimorfismos de los genes de desintoxicación CYP1A1, CYP2E1, GSTT1 y GSTM1 en la susceptibilidad al cáncer gástrico. Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 77p.

34. Hamajima, N., Ito, H., Matsuo, K., Tajima, K., Tominaga, S. 2002. *Helicobacter pylori* seropositivity, the interleukin 1B polymorphism, and smoking among first-visit outpatients. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 3:23-28.
35. Hamajima, N., Matsuo, K., Saito, T., Tajima, K., Okuma, K., Yamao, K., Tominaga, S. 2001. Interleukin 1 polymorphisms, lifestyle factors, and *Helicobacter pylori* infection. *Jpn. J. Cancer Res.* 92: 383-389.
36. Hansson, L.E. 2000. Risk of stomach cancer in patients with peptic Ulcer disease. *World J. Surg* 24:315-320.
37. Hiyama, T., Tanaka, S., Kitadai, Y., Ito, M., Sumii, M., Yoshihara, M., Shimamoto, F., Haruma, K., Chayama, K. 2002. p53 codon polymorphism in gastric cancer susceptibility in patients with *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis. *Int. J. Cancer* 100: 304-308.
38. Hsieh, L.L., Hsieh, J.T., Wang, L.Y., Fang, C.Y., Chang, S.H., Chen, T.C. 1996. p53 mutations in gastric cancer from Taiwan. *Cancer Letters* 100:107-113.
39. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C. 1991. p53 mutations in human cancer. *Science* 253:49-53.
40. Huang, J.Q., Zheng, G.F., Sumanac, K., Irvine, E.J., Hunt, R. 2003. Meta-analysis of the relationship between *cagA* seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology* 125:1636-1644.
41. Ismail, H., Fick, P., Zhang, J., Lynch, R., Berg, D. 2003. Depletion of neutrophils in IL-10<sup>-/-</sup> mice delays clearance of gastric *Helicobacter pylori* infection and decreases the Th1 immune response to *Helicobacter*. *The Journal of Immunology* 170:3782-3789.
42. Japanese Research Society for Gastric Cancer. 1995. Japanese classification of

- gastric carcinoma. KANEHARA & CO.,LTD. Tokio. Japan. 103p.
43. Kato, S., Onda, M., Yamada, S., Matsuda, N., Tokunaga, A., Matsukura, N.. 2001. Association of the interleukin-1 $\beta$  genetic polymorphism and gastric cancer risk in Japanese. *J. Gastroenterology* 36: 696-699.
  44. Koivurova, O.P., Karhukorpi, M.J., Joensuu, E.T., Koistinen, P.O., Valtonen, J.M., Karttunen, T.J., Niemelä, S.E., Karttunen, R.A. IL-1RN 2/2 genotype and simultaneous carriage of genotypes IL-1RN 2/2 and IL-1 $\beta$ -511 T/T associated with oesophagitis in *Helicobacter pylori*-negative patients. *Scand. J. Gastroenterol.* 12:1217-1222.
  45. Krakauer, T., Vilcek, J., Oppenhiem, J. **TITULO DEL LIBRO.** En: *Fundamental immunology.* 1999. 4<sup>th</sup> edition. Edited by P. F. Willian. Lippincot-Raven Publishers. Philadelphia. USA. Pp 775-813
  46. Kuipers, E. J. 1999. Review article: exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 13 ( suppl. 1 ): 3-11.
  47. Lane, D. P. 1992. p53, guardian of the genome. *Nature* 358:15-16.
  48. Lee, S.-G., Kim, B., Choi, W., Lee, I., Choi, J., Song, K. 2003. Lack of association between pro-inflammatory genotypes of interleukin-1 (IL-1B C/+ and IL-1RN \*2 / \*2) and gastric cancer/duodenal ulcer in Korean population. *Cytokine* 21:1-5.
  49. Levine, A. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323-331.
  50. Machado, J., Pharoah, P., Sousa, S., Carvalho, R., Oliveira, C., Figueiredo, C., Amorim, A., Seruca, R., Caldas, C., Carneiro, F., Sobrinho-Simoes, M. 2001.

- Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology* 121(4):823-829.
51. Mata, L. 1985. Evolución de las enfermedades diarreicas en las américas.p 57-66  
En: Control y erradicación de enfermedades infecciosas: un simposio internacional. editado por: Leonardo Mata. Organización Panamericana de la Salud.
52. Mccoll, K., El-Omar, E. 2002. How does *H. pylori* infection cause gastric cancer?. *Keio J Med.* 51(suppl. 2):53-56.
53. McCulloch, P. 1996. Gastric cancer. *Postgrad. Med. J.* 72: 450-457.
54. Moore, K., de Wall Malefyt, R., Koffman, R., O'Garra, A. 2001. Interleukin-1 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19:683-765.
55. Morera, B., Barrantes, R., Marin-Rojas, R. 2003. Gene admixture in the Costa Rican population. *Annals of Human Genetics* 67:71-80.
56. Morera-Brenes, B., Sierra, R., Barrantes, R., Jonasson, J., Nord, C. 1994. *Helicobacter pylori* in a Costa Rican dyspeptic patien population. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13:253-257.
57. Muñoz, N. 1998. Cáncer gástrico y *Helicobacter pylori*. En: infección por *Helicobacter pylori* en lesiones gastroduodenales: la segunda década. Editores: Pajares Garcia, J., Correa, P., Péres Pérez, G. Prous Science. Barcelona. España. Pp 199-200.
58. Nicklin, M., Weith, A., Duff, G. 1994. A physical map of the region encompassing the human interleukin-1 $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and interleukin-1 receptor antagonist gene. *Genomics* 19: 382-384.

59. Oka, K., Ishkawa, K., Brunner, J., Takashaki, R., Saya, H. 1991. Detection of loss of heterozygosity in the p53 gene in renal cell carcinoma and bladder cancer using the polymerase chain reaction. *Mol. Carcinog.* 4: 10-13.
60. OMIM DATABASE NUMBER 124092. INTERLEUKIN-10.  
[www.ncbi.nlm.gov](http://www.ncbi.nlm.gov)
61. Oppenheim, J., J., Feldman, M. 2001. *Cytokine reference*. Academic press. London. England. Pp 289-351, 1563-1587.
62. Parkin, M., Pisani, P., Ferlay, J. 1999. Estimates of the worldwide incidence of major 25 major cancers in 1990. *Int. J. Cancer* 80:827-841.
63. Parsonnet, J. 1993. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Gastroenterology Clinics of North America* 22(1):89-104.
64. Peek, R., Blaser, M. 2002. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat. Rev. Cancer* 2: 28-37.
65. Pérez-Pérez GI, Tijerina-Menchaca R, Portal-Celhay C, Bosques-Padilla FJ, Garza-González E. Development of a pyrosequencing protocol for determining the polymorphism on the position -31 of the interleukin-1 gene. *Helicobacter* 2003; 374: 352
66. Powell, S. 1997. Stomach cancer. En: Vogelstein, B., Kinzler, K. W. *The genetic basis of human cancer*. p 647-652. Mc Graw-Hill. New York. USA.
67. Pentti, S., Correa, P. 2002. Delayed rise in incidence of gastric cancer in females results in unique sex ratio (M/F) pattern: etiologic hypothesis. *Gastric Cancer* 5:213-219.
68. Rad, R., Prinz, C., Neu, B., Neuhofer, M., Zeitner, M., Volland, P., Becker, I.,

- Schepp, W., Gerhard, M. 2003. Synergistic effect of *Helicobacter pylori* virulence factors and interleukin-1 polymorphisms for the development of severe histological changes in the gastric mucosa. *Journal of Infectious Diseases* 188:272-281.
69. Rollinson, S., Leneve, A., Mensah, F., Roddam, P., Allan, J., Diss, T., Roman, E., Jack, A., McLennan, K., Dixon, M., Morgan, G. 2003. Gastric marginal zone lymphoma is associated with polymorphisms in genes involved in inflammatory response and antioxidative capacity. *Blood* 102(3):1007-1011.
70. Rosero-Bixby, L. 1988. Costa Rica saves infant's lives. *World Health Forum* 9:439.
71. Sharon, J. 1998. *Basic Immunology*. Willians & Wilkins. Baltimore. USA. Pp 107-128.
72. Shepherd, T., Tolbert, D., Benedetti, J., MacDonald, J., Stemmermann, G., Wiest, J., DeVoe, G., Miller, M., Wang, J., Noffsinger, A., Fenoglio-Preiser, C. 2000. Alterations in exon 4 of the p53 gene in gastric carcinoma. *Gastroenterology* 118:1039-1044.
73. Shin, H., Park, B., Kim, J., Jung, J., Kim, J., Yoon, J., Kim, Y., Lee, H. 2003. Interleukin-10 haplotype associated with increased risk of hepatocellular carcinoma. *Human Molecular Genetics* 12(8):901-906.
74. Siders, W., Klimovitz, J., Mizel, S. 1993. Characterization of the structural requirements and cell type specificity of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  secretion. *J. Biol Chem.* 268 ( 29): 22170-22174.
75. Sierra, R., Chinnock, A., Oshima, H., Pignatelli, B., Malaveille, C., Gamboa, C.,

- Teuchmann, S., Muñoz, N., Bartsch, H. 1993. In vivo nitrosoproline formation and the other risk factors in costa rican children from high- and low- risk areas for gastric cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers and prevention* 2: 563-568.
76. Sierra, R., Maxwell, D., Muñoz, G. 1989. Cancer in Costa Rica. *Cancer Research* 49:717-724.
77. Sierra, R., Muñoz, N., Peña, A.S., Biemond, I., van Duijn, W., Lamers C.B.H.U., Teuchmann, S., Hernandez, S., Correa, P. 1992. Antibodies to *Helicobacter pylori* and pepsinogen levels in children from Costa Rica: comparison of two areas with different risks for stomach cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1:449-454.
78. Sierra, R., Ohshima, H., Muñoz, N., Teuchmann, N., Peña, A.S., Malaveille, C., Pignatelli, B., Chinnock, A., El Ghissassi, F., Chen, C., Hautefeuille, A., Gamboa, C., Bartsch, H. Exposure to N-nitrosamines and other risk factors for gastric cancer in Costa Rican children. In: *Relevance to human cancer of N-nitroso compounds, tobacco smoke and mycotoxins*. 1991. Edited by L.K. O'Neill, J. Chen and H. Bartsch. International Agency for Research on Cancer (IARC). Lyon, France. Pp 162-167.
79. Sierra, R., Salas, P., Mora-Zuñiga, F., Sanabria, M., Chinnock, A., Peña, S., Quirós, E., Mora, W., Mena, F., Altman, R., Muñoz, N. 1998. Erradicación de *Helicobacter pylori* en una población de alto riesgo de cáncer gástrico. *Acta Médica Costarricense* 40(2): 30-35.
80. Statdländer, C., Waterbor, J. 1999. Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer. *Carcinogenesis* 20 (12): 2195-2207.
81. Tahara, E., Semba, S., Tahara, H. 1996. Molecular biological Observations in

- gastric cancer. *Seminars in oncology* 23(3):307-315.
82. Takashima, M., Furuta, T., Hanai, H., Sugimura, H., Kaneko, E. 2001. Effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric acid secretion and serum gastrin levels in Mongolian gerbils. *Gut* 48:765-773.
83. Tarlow, J., Blakemore, A., Lennard, A., Solari, R., Hughes, H., Steinkasserer, A., Duff, G. 1993. Polymorphisms in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of tandem repeat. *Hum. Genet.* 91: 403-404.
84. Thomas, M., Kalita, A., Labrecque, S., Pim, D., Banks, L., Matlasewski, G. 1999. Two polymorphic variants of wild type p53 differ biochemically and biologically. *Mol. Cell. Biol.* 19:1092-1100.
85. Tilg, H., Vannier, E., Vachino, G., Dinarello, C., Mier, J. 1993. Anti-inflammatory properties of hepatic acute phase proteins: preferential induction of interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist over IL-1 $\beta$  synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. *J. Exp. Med.* 178: 1629-1636.
86. Tolbert, D., Fenoglio-Preiser, C., Noffsinger, A., De Voe, G., MacDonald, J. 1999. The relation of p53 gene mutations to gastric cancer subsite and phenotype. *Cancer cases and control* 10: 227-231.
87. Troost, E., Hold, G., Smith, M., Chow, W., Rabkin, C., McColl, K., El-Omar, E. 2003. The role of IL-1beta and other potential genetic markers as indicators of gastric cancer risk. *Can. J. Gastroenterol.* 17(Suppl B):8B-12B.
88. Tseng, L., Chen, P., Lin, M., Shau, W., Chaung, S., Martin, P., Hansen, J. 2001. Single nucleotide polymorphisms in intron 2 of the human interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene: further definition of the IL-1 $\beta$  and IL-1Ra

- polymorphisms in north American Caucasians and Taiwanese Chinese. *Tissue Antigens* 57: 318-324.
89. Turner, D.M., Williams, D.M., Sankaran, D., Lazarus, M., Sinnott, P.J., Hutchinson, IV. 1997. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur. J. Immunogenet.* 24:1-8.
90. Uno, M., Hamajima, N., Ito, L., Oba, S., Marie, S., Shinjo, S., Onda, H., Saito, T., Takezaki, T., Tajima, K., Tominaga, S. 2002. *Helicobacter pylori* seropositivity and IL-1B C-31T polymorphism among Japanese Brazilians. *International Journal of Molecular Medicine* 10:321-326.
91. Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A. 2000. Surfing the p53 network. *Nature* 408:307-310.
92. Wang, Y.C., Chen, C.Y., Chen, S.K., Chang, Y.Y., Lin, P. 1999. p53 codon 72 polymorphism in Taiwanese lung cancer patients: Association with lung cancer susceptibility and prognosis. *Clinical cancer research* 5:129-134.
93. Walker, K., Levine, A. 1996. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 15335-15340.
94. Webb, P., Hengels, K., Moller, H., Newell, D., Palli, D., Elder, J., Coleman, M., De Backer, G., Forman, D. 1994. The epidemiology of low serum pepsinogen A levels and an international association with gastric cancer rates. *Gastroenterology* 107: 1335-1344.
95. Witkin, S., Gerber, S., Ledger, W. 2002. Influence of Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in disease. *Clinical Infectious Disease* 34:204-209.

96. Wong, B.C., Zhu, G.H., Lam, S.K. 1999. Aspirin induced apoptosis in gastric cancer cells. *Biomed & pharmacother* 53: 315-318.
97. Wu, M., Chen, M., Wu, D. 2004. Influences of lifestyle habits and p53 codon 72 and p21 codon 31 polymorphisms on gastric cancer risk in Taiwan. *Cancer Letters* 205:61-68.
98. Wu, M., Huang, S., Chang, Y., Shun, C., Chang, M., Lin, M., Wang, H., Lin, J. 2002. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-10 promoter polymorphisms in Epstein-Barr Virus-associated gastric carcinoma. *The Journal of Infectious Diseases* 185:106-109
99. Wu, M., Wu, C., Chen, C., Lin, M., Shun, C., Lin, J. 2003. Interleukin-10 genotypes associate with the risk of gastric carcinoma in Taiwanese Chinese. *Int. J. Cancer* 104: 617-623.
100. Yasui, W., Oue, N., Kuniyasu, H., Ito, R., Tahara, R., Yokozaki, H. 2001. Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. *Gastric cancer* 4: 113-121.
101. Yee, L., Tang, J., Gibson, A., Kimberly, R., van Leewen, D., Kaslow, R. 2001. Interleukin 10 polymorphisms as predictors of sustained response in antiviral therapy for chronic hepatitis C infection. *Hepatology* 33:708-712.
102. Zhang, Z.W., Laurence, N., Hollowood, A., Newcomb, P., Moorghen, M., Gupta, J., Feakins, R., Farthing, M., Alderson, D., Holly, J. 2004. Prognostic value of *TP53* codon 72 polymorphism in advanced gastric adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research* 10; 131-135.
103. Zhang, Z.W., Newcomb, P., Hollowood, A., Feakins, R., Moorghen, M., Feakins, R., Storey, A., Farthing, M., Alderson, D., Holly, J. 2003. Age-

associated increase of codon 72 arginine p53 frequency in gastric cardia and non-cardia adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research* 9;2151-2156.

104. Zeng, Z., Hu, P., Hu, S., Pang, R., Chen, M., Ng, M., Sung, J. 2003. Association of interleukin 1B gene polymorphism and gastric cancers in high and low prevalence regions in China. *Gut* 52:1684-1689.

## ANEXOS.

### ❖ Protocolo de extracción de ADN a partir de sangre periférica.

#### Fase I.

1. 500  $\mu$ l de sangre mas 1000  $\mu$ l de buffer de lisis. Incubar en hielo por 45 minutos.  
Centrifugar 10 minutos a 5000 rpm a 4°C.
2. Disolver el botón en 1000  $\mu$ l de buffer de lisis. Centrifugar 10 minutos a 5000 rpm a 4°C.
3. Disolver el botón en 500  $\mu$ l de buffer SE. Centrifugar 10 minutos a 5000 rpm a 4°C.
4. Disolver el botón en 400  $\mu$ l de buffer SE, agregar 15  $\mu$ l de proteinasa K, 50  $\mu$ l SDS 20%. Dejar toda la noche a 37°C en baño maría.

#### Fase II. Extracción con fenol.

Puntas nuevas a partir del paso 9 en adelante.

Agregar 300  $\mu$ l de buffer SE.

5. A la solución de proteólisis añadir 400  $\mu$ l de fenol, mezclar en rotor durante 10 minutos, centrifugar 10 minutos a 8000 rpm a 4°C. Trasegar la fase superior a otro eppendorf.
6. Repetir el paso 5.
7. Añadir 200  $\mu$ l de fenol y 200  $\mu$ l de cloroformo-alcohol isomílico, mezclar en rotor por 10 minutos, centrifugar 10 minutos a 8000 rpm a 4°C. Trasegar la fase superior a otro eppendorf.
8. Añadir 400  $\mu$ l de cloroformo-alcohol isomílico, mezclar en rotor durante 10 minutos, centrifugar 10 minutos a 8000 rpm a 4°C. Trasegar la fase superior a otro eppendorf.

9. Añadir 10  $\mu$ l de acetato de sodio (3M pH 5.2) y mezclar. Agregar 700  $\mu$ l de etanol absoluto. Precipitar moviendo cuidadosamente, centrifugar a 14000 rpm a 4°C durante 30 minutos. Eliminar el máximo de alcohol posible.
10. Realizar un lavado con etanol al 70%, centrifugar a 14000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Eliminar el máximo de alcohol posible, secar el alcohol a 37°C.
11. Diluir en TE y dejar una noche a 37°C.

**Cloroformo-alcohol isomílico 24:1**

240 ml de cloroformo.

10 ml de alcohol isomílico.

**Acetato de sodio 3M pH 5.2**

24.609 g de acetato de sodio en 100 ml de agua.

12.3 g de acetato de sodio en 50 ml de agua.

**SDS 20%.**

20 g de SDS en 100 ml de agua.

**Buffer SE pH 8.0**

NaCl 8.29 g

KHCO<sub>3</sub> 1.00 g

EDTA 200  $\mu$ l 0.5M.

Agua 1000 ml

**EDTA 0.5 M**

78.8 g de EDTA en 1000 ml de agua.

7.88 g EDTA en 100 ml de agua.

**Buffer TE**

15.76 g tris HCl 1M.

7.8 g EDTA 0.5M.

Agua 1000 ml.

Autoclavar a 121°C a 15psi durante 10 minutos.

**Buffer TBE 1X.**

10.8 g tris HCl.

5.5 g ácido bórico.

0.95 g EDTA.

Ajustar a pH 8.00.