



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**“POLIMORFISMO DE LOS GENES *MICA*, *TNF- α* ,
TNF- β , *HSP70-1*, *HSP70-2* Y *HSP70-HOM* EN
PACIENTES MESTIZOS MEXICANOS CON
LESIONES GÁSTRICAS ASOCIADAS A
Helicobacter pylori”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

PARTIDA RODRÍGUEZ OSWALDO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:
DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ

COMITÉ TUTOR:
DR. GONZALO CASTILLO ROJAS
DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.


Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 18 de enero de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **PARTIDA RODRÍGUEZ OSWALDO** con número de cuenta **93155968** con la tesis titulada: **"POLIMORFISMO DE LOS GENES MICA, TNF-ALFA, TNF-BETA, HSP70-1, HSP70-2, HSP70-HOM EN PACIENTES MESTIZOS MEXICANOS CON LESIONES GÁSTRICAS ASOCIADAS A *Helicobacter pylori*."**, realizada bajo la dirección del **DRA. MARTHA E. PÉREZ RODRÍGUEZ**:

Presidente:	DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
Vocal:	DR. GONZALO CASTILLO ROJAS
Vocal:	DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA
Vocal:	DR. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN
Secretario:	DRA. MARTHA E. PÉREZ RODRÍGUEZ
Suplente:	DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ
Suplente	DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 21 de junio de 2010.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

AGRADECIMIENTOS

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

- A los apoyos recibidos: beca CONACYT de estudios de doctorado (num 172452), beca IMSS (2 años) (num 99092374), apoyo a proyectos de investigación CONACYT (num 6957) y FOFOI IMSS (num 2001/007 y 2002/110).

- A los miembros del Comité Tutor:

Dra. Martha Esthela Pérez Rodríguez

Dr. Gonzalo Castillo Rojas

Dr. Emilio Rojas del Castillo

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

- A la Dra. Martha E. Pérez Rodríguez, por aceptarme en su grupo de trabajo, por su empeño en el proyecto y confianza en mí.
- Al Dr. Javier Torres López, por la aportación de las muestras biológicas de pacientes, el soporte económico y la asesoría en la escritura del artículo científico.
- A los miembros de mi Comité Tutor: el Dr. Gonzalo Castillo Rojas, por sus valiosas observaciones y correcciones durante el desarrollo del proyecto, por su ayuda a lo largo de todo el proceso del examen de candidatura y por su sencillez y total disposición; al Dr. Emilio Rojas del Castillo, por sus agudos e inteligentes comentarios en el desarrollo del proyecto y por los consejos para el examen de candidatura.
- Al jurado de examen de Candidatura: Dra. Ivonne Rosenstein, Dr. Edgar Zenteno y Dr. Enrique Ortega, por sus importantes observaciones y por ayudarme a mejorar significativamente el proyecto.
- Al jurado de examen de grado: la Dra. Yolanda López Vidal, por su fundamental ayuda en mi formación académica desde maestría, su disponibilidad para ayudar en la coordinación del posgrado, su tenacidad y dedicación y por ser admirable como investigadora; al Dr. Julio Granados Arriola, por participar con su experiencia e inteligencia en mi formación desde la licenciatura, la maestría, en la preparación de la candidatura y en la corrección del artículo; siempre de forma amable, sencilla y lúcida; al Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón, por iniciarme en la investigación durante la licenciatura, por su confianza, apoyo total, respeto y motivación, al Dr. Julio César Carrero Sánchez, por sus importantes observaciones sobre la tesis, que sin duda la mejoraron muchísimo.

- Al Dr. José Manuel y al Dr. Gilberto Vargas Alarcón, por su generosa ayuda con el análisis de haplotipos.
- Al Dr. Francisco Blanco Favela, por permitirme realizar mi proyecto en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología, por su confianza, candor, sencillez, y sus valiosos consejos.
- Al Dr. Roberto Kretschmer Schmid†, por la ayuda en el establecimiento del proyecto, y por ser una fuente de inspiración, educación, cultura y admiración.
- A la Dra. Margarita Camorlinga Ponce, por la asesoría en el proyecto y la ayuda en la determinación de anticuerpos.
- Al Dr. Eduardo Lazcano Ponce, por la aportación de las muestras biológicas de pacientes.
- Al Dr. Benny Palomares, por las facilidades para obtener las muestras biológicas de los individuos asintomáticos.
- A la Dra. Lourdes Flores Luna y al Dr. Juan Manuel Mejía, por su asistencia en el análisis estadístico.
- Al Instituto Mexicano del Seguro Social, por permitirme usar sus instalaciones y por la aportación de una beca por dos años.
- A los miembros del Anthony Nolan Research Institute; Jennifer, Michelle, Prof. Madrigal, Prof. Marsh, Alice, Daniel, Hazel, Angus y demás, por el increíble recibimiento, su amistad, su orientación y ayuda no sólo en el laboratorio, sino también para la vida cotidiana.
- Al Dr. Eric Goyo Hernández Hernández, por su apoyo técnico en la extracción de DNA, pero sobre todo por su amistad y la diversión en el laboratorio
- Al Richard, por su ayuda en la preparación de material de laboratorio y por su amistad

- A los amigos de la UIMI: Mony, Memo, Yadira, Luis, Vicky, Lalo, Karina, Cancino, Emiliano, Arno, Estrellita, Lety, Sara, Raúl, Dra. Lupita, Dr. Álvaro, Ara, América, Julio, Óscar I, Óscar II, Ely, Eye, Javier, Vale, Mony II, por hacer del laboratorio una segunda casa.
- Al CONACYT, por el financiamiento del proyecto, la aportación de la beca de Doctorado y la beca mixta para la estancia en el Anthony Nolan Research Institute.
- Al Posgrado en Ciencias Biológicas, por aceptarme para estudiar mi Maestría y Doctorado, a todos los profesores e investigadores por la formación académica, y a todo el personal administrativo, Dr. Farfán, Lilia Espinoza, Lilia Jiménez, Lolita, Erica, Ernesto, Gonzalo, Paty, Contadora por facilitar trámites, por el otorgamiento de apoyos económicos para actividades académicas, por su buena disposición y amistad.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi *alma mater*, por cambiar mi vida al otorgarme educación, no sólo durante el bachillerato hasta el doctorado sino prácticamente desde mi nacimiento.
- A mi familia: Mom, Abue, Matloc†, Tía Sixta†, Sra. Chuy, Tía Coty, Ruco, Tía MaElena, Alfonso, Kalis, Tía Estela, Chilaquil†, Tía Lola, Sra. Pola, Sra. Lily, Sra. Sonia, Sr. Ulises, Sra. Amalia, Sr. Alejandro, Sra. Dulce, Sr. Alfonso, Nesto, Patisitas, Mojas, Gato, Chore, Gordis, Bere, Castorcita, Sami, Homero, Chorris, Chipotilla, Pelonio, Pistachoncita, Tanquecín, Kañitas, Xóchitl, Ivette, René, Mau, Tilón, Paco, Paty, Iván, Aida, Irina, Betza, Dulce, Bere II, Karla, Sebas, Prisma, Ivana, Mau II, Frida, Max, Daniela, (hija Irina), por su apoyo y motivación para continuar.

- Pero sobre todo...

Mi más grande agradecimiento a la Dra. Miriam Enriqueta Nieves Ramírez (mi preciosa esposa), por su apoyo académico y técnico, pero sobre todas las cosas, por ser mi fuente de inspiración, motivación, seguridad, admiración, fuerza, orgullo y amor del bueno.

DEDICATORIA

A la mujer de mi vida...

“L’amour, c’est la salutation des anges aux astres”

Les Misérables, Victor Hugo

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	i
RESUMEN	1
RESUMEN EN INGLÉS (ABSTRACT)	2
INTRODUCCIÓN	3
<i>Helicobacter pylori</i>	3
EPIDEMIOLOGÍA	4
FACTORES DE VIRULENCIA	6
<i>H. pylori</i> Y ENFERMEDADES GASTRODUODENALES	8
Gastritis Aguda	10
Gastritis Crónica No Atrófica	10
Gastritis Crónica Atrófica	11
Metaplasia Intestinal	12
Displasia Gástrica	15
Cáncer Gástrico	17
Úlcera Duodenal	20
Linfoma MALT	21
Factores genéticos del hospedero	23
COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC)	23
Moléculas de HLA	25
Polimorfismo de HLA	27
HLA y enfermedades gástricas asociadas a <i>H. pylori</i>	28
GENES NO HLA	29
<i>MICA</i>	29
<i>TNF</i>	31
<i>HSP70</i>	33
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
HIPÓTESIS	35
OBJETIVOS	35

MATERIAL Y MÉTODOS	36
Sujetos de estudio	36
Individuos asintomáticos	36
Pacientes	37
Material Biológico	37
Determinación de anticuerpos contra <i>H. pylori</i> y CagA	37
Extracción de DNA	39
Reacción en cadena de la polimerasa de DNA (PCR)	39
<i>MICA</i>	39
<i>TNF-α</i> -308	41
<i>TNF-β</i> +252	41
<i>HSP70-1</i> +190	41
<i>HSP70-2</i> +1267	42
<i>HSP70-HOM</i> +2437	42
Tipificación del polimorfismo	42
<i>MICA</i>	42
<i>TNF</i> y <i>HSP70</i>	48
Análisis estadístico	51
RESULTADOS	52
<i>H. pylori</i> y CagA	52
Polimorfismos genéticos	53
<i>MICA</i>	54
Microsatélites GCT de <i>MICA</i>	54
Alelos de <i>MICA</i>	56
<i>TNF-α</i> SNP -308 (G \rightarrow A)	58
<i>TNF-β</i> +252 SNP +252 (A \rightarrow G)	60
<i>HSP70-1</i> SNP +190 (G \rightarrow C)	62
<i>HSP70-2</i> SNP +1267 (A \rightarrow G)	64
<i>HSP70-HOM</i> SNP +2437 (T \rightarrow C)	65
Haplotipos	66
Haplotipos de <i>TNF</i>	66

Haplotipos de <i>HSP70</i>	66
Haplotipos de <i>TNF</i> y <i>HSP70</i>	66
Combinaciones de genotipos de <i>MICA</i> , <i>TNF</i> y <i>HSP70</i>	67
Metaplasias completa e incompleta	70
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	71
CONCLUSIONES	80
REFERENCIAS	81

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Electromicrografía de transmisión de <i>H. pylori</i>	3
Figura 2. Progresión natural de la infección por <i>H. pylori</i>	9
Figura 3. Gastritis crónica no atrófica producida por la infección de <i>H. pylori</i>	11
Figura 4. Gastritis crónica atrófica producida por la infección de <i>H. pylori</i>	12
Figura 5. Gastritis crónica atrófica con metaplasia intestinal completa	14
Figura 6. Tinción Alción/HID positivas para sialomucinas (azul) en células	15
Figura 7. Displasia gástrica de bajo grado.	16
Figura 8. Cáncer gástrico asociado a la infección de <i>Helicobacter pylori</i>	19
Figura 9. Endoscopia que muestra una úlcera duodenal asociada a la infección de <i>Helicobacter pylori</i>	21
Figura 10. Mapa genético del Complejo Principal de Histocompatibilidad Humano	26
Figura 11. Gene <i>MICA</i>	31
Figura 12. Genes de <i>TNF</i> .	32
Figura 13. Genes de <i>HSP70</i>	33
Tabla 1. Secuencias de los iniciadores específicos para la amplificación por PCR de los polimorfismos	40
Figura 14. Técnica de RSCA para la tipificación del polimorfismo de <i>MICA</i> .	45
Figura 15. Tipificación de <i>MICA</i> por RSCA	46
Figura 15 (cont.). Tipificación de <i>MICA</i> por RSCA.	47
Tabla 2. Patrones de restricción de los alelos en los SNPs de <i>TNF</i> y <i>HSP70</i>	48
Figura 16. Geles de RFLP de los SNPs de <i>TNF</i> y <i>HSP70</i>	49
Figura 16 (cont). Geles de RFLP de los SNPs de <i>TNF</i> y <i>HSP70</i>	50
Tabla 3. Características de los grupos estudiados	52
Tabla 4. Número de muestras tipificadas	53
Tabla 5. Frecuencias de los microsatélites GCT de <i>MICA</i>	54
Tabla 6. Frecuencias genotípicas de los microsatélites GCT de <i>MICA</i>	55
Tabla 7. Frecuencias (%) de los alelos de <i>MICA</i>	56
Tabla 8. Frecuencias (%) de los principales genotipos de <i>MICA</i>	57
Tabla 9. Frecuencias (%) de los alelos y genotipos de <i>TNF-α</i> -308	58
Tabla 10. Frecuencias (%) de los alelos de <i>TNF-β</i> +252	60
Tabla 11. Frecuencias (%) de los genotipos de <i>TNF-β</i> +252	61
Tabla 12. Frecuencias (%) de alelos de <i>HSP70-1</i> +190	62
Tabla 13 Frecuencias (%) de genotipos de <i>HSP70-1</i> +190	63
Tabla 14. Frecuencias (%) de alelos y genotipos de <i>HSP70-2</i> +1267	64
Tabla 15. Frecuencias (%) de alelos y genotipos de <i>HSP70-HOM</i> +2437	65
Tabla 16. Frecuencias de las combinaciones de genotipos de los SNPs de <i>TNF</i> en pacientes...	67
Tabla 17. Frecuencias de las combinaciones de genotipos de los SNPs de <i>HSP70</i> en pacientes...	68

Tabla 18. Frecuencias de las combinaciones de genotipos de MICA, <i>TNF</i> y <i>HSP70</i> en pacientes...	69
Tabla 19. Frecuencias (%) de los genotipos de <i>TNF</i> y <i>HSP70</i> en metaplasias completa e incompleta	70

RESUMEN

La colonización de la mucosa gástrica por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es una de las principales causas de gastritis crónica y predispone al desarrollo de úlcera péptica y cáncer gástrico. Alrededor del 80% de los mexicanos adultos son positivos a la infección por *H. pylori*, pero solo cerca del 15% desarrollará una enfermedad gastroduodenal. Por lo tanto, otros factores como la inmunogenética del hospedero están involucrados en la aparición de estas lesiones. El gene A relacionado con la cadena de clase I del MHC (MICA), el factor de necrosis tumoral (TNF) y las proteínas de choque térmico 70 (HSP70) son importantes participantes de la respuesta inmuno-inflamatoria a *H. pylori* en el estómago, y los genes que codifican estas moléculas son polimórficos. Tal polimorfismo puede influenciar su actividad, y ha sido asociado con susceptibilidad a enfermedades (infección y transformación). En este trabajo se analizó las asociaciones del polimorfismo alélico y de microsatélites de MICA (exones 2 al 5), y de los polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP) de *TNF- α* -308 (G/A), *TNF- β* +252 (A/G), *HSP70-1* +190 (G/C), *HSP70-2* +1267 y *HSP70-HOM* +2437 (C/T) con la susceptibilidad a las lesiones gastroduodenales relacionadas a la infección por *H. pylori* en pacientes Mestizos mexicanos. Se tipificó el polimorfismo de MICA por análisis conformacional mediante una cadena de referencia (RSCA) y los SNPs de *TNF* y *HSP70* por longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Las frecuencias de los polimorfismos fueron comparadas de forma estadística entre 345 pacientes positivos a *H. pylori*, diagnosticados mediante endoscopia e histología (gastritis no atrófica=172, metaplasia intestinal=80, cáncer gástrico=42 y úlcera duodenal=51) y 106 individuos seropositivos a *H. pylori*, asintomáticos, sin lesiones gastroduodenales. No se encontraron asociaciones del polimorfismo de MICA, *HSP70-2* y *HSP70-HOM* con susceptibilidad a estas lesiones. Sin embargo, en *TNF- α* -308 se observó susceptibilidad producida por el genotipo G/A al desarrollo de metaplasia intestinal (RM=2.44), metaplasia colónica incompleta (RM=4.59), cáncer gástrico (RM=10.07) y úlcera duodenal (RM=21.82). También se descubrió una importante asociación de susceptibilidad del alelo A (RM=5.69) y de protección del genotipo G/G (RM=0.09) de *TNF- β* +252 en cáncer gástrico. Finalmente, en *HSP70-1* +190, se encontró una fuerte asociación del genotipo G/C con susceptibilidad hacia metaplasia intestinal (RM=3.45), metaplasia colónica incompleta (RM=2.67), cáncer gástrico (RM=13.31) y úlcera duodenal (RM=16.19). Estos resultados aportan evidencia de que los SNPs de *TNF* y *HSP70* son factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades gastroduodenales asociadas a la infección por *H. pylori* en población mexicana.

RESUMEN EN INGLÉS (ABSTRACT)

Helicobacter pylori (*H. pylori*) colonization of the gastric mucosa is a major cause for chronic gastritis and predisposition for peptic ulcer and gastric cancer. Over 80% of adult people are positive to *H. pylori* infection in Mexico, but only about 15% of them will develop a gastroduodenal disease. Therefore, other factors like host immunogenetics, are involved in the emergence of these lesions. MHC class I chain related gene A (MICA), Tumour Necrosis Factor (TNF) and Heat Shock Protein 70 (HSP70) are important participants in the immunoinflammatory response to *H. pylori* in the stomach, and the genes coding this molecules are polymorphic. Such polymorphism may influence their activity, and has been associated with disease susceptibility (infection and transformation). In this work, we analyze the associations of *MICA* allelic and microsatellite polymorphism (exons 2 to 5), and the Single Nucleotide Polymorphism (SNP) of *TNF- α* -308 (G/A), *TNF- β* +252 (A/G), *HSP70-1* +190 (G/C), *HSP70-2* +1267 and *HSP70-HOM* +2437 (C/T) with the susceptibility to gastroduodenal lesions related to *H. pylori* infection in Mexican Mestizo patients. We genotyped *MICA* polymorphism by Reference Strand Conformation Analysis (RSCA) and SNPs of *TNF* and *HSP70* by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). We statistically compared polymorphism frequencies between 345 *H. pylori*-positive patients diagnosed by endoscopy and histology (non-atrophic gastritis=172, intestinal metaplasia=80, gastric cancer=42 and duodenal ulcer=51), and 106 *H. pylori* seropositive asymptomatic people without gastroduodenal lesions. We didn't find associations between *MICA*, *HSP70-2* and *HSP70-HOM* polymorphism with susceptibility to these diseases. However, in *TNF- α* -308 we observed susceptibility produced by genotype G/A to the development of intestinal metaplasia (OR=2.44), incomplete colonic metaplasia (OR=4.59), gastric cancer (OR=10.07) and duodenal ulcer (OR=21.82). We also discovered an important association of susceptibility of allele A (OR=5.69) and protection of the genotype G/G (OR=0.09) of *TNF- β* +252 with gastric cancer. Finally, in *HSP70-1* +190, we found a strong association of genotype G/C with susceptibility to intestinal metaplasia (OR=3.45), incomplete colonic metaplasia (OR=2.67), gastric cancer (OR=13.31) and duodenal ulcer (OR=16.19). These results give evidence for *TNF* and *HSP70* SNPs as risk factors to the development of gastroduodenal diseases associated to *H. pylori* infection in Mexican population.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori

El género *Helicobacter* fue formalmente propuesto en 1989 (Goodwin *et al.* 1989) y actualmente existe un total de veinte especies registradas (*i. e.* *H. canis*, *H. felis*, *H. acinonychis*, *H. mustelae*, *H. heilmannii*, etc). Las especies del género *Helicobacter* se han agrupado como organismos gástricos o entéricos (enterohepáticos) dependiendo del sitio de colonización (Achtman y Suerbaum 2001).

Los organismos gástricos en humanos han sido descritos por más de 100 años (Jaworski 1889). Sin embargo, no fue sino hasta 1982 que dos médicos australianos, Robin Warren y Barry Marshall, identificaron al bacilo gramnegativo, de 3 x 0.5 μm , espiralado y flagelado, ahora nombrado *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), adyacente al epitelio gástrico de pacientes con gastritis crónica (Marshall y Warren 1984) (**Figura 1**).

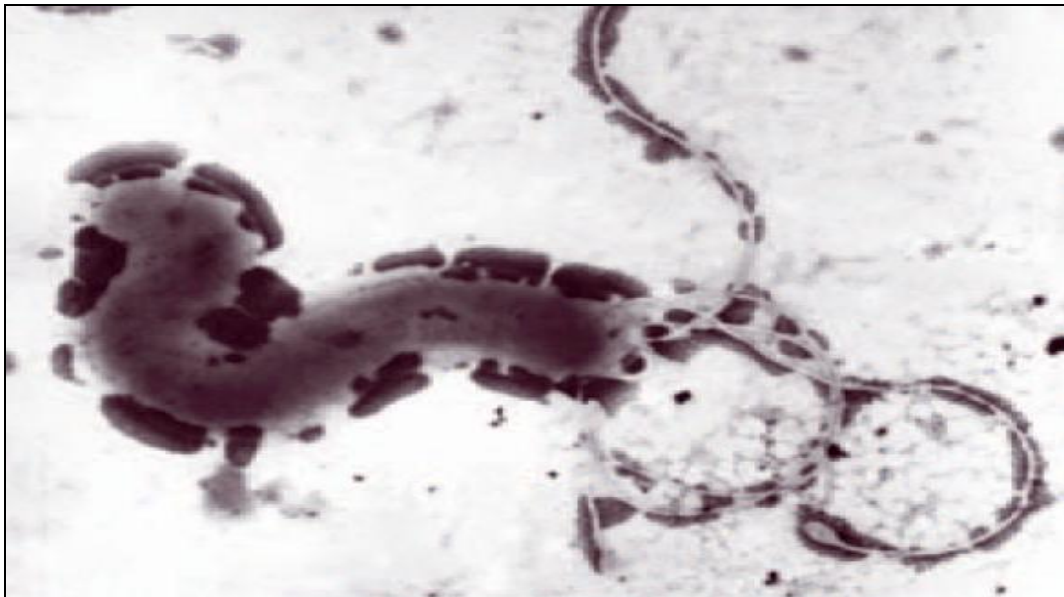


Figura 1. Electromicrografía de transmisión de *H. pylori* (Tomada de Suerbaum y Josenhans 2007).

Una característica clave de *H. pylori* es su microaerofilicidad, con un crecimiento óptimo en niveles de O₂ de 2 a 5% y la necesidad de alta humedad y un 5 a 10% de CO₂ (Kusters *et al.* 2006). *H. pylori* es ureasa, catalasa y oxidasa positiva, características que a menudo son usadas para la identificación de esta bacteria (Kusters *et al.* 2006).

EPIDEMIOLOGÍA

H. pylori está altamente adaptada al estómago humano donde ha vivido por miles de años, como se demuestra por las asociaciones geográficas de sus genotipos (Kersulyte *et al.* 2000), y los flujos migratorios humanos (Falush *et al.* 2003). De hecho se estima que *H. pylori* ha infectado a los humanos desde antes de las principales migraciones del *Homo sapiens* fuera de África hace unos 50,000 a 100,000 años (Covacci *et al.* 1999).

Debido a los genotipos Europeos aislados inicialmente de pacientes latinoamericanos, se creía que *H. pylori* había llegado al continente Americano a través de los colonos Europeos hace unos 500 años (Kersulyte *et al.* 2000). Sin embargo, hay evidencia de la presencia de genotipos *H. pylori* del este Asiático en poblaciones Amerindias, lo que indicaría que *H. pylori* habría arribado a América hace unos 11,000 años junto con los grupos humanos que atravesaron el estrecho de Behring (Ghose *et al.* 2002). Se han descrito momias precolombinas con *H. pylori*. En la región Andina de Sudamérica, se hallaron muestras fecales positivas a antígenos de *H. pylori* de unos 3,000 años de antigüedad (Allison *et al.* 1999). Sin embargo, la evidencia más antigua de *H. pylori* en tejido gástrico en poblaciones Latinoamericanas fue reportada recientemente por Castillo-Rojas y colaboradores (2008) en un estudio en el cual se encontraron secuencias de DNA de *H. pylori* en una momia Tarahumara del desierto de Chihuahua correspondiente aproximadamente al año 1350.

H. pylori produce la infección bacteriana crónica más común en humanos (Moss y Sood, 2003). Esta bacteria coloniza el estómago por años, décadas, o de por vida, no por días o semanas como es usualmente el caso de bacterias patógenas. La seroprevalencia mundial de *H. pylori* fluctúa entre 20-80%, con una media de 50% (Torres *et al.* 1998a, Pérez-Pérez *et al.* 2004). La infección está asociada estrechamente con las condiciones socioeconómicas, con una prevalencia promedio de 80% en países en desarrollo comparada con un 20-50% en el mundo industrializado (Suerbaum y Michetti, 2002). En México la infección por *H. pylori* estimada por serología ocurre en el 80% de los adultos, siendo además de adquisición relativamente temprana (Mitchell 1993, Torres *et al.* 2000).

El modo de transmisión no está completamente claro. Las hipótesis más aceptadas son que el organismo se transmite directamente de persona a persona entre la familia durante la infancia (Malaty *et al.* 2002), por heces (fecal-oral), por contenido gástrico (gástrico-oral), a través de fuentes de agua (Brown *et al.* 2002) o por equipo de endoscopía mal aseado (Covacci *et al.* 1999). También se ha documentado que infecta de manera natural a otros mamíferos, como gatos (Fox *et al.* 1995) y primates no humanos (Handt *et al.* 1997), y se ha reportado la infección experimental de ratones de laboratorio.

La infección con *H. pylori* puede ser diagnosticada mediante métodos invasivos a través de una biopsia por endoscopía (prueba rápida de urea, examen histológico, cultivo o PCR) o mediante métodos no invasivos (serología, prueba de aliento o la detección de antígenos de *H. pylori* en heces) (Monteiro *et al.* 2001).

El principal tratamiento contra *H. pylori* son las terapias triples en las que se emplean dos antibióticos con compuestos de bismuto o inhibidores de bombas de protones. Las drogas más usadas son tetraciclina, amoxicilina, imidazoles (metronidazol, tinidazol), y macrolidos (claritromicina, azitromicina) (Megraud y Lamouliatte 2003). Estas combinaciones tienen tasas de erradicación de *H. pylori* de alrededor del 80%.

FACTORES DE VIRULENCIA

H. pylori ocupa un nicho único, coloniza el estómago humano en condiciones de microaerofilia y en un ambiente extremadamente ácido, por lo que ha desarrollado una serie de adaptaciones para desarrollarse en este medio. Esta bacteria produce ureasa la cual cataliza la hidrólisis de urea en amoníaco y dióxido de carbono incrementando el pH localmente, lo que le permite colonizar la mucosa gástrica. Como algunas otras bacterias de este género, *H. pylori* posee actividades de catalasa, oxidasa, γ -glutamyl-transpeptidasa y reductoras de nitrógeno. Además, puede utilizar el hidrógeno molecular como fuente de energía, de manera que su crecimiento depende en cierta medida del hidrógeno excretado por bacterias intestinales difundido hasta el estómago (Olson y Maier 2002). Otra enzima, la endonucleasa III (esencial para la reparación de bases pirimídicas oxidadas), es requerida para una exitosa colonización de la bacteria, quizá mediante un efecto de protección contra el estrés oxidativo en la reacción inflamatoria contra *H. pylori* (O'Rourke *et al.* 2003).

A pesar de que la infección por *H. pylori* casi siempre resulta en gastritis crónica activa, la mayoría de los individuos infectados no desarrollan ninguna complicación y no presentan síntomas de la infección (Blaser y Atherton 2004). Esto lleva a la noción de que algunas cepas son más virulentas que otras. Una característica importante de la virulencia de *H. pylori* es que aproximadamente el 60% de sus cepas producen proteínas codificadas por genes localizados en

una isla de patogenicidad conocida como PAI *cag*, de un tamaño aproximado de 40 kb, con alrededor de 18 genes relacionados al complejo de secreción tipo IV y varios genes de virulencia (Atherton 1997).

Las características de la isla PAI *cag* son las siguientes: i) su contenido de G+C es del 35% comparado con el 39% del resto del genoma; ii) contiene genes de virulencia y genes que codifican proteínas del sistema de secreción tipo IV; iii) presenta una o dos secuencias de inserción (IS605 e IS606) en algunas cepas; iv) está flanqueada por secuencias repetidas directas que participan en su integración en el genoma bacteriano (Ge y Taylor 1999). La PAI *cag* puede estar organizada de forma diferente dependiendo de la cepa que se estudie. La isla puede estar continua en una misma región o estar dividida en dos regiones *cag* I y *cag* II por secuencias IS605 e IS606 o por secuencias del genoma bacteriano (Kersulyte *et al.* 2000).

El principal factor de virulencia ubicado en la PAI *cag* es el gene A asociado a la citotoxina (*cagA*). Este gene codifica una proteína altamente inmunogénica de aproximadamente 140 kDa llamada proteína asociada a la citotoxina (CagA) (Covacci *et al.* 1993). Después de la adhesión de *H. pylori* al epitelio, las proteínas del sistema de secreción tipo IV translocan a CagA (Backert *et al.* 2000). Una vez dentro de la célula epitelial, CagA es fosforilada en residuos de tirosina específicos (EPIYA) por miembros de la familia de las cinasas Src (Odenbreit *et al.* 2000; Stein *et al.* 2000; Selbach *et al.* 2002). La CagA fosforilada activa a la fosfatasa eucariótica SHP-2 así como a ERK, un miembro de la familia de las MAPK, provocando cambios morfológicos y proliferación celular (Higashi *et al.* 2004).

Las cepas que llevan la PAI *cag* son conocidas como CagA⁺. Los pacientes infectados con cepas CagA⁺ usualmente tienen una respuesta inflamatoria más intensa (Peek *et al.* 1995) y están significativamente en mayor riesgo de desarrollar úlcera péptica, gastritis atrófica y cáncer gástrico en poblaciones occidentales (Blaser y Crabtree 1996). Sin embargo, debido a que esta susceptibilidad no se observa en poblaciones orientales (Hamlet *et al.* 1999), a que se han observado cepas sin PAI *cag* en pacientes con úlcera péptica y cáncer gástrico, y a que una proporción significativa (10%) de las cepas CagA⁺ tienen una PAI *cag* incompleta (Maeda *et al.* 1999), es evidente que existen otros factores que influyen en el desarrollo de estas patologías.

Una consecuencia independiente del contacto epitelial mediado por *cag* es la inducción de la quimiocina IL-8. Muchos genes de la PAI *cag* (*cagE*, *cagG*, *cagH*, *cagI*, *cagL*, *cagM*, *virB9*, *virB10* y *virB11*), excepto *cagA* son requeridos para la activación de la producción de IL-8 a través de NF-κB (Crabtree *et al.* 1995, Fischer *et al.* 2001). El producto translocado por el sistema de secreción tipo IV que activa a NF-κB no está bien definido, sin embargo, se ha descubierto que *H. pylori* también transloca peptidoglicana, la cual es reconocida por Nod1 en el citoplasma, lo que puede activar a NF-κB para la inducción de IL-8 y otros genes pro-inflamatorios (Vial *et al.* 2004).

H. pylori Y ENFERMEDADES GASTRODUODENALES

La colonización de *H. pylori* no es una enfermedad en sí misma, sino una condición que aumenta el riesgo relativo de desarrollar varios desórdenes clínicos del tracto gastrointestinal alto. Cada año al menos 7 millones de casos de enfermedades gastroduodenales asociadas a *H. pylori* se presentan mundialmente, resultando en cientos de miles de muertes (Parsonnet 1998).

La historia natural de la infección por *H. pylori* en humanos ha sido bien documentada. La colonización por *H. pylori* virtualmente siempre produce la infiltración de células mononucleares y neutrófilos en la mucosa gástrica del antro y del cuerpo. La infección por *H. pylori* causa un síndrome característico de gastritis aguda que persiste unas pocas semanas. Más del 80% de los pacientes desarrollan una infección crónica que causa una gastritis crónica activa. Esta infección generalmente perdura toda la vida, con bajas tasas de pérdida de la infección. La mayoría de estos individuos son asintomáticos, lo que permite que la bacteria persista en el hospedero. Alrededor del 10-20% desarrollarán una úlcera péptica, del 1-2% un cáncer gástrico (De Koster *et al.* 1994, Go 1997, Cats *et al.* 1998, Kuipers 1998 y 1999, Ernst y Gold 2000) y menos del 1% un linfoma tipo MALT de estómago (Taupin *et al.* 1999) (Figura 2). El desarrollo de la infección depende de una variedad de factores bacterianos, del hospedero y ambientales que determinan el patrón y severidad de la gastritis.

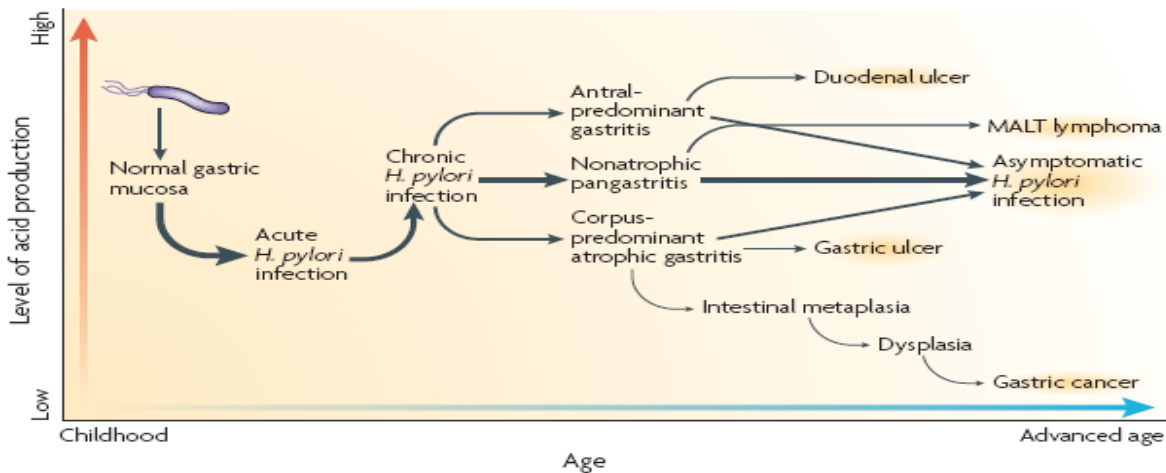


Figura 2. Progresión natural de la infección por *H. pylori* (Tomada de Suerbaum y Josenhans 2007).

El resultado final de la infección por *H. pylori* dependerá, entre otros factores, de la zona de infección, el nivel de producción de ácido gástrico y el tiempo de persistencia de la infección.

Gastritis Aguda

Los datos sobre la fase aguda de la infección son escasos, y en su mayoría proceden de reportes de personas que deliberadamente o por accidente ingirieron *H. pylori* o se expusieron a procedimientos con material contaminado. En un estudio realizado con voluntarios sanos infectados con *H. pylori* (Graham *et al.* 2004), se reportó que la fase aguda de la colonización puede asociarse con síntomas dispépticos como sensación de llenado, náusea y vómito, y con una considerable inflamación de la mucosa estomacal tanto proximal como distal o pangastritis. Esta fase a menudo está asociada con hipocloridria, que puede durar meses.

Gastritis Crónica No Atrófica

Cuando la colonización se vuelve persistente, se presenta una inflamación crónica de la mucosa gástrica. La mucosa gástrica normal contiene sólo células inflamatorias (células mononucleares) individuales y dispersas en la lámina propia, por lo que cualquier aumento en estas células indica una gastritis crónica (Dixon *et al.* 1996). En la gastritis crónica no atrófica provocada por *H. pylori* hay una infiltración de linfocitos de la mucosa y submucosa, células plasmáticas, monocitos, células cebadas, neutrófilos y eosinófilos acompañadas por defectos epiteliales sobresalientes que incluyen dilatación glandular y mineralización (Dixon *et al.* 1996, Fox y Wang 2007) (**Figura 3**).

Existe una estrecha correlación entre el nivel de la secreción de ácido y la distribución de la gastritis. Ésta es resultante de los efectos contrarios del ácido en el crecimiento bacteriano y de las consecuencias que la inflamación provoca en la regulación de la secreción de ácido. En sujetos con una secreción de ácido intacta, *H. pylori* coloniza en particular el antro gástrico, donde están presentes pocas células parietales. Este patrón de colonización está asociado con una gastritis predominante en el antro (Kusters *et al.* 2006). Mientras que en personas en las que la

secreción de ácido está disminuida, se observa una distribución más homogénea de la bacteria en cuerpo y antro, y las bacterias en el cuerpo están en contacto estrecho con la mucosa produciendo una pangastritis predominante en el cuerpo (Kuipers *et al.* 1995). La gastritis crónica es un precursor remoto del cáncer gástrico y podría ser mejor clasificado como una condición de predisposición.

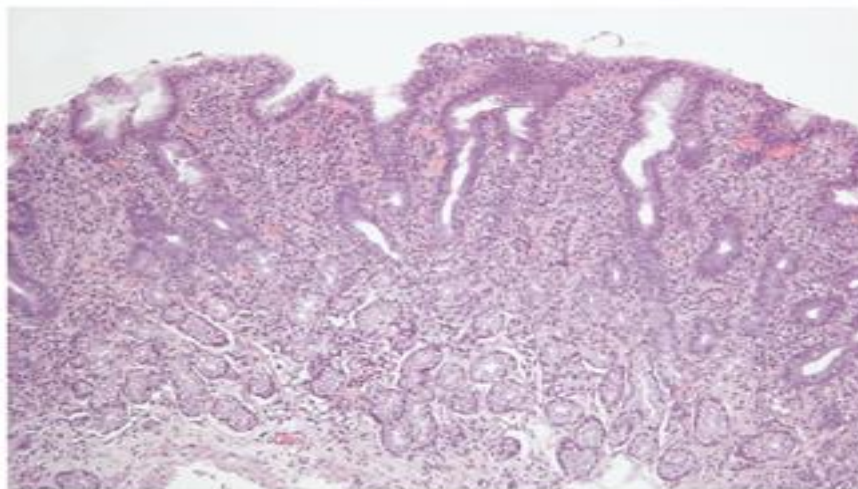


Figura 3. Gastritis crónica no atrófica producida por la infección de *H. pylori*.

Mucosa gástrica antral con infiltración leucocítica mononuclear y glándulas bien preservadas (Tomada de Correa y Houghton 2007).

Gastritis Crónica Atrófica

La gastritis atrófica es definida como una pérdida de las estructuras glandulares de la mucosa del estómago, acompañada de inflamación crónica con fibrosis local y pérdida completa de células parietales (Fox y Wang, 2007). La atrofia focal de las glándulas comienza en la unión entre el cuerpo y el antro, especialmente en la incisura angularis. El mecanismo de pérdida celular parece estar directamente relacionado a los efectos de los productos bacterianos y a las citocinas del medio dentro de la mucosa gástrica. Con el tiempo, un tejido fibroso reemplaza los huecos dejados por las glándulas perdidas (Correa y Houghton 2007) (**Figura 4**). La pérdida de la

comunicación célula-célula y la introducción de tejido fibroso estromal orquestan el influjo de células progenitoras de la sangre responsables de los subsecuentes cambios tisulares que conducen al cáncer.

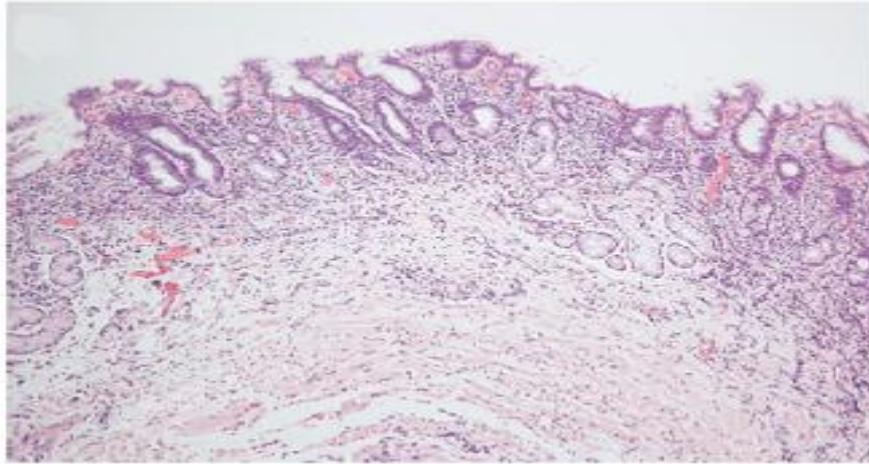


Figura 4. Gastritis crónica atrófica producida por la infección de *H. pylori*.

Las glándulas antrales han desaparecido del centro del campo y son reemplazadas por tejido fibroso. También se observa un infiltrado leucocítico mononuclear difuso en la lámina propia (Tomada de Correa y Houghton 2007).

Metaplasia Intestinal

Es una metaplasia del epitelio gástrico hacia un fenotipo intestinal caracterizado por elongación columnar, que ocasionalmente forman células caliciformes, y producción de una mezcla de mucinas acídicas (azul, tipo intestinal) y neutras (roja, tipo gástrico) cuando se hace una tinción con Azul Alcian/PAS (Fox y Wang, 2007). Las células metaplásticas intestinales en las fases iniciales se parecen a la mucosa del intestino delgado, con enterocitos absorbentes eosinofílicos con un borde en forma de cepillo bien desarrollado compuesto de miles de microvellosidades. Alternando con estas células a intervalos regulares, se encuentran células caliciformes llenas de mucina (**Figura 5A**). Este tipo de metaplasia ha recibido varios nombres: tipo intestino delgado,

basado en su estructura morfológica; tipo I, basado en la histoquímica de mucinas; y completa, reflejando el hecho de que secreta el grupo normal de enzimas digestivas tales como sucrasa, trealasa y fosfatasa alcalina (Matsukura *et al.* 1980).

En etapas tardías, las células metaplásticas pierden el fenotipo de intestino delgado, adquieren características morfológicas de intestino grueso, y están compuestas sólo por células caliciformes de diferentes tamaños y formas (**Figura 5B**). Este tipo es llamado metaplasia colónica o incompleta e incluyen los tipos II y III (Dixon *et al.* 1996).

Las tinciones inmunohistoquímicas de mucinas muestran que la metaplasia completa expresa el tipo intestinal de mucinas ácidas, que se tiñen con azul Alción a pH 2.5, y son negativas para sulfomucinas con una tinción con diamina alta en hierro (HID) (**Figura 6A**). La tinción de mucinas en metaplasia incompleta muestra mucinas sulfatadas HID positivas (**Figura 6B**) (Piazuelo *et al.* 2004).

La mucina intestinal MUC2, ausente en la mucosa gástrica normal, es positiva en células caliciformes tanto en la metaplasia intestinal completa como en la incompleta. MUC 5AC y MUC6 son mucinas típicas de la mucosa gástrica. MUC5AC está ausente en la metaplasia intestinal completa y presente en la incompleta (**Figura 6C**). MUC6 está ausente en ambos tipos de metaplasia intestinal. El marcador Das-1, típico de intestino grueso, es positivo en metaplasia intestinal incompleta (Piazuelo *et al.* 2004) (**Figura 6D**).

En la metaplasia incompleta, hay una mayor cantidad de células apoptóticas que en la completa, indicando que aparecen más frecuentemente células con DNA dañado en la primera, y que presumiblemente son más frecuentemente eliminadas por apoptosis para evitar la transformación celular (Hua-Xiang *et al.* 2001). Esto es consistente con las observaciones de que la metaplasia

colónica incompleta tiene una relación más cercana con el cáncer gástrico, que la completa (Matzukara *et al.* 1980)

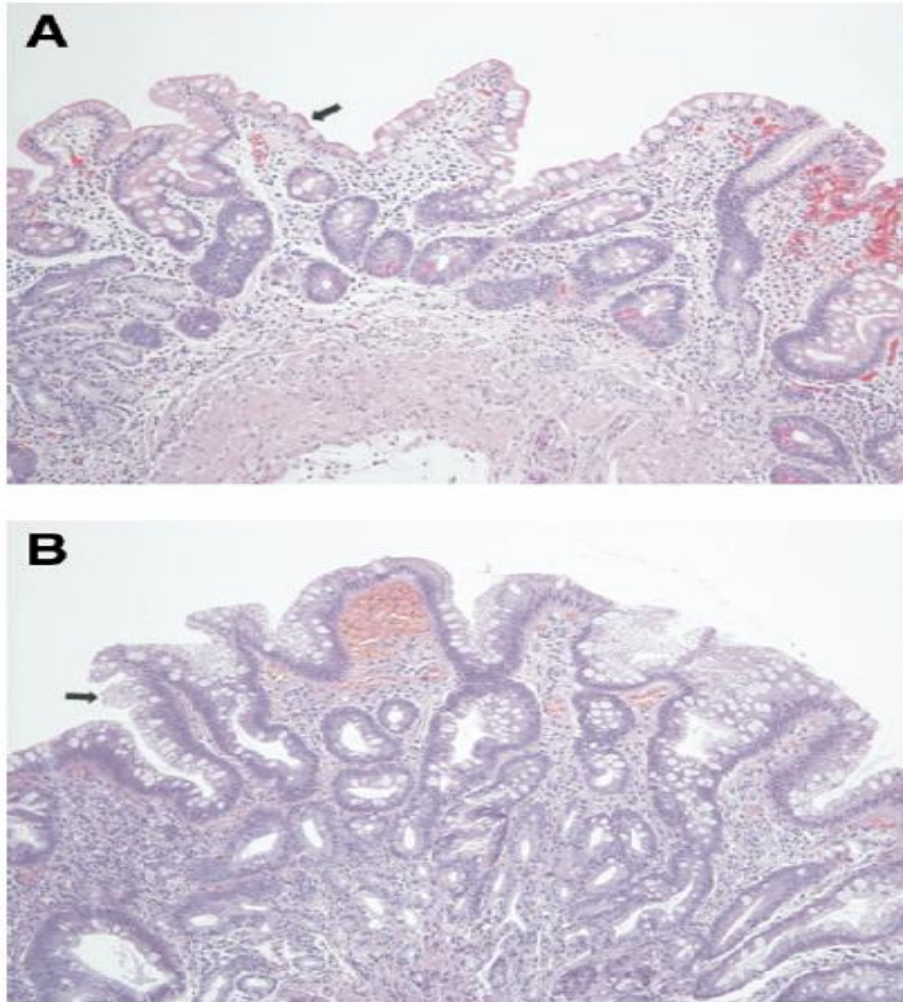


Figura 5. (A) Gastritis crónica atrófica con metaplasia intestinal completa.

La flecha señala los enterocitos absorbentes con borde en cepillo. (B) Gastritis crónica atrófica con metaplasia intestinal incompleta. La flecha indica células caliciformes con varias vacuolas irregulares y sin borde en cepillo. (Tomada de Correa y Houghton 2007).

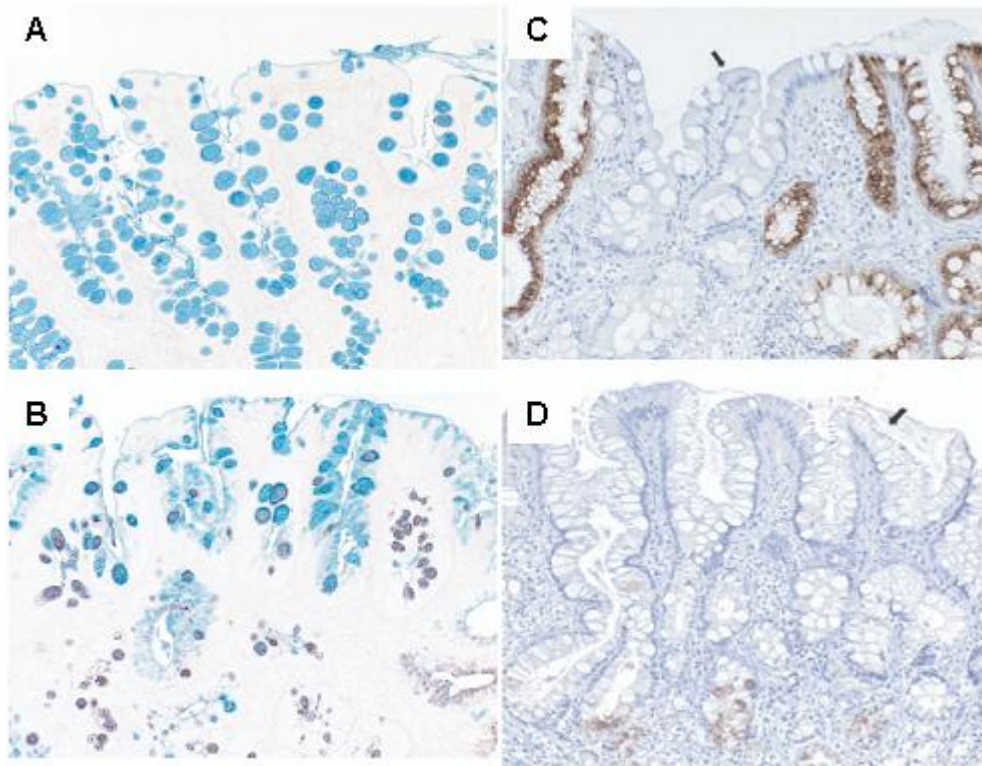


Figura 6. (A) Tinción Alción/HID positivas para sialomucinas (azul) en células caliciformes en metaplasia intestinal completa. (B) Además de sialomucinas, la metaplasia intestinal incompleta muestra sulfomucinas (café) en células caliciformes y columnares. (C) MUC5AC en una metaplasia intestinal combinada entre completa (centro) e incompleta (periferia). MUC5AC es positiva en la metaplasia intestinal incompleta. (D) Metaplasia intestinal incompleta positiva a Das-1 (Tomada de Correa y Houghton 2007).

Displasia Gástrica

La displasia está caracterizada por cambios atípicos en la morfología nuclear y arquitectura tisular. Los núcleos del epitelio displásico son agrandados, hipercromáticos, de forma irregular y carecen de polaridad. La arquitectura es irregular, frecuentemente formada por estructuras tubulares compactadas llamadas adenomas. Los cambios atípicos se presentan tanto en la

superficie del epitelio como al interior de las glándulas (**Figura 7**). Las displasias están clasificadas como de bajo y alto grado dependiendo del grado de atípia nuclear y distorsión de la arquitectura. Todas las células atípicas están confinadas dentro de la estructura tubular. Si atraviesan la membrana basal, se convierten en carcinomas invasivos. Hay en general un consenso de que el epitelio displásico es neoplásico, por lo tanto, la displasia también es conocida como neoplasia intraepitelial (Rugge *et al.* 2000, Fox y Wang, 2007).

Hasta un 50% de todos los individuos infectados con *H. pylori* progresarán hacia algún tipo de cambio histológico en una secuencia preneoplásica (Correa, 1992). La progresión de displasia a carcinoma invasivo se ha reportado en el 60 al 85% de los casos (Hamilton y Aaltonen 2000, de Vries *et al.* 2007).

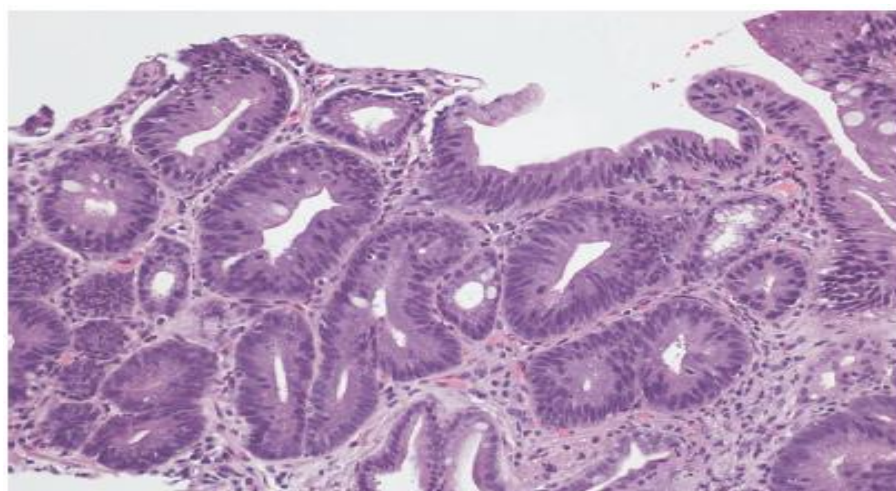


Figura 7. Displasia gástrica de bajo grado. La presencia de glándulas irregulares cubiertas de células epiteliales con núcleos agrandados, hiper cromáticos y mitosis frecuentes (Tomada de Correa y Houghton 2007).

Cáncer Gástrico

En el mundo, el cáncer gástrico es el cuarto tipo más común de cáncer, sólo precedido por los cánceres de pulmón, mama y de colón-recto. En el año 2000 se diagnosticaron alrededor de 880,000 personas con cáncer gástrico y aproximadamente 650,000 murieron por la enfermedad (Parkin *et al.* 2001, Parkin 2004, Brenner *et al.* 2009). La incidencia de cáncer gástrico en el mundo varía ampliamente. Casi dos tercios de cánceres de estómago se presentan en países en desarrollo (Parkin 2004). Japón y Corea tienen las tasas más altas de cáncer gástrico en el mundo (Ahn *et al.* 1991, Yamamoto 2001). En Latinoamérica y Asia, el cáncer gástrico es el cáncer más común en los hombres y ocupa el segundo lugar entre las mujeres (Guarner *et al.* 1993, Mitchell *et al.* 1993, De Koster *et al.* 1994). Alrededor de un millón de nuevos casos fueron diagnosticados en 2008 a nivel mundial. Más del 70% de los casos ocurrieron en países en desarrollo y la mitad del total mundial se presentaron en el Este Asiático (principalmente China) (GLOBOCAN 2008 (IARC), Section of Cancer Information, <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/stomach.asp>).

Durante los últimos 70 años las tasas de mortalidad por cáncer gástrico han bajado dramáticamente en los países desarrollados. Sin embargo, sigue siendo una enfermedad con un mal pronóstico y una alta mortalidad, representando la decimocuarta causa de muerte a escala mundial (Murray y López 1997) y se estima que se convierta en la causa número 8 para el año 2010 (Covacci *et al.* 1999). Mientras que respecto a la mortalidad por neoplasias en el mundo, el cáncer gástrico es la segunda causa de muerte por cáncer (737 000 muertes, 9.7% del total), solo abajo del cáncer de pulmón (Verdechia *et al.* 2004, Brenner *et al.* 2009). Las tasas más altas de mortalidad se encuentran en el Este Asiático (28.1 per 100,000 in men, 13.0 per 100,000 in women) y las más bajas en Norteamérica (2.8 and 1.5 respectively). En Centro y Sudamérica se

presentan altas tasas de mortalidad (GLOBOCAN 2008 (IARC), Section of Cancer Information, <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/stomach.asp>).

En México hay zonas que difieren en riesgo de cáncer gástrico. En el Estado de México el riesgo es de 2.5/100,000 habitantes (bajo), en Chiapas es de 6.4/100,000 habitantes (alto) y en el D. F. de 4.5/100,000 habitantes (medio) (Torres *et al.* 1998b). En nuestro país el cáncer es la segunda causa de muerte y el gástrico ocupa el quinto lugar entre las neoplasias malignas (Secretaría de Salud 1999). En 2008, se presentó una incidencia de 9.4 casos por cada 100,000 hombres (4327 casos) y 6.7 casos por cada 100,000 mujeres (3532 casos). Asimismo, tuvo una mortalidad de 7.9 muertes por cada 100,000 hombres (3641 muertes) y 5.8 muertes por cada 100,000 mujeres (3110 muertes) (GLOBOCAN 2008 (IARC), Section of Cancer Information, <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/stomach.asp>).

Alrededor del 90% de los cánceres de estómago son adenocarcinomas, los cuales se subdividen en dos tipos histológicos principales: el tipo intestinal y el tipo difuso. El tipo intestinal está relacionado con una gastritis predominante en el *corpus* con una atrofia gástrica y una metaplasia intestinal, mientras que el tipo difuso usualmente se origina en una pangastritis sin atrofia (Crew y Neugut 2006) (**Figura 8**).

El tipo intestinal es más común en hombres, negros y personas de edad avanzada, mientras que el tipo difuso tiene una incidencia similar entre hombres y mujeres y es más frecuente en individuos jóvenes (Lauren 1965, Correa *et al.* 1973). El tipo intestinal predomina en áreas de alto riesgo tales como el Este Asiático, el Este de Europa, Centro y Sudamérica; en cambio el tipo difuso tiene una distribución geográfica más homogénea (Muñoz *et al.* 1968).

El cáncer gástrico es una enfermedad multifactorial. Su amplia variación geográfica, el cambio de su incidencia a través de los años sugieren que factores ambientales o de estilo de vida son contribuyentes principales en la etiología de esta enfermedad. Se ha relacionado con factores ambientales (nivel socioeconómico, hábitos higiénicos y alimenticios), infecciosos (*Helicobacter pylori*) y del hospedero (mutaciones y polimorfismos genéticos) (Akhter *et al.* 2007).

La infección persistente de la mucosa gástrica por *H. pylori* es uno de los principales factores etiológicos del cáncer gástrico (Kuipers 1999), sin embargo, menos del 2% de los infectados desarrollarán cáncer gástrico (Go 1997, Cats *et al.* 1998, Kuipers 1999). En 1994, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) designó a *H. pylori* como un carcinógeno humano (IARC WHO 1997).

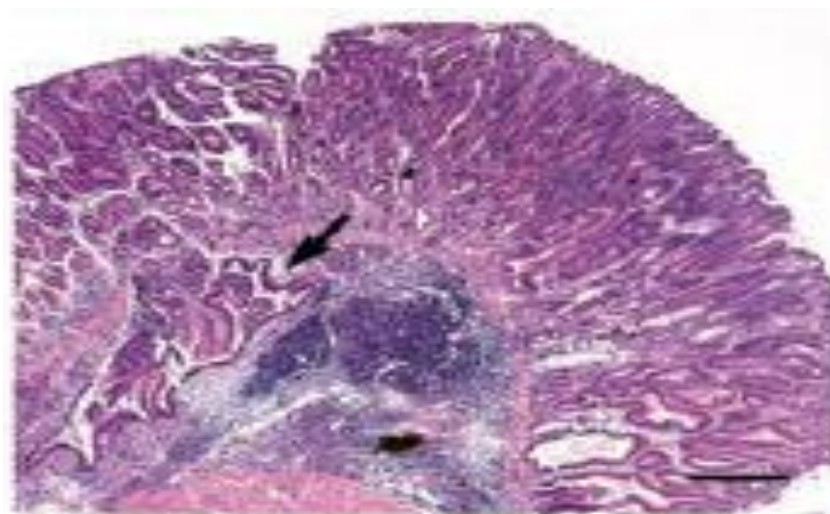


Figura 8. Cáncer gástrico asociado a la infección de *Helicobacter pylori* (Tomado de Fox y Wang 2007). Neoplasia intraepitelial gástrica con invasión a la mucosa (flecha)

Existen diferentes mecanismos de *H. pylori* relacionados con carcinogénesis. La infección crónica está asociada con un incremento del recambio epitelial gástrico, importante en la

transformación celular. El aumento de la proliferación celular (sin incremento de apoptosis) puede estar relacionado a la adhesina *babA2* de *H. pylori* (Yu *et al.* 2002). En algunas cepas de *H. pylori*, la PAI *cag* es antiapoptótica a través de una vía que involucra el factor nuclear *kappa B* (Maeda *et al.* 2002) lo que indica que al modular el ciclo celular de las células epiteliales, *H. pylori* puede originar la aparición células epiteliales neoplásicas y preneoplásicas. También se ha reportado la estimulación de la producción de sintetasa inducible de óxido nítrico de macrófagos por la ureasa (Gobert *et al.* 2002) aumentando el daño inflamatorio. *H. pylori* interfiere *in vitro* con la maquinaria celular que se encarga de limitar el daño en el DNA mediante la corrección de desapareamientos (Kim *et al.* 2002). Con la participación de sus proteínas CagA, VacA y Ureasa (Parsonnet *et al.* 1997, Torres *et al.* 1998b, Vaucher *et al.* 2000, Castillo-Rojas *et al.* 2004). Se han encontrado varios genes de virulencia en *H. pylori* en poblaciones occidentales que están asociados con un incremento en el riesgo de cáncer gástrico y lesiones pre-cancerosas, no obstante estas relaciones varían ampliamente entre poblaciones. En nuestro país las cepas CagA+ se han considerado como un factor de riesgo adicional en el desarrollo del carcinoma gástrico, lo que contrasta con lo observado en otros países (Torres *et al.* 1998b).

Úlcera Duodenal

Las úlceras gástricas y duodenales (comúnmente referidas como úlceras pépticas) son definidas como defectos de la mucosa con un diámetro de al menos 0.5 cm que penetran la mucosa muscularis (**Figura 9**). Las úlceras gástricas principalmente se presentan a lo largo de la curvatura menor del estómago, en particular en la transición de las mucosas del antro y el cuerpo (Veldhuyzen van Zanten *et al.* 1999). Las úlceras duodenales usualmente se presentan en el bulbo duodenal, la cual es el área más expuesta al ácido gástrico. En poblaciones occidentales, las úlceras duodenales son aproximadamente cuatro veces más comunes que las gástricas. Las

úlceras duodenales en particular ocurren entre los 20 a 50 años de edad, mientras que las gástricas después de los 40 (Kusters *et al.* 2006).



Figura 9. Endoscopia que muestra una úlcera duodenal (flecha) asociada a la infección de *Helicobacter pylori* (Tomada de Kusters *et al.* 2006).

Tanto la úlcera gástrica como la duodenal están fuertemente relacionadas con *H. pylori*. Aproximadamente el 95% de las úlceras duodenales y el 85% de las gástricas ocurren en presencia de *H. pylori* (Kuipers *et al.* 1995a). Se estima que entre 10-20% de las personas infectadas con *H. pylori* desarrollarán úlceras pépticas, (Go 1997, Cats *et al.* 1998, Kuipers 1999, Chan *et al.* 2002, Huang *et al.* 2002). Si la producción de ácido en el paciente es de normal a alta, la inflamación producida por *H. pylori* es más severa en el estómago distal y el duodeno proximal, lo que da origen a la úlcera duodenal (Kusters *et al.* 2006).

Linfoma MALT

La mucosa gástrica normalmente no contiene tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), pero casi siempre aparece en respuesta a la colonización por *H. pylori*. En casos raros, una población monoclonal de células B surge de este tejido y prolifera lentamente hasta formar un linfoma tipo MALT. El diagnóstico está basado en apariencia histológica mediante microscopía y en la demostración de clonalidad mediante inmunohistoquímica y técnicas moleculares como PCR (Kuster *et al.* 2006). Casi todos los pacientes con linfoma MALT son *H. pylori* positivos

(Parsonnet e Isaacson 2004), y en algunos estudios se ha reportado que los individuos infectados con *H. pylori* tienen un riesgo entre dos y seis veces mayor de desarrollar linfomas tipo MALT si se les compara con individuos libres de la bacteria (De Koster *et al.* 1994, Kuipers 1999, Taupin *et al.* 1999).

A pesar de que la asociación de la infección con *H. pylori* con el desarrollo de gastritis crónica está bien demostrada, se ha reportado que también puede ser benéfica y proteger contra el reflujo esofágico y el adenocarcinoma del esófago distal y el *cardias* gástrico (Chow *et al.* 1998).

Factores genéticos del hospedero

Las relaciones ecológicas que resultan de la co-evolución entre el epitelio intestinal humano y ciertas bacterias abarcan desde comensalismo, simbiosis y enfermedad (Hooper y Gordon 2001). Ahora es posible establecer algunas bases moleculares y genéticas de estos fenómenos y saber si ocurre paralelamente un proceso de selección de ciertos rasgos genéticos de posible propensión y/o resistencia a estos procesos.

La variabilidad de los factores del hospedero tales como el origen étnico, antígenos de grupos sanguíneos, edad de infección contribuyen a los diferentes resultados clínicos (Covacci *et al.* 1999). Un punto importante en la patogénesis de *H. pylori* es la demostración de que la respuesta epitelial e inmune en el estómago depende en cierto grado de los polimorfismos de genes de IL-1 β , y TCR (El-Omar *et al.* 2000, Kuntsman *et al.* 2000, Furuta *et al.* 2002^a, Furuta *et al.* 2002^b, González *et al.* 2002, Macarthur *et al.* 2004). Otros factores inmunogenéticos asociados son algunos genes *HLA* (*Human Leucocyte Antigens*) de clase II en poblaciones caucásicas, orientales y mexicanas (Azuma *et al.* 1998, El-Omar *et al.* 2000; Kuntsman *et al.*, 2000, González *et al.* 2002, Herrera *et al.* 2004, Azuma *et al.* 1994, 1995 y 1998; Morris *et al.* 1994; Go 1997, Yoshitake *et al.* 1999).

COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC)

El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) humano, en la región cromosómica 6p21, se extiende a lo largo de 3.6 Mb donde se encuentran seis genes *HLA* (Antígenos leucocitarios Humanos) clásicos y muchos otros con funciones importantes en la regulación del sistema inmunológico (*i. e.* *TNF*, *HSP70*, *TAP*, etc.) y otros procesos celulares fundamentales. El MHC contiene un total de 239 *loci*, de entre los cuales 130 son genes expresados, 17 son posibles

genes, 4 son genes no codificantes y 88 son pseudogenes (Shiina *et al.* 2004). Convencionalmente, el MHC se divide en tres regiones, Clase II, Clase III y Clase I de centrómero a telómero.

La región de clase II se extiende en aproximadamente 0.9 Mb y contiene los genes clásicos de clase II, cadenas α y β de *HLA-DP*, *HLA-DQ* y *HLA-DR*, que son expresados principalmente en la superficie de las células presentadoras de antígenos. En la región de clase III, a lo largo de 0.9 Mb, no se han encontrado genes parecidos a los genes *HLA* clase I ni II, pero contiene genes para factores del complemento *C2*, *C4* y *Bf*, genes de citocinas *TNF- α* , *LTA* y *LTB*, genes de proteínas de choque térmico *HSP70-1*, *-2*, *-HOM*, y otros genes sin una función inmunológica obvia. La región de clase I comprende 1.8 Mb y alberga a los genes clásicos de clase I, cadenas α de *HLA-A*, *HLA-B* y *HLA-C*, expresados en la membrana de células nucleadas (Shiina *et al.* 2004) (**Figura 10**).

Existen 55 *loci* identificados dentro de la región de clase II con 31 genes expresados, tres posibles genes, un gene no expresado y 20 pseudogenes. Diecinueve de los *loci* son secuencias tipo *HLA* clase II, incluyendo 15 *loci* *HLA* clase II clásicos y 4 *loci* *HLA* clase II no clásicos (Shiina *et al.* 2004). La región de clase III contiene 62 *loci* con 58 genes expresados, dos posibles genes y dos pseudogenes, esta es una región con una densidad genética muy alta con aproximadamente un gene por cada 14,516 pb. En la región de clase I se encuentran 122 *loci* con 41 genes expresados, 12 posibles genes, 3 genes no codificantes y 66 pseudogenes. Entre éstos, al menos 18 genes son genes tipo *HLA* clase I, que incluyen tres *loci* *HLA* clase I clásicos, tres *loci* *HLA* clase I no clásicos y 12 genes no codificantes o que son pseudogenes (Shiina *et al.* 2004). También se

encuentran siete genes parecidos a *HLA* clase I, conocidos como *MIC* (*MHC class I chain related genes*) implicados en la respuesta inmune innata (Bahram 2001).

Existen cuatro categorías funcionales de los genes localizados en el MHC: i) procesamiento y presentación de antígenos mediante *HLA* clase I y II, *LMPs* y *TAP*; ii) inmunidad innata, inflamación y regulación de la respuesta inmunológica mediante genes de clase III, iii) interacciones intercelulares a través de receptores de MHC y sus ligandos y iv) funciones no relacionadas a la inmunidad (Bart 1998, Kulski *et al.* 2002).

Moléculas de HLA

La generación de una respuesta inmunológica adaptativa depende de la participación de las moléculas de *HLA*. El *HLA* comprende un grupo de genes relacionados entre sí localizados en el MHC humano, que codifican moléculas de membrana con la función principal de presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T (Stern y Wiley 1994). Las moléculas HLA clase I son heterodímeros compuestos por una glucoproteína transmembranal de 44 kDa codificada en el MHC conocida como cadena pesada o cadena α y una proteína no polimórfica de 12 kDa conocida como β 2m codificada en el cromosoma 15, que se une no covalentemente con la porción extracelular de la cadena pesada. Estas moléculas se expresan en prácticamente todas las células nucleadas y restringen el reconocimiento de péptidos antigénicos por las células T $CD8^+$ (Karr 1998).

Los productos de HLA clase II son heterodímeros compuestos por una cadena α de ~32 kDa y una cadena β de ~28 kDa codificadas en el MHC y forman parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Estas glucoproteínas transmembranales se encuentran en células presentadoras

de antígenos (*i.e.* células dendríticas, macrófagos, linfocitos B) y restringen el reconocimiento de péptidos antigénicos principalmente extracelulares a linfocitos T CD4⁺ (Karr 1998).

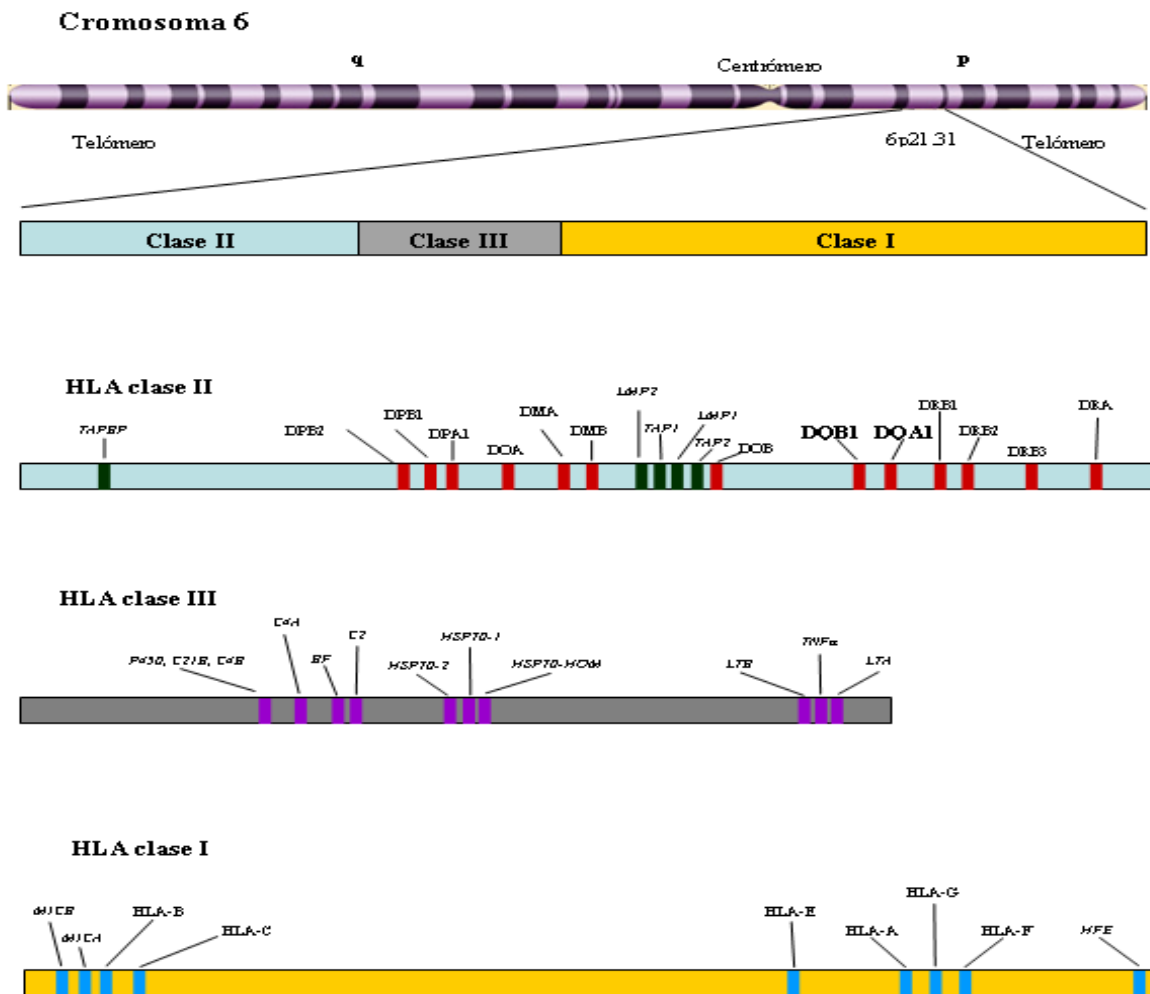


Figura 10. Mapa genético del Complejo Principal de Histocompatibilidad Humano

En el cromosoma 6 del humano, a lo largo de 3.6Mb, se localizan 239 loci que componen las regiones de MHC clase I, clase III y clase II. Los productos de los genes de HLA clase I y II se encargan de la presentación de antígenos peptídicos a linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ respectivamente. También existen genes no HLA encargados de funciones inmunológicas e inflamatorias (Modificado de Shiina *et al.* 2004).

Polimorfismo de *HLA*

Entre los genes que codifican las moléculas de HLA clase I y II, se incluyen varios que son altamente polimórficos. Hasta diciembre de 2004 los números de variantes alélicas reportadas son los siguientes: 349 *HLA-A*; 627 *HLA-B*; 182 *HLA-C*; 394 *HLA-DRB1*; 28 *HLA-DQA1*; 61 *HLA-DQB1*; 22 *HLA-DPA1* y 116 *HLA-DPB1* (Marsh *et al.* 2005).

Convencionalmente se considera que hay una asociación con una enfermedad o una infección si la frecuencia de uno o más alelos está incrementada (asociación positiva) o disminuida (asociación negativa) de forma significativa cuando se compara un grupo de pacientes contra un grupo de control apropiado. Existen evidencias de que el polimorfismo en *HLA* se mantiene por selección positiva relacionada a su función inmunológica. Esta selección puede mantener linajes alélicos por periodos de tiempo más largos de lo que se espera y ciertas variedades pueden asociarse a enfermedades. Los genes de *HLA* clase I y II han sido asociados con más de 100 distintas enfermedades, de tipo inflamatorio y alérgico (Asma, Behçet, etc), infeccioso (Tuberculosis, VIH, VPH, etc) y tumoral (Cáncer de próstata, Melanoma, Cáncer de tiroides, etc) (Shiina *et al.* 2004).

La combinación de los alelos de diferentes *loci*, localizados unos cerca de otros en un segmento cromosómico, que tienden a heredarse en bloque, recibe el nombre de haplotipo. Algunas combinaciones se presentan en haplotipos de HLA más frecuentemente de lo esperado por las frecuencias de los alelos individuales, esto es, la frecuencia de las combinaciones de alelos no es al azar. Este fenómeno se conoce como desequilibrio de enlace y varía de un grupo étnico a otro reflejando las presiones de selección a que ha estado sometido (Rodey 2000). El desequilibrio de enlace es importante en la asociación de HLA con enfermedades, debido a que hay ciertas enfermedades que han sido asociadas con algún *locus* en particular, pero que al estudiar el

polimorfismo de *loci* cercanos se ha observado que dicha asociación es efecto secundario del desequilibrio de enlace con un *locus* próximo que es el que en realidad está asociado. Por lo anterior es muy importante estudiar el polimorfismo de los genes cercanos cuando se encuentra una asociación, y así descartar el efecto del desequilibrio de enlace (Rodey 2000)..

HLA y enfermedades gástricas asociadas a *H. pylori*

La principal interacción entre el HLA y *H. pylori* más probable es la presentación de antígenos peptídicos de la bacteria a los linfocitos T a través del HLA de clase II. También se ha observado la inducción de apoptosis por la ureasa de *H. pylori* en células epiteliales gástricas que expresan moléculas HLA clase II, lo que apunta a un posible mecanismo en el cual la bacteria y la respuesta del hospedero se integran y participan en la patogénesis del daño en las células epiteliales (Chiba *et al.* 1995, Fan *et al.* 1998 y 2000).

La mayoría de estudios de asociación entre alelos del sistema HLA y cáncer gástrico, relacionado con la infección crónica de *H. pylori*, se han realizado en poblaciones japonesas y caucásicas (Lee *et al.* 1996, Azuma *et al.* 1998, Karhukorpi *et al.* 1999). Se han encontrado asociaciones de los *loci* HLA-DQ con la infección y las enfermedades. En Japón el alelo DQA1*0102 es menos frecuente en pacientes con gastritis atrófica y úlcera duodenal cuando se les compara con pacientes de gastritis superficial y con testigos *H. pylori* negativo (Azuma *et al.* 1995 y 1998, Yoshitake *et al.* 1999). Por lo tanto, puede considerarse que la ausencia de dicho alelo podría constituir un factor de riesgo genético para la asociación de gastritis atrófica causada por *H. pylori* y el cáncer gástrico (distal) de tipo histológico intestinal (Azuma *et al.* 1998) en contraste con el tipo histológico difuso. Otros estudios, también en población japonesa han relacionado

positivamente el alelo DQB1*0401 con gastritis atrófica y úlcera duodenal (Sakai *et al.* 1999, Yoshitake *et al.* 1999). Sin embargo, en la población caucásica no se encontró asociación alguna con *HLA-DQ* (Caselli *et al.* 1999, Karhukorpi *et al.* 1999, Kuntsmann *et al.* 2002, Perri *et al.* 2002), aunque algún estudio aislado reportó el aumento de DQB1*0301 en pacientes con cáncer gástrico (Lee *et al.* 1996).

En población mexicana, al estudiar las frecuencias de entre un grupo de 20 pacientes mestizos mexicanos con cáncer gástrico y 99 controles sanos, se reportó una susceptibilidad por parte del alelo DQB1*050101 con una razón de momios de 4.5 (Herrera-Goepfert *et al.* 2004). En nuestro grupo de laboratorio se estudiaron los polimorfismos de *HLA-DQA1* y *HLA-DQB1* en pacientes con cáncer gástrico y sus lesiones precursoras y úlcera duodenal. Se corroboró la asociación del alelo DQB1*050101 con cáncer gástrico reportada por Herrera-Goepfert *et al.*, pero además se encontró una asociación del alelo DQB*0601 con el desarrollo de la metaplasia intestinal (artículo en preparación).

GENES NO HLA

Dentro del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), además del HLA, se encuentran otros genes con funciones inmunológicas importantes.

MICA

El gene *MHC class I Chain related gene A (MICA)*, localizado cerca de HLA-B, es altamente polimórfico (Bahram *et al.* 1994, Fodil *et al.* 1999). MICA no se asocia con β 2microglobulina, no presenta antígenos peptídicos, es inducible en condiciones de estrés y es reconocida por células

T γ δ , encargadas de la eliminación de células infectadas y dañadas (Groh *et al.* 1997). MICA en una célula cancerosa o infectada funciona como una marca de destrucción ya que es ligando del complejo formado por el receptor NKG2D, (una lectina tipo C codificada por un miembro del complejo receptor de NK) (Bauer *et al.* 1999) y la molécula adaptadora DAP10 (Wu *et al.* 1999). *MICA* es un gene involucrado en la respuesta inmune innata. Tiene homología con los genes de HLA de clase I, sin embargo, no presenta péptidos antigénicos. Se expresa principalmente en epitelio gastrointestinal y se sobreexpresa en condiciones de estrés celular como infección, inflamación y transformación tumoral (Groh *et al.* 1997). El producto de *MICA* es una glicoproteína de membrana que es ligando activador del receptor NKG2D/DAP10 ubicado en células NK, T γ δ y CD8+ (Bahram 2001) (**Figura 11**).

MICA es un gene polimórfico. En el exón 5 tiene una región microsatelital de repeticiones de alaninas, la cual ha sido asociada con la ubicación y la estabilidad de MICA en la membrana, debido a que codifica para la región transmembranal de la proteína (Bahram 2001). El significado del polimorfismo de *MICA* no es muy claro, sin embargo se cree que influye en su capacidad para unirse a su receptor, además en el exón 5 contiene una región de microsátélites GCT (alanina), con siete variables (A4, A5, A5.1, A6, A7, A9 y A10), que codifica la región transmembranal de la molécula, lo que puede influir en su estabilidad en la membrana (Groh *et al.* 2002).

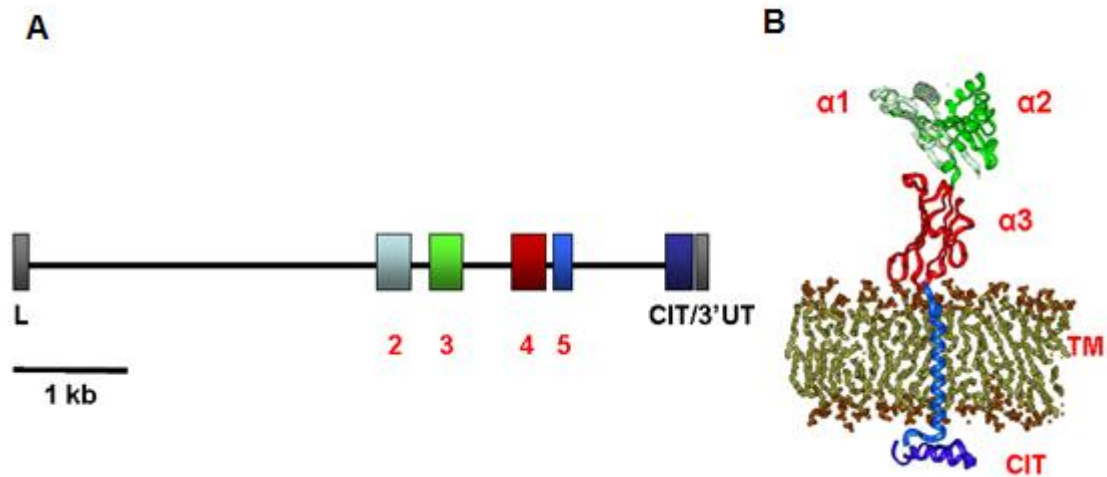


Figura 11. Gene *MICA*.

A) El gene *MICA* es muy polimórfico. Cuenta con una región microsatelital GCT en el exón 5 que codifica repeticiones de alaninas con ocho variantes descritas (A4, A5, A5.1, A6, A7, A8, A9, y A10), y en conjunto con el polimorfismo en los exones 2 al 4 se han identificado 69 alelos diferentes (IMGT/HLA Database). B) Los exones 2, 3, 4 y 5 codifican los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ y transmembranal (TM) respectivamente de la proteína MICA, la cual se asemeja a las moléculas HLA clase I, pero no se une a $\beta 2m$, ni presenta péptidos antigénicos.

TNF

En la región de clase III se ubican los genes *TNF- α* (*Tumor Necrosis Factor alpha*), *TNF- β* (*Tumor Necrosis Factor beta*), y los genes *HSP70* (*Heat Shock Protein 70*) -1, -2 y -HOM. (Shiina *et al.* 2004). La citocina multifuncional *TNF- α* está involucrada en la promoción de respuestas inflamatorias y es determinante en la patogénesis de enfermedades inflamatorias, autoinmunes y tumorales (Bazzoni y Beutler 1996). Altos niveles de *TNF- α* en plasma de pacientes con cáncer se asocian con un mal pronóstico (Warzocha *et al.* 1997), además es un poderoso angiogénico e induce la expresión de moléculas de adhesión involucradas en el

aumento de la motilidad y comportamiento invasivo-metastático de las células tumorales (Leek *et al.* 1998). Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en las posiciones -308 (G/A) y -238 (G/A) de la región promotora del gene de *TNF- α* han sido estudiados debido a que el raro alelo A en -308 y el alelo común G en -238 se han asociado con una alta producción de *TNF- α* *in vitro* (Hajeer y Hutchinson 2001; Louis *et al.* 1998) y con enfermedades inflamatorias (Huizinga *et al.* 1997) (Figura 12).

En contraste con *TNF- α* , expresado principalmente en macrófagos, *TNF- β* se expresa en células CD4+ Th1, células B activadas y células NK (Vassalli 1992). Hay una variación de la expresión de *TNF- β* ligada al polimorfismo bialélico (A/G) localizado en el primer intrón del gene en la posición +252 (Stüber *et al.* 1996), en donde el nucleótido G ha sido asociado a enfermedades inflamatorias (Hessen *et al.* 2003) De hecho, en población china, la frecuencia del genotipo heterocigoto de *TNF- β* A/G en pacientes infectados con *H. pylori* y con cáncer gástrico es significativamente mayor que en controles positivos para la infección sin cáncer (Li *et al.* 2005).

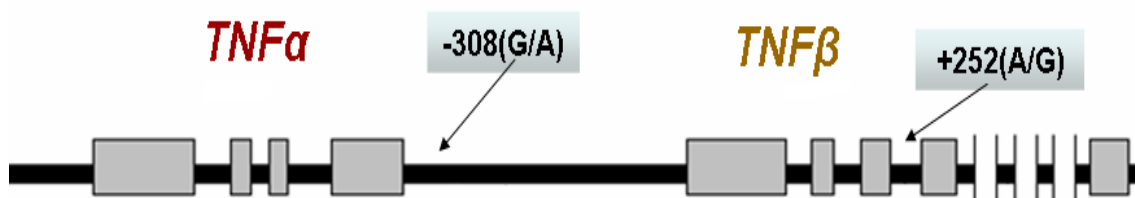


Figura 12. Genes de *TNF*.

Los genes *TNF- α* y *TNF- β* están localizados en la región de clase II del MHC. Ambos tienen polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en sus secuencias. Los más estudiados han sido el SNP -308(G/A) en el promotor de *TNF- α* y el SNP +252(A/G) en el primer intrón de *TNF- β* , los cuales han sido asociados con diferentes enfermedades inflamatorias, infecciosas y tumorales.

HSP70

El loci *HSP70* está localizado cerca de *HLA-B*, e incluye a los genes *HSP70-2* y dos genes adyacentes *HSP70-1* y *HSP70-HOM* a 280 Kb centromérico de *TNF- α* (Sargent *et al.* 1989) (**Figura 13**). Estos genes están involucrados en el procesamiento y presentación de antígenos (Pierce *et al.* 1991), pero además poseen diversas funciones inmunológicas. En condiciones de estrés, sus moléculas son reconocidas por células NK y linfocitos T citotóxicos como antígenos (sin presentación) (Botzler *et al.* 1998) y su polimorfismo se ha asociado con enfermedades autoinmunes (Ratanachaiyavong *et al.* 1991, Pablos *et al.* 1995, Jarjour *et al.* 1996, Vargas *et al.* 2002).

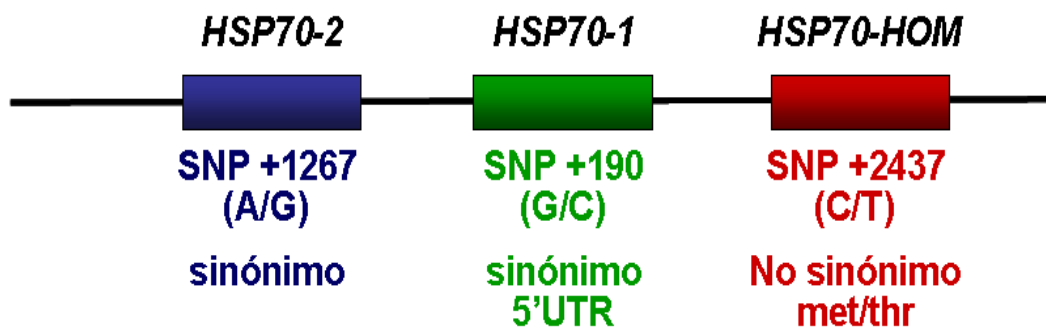


Figura 13. Genes de *HSP70*.

Los genes de *HSP70* ubicados en el MHC son monoexónicos y tienen polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). El SNP +1267(A/G) de *HSP70-2* y el SNP +190(G/C) de *HSP70-1* son sinónimos, es decir, no cambian la secuencia de aminoácidos en la proteína, mientras que el SNP +2437(C/T) de *HSP70-HOM* provoca un cambio del aminoácido metionina a treonina.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se considera que la inflamación crónica de la mucosa gástrica por *H. pylori* es el principal factor etiológico de la gastritis crónica, la metaplasia intestinal, el cáncer gástrico y la úlcera duodenal. El hecho de que en México, alrededor del 80% de la población adulta sea seropositiva a *H. pylori* y de que sólo un 15% de los infectados presenten síntomas indica la participación de factores ambientales y del hospedero en el establecimiento de la enfermedad. La naturaleza de la respuesta inmuno-inflamatoria local en la mucosa contribuye de forma importante a este proceso de transformación tumoral. Ya se ha descrito la relación de los polimorfismos de ciertos genes de *HLA* y citocinas como marcadores de susceptibilidad, de resistencia o de manifestaciones clínicas específicas en la infección por *H. pylori* y en el desarrollo de cáncer gástrico y úlcera duodenal en poblaciones caucásicas y orientales. Sin embargo, estos datos no pueden ser extrapolados a nuestra población a causa de nuestro diferente fondo genético. Además, a causa del desequilibrio de enlace que se presenta en la región del MHC, las asociaciones descritas entre el cáncer gástrico y el *HLA* podrían deberse en parte a otros genes dentro del MHC. Tal es el caso de los genes relacionados con la cadena de MHC clase I (*MIC*), los genes del Factor de Necrosis Tumoral (*TNF*), y de las Proteínas de Choque Térmico 70 (*HSP70*). Los productos de estos genes tienen participación en la inmunidad innata, en procesos de inflamación crónica, en condiciones de estrés celular y en el desarrollo de varios tipos de cáncer. Asimismo, su polimorfismo ha sido asociado a enfermedades infecciosas, inflamatorias y cancerosas.

HIPÓTESIS

Si los polimorfismos genéticos de *HSP70*, *TNF* y *MICA* están involucrados en la susceptibilidad al cáncer gástrico, sus lesiones precursoras y a la úlcera duodenal, entonces presentarán diferentes frecuencias génicas, genotípicas y haplotípicas entre pacientes e individuos asintomáticos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Conocer si existe asociación del polimorfismo de los genes *MICA*, *TNF- α* , *TNF- β* , *HSP70-1*, *HSP70-2* y *HSP70-HOM* con el cáncer gástrico, sus lesiones precursoras (gastritis no atrófica y metaplasia intestinal) y úlcera duodenal en población mexicana.

Objetivos particulares

- Estudiar las frecuencias génicas, genotípicas y haplotípicas de los genes *MICA*, *TNF- α* SNP-308, *TNF- β* SNP+252, *HSP70-1* SNP+190, *HSP70-2* SNP+1267 y *HSP70-HOM* SNP+2437 en individuos diagnosticados con cáncer gástrico, sus lesiones precursoras y úlcera duodenal y en individuos sin diagnóstico ni síntomas de estas lesiones gástricas para determinar si existe asociación (susceptibilidad o protección) en pacientes mexicanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sujetos de estudio

Este estudio fue aprobado por los comités de ética del Hospital General de México, Secretaría de Salud y del Hospital de Oncología del Instituto Mexicano del Seguro Social. A todos los individuos estudiados se les aplicó un cuestionario acerca de sus hábitos alimenticios, higiénicos, de condiciones de vida y antecedentes familiares de enfermedades. Todos los individuos firmaron una carta de consentimiento informado.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes: 1) Mestizos mexicanos. Con base en la definición que establece el Instituto Nacional de Antropología, se considero como Mestizo Mexicano aquella persona con tres generaciones (incluida la suya) nacidas en México, descendiente de los habitantes autóctonos originales y de individuos españoles (con apellidos derivados del español) o negros que vinieron a América durante el siglo XVI (Serrano-Sanchez 1996, Lisker 1981, Gorodezky *et al.* 2001, Gamboa *et al.* 2006), 2) Edad mayor de 30 años. 3) Firma de consentimiento informado.

Los criterios de exclusión fueron: 1) Tratamiento contra cáncer. 2) Toma de antibióticos, compuestos de bismuto, inhibidores de bombas de protones y antiinflamatorios no esteroideos durante las dos semanas previas al estudio y 3) Diagnóstico o síntomas de otras enfermedades crónicas severas o enfermedades mentales.

Individuos asintomáticos

Se estudiaron 132 muestras de donadores adultos, mestizos, mexicanos de los Bancos de Sangre del Hospital General Regional No. 25 y del Centro Médico Nacional S-XXI del Instituto

Mexicano del Seguro Social (IMSS). Ningún individuo reportó síntomas ni diagnóstico de enfermedades gástricas, autoinmunes, inflamatorias, diabetes o cáncer,

Pacientes

Se estudiaron en ciego 447 muestras de pacientes adultos, mestizos, mexicanos, diagnosticados mediante serología, endoscopia e histología, provenientes del Hospital General de México SSA y del Hospital de Oncología del IMSS que acudieron a consulta debido a síntomas gastroduodenales o por un probable cáncer gástrico (Hospital de Oncología) programados para endoscopia y biopsia para propósitos de diagnóstico.

De acuerdo al diagnóstico de la histología (siete biopsias: cuatro de antro y tres de cuerpo), basados en la clasificación de Sydney, se ordenaron los pacientes en cuatro grupos: 228 pacientes con gastritis no atrófica, 98 con metaplasia intestinal, 63 con cáncer gástrico y 58 con úlcera duodenal.

Material Biológico

Se emplearon de 5-10ml de sangre periférica. Mediante centrifugación se separó el anillo leucocitario para la extracción de DNA mediante una técnica de *salting out*. (Miller *et al.* 1988) y el plasma para la determinación de anticuerpos IgG contra *H. pylori* y CagA. (Camorlinga *et al.* 1998).

Determinación de anticuerpos contra *H. pylori* y CagA

En la determinación de anticuerpos IgG contra *H. pylori* y CagA se aplicó una técnica de ELISA validada (Camorlinga *et al.* 1998). En el caso de anticuerpos contra *H. pylori*, las placas se sensibilizaron con un extracto de células completas de la bacteria usando 0.5ug/pozo que actúa

como antígeno concentrado y se incubó por 12 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, el bloqueo de uniones inespecíficas se realizó con gelatina 0.1% en PBS incubándolo por 12 horas a 4⁰C. Después de 3 lavados con PBS pH 7.4, se procedió a la unión del anticuerpo primario (sueros a evaluar en dilución 1:1000 en PBS con gelatina 0.1% y gammaglobulina bovina 0.5%) y se dejó incubar a 4⁰C por 12 horas. Se realizaron tres lavados con PBS, se añadió el anticuerpo secundario (anti-IgG conjugado con fosfatasa alcalina) 1:1,000 y se incubó 1 hora a 37⁰C. El sustrato p-nitrofenilfosfato 1 mg/ml se agregó en buffer de dietanolamina para el desarrollo de color y después de 30min se leyó a 405nm. Los ensayos se realizaron por duplicado. En cada placa se incluyeron controles seronegativos y seropositivos y los valores mayores a 1 unidad de ELISA fueron considerados como seropositivos de acuerdo a Camorlinga *et al.* (1998) Torres *et al.* (1998b).

Para la determinación de IgGs contra CagA, se utilizó un procedimiento validado (Camorlinga *et al.* 1998). Las placas se sensibilizaron con un el antígeno CagA a 0.1 ug/pozo y se incubó por 12 horas a 4⁰C. El bloqueo de uniones inespecíficas se realizó con leche descremada al 2.5% en PBS incubándolo por 1 hora a 37⁰C. Después de 3 lavados con PBS se procedió a la unión del anticuerpo primario (sueros a evaluar en dilución 1:1,000 en PBS con leche descremada) y se dejó incubar a 37⁰C por 1 hora. A partir de la aplicación del anticuerpo secundario 1:1,000, se procedió como en la ELISA contra *H. pylori*. Para este caso y de acuerdo a Camorlinga *et al.* (1998), los valores mayores a 1.5 unidades de ELISA fueron considerados como seropositivos.

La infección por *H. pylori* fue definida cuando se presentaron un ELISA positivo y la presencia de la bacteria en la histología de las biopsias gástricas.

Extracción de DNA

En la extracción de DNA se partió de anillo leucocitario y se utilizó una técnica de *salting out* (Miller *et al.* 1988). En breve: para lisar los eritrocitos, el anillo leucocitario se resuspendió en una solución amortiguadora con sacarosa 0.3 M, Tris-HCl 10mM, MgCl₂ 5 mM y Triton 100x 1.0 %. Mientras que los leucocitos se lisaron con un buffer de NaCl 0.075M y EDTA 0.024M. El DNA se separó de las proteínas con SDS 20%, NaClO₄ 5M y NaCl 5M. Se precipitó con isopropanol a -20⁰C. Después de 12 horas a -20⁰C fue lavado con etanol al 70% a la misma temperatura y se disolvió el DNA en agua bidestilada. El DNA fue cuantificado por espectrofotometría y se evaluó su integridad mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%, con TBE.

Reacción cadena de la polimerasa de DNA (PCR).

Se emplearon iniciadores específicos y reacciones de PCR ya reportadas para el polimorfismo de cada uno de los genes a estudiar: exones 2 al 5 de *MICA* (Pérez *et al.* 2000); SNP -308 (G/A) del promotor de *TNF- α* , y SNP +252 (A/G) de *TNF- β* ; SNP +190 (G/C) de *HSP70-1*, SNP +1267 (A/G) de *HSP70-2* y SNP +2437 (C/T) de *HSP70-HOM* (Vargas *et al.* 2002) (Tabla 1).

MICA

Se obtuvieron dos amplicones, por una parte los exones 2 y 3 (*MICA* 2-3) y por otra los exones 4 y 5 (*MICA* 4-5). En la reacción de *MICA* 2-3 se emplearon reactivos de la marca Invitrogen, Brasil. Se realizó con solución amortiguadora de PCR 1x (Invitrogen), 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 0.5 pmol de cada iniciador, 0.03 U de *Taq*-polimerasa y 300 ng de DNA. Las condiciones de amplificación consistieron en la desnaturalización a 95⁰C por 5 min, seguido por 33 ciclos de desnaturalización a 95⁰C por 30 s, alineamiento de iniciadores a 65⁰C por 50 s,

extensión a 72⁰C por 30 s, y finalmente un paso de extensión a 72⁰C por 8 min. El tamaño del producto de *MICA* 2-3 es de 949 bp.

Para *MICA* 4-5, en 25 ul se preparó con solución amortiguadora de PCR 1x, 0.2 mM de dNTPs, 2 mM de MgCl₂, 0.5 pmol de cada iniciador, 0.03 U de *Taq*-polimerasa y 300 ng de DNA. Las condiciones de amplificación comenzaron con la desnaturalización a 94⁰C por 4 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94⁰C por 1 min, alineamiento de iniciadores a 63⁰C por 1:30 min, extensión a 72⁰C por 2 min, y finalmente un paso de extensión a 72⁰C por 10 min. El tamaño del producto de *MICA* 4-5 es de 678 bp.

Tabla 1. Secuencias de los iniciadores específicos para la amplificación por PCR de los polimorfismos.

Nombre	Secuencia	Tamaño del producto (pb)
MICA 2-3 5'	5'-TCCTGCCCCAGGAAGGTTGGG-3' (f)	949
MICA 2-3 3'	5'-AGGGAGAGGAGAGCCCTTGGC-3' (r)	
MICA 4-5 5'	5'-CAGACTTGCAGGTCAGGGTCCCG-3' (f)	678
MICA 4-5 3'	5'-CCTTACCATCTCCAGAACTGC-3' (r)	
TNF α -308 5'	5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3' (f)	107
TNF α -308 3'	5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' (r)	
TNF β +252 5'	5'-AGACGTTTCAGGTGGTGTGCAT-3' (f)	289
TNF β +252 3'	5'-TCTGACTCTCCATCTGTGTCAG-3' (r)	
HSP70-1 +190 5'	5'-TCCGGCGTCCGGAAGGACC-3' (f)	325
HSP70-1 +190 3'	5'-TGCGGCCAATCAGGCGCTT-3' (r)	
HSP70-2 +1267 5'	5'-CATCGACTTCTACACGTCCA-3' (f)	1117
HSP70-2 +1267 3'	5'-CAAAGTCCTTGAGTCCCAAC-3' (r)	
HSP70-HOM +2437 5'	5'-GGACAAGTCTGAGAAGGTACAG-3' (f)	878
HSP70-HOM +2437 3'	5'-GTAACCTTAGATTCAGGTCTGG-3' (r)	

TNF- α SNP -308

Se amplificó con 0.2 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 0.5 pmol de cada iniciador, 0.03 U de *Taq*-polimerasa y 150 ng de DNA. Las condiciones de PCR empleadas comenzaron con un ciclo de desnaturalización a 94⁰C por 3 min, alineamiento a 61⁰C por 1 min y extensión a 72⁰C por 1 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94⁰C por 1 min, alineamiento a 61⁰C por 1 min y extensión a 72⁰C por 1 min y finalmente un ciclo a 94⁰C por 1 min, alineamiento a 61⁰C por 1 min y extensión a 72⁰C por 5 min. El producto obtenido fue de 107 bp.

TNF- β +252

Se amplificó con 0.2 mM de dNTP's, 1.5mM de MgCl₂, 0.5 pmol de cada iniciador, 0.05U de *Taq*-polimerasa y 150 ng de DNA. Las condiciones de PCR empleadas comenzaron con un paso de desnaturalización a 95⁰C por 10 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94⁰C por 1 min, alineamiento a 60⁰C por 1 min y extensión a 72⁰C por 1 min y finalmente un paso de extensión a 72⁰C por 8 min. El producto obtenido fue de 289 bp.

HSP70-1 +190

La reacción de amplificación usada fue 0.2 mM de dNTP's, 1.5 mM de MgCl₂, 1.0 pmol de cada iniciador, 0.05 U de *Taq*-polimerasa y 150 ng de DNA. Las condiciones de PCR empleadas comenzaron con un paso de desnaturalización a 94⁰C por 4min, 30 ciclos de desnaturalización a 94⁰C por 1 min, alineamiento a 60⁰C por 1 min y extensión a 72⁰C por 3 min y finalmente un paso de extensión a 72⁰C por 10 min. El producto de PCR fue de 325 bp.

HSP70-2 +1267

Se amplificó con 0.2 mM de dNTP's, 1.0 mM de MgCl₂, 1.0 pmol de cada iniciador, 0.05 U de *Taq*-polimerasa y 150 ng de DNA. Las condiciones de PCR empleadas fueron las mismas usadas para *HSP70-1 +190*. El producto obtenido fue de 1,117 bp.

HSP70-HOM +2437

La reacción y las condiciones de PCR fueron las mismas que se emplearon para *HSP70-1 +190*. El producto obtenido fue de 878 bp.

Tipificación del polimorfismo

A partir de los productos de PCR específicos, se tipificaron los alelos de *MICA* y los SNPs de *TNF* y *HSP70* por diferentes técnicas.

MICA

Debido a que el gene *MICA* posee 68 alelos y 7 variantes microsatelitales (hla.alleles.org Anthony Nolan Research Institute, enero 2010), la tipificación de su polimorfismo se realizó con la aplicación de una técnica conformacional de DNA llamada *Reference Strand Conformational Analysis* (RSCA) (Argüello *et al.* 1998, Pérez *et al.* 2000) (**Figura 14**). Se tipificaron por separado los exones 2 y 3 de los 4 y 5.

El primer paso de RSCA fue la amplificación por PCR del *locus* específico de estudio (*MICA* 2-3 o *MICA* 4-5) a partir de DNA de líneas celulares linfoblastoides homocigotas con alelos de *MICA* conocidos. En esta reacción se utilizó un iniciador (sentido o antisentido) marcado con el fluorocromo carbocianina 5 (Cy5), de tal forma que sólo una de las cadenas del producto de PCR fue marcada. A este producto se le conoce como FLR (*Fluorescence Labelled Reference*) (**Figura**

14a). Cualquier actividad existente de la Taq polimerasa en el producto de PCR (100 µl) de la FLR se inactivó con 4 µl de EDTA 0.5 M. Se usaron dos FLRs por cada *locus*. Las líneas celulares empleadas como FLRs tienen los alelos *001 y *00801 para *MICA* 2-3 y *001 y *004 para *MICA* 4-5.

En forma independiente, se realizó una amplificación del mismo locus en las muestras a estudiar, usando los mismos iniciadores pero sin marca (**Figura 14b**). Posteriormente, cada muestra se mezcló con su FLR y se llevó a cabo la desnaturalización e hibridación de la muestra con la FLR (**Figura 15c**), formándose combinaciones de homodúplex y heterodúplex (**Figura 14d**). La hibridación se realizó con 3 µl de producto de PCR de la muestra y 1 µl de FLR, esta mezcla se desnaturalizó a 95⁰C por 4min, enseguida fue llevada a 55⁰C por 5 min para permitir la hibridación de las cadenas y después se mantuvo a 15⁰C por 7 min. Finalmente se agregó 1 µl de buffer de carga de RSCA (Argüello *et al.* 1998).

Los dúplex (homodúplex y heterodúplex) fueron separados por electroforesis en un secuenciador automatizado ALFexpress II (*Amersham Pharmacia Biotech*). De cada muestra hibridada, se cargó 1 µl en un gel no desnaturalizante al 6.0% de acrilamida (30.0%) (Sigma, USA). El tamaño del gel fue 21 cm de largo y 0.5 mm de espesor. La electroforesis se llevó a cabo en TBE a 40⁰C, 647 V, 46 mAmp, y 30 W por 480 minutos.

La conformación molecular de cada dúplex resultante fue única, y estuvo basada en el nivel de complementaridad. Debido a que la movilidad del DNA de doble cadena en un gel de acrilamida no desnaturalizante en condiciones electroforéticas constantes depende únicamente del peso y de la conformación molecular; al presentar todos los dúplex el mismo peso molecular, su migración dependió exclusivamente de las diferencias en la conformación molecular, lo que se reflejó en la

movilidad electroforética (**Figura 14e**). Para tipificar cada muestra, las diferentes movilidades se compararon con controles internos que son productos de PCR ya tipificados.

Las movilidades de los diferentes dúplex fueron analizadas con el software Allelelocator 1.03 (*Amersham Pharmacia Biotech*). La corrección del gel y el análisis de los datos se realizaron asignando al pico del iniciador fluorescente el valor de 1 y al homodúplex el valor de 1000, para alinear de esta forma todos los homodúplex. Finalmente las movilidades de las muestras fueron comparadas con las de los controles de cada FLR para determinar los alelos (**Figura 15**).

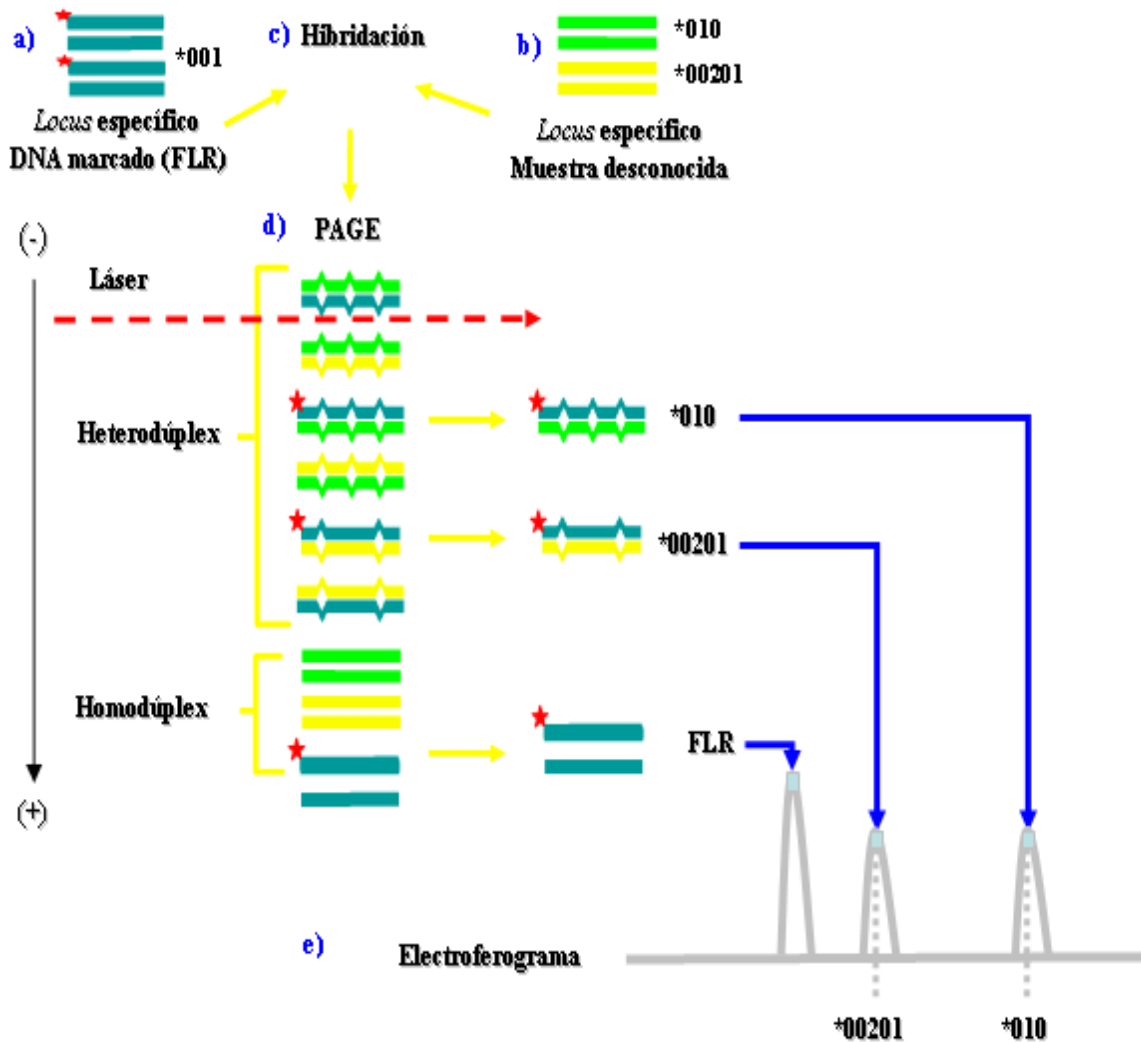


Figura 14. Técnica de Análisis Conformacional mediante una Cadena de Referencia (RSCA) para la tipificación del polimorfismo de *MICA*.

La determinación del polimorfismo de *MICA* (exones 2-5) por RSCA se fundamenta en el uso de DNA de una referencia de secuencia conocida, marcada con un fluorocromo (FLR) (a), y el DNA de estudio (b). Al hibridar ambos DNAs (c), se generan diferentes conformaciones de heterodúplex a causa de la formación de asas por la falta de complementariedad de sus secuencias. Estas conformaciones tienen patrones de migración particulares en electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) (d), de forma que pueden ser identificados en un electroferograma (e), gracias a la marca con el fluorocromo.

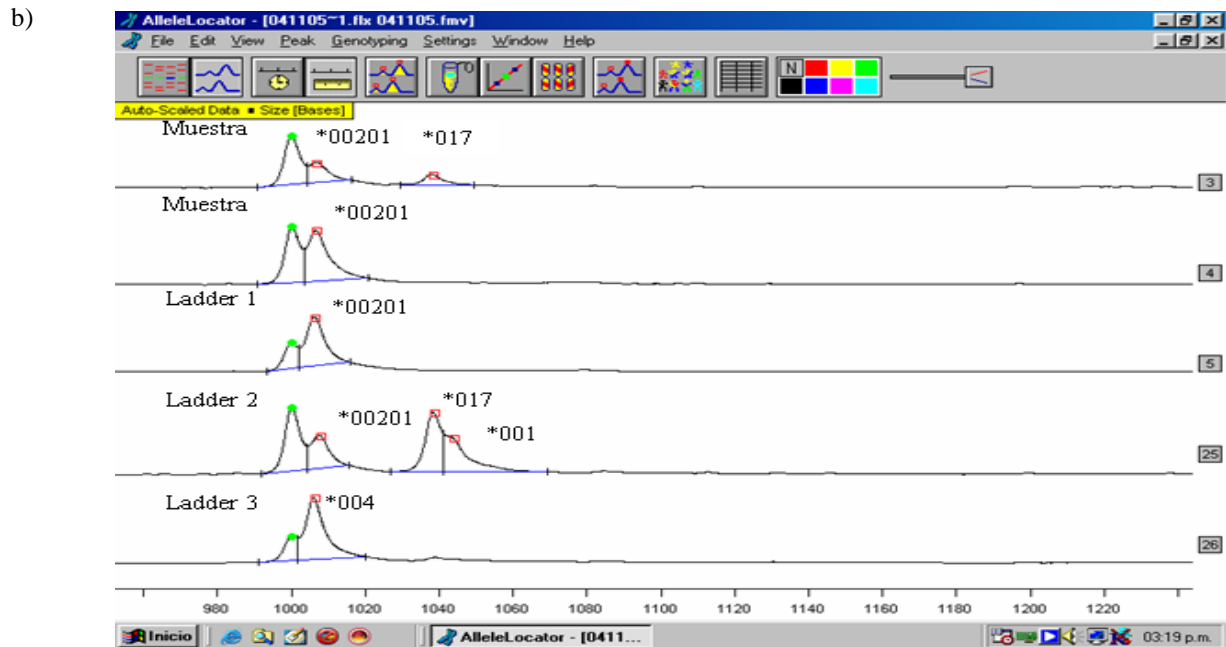
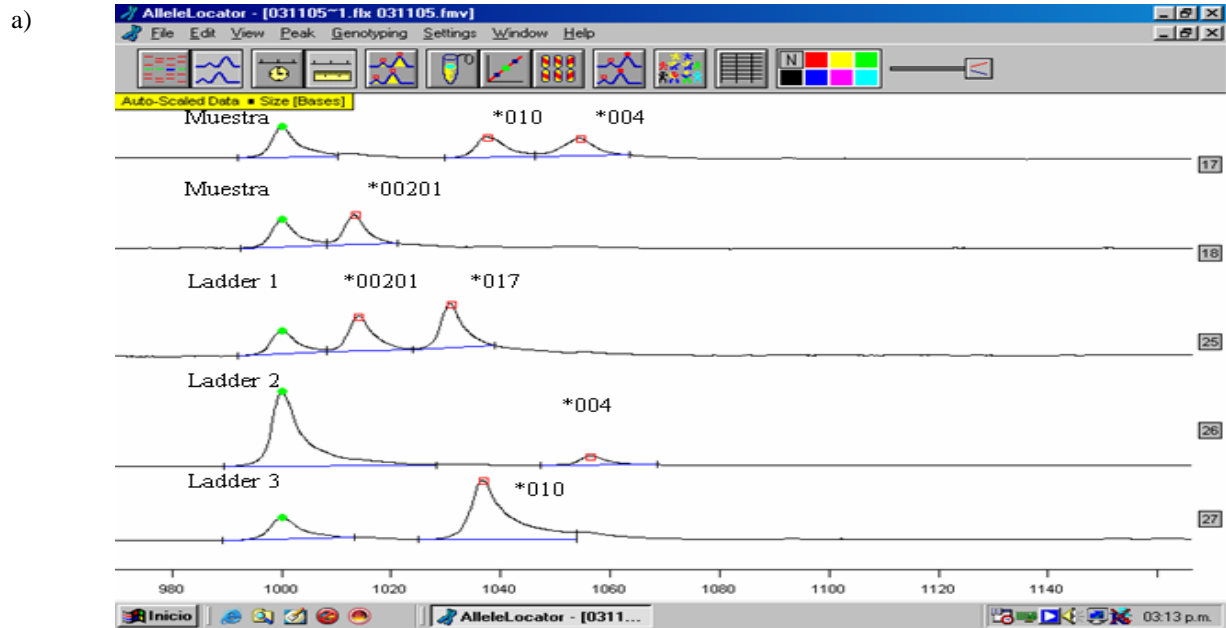
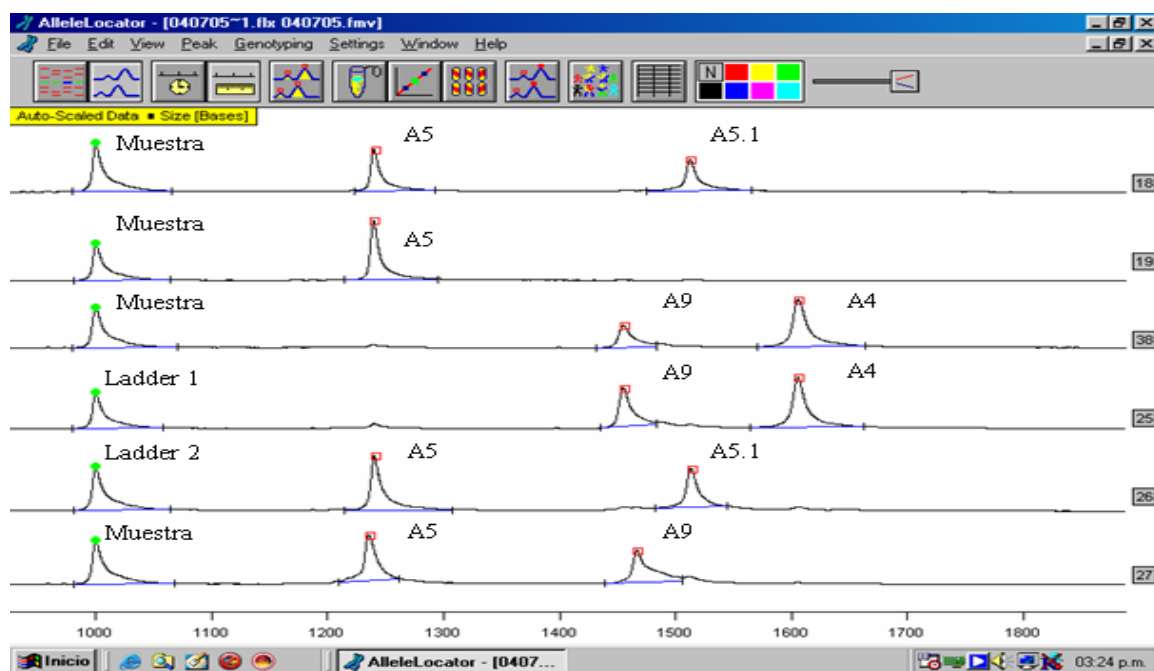


Figura 15. Tipificación de *MICA* por RSCA.

Electroferograma de *MICA* exones 2 y 3 con las FLRs *MICA**001 (a) y *MICA**008 (b) en muestras homocigotas y heterocigotas y los controles (*ladders*) respectivos.

A)



B)

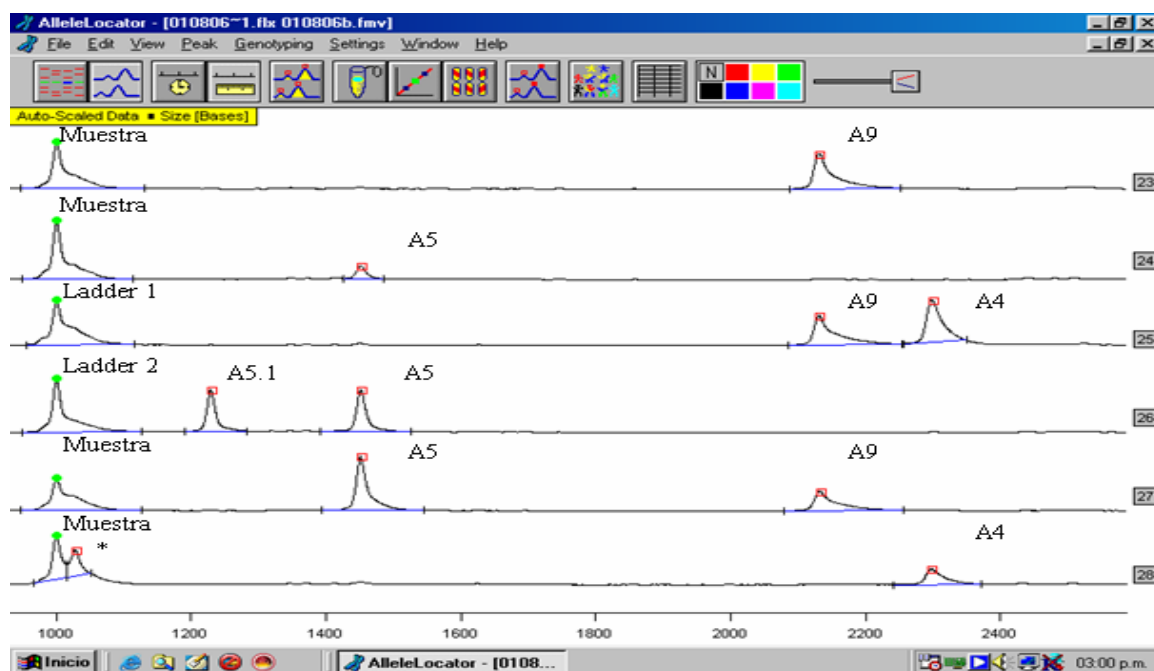


Figura 15 (cont.). Tipificación de *MICA* por RSCA.

Electroferograma de *MICA* exones 4 y 5 con las FLRs A4 (a) y A6 (b) en muestras homocigotas y heterocigotas y los controles (*ladders*) respectivos.

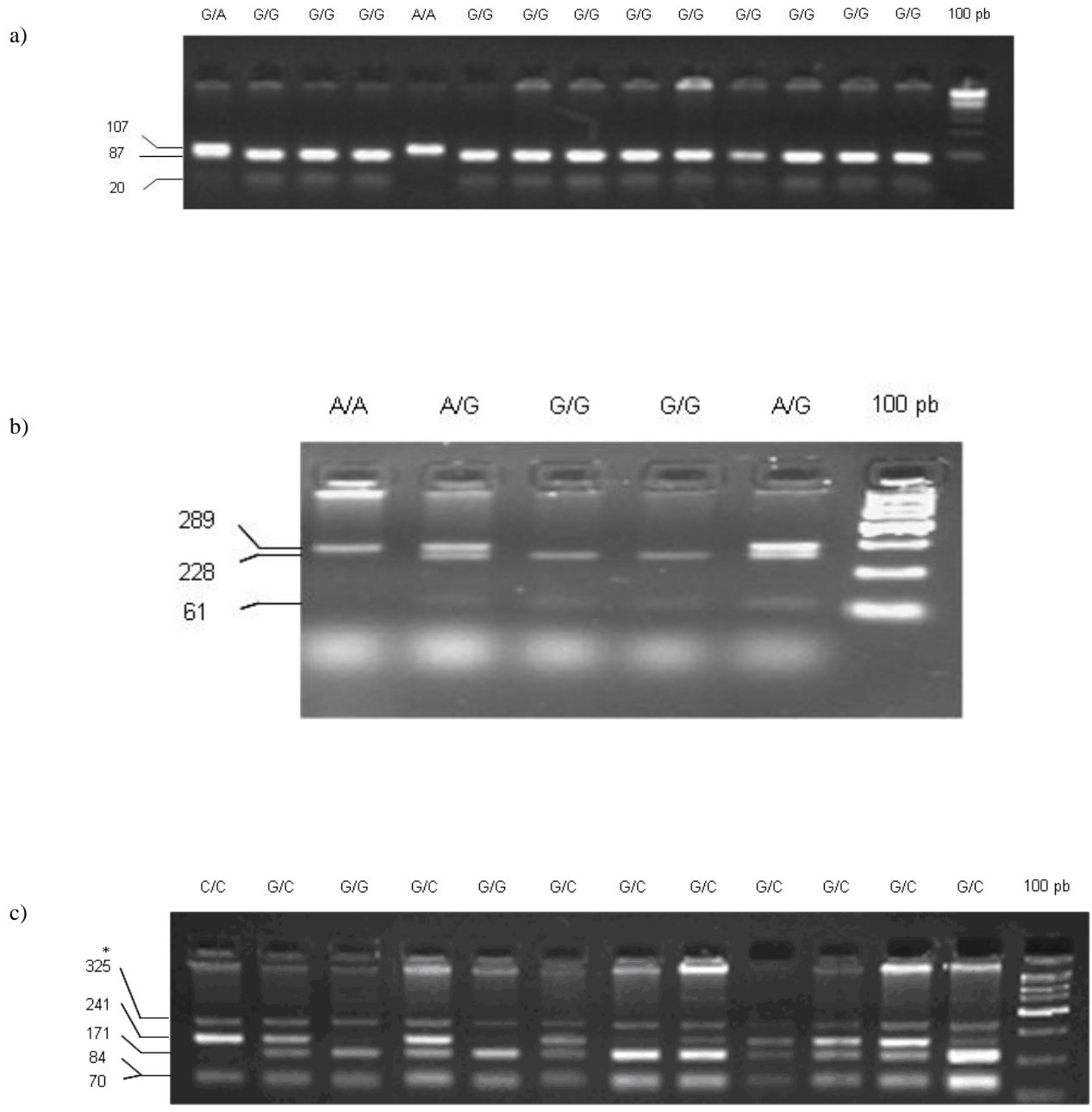
TNF y HSP70

Debido a que en los SNPs estudiados de los genes *TNF* y *HSP70* crean sitios de restricción, el polimorfismo bialélico de estos SNPs se tipificó mediante la técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), con las enzimas *NcoI* para los SNPs -308 de *TNF- α* , +252 de *TNF- β* y +2437 de *HSP70-HOM*, *BsrBI* para +190 de *HSP70-1* y *PstI* para +1267 de *HSP70-2* (Vargas *et al.* 2002) (Tabla 2).

Tabla 2. Patrones de restricción de los alelos en los SNPs de *TNF* y *HSP70*.

SNP	Producto de PCR (pb)	Enzima de restricción Alelos y patrón de restricción (pb)
<i>TNF-α</i> -308	107	<i>NcoI</i> G =87+20 A =107
<i>TNF-β</i> +252	289	<i>NcoI</i> A=289 G =228+61
<i>HSP70-1</i> +190	325	<i>BsrBI</i> G =171+84+70 C =241+84
<i>HSP70-2</i> +1267	1117	<i>PstI</i> A =1117 G =936+181
<i>HSP70-HOM</i> +2437	878	<i>NcoI</i> T =551+327 C =878

En todos los casos se utilizaron 5 U de enzima de restricción por muestra y se digirió a 37°C por seis horas. Los productos digeridos fueron corridos electroforéticamente en geles de agarosa al 2% (Figura 16).



* En este caso no se digiere completamente el producto de PCR de *HSP70-1* +190, por lo que en todas las muestras se presenta una banda de 325pb.

Figura 16. Geles de RFLP de los SNPs de *TNF* y *HSP70*.

Patrones de restricción del polimorfismo de *TNF-α* -308 (a), *TNF-β* +252 (b) y *HSP70-1* +190 (c).

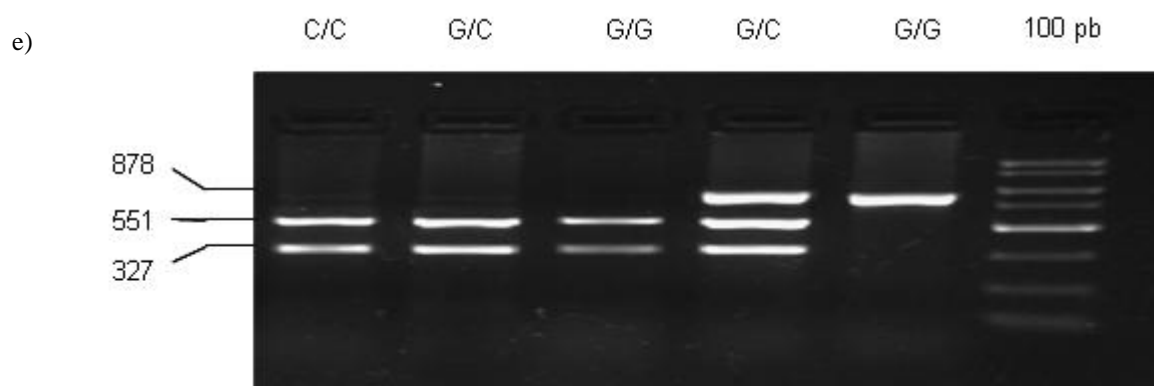
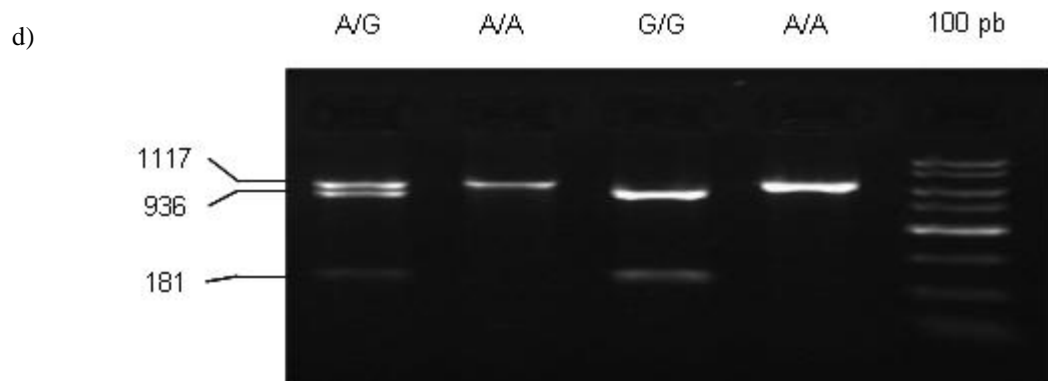


Figura 16 (cont). Geles de RFLP de los SNPs de *TNF* y *HSP70*.

Patrones de restricción del polimorfismo de *HSP70-2 +1267* (d) y *HSP70-HOM +2437* (e).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se tomaron en cuenta únicamente a los individuos positivos a *H. pylori*. Las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de los diferentes grupos se compararon con el grupo de asintomáticos. También se analizaron las combinaciones de genotipos de *MICA*, *TNF* y *HSP70*. Las diferencias fueron evaluadas estadísticamente mediante la prueba de χ^2 y la prueba exacta de Fisher (Matthews y Farewell 1985) con tablas de contingencia de 2x2 usando el programa estadístico STATA 9.0 (Stata Corporation College Station TX) tomando en cuenta un índice de confianza del 95% para estimar el riesgo (Matthews y Farewell 1985). De esta manera se determinó el valor de la (p), la cual se corrigió (pc) por el número de especificidades estudiadas (grupos de pacientes multiplicado por el número de alelos, haplotipos o combinaciones de genotipos) y se consideró como significativo un valor de $pc \leq 0.05$. La magnitud de la asociación se calculó usando la razón de momios (RM) y los intervalos de confianza del 95% fueron calculados. En las celdas con valor de cero, las razones de momios fueron estimadas con la prueba de Haldane. Las RM fueron corregidas por género y edad usando un modelo de regresión logística (Petri y Sabin 2000). Además se realizó un análisis de chi-cuadrada para buscar en las distribuciones de los genotipos posibles desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (Sham 2001). Finalmente, se calcularon las razones de momios para cada genotipo usando el genotipo homocigoto más frecuente de cada polimorfismo (excepto en *TNF α* -308, debido a datos insuficientes) como referencia. El efecto dosis-gene fue determinado con una prueba de tendencia lineal mediante una prueba de chi-cuadrada usando el programa estadístico Epidat 3.1 (Hervada *et al.* 2004) con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. La inferencia y el análisis de haplotipos se realizó con el programa Haploview 4.1 (Barret *et al.* 2005).

RESULTADOS

H. pylori y CagA

Se evaluó la infección por *H. pylori* por serología en los individuos asintomáticos y mediante histología y serología en los grupos de pacientes (Tabla 3).

Tabla 3. Características de los grupos estudiados

Grupo de diagnóstico	Pacientes estudiados n	Edad promedio años (+/-)	Género M/F	Serología	
				<i>H. pylori</i> n (%)	CagA n (%)
Asintomáticos	132	31.9 (8.59)	97/35	106 (80.3)	77 (58.3)
Gastritis no atrófica	228	47.9 (12.23)	75/153	172 (75.4)	148 (64.9)
Metaplasia intestinal	98	57.6 (13.31)	34/64	80 (81.6)	78 (79.6)
Cáncer gástrico	63	60.7 (13.31)	39/24	42 (66.7)	43 (68.2)
Úlcera duodenal	58	51.8 (12.42)	31/27	51 (87.9)	43 (74.1)
Todos los pacientes	447	52.3 (13.61)	179/268	345 (77.2)	312 (69.8)

Se observó una seropositividad del 80.3% en el grupo asintomático. En los pacientes el porcentaje fue similar, excepto en el grupo de cáncer gástrico, en el cual la infección por *H. pylori* disminuyó a 66.7% ($p=0.037$, RM=0.49, IC 95%=0.24-1.02). Al comparar la

seropositividad de CagA con los individuos asintomáticos, se encontró una mayor prevalencia en los pacientes con metaplasia intestinal ($p=0.00067$, $RM=2.79$, $IC\ 95\% =1.47-5.32$) y en úlcera duodenal ($p=0.0375$, $RM=2.05$, $IC\ 95\% =0.99-4.29$).

Polimorfismos genéticos

Contando los grupos de lesiones más el grupo de asintomáticos, se tipificaron 529 para el microsatélite de *MICA*, 477 para los alelos (exones 2, 3, 4 y 5) de *MICA*, 575 muestras para el SNP -308 de *TNF- α* , 571 para el +252 de *TNF- β* , 562 para el +190 de *HSP70-1*, 572 para el +1267 de *HSP70-2* y 535 para el +2437 de *HSP70-HOM* (Tabla 4).

Tabla 4. Número de muestras tipificadas.

	Asintomáticos n=132	Gastritis no Atrófica n=228	Metaplasia Intestinal n=98	Cáncer Gástrico n=63	Úlcera Duodenal n=58	Total muestras n=579
<i>MICA</i> GCT	128	209	87	53	52	529
<i>MICA</i> (alelo)	118	180	83	47	49	477
<i>TNF-α</i> SNP -308	132	225	98	62	58	575
<i>TNF-β</i> SNP +252	132	228	93	62	56	571
<i>HSP70-1</i> SNP +190	132	216	96	61	57	562
<i>HSP70-2</i> SNP +1267	132	225	96	61	58	572
<i>HSP70-HOM</i> SNP +2437	132	208	91	55	49	535

Debido a que estas enfermedades gastroduodenales están ligadas a la infección por *H. pylori*, el análisis de las frecuencias de estos polimorfismos se enfocó en individuos positivos a esta

bacteria (**Tabla 3**). Se hizo la comparación de las frecuencias de los polimorfismos de los pacientes tomando como referencia al grupo asintomático y al grupo de gastritis no atrófica.

MICA

En *MICA* se analizaron primero la región microsatelital y después los 4 exones juntos para determinar los alelos.

Microsatélites GCT de MICA

Del gene *MICA* se analizó el polimorfismo de su región microsatelital ubicada en el exón 5 y que codifica el dominio transmembranal de la molécula. De las ocho variedades de microsatélites reportadas basadas en el número de repeticiones de GCT (alanina) nombradas A4, A5, A5.1, A6, A7, A8, A9 y A10, en nuestra población de estudio se encontraron cinco, de los cuales el microsatélite A9 fue el más frecuente, seguido en orden decreciente por A5, A6, A5.1 y A4 (**Tabla 5**). Al comparar las frecuencias de los microsatélites entre pacientes y asintomáticos no hubo diferencias significativas en ningún grupo.

Tabla 5. Frecuencias de los microsatélites GCT de *MICA*.

Grupos (n)	Microsatélites				
	A4 n (%)	A5 n (%)	A5.1 n (%)	A6 n (%)	A9 n (%)
Asintomáticos (103)	12 (5.8)	52 (25.2)	22 (10.7)	37 (18.0)	83 (40.3)
Gastritis no atrófica (159)	13 (4.1)	93 (29.2)	46 (14.5)	50 (15.7)	116 (36.5)
Metaplasia intestinal (70)	6 (4.3)	37 (26.4)	12 (8.6)	30 (21.4)	55 (39.3)
Cáncer gástrico (36)	4 (5.6)	19 (26.4)	6 (8.3)	15 (20.8)	28 (38.9)
Úlcera duodenal (45)	5 (5.6)	30 (33.3)	11 (12.2)	17 (18.9)	27 (30.0)

No se encontraron diferencias significativas en las frecuencias de los microsatélites

Se analizaron los genotipos de los microsatélites de *MICA* y se encontraron 15 genotipos. El homocigoto A9/A9 y los heterocigotos A5/A9 y A6/A9 fueron los más frecuentes en todos los grupos (Tabla 6). Después de hacer las comparaciones de los genotipos entre pacientes y asintomáticos se encontró un aumento estadísticamente significativo del genotipo A5/A5 en gastritis no atrófica, que perdió significancia al corregir el valor de p ($p < 0.05$).

Tabla 6. Frecuencias genotípicas de los microsatélites GCT de *MICA*.

Grupos (n)	Genotipos de microsatélites				
	A5/A5 n (%)	A5/A6 n (%)	A5/A9 n (%)	A5.1/A5.1 n (%)	A9/A9 n (%)
Asintomáticos (103)	7 (6.8)	10 (9.7)	19 (18.4)	4 (3.9)	22 (21.4)
Gastritis no atrófica (159)	30 (18.9)	6 (3.8)	21 (13.2)	10 (6.3)	33 (20.7)
Metaplasia intestinal (70)	11 (15.7)	5 (7.1)	5 (7.1)	2 (2.9)	20 (28.6)
Cáncer gástrico (36)	2 (5.6)	7 (19.4)	5 (13.9)	0 (0.0)	9 (25.0)
Úlcera duodenal (45)	6 (13.3)	4 (8.9)	10 (22.2)	1 (2.2)	4 (8.9)

Alelos de MICA

Para poder determinar las variantes alélicas de *MICA* es necesario estudiar no sólo el microsatélite de su exón 5, sino también los cambios en las secuencias de sus demás exones. Por ello estudiamos mediante RSCA los exones 2, 3, 4 y 5 de *MICA*. Se encontraron seis alelos (*001, *002, *004, *008, *010 y *017), de los cuales el más frecuente fue el *MICA**002 (Tabla 7). Se hizo la comparación de las frecuencias alélicas de *MICA* entre pacientes y asintomáticos, y no se encontró ninguna diferencia significativa.

Tabla 7. Frecuencias (%) de los alelos de *MICA*

Grupos (n)	Alelos					
	001 n (%)	002 n (%)	004 n (%)	008 n (%)	010 n (%)	011 n (%)
Asintomáticos (96)	10 (5.2)	78 (40.6)	33 (17.2)	21 (10.9)	48 (25.0)	2 (1.1)
Gastritis no atrófica (139)	7 (2.5)	103 (37.1)	36 (12.9)	40 (14.4)	86 (30.9)	6 (2.2)
Metaplasia intestinal (67)	4 (3.0)	56 (41.8)	25 (18.7)	10 (7.5)	36 (26.9)	3 (2.2)
Cáncer gástrico (34)	2 (2.9)	27 (39.7)	14 (20.6)	6 (8.8)	19 (27.9)	0 (0.0)
Úlcera duodenal (42)	5 (5.9)	29 (34.5)	10 (11.9)	11 (13.1)	28 (33.3)	1 (1.2)

De los 18 diferentes genotipos encontrados de *MICA*, el más frecuente fue el 002/002, seguido por el 002/010 (Tabla 8). Al comparar las frecuencias de los genotipos en pacientes, se encontró un aumento significativo del genotipo 010/010 en el grupo de gastritis no atrófica que se perdió al hacer la corrección del valor de *p*.

Tabla 8. Frecuencias (%) de los principales genotipos de *MICA*

Grupos (n)	Genotipos				
	002/002 n (%)	002/010 n (%)	004/010 n (%)	008/008 n (%)	010/010 n (%)
Asintomáticos (96)	22 (23.0)	17 (17.7)	9 (9.4)	4 (4.17)	7 (7.3)
Gastritis no atrófica (139)	29 (20.9)	17 (12.2)	6 (4.3)	10 (7.2)	29 (20.9)
Metaplasia intestinal (67)	20 (29.9)	7 (10.5)	6 (9.0)	2 (3.0)	9 (13.4)
Cáncer gástrico (34)	8 (23.5)	6 (17.6)	6 (17.6)	0 (0.0)	2 (5.9)
Úlcera duodenal (42)	4 (9.5)	11 (26.2)	1 (2.4)	1 (2.4)	6 (14.3)

En la tabla sólo se muestran los genotipos más representativos de *MICA*

TNF- α SNP -308 (G \rightarrow A)

En el SNP -308 de *TNF- α* , hubo una mucho mayor frecuencia del alelo G (91.5%) en comparación con el alelo A (8.5%) en el grupo de asintomáticos (Tabla 9). En general se presentan frecuencias parecidas en los grupos de pacientes aunque con un ligero aumento progresivo de la frecuencia del alelo A sin llegar a ser estadísticamente significativo.

Tabla 9. Frecuencias (%) de los alelos y genotipos de *TNF- α* -308

Grupos (n)	Alelos		Genotipos			G/A pC* RM (95% IC)
	G	A	G/G	G/A	A/A	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Asintomáticos (106)	195 (92.0)	17 (8.0)	96 (90.6)	3 (2.8)	7 (6.6)	
Gastritis no atrófica (169)	323 (95.6)	15 (4.4)	156 (92.3)	11 (6.5)	2 (1.2)	
Metaplasia Intestinal (80)	145 (90.6)	15 (9.3)	65 (81.3)	15 (18.7)	0 (0.0)	0.0036 2.44 (0.32-18.15)
Cáncer gástrico (42)	75 (89.3)	9 (10.7)	33 (78.6)	9 (21.4)	0 (0.0)	0.0024 10.07 (1.14-88.96)
Úlcera duodenal (51)	89 (87.3)	13 (12.7)	38 (74.5)	13 (25.5)	0 (0.0)	0.00012 21.82 (3.06-155.39)

* Las comparaciones fueron hechas con el grupo asintomático como referencia. Los valores de RM fueron ajustados por edad y género.

RM=razón de momios, IC=intervalo de confianza, pC=corregida

Cuando se comparan los genotipos, el genotipo G/A aumentó significativamente su frecuencia ($p < 0.05$) en los pacientes de forma progresiva con las enfermedades, y esta diferencia fue estadísticamente significativa en metaplasia intestinal, cáncer gástrico y úlcera duodenal (Tabla 9).

Tanto en alelos como genotipos no hubo diferencias al comparar los pacientes contra el grupo de gastritis no atrófica. En el caso del SNP -308 *TNF- α* no fue posible realizar un estudio de tendencia, debido a que en algunas casillas el valor de las frecuencias fue cero.

TNF-β SNP +252 (A → G)

Los alelos A y G resultaron tener una frecuencia muy similar en asintomáticos. Cuando se comparó con pacientes, se encontró una asociación entre el alelo A y el cáncer gástrico, con un incremento de su frecuencia hasta de 76.2% en estos pacientes. Esta diferencia resultó tener significancia estadística ($p < 0.05$), aumentando el riesgo en más de cinco veces [RM=5.69 (1.88-17.19)] (Tabla 10).

Tabla 10. Frecuencias (%) de los alelos de *TNF-β* +252

Grupos (n)	Alelos		A pC RM (95% IC)
	A n (%)	G n (%)	
Asintomáticos (106)	116 (54.7)	96 (45.3)	
Gastritis no atrófica (172)	222 (64.5)	122 (35.5)	
Metaplasia Intestinal (75)	85 (56.7)	65 (43.3)	
Cáncer gástrico (42)	64 (76.2)	20 (23.8)	0.016 5.69 1.88-17.19
Úlcera duodenal (50)	65 (65.0)	35 (35.0)	

* Las comparaciones fueron hechas con el grupo asintomático como referencia. Los valores de RM fueron ajustados por edad y género.

RM=razón de momios, IC=intervalo de confianza, pC=corregida

En los genotipos se observó una asociación entre el genotipo A/G y gastritis no atrófica, cáncer y úlcera. Mientras que el genotipo G/G tuvo una menor frecuencia ($p < 0.05$) en pacientes con cáncer gástrico (2.4%) y úlcera duodenal (4.0%) comparada con individuos asintomáticos (8.5%) (Tabla 11).

El análisis de tendencia lineal de las frecuencias de los genotipos de este SNP (Tabla 11) mostró una tendencia significativa al hacer las comparaciones tomando como referencia el homocigoto

A/A. Esto indica que existe un efecto de dosis génica del alelo G de *TNF-β* SNP +252 que contribuye en la protección al desarrollo de cáncer gástrico y úlcera duodenal.

Tabla 11. Frecuencias (%) de los genotipos de *TNF-β* +252

Grupos (n)	Genotipos					Tendencia <i>p</i>
	A/A	A/G	RM	G/G	RM	
	n (%)	n (%)	(95% IC)	n (%)	(95% IC)	
Asintomáticos (106)	19 (17.9)	78 (73.6)		9 (8.5)		
Gastritis no atrófica (172)	66 (38.4)	90 (52.3)	0.33 (0.18-0.60)	16 (9.3)	0.51 (0.19-1.34)	0.0072
Metaplasia Intestinal (75)	20 (26.7)	45 (60.0)	0.55 (0.26-1.13)	10 (13.3)	1.06 (0.35-3.16)	0.6425
Cáncer gástrico (42)	23 (54.8)	18 (42.9)	0.19 (0.09-0.42)	1 (2.4)	0.09 (0.01-0.79)	0.0000
Úlcera duodenal (50)	17 (34.0)	31 (62.0)	0.44 (0.20-0.96)	2 (4.0)	0.25 (0.05-1.31)	0.0228

* Las comparaciones fueron hechas con el genotipo A/A como referencia.

RM=razón de momios, IC=intervalo de confianza, pC=corregida

HSP70-1 SNP+190 (G → C)

En el polimorfismo en *HSP70-1*, encontramos una frecuencia del alelo G del 75.0% y el alelo C de 25.0% en los asintomáticos. Cuando se comparan estas frecuencias con las observadas en los pacientes, se encuentra un aumento estadísticamente significativo ($pc \leq 0.05$) del alelo C en todos los grupos de lesiones (Tabla 12).

Tabla 12. Frecuencias (%) de alelos de *HSP70-1* +190

Grupo (n)	Alelos		Alelo C
	G	C	pC^* RM (95% IC)
Asintomáticos (106)	159 (75.0)	53 (25.0)	
Gastritis no atrófica (163)	198 (60.7)	128 (39.3)	0.0048 1.92 (1.14–3.21)
Metaplasia intestinal (78)	88 (56.4)	68 (43.6)	0.0016 3.13 (1.36–7.19)
Cáncer Gástrico (42)	45 (53.6)	39 (46.4)	0.0024 3.76 (1.46–9.65)
Úlcera duodenal (50)	53 (53.0)	47 (47.0)	0.0008 3.08 (1.44–6.62)

* Las comparaciones fueron hechas con el grupo asintomático como referencia. Los valores de RM fueron ajustados por edad y género.

RM=razón de momios, IC=intervalo de confianza.

En los genotipos, el heterocigoto G/C es significativamente más frecuente en metaplasia intestinal (61.5%), en cáncer gástrico (88.1%) y en úlcera duodenal (90.0%) en comparación con los asintomáticos (38.7%) (Tabla 13). Incluso el incremento es también significativo en el grupo de cáncer gástrico ($pc \leq 0.05$, RM=9.19, IC 95% 3.81-23.22) y úlcera duodenal ($pc \leq 0.05$, RM=8.51, IC 95% 3.51-21.58) comparado con gastritis no atrófica (44.2%)

Tabla 13 Frecuencias (%) de genotipos de *HSP70-1* +190

Grupos (n)	Genotipos					Tendencia <i>P</i> *
	G/G	G/C	RM	C/C	RM	
	n (%)	n (%)	(95% IC)	n (%)	(95% IC)	
Asintomáticos (106)	59 (55.7)	41 (38.7)		6 (5.7)		
Gastritis no atrófica (163)	63 (38.7)	72 (44.2)	1.64 (0.98-2.77)	28 (17.2)	4.37 (1.69-11.30)	0.0009
Metaplasia Intestinal (78)	20 (25.6)	48 (61.5)	3.45 (1.79-6.66)	10 (12.8)	4.91 (1.58-15.25)	0.0001
Cáncer gástrico (42)	4 (9.5)	37 (88.1)	13.31 (4.40-40.22)	1 (2.4)	2.46 (0.23-25.69)	0.000
Úlcera duodenal (50)	4 (8.0)	45 (90.0)	16.19 (5.40-48.51)	1 (2.0)	2.46 (0.23-25.69)	0.000

* Las comparaciones fueron hechas con el genotipo G/G como referencia.

RM=razón de momios, IC=intervalo de confianza, pC=corregida

HSP70-2 SNP +1267 (A → G)

El alelo A en asintomáticos presentó una frecuencia de 53.8%, mientras que el alelo G el restante 46.2%. En cuanto a las frecuencias genotípicas, el genotipo heterocigoto A/G fue el más frecuente con 54.7%, seguido por el homocigoto A/A con 26.4% y el otro homocigoto (G/G) con 18.9%. Al comparar con los diferentes grupos de pacientes se observaron frecuencias similares tanto de alelos como de genotipos, sin presentarse diferencias significativas (Tabla 14).

Tabla 14. Frecuencias (%) de alelos y genotipos de *HSP70-2* +1267

Grupos (n)	Alelos			Genotipos	
	A	G	A/A	A/G	G/G
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Asintomáticos (106)	114 (53.8)	98 (46.2)	28 (26.4)	58 (54.7)	20 (18.9)
Gastritis no atrófica (170)	186 (54.7)	154 (45.3)	53 (31.2)	80 (47.1)	37 (21.8)
Metaplasia Intestinal (78)	80 (51.3)	76 (48.7)	20 (25.6)	40 (51.3)	18 (23.1)
Cáncer gástrico (41)	40 (48.8)	42 (51.2)	10 (24.4)	20 (48.8)	11 (26.8)
Úlcera duodenal (51)	52 (51.0)	50 (49.0)	12 (23.5)	28 (54.9)	11 (21.6)

HSP70-HOM SNP +2437 (T → C)

Las frecuencias de *HSP70-HOM* son las siguientes: T=92.9%, C=7.1%, T/T=86.8%, T/C=12.3% y C/C=0.9%. Al compararlas con los grupos de pacientes no se encontraron diferencias significativas (Tabla 15).

Tabla 15. Frecuencias (%) de alelos y genotipos de *HSP70-HOM* +2437

Grupos (n)	Alelos		Genotipos		
	T	C	T/T	T/C	C/C
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Asintomáticos (106)	197 (92.9)	15 (7.1)	92 (86.8)	13 (12.3)	1 (0.9)
Gastritis no atrófica (157)	298 (94.9)	16 (5.1)	141 (89.8)	16 (10.2)	0 (0.0)
Metaplasia Intestinal (74)	142 (95.9)	6 (4.1)	68 (91.9)	6 (8.1)	0 (0.0)
Cáncer gástrico (37)	71 (95.9)	3 (4.1)	34 (91.9)	3 (8.1)	0 (0.0)
Úlcera duodenal (43)	82 (95.4)	4 (4.6)	40 (93.0)	2 (4.7)	1 (2.3)

Haplotipos

Se realizaron los análisis de los haplotipos de *TNF* (β - α), de *HSP70* (*HOM-1-2*) y *TNF-HSP70* mediante el programa Haploview. Se compararon los grupos de pacientes y todos los pacientes juntos contra el grupo asintomático.

De acuerdo a su posición en el cromosoma 6, los SNPs fueron ordenados de la siguiente manera: *TNF- β* +252 (rs909253), *TNF- α* -308 (rs1800629), *HSP70-HOM* +2437 (rs2227956), *HSP70-1* +190 (rs1043618), y *HSP70-2* +1267 (rs1061581).

Haplotipos de *TNF*

Al comparar las frecuencias de los haplotipos *TNF- β* – *TNF- α* , se registró el aumento de la frecuencia del haplotipo A – G en el grupo de cáncer gástrico (69.1%) con respecto a los asintomáticos (52.7%), con un valor de *p* de 0.0072. No se encontró ninguna otra asociación con los grupos de pacientes, sin embargo, al comparar todos los pacientes juntos, se volvió a encontrar una mayor frecuencia (*p*=0.0213) del haplotipo A – G (61.7%) en comparación con los asintomáticos (52.9%).

Haplotipos de *HSP70*

Al analizar los haplotipos *HSP70-HOM* - *HSP70-1* - *HSP70-2*, se observó un incremento de la frecuencia del haplotipo T – C – G en los grupos de cáncer gástrico (32.4%, *p*=0.0107) y úlcera duodenal (31.2%, *p*=0.0201), al compararlos con los asintomáticos (19.1%). Al agrupar a todos los pacientes, también hubo una diferencia significativa de este haplotipo (27.3%, *p*=0.0099).

Haplotipos de *TNF* y *HSP70*

Finalmente, los haplotipos *TNF- β* – *TNF- α* - *HSP70-HOM* - *HSP70-1* - *HSP70-2* fueron analizados. Se observó que el haplotipo A – G – T – C – A fue más frecuente en los grupos de pacientes que en asintomáticos, cuya frecuencia fue de 5.5%. En gastritis no atrófica tuvo una frecuencia de 13.7% (*p*=0.0023), en metaplasia intestinal de 16.3% (*p*=0.0031), en cáncer gástrico de 19.9% (*p*=0.0063), en úlcera duodenal de 11.2% (*p*=0.0259) y en todos los grupos de pacientes juntos de 13.6% (*p*=0.0017).

Combinaciones de genotipos de *MICA*, *TNF* y *HSP70*

Se compararon las combinaciones de los genotipos estudiados de *TNF- α* y *TNF- β* , y se encontró que la combinación -308 G/G y +252 A/A fue significativamente más frecuente (RM 10.41; 95% IC 2.79-38.81) en pacientes con cáncer gástrico (44.3%) que en el grupo de asintomáticos (17.0%). Asimismo, la combinación -308 G/G y +252 A/G fue significativamente menos frecuente en pacientes con cáncer gástrico (27.9%, RM 0.05; 95% IC 0.01-0.23) y úlcera duodenal (22%, RM 0.20; 95% IC 0.08-0.52) en comparación con los asintomáticos (66%) (Tabla 16).

Tabla 16. Frecuencias de las combinaciones de genotipos de los SNPs de *TNF* en pacientes con enfermedades gastroduodenales.

Grupos (n)	<i>TNFα-TNFβ</i>	
	G/G – A/A	G/G – A/G
	n (%) <i>pC</i> , RM (95% IC)*	n (%) <i>pC</i> , RM (95% IC)*
Asintomáticos (100)	17 (17.0)	66 (66.0)
Gastritis no atrófica (225)	91 (40.4) 0.108, 2.69 (1.39-5.23)	102 (45.3) 0.108, 0.42 (0.24-0.74)
Metaplasia intestinal (93)	18 (19.3) 34.128, 1.04 (0.31–3.55)	49 (52.7) 4.32, 0.49 (0.19–1.20)
Cáncer gástrico (61)	27 (44.3) 0.0036, 10.41 (2.79–38.81)	17 (27.9) 0.0036, 0.05 (0.01-0.23)
Úlcera duodenal (56)	18 (32.1) 1.08, 3.18 (1.21–9.02)	22 (39.3) 0.036, 0.20 (0.08-0.52)

* Las comparaciones fueron hechas con el grupo asintomático como referencia.

RM=razón de momios, IC=intervalo de confianza

También se contrastaron las combinaciones de genotipos de *HSP70-1* - *HSP70-2* - *HSP70-HOM*, y se encontró que la combinación G/G – A/G – T/T, estuvo ausente en pacientes con cáncer gástrico (RM 0.06; 95% IC 0.00-0.45), mientras que su frecuencia en los otros grupos fue de

23.0% en asintomáticos, 12.5% en gastritis no atrófica, 13.3% en metaplasia intestinal y 4.1% en úlcera duodenal (Tabla 17).

Tabla 17. Frecuencias de las combinaciones de genotipos de los SNPs de *HSP70* en pacientes con enfermedades gastroduodenales.

Grupos (n)	<i>HSP70-1 – HSP70-2 – HSP70-HOM</i>	
	G/G – A/G – T/T	n (%)
	<i>pC, RM (95% IC)*</i>	
Asintomáticos (100)	23 (23.0)	
Gastritis no atrófica (200)	25 (12.5) 2.808, 0.41 (0.19-0.90)	
Metaplasia intestinal (90)	12 (13.3) 4.32, 0.30 (0.09-0.94)	
Cáncer gástrico (55)	0 (0.0) 0.0108, 0.00 (0.00-0.00)	
Úlcera duodenal (49)	2 (4.1) 1.944, 0.127 (0.023-0.699)	

* Las comparaciones fueron hechas con el grupo asintomático como referencia.

RM=razón de momios, IC=intervalo de confianza

Al analizar las combinaciones de genotipos de *MICA - TNF - HSP70*, se encontraron 206 combinaciones diferentes. Se compararon las frecuencias de estas combinaciones en los grupos de pacientes y se observó un aumento de la frecuencia de la combinación 00201/00201 - G/G - G/A - G/C - A/G - T/T en pacientes con metaplasia intestinal y cáncer gástrico. Asimismo, hubo un incremento de la combinación 00201/010 - G/G - G/A - G/C - G/G - T/T en úlcera duodenal (Tabla 18). Por otra parte la combinación 00201/00201 - G/G - G/A - G/G - A/G - T/T fue menos frecuente en gastritis no atrófica y metaplasia intestinal (Tabla 18). Al corregir el valor de *p* las significancias estadísticas se perdieron.

Tabla 18. Frecuencias de las combinaciones de genotipos de los alelos de MICA y los SNPs de *TNF* y *HSP70* en pacientes con enfermedades gastroduodenales.

Grupos (n)	MICA - TNFα-TNFβ - HSP70-1 - HSP70-2 - HSP70-HOM		
	00201/00201 - G/G - G/A -	00201/00201 - G/G - G/A -	00201/010 - G/G - G/A -
	G/C - A/G - T/T	G/G - A/G - T/T	G/C - G/G - T/T
	n (%)	n (%)	n (%)
	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
RM (95% IC)*	RM (95% IC)*	RM (95% IC)*	
Asintomáticos (98)	0 (0.0)	6 (6.1)	1 (1.0)
Gastritis no atrófica (141)	2 (1.4) 0.347 1.40 (0.10-39.44)	1 (0.7) 0.020 0.11 (0.00-0.94)	0 (0.0) 0.41 0.69 (0.02-25.67)
Metaplasia intestinal (69)	8 (11.6) 0.0006 12.72 (1.55-277.85)	0 (0.0) 0.038 0.23 (0.01-1.96)	1 (1.4) 1.00 1.430 (0.00-53.22)
Cáncer gástrico (37)	4 (10.8) 0.004 11.76 (1.17-286.55)	0 (0.0) 0.140 0.43 (0.02-3.80)	1 (2.7) 0.474 2.69 (0.00-101.74)
Úlcera duodenal (43)	1 (2.3) 0.304 2.31 (0.00-86.89)	0 (0.0) 0.107 0.37 (0.02-3.23)	4 (9.3) 0.030 9.95 (1.00-241.42)

* Las comparaciones fueron hechas con el grupo asintomático como referencia.

RM=razón de momios, IC=intervalo de confianza.

Metaplasias completa e incompleta

Las frecuencias de los alelos y genotipos de *MICA*, *TNF* y *HSP70* fueron comparados dividiendo el grupo de metaplasia intestinal en casos con metaplasia intestinal completa (MIC, n=62) y metaplasia colónica incompleta (MCI, n=36) (Tabla 19). Cuando los dos tipos de metaplasia se compararon contra el grupo asintomáticos, los genotipos G/A de *TNF-α* -308, G/G de *TNF-β* +252 y G/C de *HSP70-1* +190 aumentaron su frecuencia de forma significativa en MCI (RM de 4.59, 4.98 y 2.67, respectivamente), y no con MIC. Más aún, se encontraron diferencias en estos SNPs al comparar los pacientes con MIC contra pacientes con MCI: en MCI se presentaron aumentos en las frecuencias de los genotipos G/G de *TNF-β* +252 (27.3% vs 6.7%; RM 5.25, 95% IC 1.3-22.78) y G/G de *HSP70-2* +1267 (37.1% vs 14.7%; RM 3.41, 95% IC 1.15-10.29). No se observaron diferencias con los microsatélites y los alelos de *MICA*.

Tabla 19. Frecuencias (%) de los genotipos de *TNF* y *HSP70* en metaplasias completa e incompleta

Grupos (No.)	<i>TNF-α</i> -308 G/A % RM (95% IC)	<i>TNF-β</i> +252 G/G % RM (95% IC)	<i>HSP70-1</i> +190 C/G % RM (95% IC)	<i>HSP70-2</i> +1257 G/G % RM (95% IC)	<i>HSP70-HOM</i> +2437 T/T % RM (95% IC)
Asintomáticos (100)	5.0	7.0	45.0	21.0	87.0
Metaplasia Intestinal Completa (62)	16.1	6.7	62.3	14.7	93.4
Metaplasia Colónica Incompleta (36)	19.4* 4.59 (1.19-18.29)	27.3* 4.98 (1.5-16.85)	68.6* 2.67 (1.10-6.54)	37.1 2.22 (0.89-5.57)	86.7

Las comparaciones fueron hechas contra el mismo alelo o genotipo en el grupo asintomático.

*p corregida < 0.05

RM=razón de momios, IC=intervalo de confianza

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La seropositividad a *H. pylori* del grupo asintomático fue del 80.3%. Este resultado es similar a lo reportado en población mexicana (Torres *et al.* 1998a). En los grupos de pacientes el porcentaje de positividad a *H. pylori* fue semejante y sólo hubo diferencia en los pacientes con cáncer gástrico, los que presentaron una frecuencia menor ($p=0.037$). *H. pylori* solo es capaz de colonizar epitelio gástrico normal. Si hay daño en la mucosa, por ejemplo una lesión preneoplásica, la colonización de *H. pylori* normalmente tiende a desaparecer. Lo anterior alteraría las pruebas de diagnóstico, en especial las que detectan la memoria de la infección, ya que la respuesta humoral mostraría un decaimiento gradual (Camorlinga *et al.* 2008), lo que explicaría la disminución de la seropositividad a *H. pylori* en los grupos de pacientes.

Al comparar la seroprevalencia de CagA, ésta fue mayor en metaplasia intestinal ($p=0.0006$) y en úlcera duodenal ($p=0.0375$) en comparación con los asintomáticos. Esta observación ha sido reportada previamente en México (Torres *et al.* 1998b; López-Carrillo *et al.* 2004) y en otras poblaciones (Ekström *et al.* 2001). Aunque sigue siendo un tema sin resolver, se ha discutido que en el cáncer, la colonización de *H. pylori* disminuye y la respuesta humoral a la mayoría de antígenos desaparece, mientras que los anticuerpos contra CagA persisten por más tiempo. Debido a que la infección persistente por *H. pylori* es una de las principales causas del cáncer gástrico y la úlcera duodenal, en este estudio únicamente se tomaron en cuenta los individuos positivos a *H. pylori* para el análisis de las asociaciones con los polimorfismos genéticos.

En este estudio se encontró una ligera asociación del genotipo A5/A5 de *MICA* con gastritis no atrófica que no se mantuvo al realizar la corrección del valor de p . Este resultado contrasta con lo reportado por Lo *et al.* (2004), dónde encontraron una asociación de susceptibilidad del microsatélite A9 con cáncer gástrico en Taiwán, mientras que en nuestra población este microsatélite es muy frecuente y no se observó diferencias significativas en sus frecuencias entre pacientes y asintomáticos.

No sólo existe polimorfismo en la región microsatelital de *MICA* ubicada en el exón 5, por lo que para conocer el alelo se requiere estudiar también los exones 2, 3 y 4 del gene (Perez-Rodriguez *et al.* 2002). Hasta dónde se sabe, éste es el primer trabajo realizado acerca de la susceptibilidad de estas enfermedades y el polimorfismo en los exones 2, 3, 4 y 5 de *MICA*. Se encontró que el

alelo y el genotipo más frecuente en individuos asintomáticos son el *002 y su homocigoto 002/002, respectivamente. En los grupos de pacientes se encontró un aumento significativo del genotipo 010/010 en el grupo de gastritis no atrófica; ésto corrobora lo encontrado al estudiar los microsatélites de *MICA*, ya que el alelo *010 tiene cinco repeticiones de alanina. Sin embargo, nuevamente se perdió la significancia al hacer la corrección del valor de p .

La pérdida de la significancia estadística en las asociaciones de *MICA* se produjo por la corrección rigurosa del valor de p . Esto puede ser un indicio de que probablemente sí existan asociaciones del polimorfismo de *MICA* con estas enfermedades, pero que con el tamaño de muestra estudiado no fue posible descubrirlas, por lo que estudios con números de muestras mayores podrían proporcionar conclusiones más contundentes.

En el cáncer gástrico se esperaba una diferencia de la frecuencia del alelo*00801. Esto se debe a que este alelo se asocia con el desarrollo de células tumorales porque su microsatélite A5.1 tiene una inserción de un nucleótido que produce un codón de paro prematuro; al convertir a *MICA* en una molécula soluble, bloquea la unión con el receptor NKG2D de células NK, CD8+ $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, generando un sistema de evasión de la respuesta inmune contra el tumor (Groh *et al.* 2002). No obstante, en general se observaron frecuencias de alelos y genotipos semejantes con los grupos asintomáticos y de gastritis no atrófica, sugiriendo que en cáncer gástrico, este modelo quizá no sea tan relevante en población mestiza mexicana.

La familia de genes *MIC* fue considerada alguna vez que cumplía con los cinco criterios de los genes de clase I no clásicos (en comparación con los genes clásicos): i) disimilitud de secuencia, ii) distribución tisular aleatoria, iii) presencia de pseudogenes, iv) polimorfismo reducido y v) diferencias en funcionalidad (Klein y O’Hugin 1994). Sin embargo, ahora se sabe que *MICA*, como miembro de esta familia, es el más polimórfico de los genes de clase I no clásicos. El extenso polimorfismo de *MICA* sigue siendo un tema que aún no ha sido resuelto y permanece sin conocerse a ciencia cierta su significancia en procesos fisiológicos y patológicos. Existen dos principales teorías para el surgimiento del polimorfismo de *MICA*. La primera, tal como ha ocurrido con los genes HLA de clase I (Stephens 2001), es que el polimorfismo ha sido generado por selección natural “superdominante”, que favorece la heterocigocidad, lo que confiere ventajas funcionales (Penn *et al.* 2002). Debido a que no se han encontrado fuertes asociaciones del polimorfismo de *MICA* con susceptibilidad a infecciones y enfermedades, ha surgido la segunda

teoría, que es que la diversidad de *MICA* es consecuencia de un fenómeno de “*hitchhiking*” por la diversificación de genes en la vecindad (Shiina *et al.* 2006).

Recientemente, Choy y Phipps (2003 y 2010), analizaron secuencias de 821 nucleótidos que comprenden los exones 2-4 de los 65 alelos de *MICA*. Al construir un árbol filogenético han encontrado la presencia de dos linajes principales, el linaje I (LI) agrupa 36 alelos y el LII 29 variantes. Las cuatro posiciones variables que distinguen estos dos linajes son 684, 685, 697 y 713 del exón 4 que codifica el dominio $\alpha 3$. De manera interesante, este dominio está relacionado con el fenómeno de shedding que se presenta en la molécula de *MICA* en el que en la superficie de células tumorales, el dominio $\alpha 3$ de *MICA* forma un complejo con la proteína 5 del retículo endoplásmico (ERp5) para inducir un cambio conformacional que permite el corte proteolítico de *MICA* por las proteasas ADAM (Kaiser *et al.* 2007). La molécula de *MICA* soluble, entonces interactúa con NKG2D, lo que a su vez induce la internalización y degradación del receptor y estimula la expansión de células T CD4⁺NKG2D⁺ inmunosupresoras (Groh *et al.* 2002) permitiendo la evasión inmune por parte de las células tumorales. Teóricamente, las moléculas de *MICA* LI son menos susceptibles a ser cortadas, por lo que sería interesante hacer un análisis de los alelos LI y LII de *MICA* y su posible asociación con el desarrollo de las lesiones gastroduodenales ocasionadas por la infección crónica de *H. pylori*.

El polimorfismo -308 en la región promotora de *TNF- α* ha sido relacionado con un cambio en la actividad transcripcional de este gene (Bouma *et al.* 1996, Kroeger *et al.* 1997, Wilson *et al.* 1997, Louis *et al.* 1998). De hecho el alelo A se ha asociado con una alta producción de *TNF- α* *in vitro* (Louis *et al.* 1998, Hajeer y Hutchinson 2001). En el presente trabajo no se encontró asociación del alelo A con cáncer a diferencia de lo reportado en otros estudios (Zhang *et al.* 2008). Por ejemplo, en población coreana se ha encontrado una asociación entre el SNP -308 de *TNF- α* con la infección por *H. pylori* reportándose que el alelo A está vinculado con la susceptibilidad a la infección por cepas CagA⁺ (Yea *et al.* 2001).

En el presente estudio se encontró un aumento de la frecuencia del genotipo heterocigoto G/A de acuerdo a la severidad de la lesión, aumentando el riesgo en metaplasia intestinal y cáncer gástrico en más de dos y diez veces, respectivamente; insinuando un gradiente en el riesgo de lesiones preneoplásicas a cáncer gástrico. El genotipo G/A también estuvo asociado con úlcera duodenal, con un aumento del riesgo de 21 veces, lo que sugiere que este polimorfismo es un

factor de riesgo para ambas enfermedades gastroduodenales. Estos resultados ubican al SNP *TNF- α* -308 como un factor de riesgo para el desarrollo de las lesiones gastroduodenales asociadas a *H. pylori* en México. Lo anterior correlaciona con el resultado de Li *et al.* (2005), en el que en población china, la frecuencia del genotipo heterocigoto de *TNF- α* A/G en pacientes infectados con *H. pylori* y con cáncer gástrico es significativamente mayor que en controles positivos para la infección sin cáncer. No obstante es interesante notar que en un estudio realizado en población de Monterrey, Nuevo León, Garza-González y colaboradores (2005), analizaron el polimorfismo de varias citocinas en pacientes con cáncer gástrico, sin encontrar ninguna asociación con *TNF- α* -308.

La diferencia entre los resultados del presente estudio y reportes previos pueden deberse en parte, a que la población de México es diversa genéticamente (Gorodezky *et al.* 2001). Alternativamente, el tamaño de la población estudiada (en el presente trabajo se analizaron muestras considerablemente más grandes) o diferencias en la metodología pudieran explicar las diferencias. Además, los resultados de las asociaciones de *TNF- α* -308 con cáncer gástrico o úlcera duodenal tienden a variar entre las poblaciones. Mientras que en algunas poblaciones como Colombia (Torres *et al.* 2004), Hungría (Gyulai *et al.* 2004), China (Li *et al.* 2005), Corea (Kim *et al.* 2006) y Japón (Sugimoto *et al.* 2007) no encuentran ninguna asociación, en otras sí se han observado asociaciones (Zambon *et al.* 2005). Más aún, en meta-análisis recientes (principalmente en poblaciones caucásicas), se han reportado la asociación significativa del alelo A de *TNF- α* -308 (Zhang *et al.* 2008) y del genotipo A/A (Gorohui *et al.* 2008) con cáncer gástrico.

Un exceso de *TNF- α* podría originar una inflamación más severa en la mucosa gástrica, aumentando de esta manera el riesgo para el desarrollo de tanto el cáncer gástrico como de la úlcera duodenal, tal como se encontró en este estudio, sugiriendo que este SNP es un factor de susceptibilidad para enfermedades causadas por daño inflamatorio de larga duración en la mucosa gastroduodenal.

La presencia del alelo *TNF- β* +252 A, se ha asociado con un incremento de los niveles de mRNA y proteína de *TNF- β* (Messer *et al.* 1991). Además, algunos estudios han encontrado que este alelo se asocia con una mayor producción de *TNF- α* tanto *in vitro* como *in vivo* y una mayor

cantidad de esta citocina en plasma (Stuber *et al.* 1996). Un aumento en la producción de TNF podría exponer a la mucosa gástrica a un mayor daño celular.

Los resultados de *TNF-β* +252 mostraron un incremento estadísticamente significativo del alelo A en cáncer gástrico con una razón de momios de 5.69, indicando una fuerte asociación de susceptibilidad. El alelo A no fue observado como factor de riesgo para úlcera duodenal, lo que sugiere que este SNP favorece el desarrollo de lesiones neoplásicas gástricas más severas. Estos resultados en conjunto hacen suponer que el polimorfismo de *TNF-β* no solo está implicado en el fenómeno inflamatorio, sino que es un marcador de susceptibilidad al desarrollo del cáncer gástrico en nuestra población. A su vez, se observó una disminución significativa del genotipo G/G con una razón de momios de 0.09 y 0.25 en cáncer gástrico y úlcera duodenal, respectivamente, indicando una fuerte asociación de protección contra estas enfermedades. Más aún, el análisis de tendencia lineal mostró un importante efecto de dosis gene con el alelo G, lo que muestra que los individuos homocigotos para el alelo G son mucho más resistentes al cáncer gástrico que los que sólo tienen una copia del alelo. El SNP *TNF-β* +252 ha sido estudiado principalmente en Asia. Un estudio en población China reportó la asociación del genotipo A/G con susceptibilidad al desarrollo de cáncer gástrico en individuos infectados con *H. pylori* (Li *et al.* 2005), lo que está de acuerdo con los resultados del presente trabajo. Estudios en otras poblaciones no han reportado asociaciones con cáncer gástrico (Seno *et al.* 2007).

En conjunto, estas evidencias muestran que los SNPs de *TNF* podrían estar influenciando las enfermedades gastroduodenales relacionadas a *H. pylori*, y que las diferencias en las asociaciones de alelos y genotipos pueden deberse a las diferencias del fondo genético entre las poblaciones.

El gene de *HSP70-1* se expresa de forma constitutiva en bajos niveles, pero en condiciones de estrés aumenta su expresión (Milner y Campbell 1990). Se ha reportado la sobreproducción de HSP70 en adenocarcinomas de tipo intestinal (Canoz *et al.* 2002) y en otros tipos de tumores (Kawanishi *et al.* 1999; Park *et al.* 1999 en Canoz *et al.* 2002). Además *H. pylori* es capaz de disminuir la transcripción del mRNA de *HSP70* (Targosz *et al.* 2006).

Se observó un aumento progresivo, estadísticamente significativo, del alelo C de *HSP70-1* +190 en todos los grupos de pacientes con respecto a los asintomáticos. De igual forma, el genotipo G/C aumentó gradualmente su frecuencia en los pacientes aumentando la razón de momios de

forma gradual de gastritis no atrófica (1.64), a metaplasia intestinal (3.45), hasta cáncer gástrico (13.31); tal gradiente de asociaciones fortalece la observación de que este SNP es un factor de riesgo para cáncer gástrico. Más aún, y de forma similar a lo hallado en *TNF-β* +252, para el genotipo C/C de *HSP70-1* +190 se encontró un efecto dosis-gene para la etapa preneoplásica metaplasia intestinal, aumentando la evidencia del genotipo C/C como un factor de riesgo para el cáncer gástrico.

El SNP+190 *HSP70-1* está ubicado en la región 5'UTR del gene. Este cambio no influye directamente en la secuencia de aminoácidos de HSP70-1 pero debido a que las secuencias 5'UTR de genes eucariontes han mostrado tener funciones en el control de la localización celular (Singer 1992), la estabilidad (Decker y Parker 1994; Beelman y Parker 1995) y la eficiencia traduccional del mRNA (Curtis *et al.* 1995), quizás este polimorfismo esté involucrado en la regulación post-transcripcional de *HSP70-1*. Lo anterior hace pensar que la susceptibilidad del alelo C y del genotipo G/C en estas enfermedades gastroduodenales se deba a que este SNP causa modificaciones en la expresión y localización de HSP70, lo que llevaría al incremento en el riesgo de daño al tejido y promueva la progresión a lesiones más serias.

Hay que notar que no existen previos estudios de la asociación de este SNP con cáncer gástrico. Aunque sí hay reportes de la sobreproducción de HSP70 en adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal (Canoz *et al.* 2002), y en otros tumores (Kawanishi *et al.* 1999), lo que fortalecería los resultados encontrados, y sugiere que este SNP podría constituir un factor de riesgo para el cáncer gástrico y otros tumores.

La expresión de TNF y HSP70 en la mucosa gástrica es afectada por la infección por *H. pylori*; TNF es sobreexpresado (Crabtree *et al.* 1991, Suganuma *et al.* 2008), mientras que HSP70 disminuye su expresión (Targosz *et al.* 2006). En contraste, en pacientes con cáncer gástrico, los niveles tanto de TNF- α (Izutani *et al.* 1996, Zhang *et al.* 2002) como de HSP70 (Isomoto *et al.* 2003) se ha reportado que aumentan. TNF es un poderoso factor angiogénico, que induce la expresión de moléculas de adhesión involucradas en la motilidad y en el comportamiento metastásico invasor de células tumorales (Leek *et al.* 1998). HSP70 actúa como una chaperona molecular para péptidos antigénicos derivados de células tumorales, que conducen al reconocimiento antitumoral por parte de linfocitos T citotóxicos (Suto *et al.* 1995); también induce la producción de TNF- α (Asea *et al.* 2000, Asea *et al.* 2002) y se ha observado que

protege a las células contra la citotoxicidad mediada por TNF (Jäättelä *et al.* 1993). Además, HSP70 es inducida en células tumorales para soportar las condiciones estresantes enfrentadas por el tumor, tales como falta de nutrientes, oxígeno, o la respuesta inmune antitumoral contribuyendo así a la sobrevivencia del tumor (Soti *et al.* 1998). Más aún, algunos reportes sugieren un posible desequilibrio de enlace entre los SNPs de *HSP70* y *TNF*, ya que las familias de *TNF* y *HSP70* están separadas por tan sólo 600 kb (Chouchane *et al.* 1997, Mestiri *et al.* 2001). Estos reportes sugieren que *TNF* y *HSP70* pueden estar actuando como promotores tumorales endógenos *in vivo*.

HSP70-2 es una proteína idéntica en sus 641 aminoácidos a HSP70-1, que se expresa en condiciones de estrés celular. A pesar de que el SNP +1267 se ubica en la secuencia codificante del gene, la sustitución A → G no provoca ningún cambio en la secuencia de aminoácidos (Milner y Campbell, 1990), probablemente a eso se deba que no se encontró ninguna diferencia en las frecuencias de este polimorfismo en pacientes y asintomáticos. Sin embargo, resulta interesante que algunos investigadores hayan reportado que el genotipo G/G provoca una disminución de la expresión de *HSP70-2* (Pociot *et al.*, 1993). El estudio de Vargas-Alarcón y colaboradores (2002) encontró una asociación de susceptibilidad de este genotipo con espondiloartropatías. Esta diferencia podría deberse a que G/G sea un marcador, probablemente asociado a otro SNP de *HSP70-2* que pueda afectar su expresión o a un gene vecino en este modelo diferente de enfermedad.

En relación al cáncer gástrico, recientemente se publicó una asociación del genotipo G/G de *HSP70-2* +1267 en mujeres japonesas (Shibata *et al.* 2009). Estos autores trabajaron con 223 pacientes con cáncer gástrico (64 mujeres) y un grupo de control heterogéneo de 200 pacientes (60 mujeres) con otras enfermedades gastroduodenales. Sin embargo, en el presente estudio no se encontró ninguna asociación con ninguna de estas enfermedades; incluso al ajustar por género, las frecuencias en los pacientes fueron muy semejantes a las del grupo asintomático. Esta discrepancia puede deberse a los diferentes fondos genéticos de la población japonesa y la mexicana. A su vez, los resultados obtenidos en los asintomáticos concuerdan con los reportados en población mestiza mexicana sana por Zuñiga *et al.* (1999) y Vargas-Alarcón *et al.* (2002), a excepción de la frecuencia del genotipo G/G, donde los autores reportan una disminución de estos homocigotos a 5.0%.

HSP70-HOM se expresa en bajos niveles tanto de forma constitutiva como en choque térmico porque no tiene río arriba en su secuencia elementos de choque térmico (Milner y Campbell, 1990). Probablemente el cambio de la frecuencia de este SNP no se traduzca en cuanto al nivel de expresión, sino a modificaciones en su actividad de chaperona y de presentación de péptidos.

El SNP +2437 de *HSP70-HOM* se encuentra en la región codificante del gene. El cambio de nucleótidos T → C se traduce en un cambio de aminoácidos metionina → treonina en la posición 493, además esta posición se encuentra en las hojas β-plegadas del sitio de unión de péptidos de *HSP70-HOM* que es muy parecido al de las moléculas de HLA de clase I (Milner y Campbell, 1992).

El alelo T ha sido asociado en población mexicana con el padecimiento de espondiloartropatías (*i. e.* espondilitis anquilosante, espondiloartropatías no diferenciadas y artritis reactiva) Vargas-Alarcón *et al.* (2002), lo que sugería que podría tener algún efecto inflamatorio en el desarrollo de gastritis, sin embargo, en el presente estudio no se encontró ninguna asociación con estas enfermedades. Al comparar con las frecuencias de controles mexicanos mestizos sanos reportadas por Vargas-Alarcón *et al.* (2002), se encontró una tendencia similar aunque con frecuencias diferentes (T=79.0%, C=21.0, TT=61.0%, T/C=35.0%, C/C=3.0%).

Al comparar las frecuencias de los haplotipos *TNF-β – TNF-α*, se encontró una asociación de susceptibilidad del haplotipo A – G en cáncer gástrico. Esta asociación parece estar influenciada por la fuerte asociación encontrada en el alelo A de *TNF-β* por separado. De la misma manera en los haplotipos de *HSP70-HOM - HSP70-1 - HSP70-2*, se encontró un haplotipo de susceptibilidad. El T – C – G resultó ser un factor de riesgo para el cáncer gástrico y úlcera duodenal. Al hacer la comparación, con todos los SNPs en haplotipo *TNF-β – TNF-α - HSP70-HOM - HSP70-1 - HSP70-2*, se encontraron resultados que corroboran los haplotipos de las familias de genes por separado. El haplotipo A – G – T – C – A resultó ser un factor de predisposición en todos los grupos de pacientes, sugiriendo un papel importante en la patogénesis por *H. pylori*.

Se analizaron las combinaciones de genotipos presentes en los pacientes. En las combinaciones de *TNF-α* y *TNF-β*, la G/G – A/A apareció como un importante factor de susceptibilidad para el cáncer gástrico; mientras que la combinación G/G – A/G se comportó como un factor de protección contra la misma enfermedad y úlcera duodenal. A pesar de que no se encontró

ninguna asociación individual de los SNPs en *HSP70-2* y *HSP70-HOM*, cabe destacar que, al combinar los genotipos de *HSP70-1* - *HSP70-2* - *HSP70-HOM*, se observó la ausencia de la combinación G/G – A/G – T/T en pacientes con cáncer gástrico mientras que estuvo bien representada en el grupo asintomático y en gastritis no atrófica. Lo anterior sugiere que esta combinación podría ser un importante factor de protección contra esta enfermedad. Esta observación, hasta donde se sabe, no ha sido reportada previamente. También se estudiaron las combinaciones de *MICA* - *TNF* - *HSP70*. Se presentó un aumento de la frecuencia de la combinación 00201/00201 - G/G - G/A - G/C - A/G - T/T en pacientes con metaplasia intestinal y cáncer gástrico. Sin embargo, al corregir el valor de *p*, las significancias estadísticas se perdieron debido al alto valor del factor de corrección provocado por el gran número de combinaciones posibles.

Se ha reportado que entre los diferentes tipos de metaplasias intestinales, el tipo colónico incompleto está más estrechamente relacionado con el cáncer gástrico distal de tipo intestinal (Ruol *et al.* 2000). Basado en lo anterior, se estudio si estos polimorfismos genéticos tienen alguna asociación con algún tipo específico de metaplasia. Los pacientes con metaplasia intestinal fueron organizados de acuerdo a su diagnóstico entre pacientes con MIC y con MCI. Se compararon las frecuencias de los polimorfismos de estos dos grupos contra las del grupo asintomático. No se encontraron asociaciones con el polimorfismo de *MICA*. Pero los genotipos G/A de *TNF- α* -308, G/G de *TNF- β* +252 y G/C de *HSP70-1* +190 estuvieron asociados de forma significativa con la susceptibilidad de desarrollar MCI. Lo anterior es importante si se toma en cuenta que este tipo de metaplasia está más estrechamente relacionada con la progresión hacia un adenocarcinoma gástrico (Correa y Houghton 2007).

Hasta el momento, no se ha reportado ningún estudio de la asociación de los polimorfismos de estos genes, ya sea por separado, en haplotipos o en combinación de genotipos, en las enfermedades gastroduodenales producidas por *H. pylori* en ninguna población. Por esto resulta relevante el haber encontrado asociación de polimorfismos de *MICA*, *TNF* y *HSP70* con la progresión de enfermedades gastroduodenales provocadas por la infección por *H. pylori* en México.

CONCLUSIONES

En este trabajo se estudiaron polimorfismos en los genes de *MICA*, *TNF* y *HSP70* en pacientes mestizos mexicanos infectados con *H. pylori* y diagnosticados con gastritis no atrófica, metaplasia intestinal (completa e incompleta), cáncer gástrico y úlcera duodenal. En el polimorfismo de *MICA*, *HSP70-2* y *HSP70-HOM* no se encontraron asociaciones con estas enfermedades. No obstante, se encontró nueva evidencia que ubican a los SNPs de *TNF- α* , *TNF- β* y *HSP70-1* como posibles factores de riesgo para el desarrollo de lesiones precancerosas, cáncer gástrico y úlcera duodenal; probablemente, debido a su asociación con una respuesta inflamatoria intensa y persistente. La significativa dosis-respuesta para los SNPs de *TNF* y *HSP70* encontrada desde las lesiones preneoplásicas hasta el cáncer gástrico concuerdan con la historia natural descrita por Correa *et al.* (1996), y sugiere que estos SNPs podrían ser útiles como biomarcadores de factores de riesgo para cáncer gástrico. Estudios más profundos son necesarios para determinar cuales son los efectos de estos SNPs en la expresión o regulación de estos genes para entender mejor el papel que juegan en la respuesta inflamatoria y en la patogénesis de enfermedades gastroduodenales severas.

REFERENCIAS

- Achtman M, Suerbaum S. *Helicobacter pylori*: Molecular and cellular biology. *Horizon Scientific Press. Wymondham, UK 2001; p15.*
- Akhter Y, Ahmed I, Devi SM, Ahmed N. The co-evolved *Helicobacter pylori* and gastric cancer: trinity of bacterial virulence, host susceptibility and lifestyle. *Infect Agent Cancer 2007; 2:2.*
- Argüello JR, Little AM, Pay AL, Gallardo D, Rojas I, Marsh SG, Goldman JM, Madrigal JA. Mutation detection and typing of polymorphic loci through double-strand conformation analysis. *Nat Genet 1998; 18:192.*
- Asaka M, Kudo M, Kato M, Sugiyama T, Takeda H. Review article: Long-term *Helicobacter pylori* infection -from gastritis to gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther 1998; 12 Suppl 1:9-15.*
- Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14- dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med 2000; 6:435-442.*
- Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem 2002; 277:15028-15034.*
- Atherton JC. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. *Gut. 1997.40(6):701.*
- Azuma T, Konishi J, Tanaka Y, Hirai M, Ito S, Kato T, Kohli Y. Contribution of HLA-DQA gene to host's response against *Helicobacter pylori*. *Lancet 1994; 343:542.*
- Azuma T, Ito Y, Miyaji H, Dojyo M, Tanaka Y, Iria M, Ito S, Kato T, Kohli Y. Immunogenetic análisis of the human leucocyte antigen DQA1 locus in patients with duodenal ulcer or chronic atrophic gastritis harbouring *Helicobacter pylori*. *Eur J Gastroenterol Hepatol 1995; 7(Suppl. 1)71.*
- Azuma, T., Ito S, Sato F, Yamazaki Y, Miyaji H, Ito Y, Suto H, Kuriyama M, Kato T, Kohli Y. The role of the HLA-DQA1 gene in resistance to atrophic gastritis and gastric adenocarcinoma induced by *Helicobacter pylori* infection. *Cancer 1998; 82:1013.*
- Backert S, Ziska E, Brinkmann V, Zimny-Arndt U, Fauconnier A, Jungblut PR Naumann M, Meyer TF. Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol 2000; 2:155-64.*
- Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91:6259.*
- Bahram S. *MIC* genes: from genetics to biology. *Adv Immunol 2001; 76:1-60.*
- Barret JC, Fry B, Maller J, Daly JM. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics 2005; 21:263-5.*
- Bart S. What sharks can tell us about the evolution of the MHC genes. *Immunol Rev 1998. 166:317.*
- Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science 1999; 285(5428):727.*
- Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med 1996; 334:1717.*

- Berg D, Hoffman P, Appelmek B, Kusters J. The *Helicobacter pylori* genome sequence: Genetic factors for long life in the gastric mucosa. *Trends Microbiol* 1997; 5:468.
- Blaser M, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Investig* 2004; 113:321-33.
- Blaser MJ, Crabtree JE. CagA and the outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Clin Pathol* 1996; 113:321-3.
- Botzler C, Li G, Issels RD, Multhoff G. Definition of extracellular localized epitopes of Hsp70 involved in an NK immune response. *Cell Stress Chaperones* 1998; 3(1):6.
- Brenner H, Rothenbacher D, Arndt V. Epidemiology of stomach cancer. *Methods Mol Biol* 2009; 472:467-77.
- Brown LM, Thomas TL, Ma JL. *Helicobacter pylori* infection in rural China: demographic, lifestyle and environmental factors. *Int J Epidemiol* 2002; 31:638.
- Camorlinga M, Torres J, Perez-Perez G, Leal-Herrera Y, Gonzalez-Ortiz B, Madrazo de la Garza A, Gómez A, Muñoz O. Validation of a serologic test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and the immune response to urease and CagA in children. *The American Journal of Gastroenterology* 1998; 93(8):1264.
- Camorlinga-Ponce M, Flores-Luna L, Lazcano-Ponce E, Herrero R, Bernal- Sahagu'n F, Abdo-Francis JM, Aguirre- Garcí'a J, Muñoz N, Torres J. Age and severity of mucosal lesions influence the performance of serologic markers in *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal pathologies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 2498–504.
- Canoz O, Beleni O, Patiroglu TE. General features of gastric carcinomas and comparison of HSP70 and NK cell immunoreactivity with prognostic factors. *Pathol Oncol Res* 2002;8: 262–9.
- Caselli M, Balboni A, Chiamenti CM, D'Ambrosi A, Alvisi V, Gandini E. *Helicobacter pylori* and Human Leucocyte Antigens. *Scand J Gastroenterol* 1999. 34:943.
- Castillo-Rojas G, Cerbón MA, López-Vidal Y. Presence of *Helicobacter pylori* in a Mexican Pre-Columbian Mummy. *BMC Microbiology* 2008; 8:119 <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/8/119>
- Castillo-Rojas G, Mazari-Hiriart M, López-Vidal Y. *Helicobacter pylori*: focus on CagA and VacA major virulence factors. *Salud Pública Mex* 2004; 46(6):538.
- Cats A., Meuwissen SG, Forman D, Craanen ME, Kuipers EJ. *Helicobacter pylori*: a true carcinogen? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; 10:447.
- Chan FK, To KF, Wu JC. Eradication of *Helicobacter pylori* and risk of peptic ulcers in patients starting long-term treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs: a randomized trial. *Lancet* 2002; 359:9.
- Chiba M, Ishii N, Ishioka T, Murata M, Masamune O, Sugiyama T, Yachi A. Topographic study of *Helicobacter pylori* and HLA-DR antigen expression on gastric epithelium. *Journal of Gastroenterology* 1995; 30:149.
- Chouchane L, Ahmed SB, Baccouche S, Remadi S. Polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha promotor region and in the heat shock protein 70 genes associated with malignant tumors. *Cancer* 1997; 80:1489–96.
- Choy MK, Phipps ME. Possible polyphyletic origin of major histocompatibility complex class I chain-related gene A (MICA) alleles. *J Mol Evol.* 2003; 57:38-43.
- Choy MK, Phipps ME. MICA polymorphism: biology and importance in immunity and disease. *Trends Mol Med.* 2010; 16:97-106.
- Chow WH, Blaser MJ, Blot WJ, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Perez-Perez GI, Schoenberg JB, Stanford JL, Rotterdam H, West AB, Fraumeni JF. An inverse relation

- between *cagA*+ strains of *Helicobacter pylori* infection and risk of esophageal and gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Res* 1998; 58(4):588.
- Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2007; 133:659-72.
 - Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. 1st American Cancer Society Award lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Res* 1992; 52:6735.
 - Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: state of the art. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5:477-81.
 - Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Rappuoli R. Molecular characterization of the 128 kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:5791-5.
 - Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 1999; 284:1328.
 - Crabtree JE, Shallcross TM, Heatley RV, Wyatt JL. Mucosal tumour necrosis factor α and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Gut* 1991; 32:147-77.
 - Crabtree JE, Xiang Z, Lindley IJD, Tompkins DS, Rappuoli R, Covacci A. Induction of interleukin-8 from gastric epithelial cells by *cagA* negative isogenic mutant of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol* 1995; 48:967-9.
 - De Koster E, Buset M, Fernandes E, Deltenre M. *Helicobacter pylori*: the link with gastric cancer. *European Journal of Cancer Prevention* 1994; 3:247.
 - De Vries AC, Hringsma J, Kuipers EJ. The detection, surveillance and treatment of premalignant gastric lesions related to *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2007; 12:1-15.
 - Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop of the histopathology of gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996; 20:1161-81.
 - Ekström AM, Held M, Hansson LE, Engstrand L, Nyrén O. *Helicobacter pylori* in gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection. *Gastroenterology* 2001; 121:784-91.
 - El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF Jr, Rabkin CS. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000; 404:398.
 - Ernst PB, Gold BD. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54:615-40.
 - Falush D, Wirth T, Linz B. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* 2003; 299:1582.
 - Fan XJ, Guanasaena H, Cheng Z, Espejo R, Crowe SE, Ernst PB, Reyes VE. *Helicobacter pylori* urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis. *J Immunol* 2000; 165:1918.
 - Fan X., Crowe S, Behar S, Guanasaena H, Ye G, Haerberle H, Van Houten N, Gourley WK, Ernst PB, Reyes VE. The effect of class II major histocompatibility complex expression on adherence of *Helicobacter pylori* and induction of apoptosis in gastric epithelial cells: a mechanism for T helper cell type 1-mediated damage. *J Exp Med* 1998; 187:1659.

- Fischer W, Puls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, Haas R. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol* 2001; 42:1337-48.
- Fodil N, Pellet P, Laloux L, Hauptmann G, Theodorou I, Bahram S. MICA haplotypic diversity. *Immunogenetics* 1999; 49:557.
- Fox JG, Batchelder M, Marini RP, Yan L, Handt L, Li X, Shames B, Hayward A, Campbell J, Murphy JC. *Helicobacter pylori* induced gastritis in the domestic cat. *Infect Immun* 1995; 63(7):2674.
- Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy and gastric cancer. *J Clin Invest* 2007; 117(1):60-9.
- Furuta T, El-Omar EM, Xiao F. Interleukin 1beta polymorphism increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan. *Gastroenterology* 2002b; 123:92.
- Furuta T, Shirai N, Takashima M. Effect of genotypic differences in interleukin-1 beta on gastric acid secretion in Japanese patients infected with *Helicobacter pylori*. *Am J Med* 2002a; 112:141.
- Gamboa R, Zamora, Rodríguez-Pérez JM, Fragoso JM, Cardoso G, Posadas-Romero C, Vargas-Alarcón G. Distribution of paraoxonase PON1 gene polymorphisms in Mexican populations. Its role in the lipid profile. *Exp Mol Pathol* 2006; 80:85-90.
- Ge Z, Taylor D. Contribution of genome sequencing to understanding the biology of *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Microbiol* 1999; 53:355.
- Ghose C, Pérez-Pérez GI, Domínguez-Bello MG, Pride DT, Bravi CM, Blaser MJ: East Asian genotypes of *Helicobacter pylori* strains in Amerindians provide evidence for its ancient human carriage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(23):15107-11.
- Go MF. What are the host factors that place an individual at risk for *Helicobacter pylori*-associated disease? *Gastroenterology* 1997; 113: S15.
- Gobert AP, Mersey BD, Cheng Y, Blumberg DR, Newton JC, Wilson KT. Cutting edge: urease release by *Helicobacter pylori* stimulates macrophage inducible nitric oxide synthase. *J Immunol* 2002; 168(12):6002.
- González CA, Sala N, Capella G. Genetic susceptibility and gastric cancer risk. *Int J Cancer* 2002; 100:249.
- Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, McConnell W, Harper WES. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol* 1989; 39:397-405.
- Gorodezky C, Alaez C, Vázquez-García MN, de la Rosa G, Infante E, Balladares S, Toribio R, Pérez-Luque E, Muñoz L. The genetic structure of Mexican Mestizos of different locations: Tracking back their origins through MHC genes, blood group systems, and microsatellites. *Human Immunology* 2001; 62:979-91.
- Gorouhi F, Islami F, Bahrami H, Kamangar F. Tumour-necrosis factor-A polymorphism and gastric cancer risk: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2008; 98:1443-51.
- Graham DY, Opekun AR, Osato MS, El-Zimaity HM, Lee CK, Yamaoka Y, Qureshi WA, Cadoz M, Monath TP. Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. *Gut* 2004; 53:1235-43.
- Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gamma delta T cells. *Science* 1997; 279:1737.

- Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumor-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T cell activation. *Nature* 2002; 419:734.
- Guarner J, Mohar A, Parsonnet J, Halperin D. The association of *Helicobacter pylori* with gastric cancer and preneoplastic gastric lesions in Chiapas, Mexico. *Cancer* 1993; 71:297.
- Gillespie H.J. Population Genetics A Concise Guide. Second Edition. *The Johns Hopkins University Press. Baltimore and London. 2004; pp. 12-18.G*
- Gyulai Z, Klausz G, Tiszai A, Lenart Z, Toth Kasa I, Lonovics J, Mandi Y. Genetic polymorphism of interleukin-8 (IL-8) is associated with *Helicobacter pylori*-induced duodenal ulcer. *Eur Cytokine Netw* 2004;15:353–8.
- Hajeer AH, Hutchinson IV. Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease. *Hum Immunol* 2001; 62:1191.
- Hamilton SR y Aaltonen LA eds: World Health Organization Classification of tumours. Pathology and Genetics. Tumours of the digestive system. Lyon: *IARC Press: 2000.*
- Hamlet A, Thoreson AC, Nilsson O, Svennerholm AM, Olbe L. Duodenal *Helicobacter pylori* infection differs in *cagA* genotype between asymptomatic subjects and patients with duodenal ulcers. *Gastroenterology* 1999; 116:259-68.
- Handt LK, Fox JG, Yan L, Shen Z, Pouch WJ, Ngai D, Motzel SL, Nolan TE, Klein HJ. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in a colony of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *J Clin Microbiol* 1997; 35:165.
- Heesen M, Kunz D, Bachmann-Mennenga B, Merk HF, Bloemeke B. Linkage disequilibrium between tumor necrosis factor (TNF)-alpha-308 G/A promoter and TNF-beta NcoI polymorphisms: association with TNF-alpha response of granulocytes to endotoxin stimulation. *Crit Care Med* 2003; 31:211.
- Herrera-Goepfert R, Zuñiga J, Hernández-Guerrero A, Rodríguez-Reyna T, Osnalla N, Ruíz-Morales J, Vargas-Alarcón G, Yamamoto-Furusho JK, Mohar-Betancourt A, Hernández-Pando R, Granados J. Asociación del alelo HLA-DQB1*0501 del complejo mayor de histocompatibilidad con cáncer gástrico en México. *Gac Med Méx* 2004; 140(3):299.
- Hervada VX, Santiago PM, Vázquez FE, Castillo SC, Loyola EE, Silva ALC. Epidat 3.0 programa para análisis epidemiológico de datos tabulados. *Rev. Esp. Salud Pública* 2004; 78:277–80.
- Higashi H, Nakaya A, Tsutsumi R, Yokohama K, Fujii Y, Ishikawa S, Higuchi M, Takahashi A, Kurashima Y, Teishikata Y, Tanaka S, Azuma T, Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. *J Biol Chem* 2004; 279:17205-16.
- Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 2001; 292:1115.
- Huang JQ, Sridhar S, Hunt RH. Role of *Helicobacter pylori* infection and non-steroidal anti-inflammatory drugs in peptic-ulcer disease: a meta-analysis. *Lancet* 2002; 359:14.
- Hua-Xiang H, Talley NJ. Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: Implications in gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:16-26.
- Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL, Keijsers V, Brinkman BM, Langermans JA, Breedveld FC, Verweij CL, van de Gaer L, Dams L, Crusius JB, Garcia-Gonzalez A, van Oosten BW, Polman CH, Pena AS. TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol* 1997; 72:149.

- International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*. *Summary of Data Reported and Evaluation*. 1994. 61:177.
- Isomoto H, Oka M, Yano Y, Kanazawa Y, Soda H, Terada R, Yasutake T, Nakayama T, Shikuwa S, Takeshima F, Udono H, Murata I, et al. Expression of heat shock protein (Hsp) 70 and Hsp 40 in gastric cancer. *Cancer Lett*. 2003; 198:219–28.
- Izutani R, Katoh M, Asano S, Ohyanagi H, Hirose K. Enhanced expression of manganese superoxide dismutase mRNA and increased TNF alpha mRNA expression by gastric mucosa in gastric cancer. *World J Surg* 1996;20: 228–33.
- Jäättelä M. Overexpression of major heat shock protein HSP70 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of phospholipase A2. *J Immunol* 1993; 151: 4286–94.
- Jarjour W, Reed AM, Gauthier J, Hunt S, Winfield JB. The 8.5-kb PstI allele of the stress protein gene, Hsp70-2. An independent risk factor for systemic lupus erythematosus in African Americans? *Hum Immunol* 1996; 45:59.
- Jaworski W. Podrecznik Chorob zoladka. *Wydawnictwa Dziel Lakarskich Polskich* 1889; 32. en: Achtman M, Suerbaum S. *Helicobacter pylori*: Molecular and Cellular Biology. *Horizon Scientific Press. Wymondham, UK* 2001. p15.
- Kaiser BK, Yim D, Chow IT, Gonzalez S, Dai Z, Mann HH, Strong RK, Groh V, Spies T. Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature* 2007; 447(7143):482-6.
- Karhukorpi J, Ikaheimo I, Silvennoinen-Kassinen S, Tiilikainen AS, Karttunen R. HLA-DQA1 alleles and the presence of *Helicobacter pylori* antibodies. *European Journal of Immunogenetics* 1999; 26:15.
- Karr WR. 1998. The HLA complex. En: Jameson JL. *Principles of molecular medicine. Humana Press USA* 1998; p273.
- Kawanishi K, Shiozaki H, Doki Y, Sakita I, Inoue M, Yano M, Tsujinaka T, Shamma A, Monden M. Prognostic significance of heat shock proteins 27 and 70 in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1999;85:1649–57.
- Kersulyte D, Mukhopadhyay AK, Velapatiño B, Su W, Pan Z, García C, Hernández V, Valdéz Y, Mistry RS, Gilman RH, Yuan Y, Gao H, Alarcón T, Brea L, Nair BG, Chowdhury A, Datta S, Shirai M, Nakazawa T, Ally R, Segal I, Wong BCY, Lam SK, Olfat FO, Borén T, Engstrand L, Torres O, Schneider R. Differences in genotypes of *Helicobacter pylori* from different human populations. *J Bacteriology* 2000; 182:(11)3210-8.
- Kim JJ, Tao H, Carloni E. *Helicobacter pylori* impairs DNA mismatch repair in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 2002; 123:542.
- Kim N, Cho SI, Yim JY, Kim JM, Lee DH, Park JH, Kim JS, Jung HC, Song IS. The effects of genetic polymorphism of IL-1 and TNF-A on *Helicobacter pylori*-induced gastroduodenal diseases in Korea. *Helicobacter* 2006; 11:105–12.
- Klein J, O’Hugin C. The conundrum of nonclassical major histocompatibility complex genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:6251-2.
- Kuipers EJ, Thijs JC, Festen HP. The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; 9(Suppl):59-69.
- Kuipers EJ, Uytterlinde AS, Pena R, Roosendal G, Pals GF, Nelis HP, Festen HP, Meuwissen, SG. Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis. *Lancet* 1995; 345:1525-1528.

- Kuipers EJ. Review article: Relationship between *Helicobacter pylori*, atrophic gastritis and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12 Suppl 1:25.
- Kuipers EJ. Review article: Exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13 Suppl 1. 3.
- Kulski JK, Shiina T, Anzai T, Kohara S, Inoko H. Comparative genomic analysis of the MHC: the evolution of class I duplication blocks, diversity and complexity from shark to man. *Immunol Rev* 2002; 190:95.
- Kuntsman E, Hardt C, Elitok E, Harder M, Suerbaum S, Peitz U, Schmiegel W, Epplen JT. The nonfunctional allele TCRBV6S1B is strongly associated with *Helicobacter pylori* infection. *Infect Immun* 2000; 68:6493.
- Kuntsmann E, Hardt C, Treitz H, Suerbaum S, Faller G, Peitz U, Schmiegel W, Epplen JT. In the European population HLA-class II genes are not associated with *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14(1):49.
- Kusters JG, van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19:449-90.
- Lee JE, Lowy AM, Thompson WA, Lu M, Loflin PT, Skibber JM, Evans DB, Curley SA, Mansfield PF, Reveille JD. Association of gastric adenocarcinoma with the HLA class II gene DQB10301. *Gastroenterology* 1996; 111:426.
- Leek RD, Landers R, Fox SB, Ng F, Harris AL, Lewis CE. Association of tumour necrosis factor alpha and its receptors with thymidine phosphorylase expression in invasive breast carcinoma. *Br J Cancer* 1998; 77:2246.
- Ley C, Mohar A, Guarner J, Herrera-Goepfert R, Figueroa LS, Halperin D, Parsonnet J. Screening markers for chronic atrophic gastritis in Chiapas, Mexico. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10:107.
- Li C, Xia B, Yang Y, Li J, Xia HH. TNF gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection in gastric carcinogenesis in Chinese population. *Am J Gastroenterol* 2005; 100(2):290.
- Lisker R. Estructura genética de la población mexicana. México:Salvat 1981.
- Lo SS, Lee YJ, Wu CW, Liu CJ, Huang JW, Lui WY. The increase of MICA gene A9 allele associated with gastric cancer and less schirrous change. *Br J Cancer* 2004; 90:1809-13.
- López-Carrillo L, Torres-López J, Galván-Portillo M, Muñoz L, López-Cervantes M. *Helicobacter pylori*-CagA seropositivity and nitrite and ascorbic acid food intake as predictors for gastric cancer. *Eur J Cancer* 2004; 40:1752-9.
- Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, Mahieu P, Malaise M, De Groote D, Louis R, Belaiche J. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1998; 113:401.
- Macarthur M, Hold GL, El-Omar EM. Inflammation and cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286:G515.
- Maeda S, Yoshida H, Ikenoue T, Ogura K, Kanai F, Kato N, Shiratori Y, Omata M. Structure of *cag* pathogenicity island In Japanese *Helicobacter pylori* isolates. *Gut* 1999; 44:336-41.
- Maeda, S, Yoshida H, Mitsuno Y. Analysis of apoptotic and antiapoptotic signaling pathways induced by *Helicobacter pylori*. *Gut* 2002; 50(6):771.

- Malaty HM, El-Kasabany A, Graham DY. Age at acquisition of *Helicobacter. Pylori* infection: a follow-up study from infancy to adulthood. *Lancet* 2002; 359:931.
- Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Geraghty DE, Hansen JA, Hurlley CK, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GMT, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI, Trowsdale J. Nomenclature for factors of the HLA system, 2004. *Tissue Antigens*. 2005; 65:301.
- Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastric and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 16(1):1311.
- Massari P, Manetti R, Burroni D, Nuti S, Norais N, Rappuoli R, Telford J. Binding of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin to target cells. *Infect Immun* 1998; 66:3981.
- Matsukura N, Susuki K, Kawachi T, Aoyagi M, Sugimura T, Kitaoka H, Numajiri H, Shirota A, Itabashi M, Hirota T. Distribution of marker enzymes and mucin in intestinal metaplasia in human stomach and relation to complete and incomplete types of intestinal metaplasia to minute gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1980; 65:231-40.
- Matthews DE, Farewell V. Using and understanding medical statistics. *S Karger*. New York 1985; p39.
- Megraud F, Lamouliatte H. Review article: the treatment of refractory *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17:1333-43.
- Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blömer K, Pape GR, Riethmüller G, Weiss EH. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF- β gene correlates with a variant amino acid in position 26 and reduced level of TNF- β production. *J Exp Med* 1991;173:209-19.
- Mestiri S, Bouaoulina N, Ahmed SB, Khedhaler A, Belhaldj B, Couchane L. Genetic variation in the Tumor Necrosis Factor- α promoter region and in the stress protein hsp70-2: Susceptibility and prognostic implications in breast carcinoma. *Cancer* 2001; 91:672-8.
- Miehke S, Tomas R, Gutierrez O, Graham DY, Go MF. DNA fingerprinting of single colonies of *Helicobacter pylori* from gastric cancer patients suggest infection with a single predominant strain. *J Clin Microbiol* 1999; 37:245.
- Miller SA, Dykes KK, Plesky HF. A single salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acid Res* 1988; 16:1215.
- Mitchell HM. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and its relation to gastric cancer. In *Helicobacter pylori: Biology and clinical practice*. Vol. 1. *CRC Press, Inc* 1993; p.96.
- Monteiro L, de Mascarel A, Sarrasqueta AM, Bergey B, Barberis C, Talby P, Roux D, Shouler L, Goldfain D, Lamouliatte H, Megraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Noninvasive methods compared to invasive methods and evaluation of two new tests. *The American Journal of Gastroenterology* 2001; 96:2.
- Morris A, Hewitt C, Young S. The major histocompatibility complex: its genes and their roles in antigen presentation. *Mol Aspects Med* 1994; 15:377.
- Moss SF, Sood S. *Helicobacter pylori*. *Curr Op Infect Dis* 2003; 16:445.
- Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349:1269.
- O'Rourke EJ, Chevalier C, Pinto AV, Thiberge JM, Ielpi L, Labigne A, Radicella P. Pathogen DNA as target for host generated oxidative stress: role for repair of bacterial DNA damage in *Helicobacter pylori* colonization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(5):2789.

- Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 2000; 287:1497-500.
- Olson JW, Maier RJ. Molecular hydrogen as an energy source for *Helicobacter pylori*. *Science* 2002; 298:1788.
- Pablos JL, Carreira PE, Martin-Villa JM, Montalvo G, Arnaiz-Villena A, Gomez-Reino JJ. Polymorphism of the heat-shock protein gene HSP70-2 in SLE. *Br J Rheumatol* 1995; 34:721.
- Papini E, Bernard M, Milia E, Bugnoli A, Zerial M, Rappuoli R, Montecucco C. Cellular vacuoles induced by *Helicobacter pylori* originate from late endosomal compartments. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:9720.
- Parsonnet J. *Helicobacter pylori*: the size of the problem. *Gut* 1998; 43 (suppl 1) S6.
- Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelmann H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1997; 40: 297.
- Peek RM, Miller GG, Tham KT, Pérez-Pérez GI, Zhao XM, Atherton JC, Blaser MJ. Heightened inflammatory response and cytokine expression *in vivo* to cagA+ *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest* 1995; 73:760-70.
- Penn DJ, Damjanovich K, Potts WK. MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:11260-4.
- Perez-Perez GI, Rothenbacher D, Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2004; 9(Suppl 1):1-6.
- Pérez-Rodríguez M, Corell A, Argüello JR, Cox ST, McWhinnie A, Marsh SGE, Madrigal JA. A new MICA allele with ten alanine residues in the exon 5 microsatellite. *Tissue Antigens* 2000; 55:162.
- Pérez-Rodríguez M, Argüello JR, Fischer G, Corell A, Cox ST, Robinson J, Hossain E, McWhinnie A, Travers PJ, Marsh SG, Madrigal JA. Further polymorphism of the MICA gene. *Eur J Immunogenet* 2002; 29:35-46.
- Perri F, Pidepolo A, Quitadamo M, Quarticelli M, Merla A, Bisceglia M. HLA-DQA1 and -DQB1 genes and *Helicobacter pylori* infection in Italian patients with gastric adenocarcinoma. *Tissue Antigens* 2002; 59:55-7.
- Petrie A, Sabin C. Medical statistics at a glance. Massachusetts: *Blackwell Science Ltd* 2000. 138 p.
- Piazuolo MB, Haque S, Delgado A, et al. Phenotypic differences between esophageal and gastric intestinal metaplasia. *Mod Pathol* 2004; 17:62-74.
- Pierce SK, DeNagel DC, VanBuskirk AM. A role for heat shock protein in antigen processing and presentation. *Curr Top Microbiol Immunol* 1991; 167:83.
- Ratanachaiyavong S, Demaine AG, Campbell RD, McGregor AM. Heat shock protein 70 (HSP70) and complement C4 genotypes in patients with hyperthyroid Graves' disease. *Clin Exp Immunol* 1991; 84:48.
- Rodey GE. HLA beyond tears: Introduction to Human Histocompatibility. 2nd ed. De Novo Inc 2000, USA.
- Rugge M, Correa P, Dixon MF, Hattori T, Leandro G, Lewin K, Riddell RH, Sipponen P, Watanabe H. Gastric dysplasia: the Padova international classification. *Am J Surg Pathol* 2000; 24:167-76.
- Ruol A, Parenti A, Zaninotto G, Merigliano S, Costantini M, Cagol M. Intestinal metaplasia is the probable common precursor of adenocarcinoma in Barrett esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia. *Cancer* 2000; 88:2520-8.

- Sakai T, Aoyama N, Satonaka K, Shigeta S, Yoshida H, Shinoda Y, Shirasaka D, Miyamoto M, Nose Y, Kasuga M. HLA-DQB1 locus and the development of atrophic gastritis with *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol* 1999; 34(Suppl. 11):24.
- Secretaría de Salud. Compendio del Registro Histopatológico de Neoplasias en México. *Dirección General de Epidemiología, México D.F* 1999.
- Sargent CA, Dunham I, Trowsdale J, Campbell RD. Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:1968.
- Selbach M, Moese S, Hauck CR, Meyer TF, Backert S. Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2002; 277:6775-8.
- Seno H, Satoh K, Tsuji S, Shiratsuchi T, Harada Y, Hamajima N, Sugano K, Kawano S, Chiba T. Novel interleukin-4 and interleukin-1 receptor antagonist gene variations associated with non-cardia gastric cancer in Japan: comprehensive analysis of 207 polymorphisms of 11 cytokine genes. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22: 729–37.
- Serrano-Sánchez C. Mestizaje e historia de la población de México (con un esbozo antropológico de los lacandones de Chiapas). En Martín Municio A, García Barreno P (eds). Polimorfismo génico (HLA) en poblaciones hispano-americanas. *Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales Madrid* 1996.
- Sham P. Statistics in human genetics. Arnold Applications of Statistics. New York: *Oxford University Press Inc* 2001.
- Shibata T, Arisawa T, Tahara T, Yoshioka D, Maruyama N, Fujita H, Kamiya Y, Nakamura M, Nagasaka M, Iwata M, Takahama K, Watanabe M, Hirata I, Nakano H. Protective role of genetic polymorphism of heat shock protein 70-2 for gastric cancer risk. *Dig Dis Sci.* 2009; 54:70-4.
- Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations. *Tissue Antigens* 2004; 64:631.
- Shiina T, Ota M, Shimizu S, Katsuyama Y, Hashimoto N, Takasu M, Anzai T, Kulski JK, Kikkawa E, Naruse T, Kimura N, Yanagiya K, Watanabe A, Hosomichi K, Kohara S, Iwamoto C, Umehara Y, Meyer A, Wanner V, Sano K, Macquin C, Ieko K, Tokunaga K, Gojobori T, Inoko H, Bahram S. Rapid evolution of major histocompatibility complex class I genes in primates generates new disease alleles in humans via hitchhiking diversity. *Genetics.* 2006;173:1555-70.
- Sipponen P, Hyvarinen H, Seppala K, Blaser MJ. Review article: Pathogenesis of the transformation from gastritis to malignancy. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12 Suppl 1:61.
- Soti C, Csermely P. Molecular chaperones in the etiology and therapy of cancer. *Pathol Oncol Res* 1998;4:316–21.
- Stein M, Rappuoli R, Covacci A. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:1263-8.
- Stephens HA. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends Immunol.* 2001; 22:378-85.
- Stern LJ, Wiley DC. Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Behring Inst Mitt* 1994:1-10.
- Stüber F, Petersen M, Bokelmann F, Schade U. A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-a concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 1996; 24:381.

- Suerbaum S, Josenhans C. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nature Reviews Microbiology* 2007; 5:441-52.
- Suerbaum, S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 2002; 347:1175.
- Suganuma M, Yamaguchi K, Ono Y, Matsumoto H, Hayashi T, Ogawa T, Imai K, Kuzuhara T, Nishizono A, Fujiki H. TNF-alpha-inducing protein, a carcinogenic factor secreted from *H. pylori*, enters gastric cancer cells. *Int J Cancer* 2008; 123:117-22.
- Sugimoto M, Furuta T, Shirai N, Nakamura A, Xiao F, Kajimura M, Sugimura H, Hishida A. Different effects of polymorphisms of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta on development of peptic ulcer and gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:51-9.
- Suto R, Srivastava PK. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned-peptides. *Science* 1995; 269:1585-8.
- Targosz A, Pierzchalski P, Krawiec A, Szczyrk U, Brzozowski T, Konturek SJ, Pawlik WW. *Helicobacter pylori* inhibits expression of heat shock protein 70 (HSP70) in human epithelial cell line. Importance of Cag A protein. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57:265-78.
- Taupin A, Occhialini A, Ruskone-Fourmestreaux A, Delchier JC, Rambaud JC, Megraud F. Serum antibody responses to *Helicobacter pylori* and the cagA marker in patients with mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6:633.
- Torres MM, Acosta CP, Sicard DM, Groot de Restrepo H. Genetic susceptibility and risk of gastric cancer in a human population of Cauca, Colombia. *Biomedica* 2004;24:153-62.
- Torres J, Perez-Perez GI, Leal-Herrera Y, Munoz O. Infection with CagA+ *Helicobacter pylori* strains as a possible predictor of risk in the development of gastric adenocarcinoma in Mexico. *Int J Cancer* 1998b; 78: 298.
- Torres J, Perez-Perez G, Goodman KJ, Atherton JC, Gold BD, Harris PR, la Garza AM, Guarner J, Munoz O. A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. *Arch Med Res* 2000; 31:431.
- Torres J, Leal-Herrera Y, Perez-Perez G, Gomez A, Camorlinga-Ponce M, Cedillo-Rivera R, Tapia-Conyer R, Munoz O. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J Infect Dis* 1998a; 178:1089.
- Vargas-Alarcón G, Londoño JD, Hernández -Pacheco G, Gamboa R, Castillo E, Pacheco-Tena C, Cardiel MH, Granados J, Burgos-Vargas R. Heat shock protein 70 gene polymorphism in Mexican patients with spondyloarthropathies. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:48.
- Vassalli P. The pathophysiology of tumour necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:411.
- Vaucher C, Janvier B, Nousbaum JB, Grignon B, Pezennec L, Robaszkiewicz M, Gouerou H, Picard B, Fauchere JL. Antibody response of patients with *Helicobacter pylori*-related gastric adenocarcinoma: significance of anti-cagA antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7:463.
- Veldhuyzen van Zanten SOJ, Dixon MF, Lee A. The gastric transitional zones: neglected links between gastroduodenal pathology and *Helicobacter* ecology. *Gastroenterology* 1999; 116:1217-29.
- Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, Mémet S, Huerre MR, Coyle AJ, DiStefano PS, Sansonetti PJ, Labigne A, Bertin J, Philpott DJ, Ferrero RL. Nod1 responds peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nature Immunol* 2004; 5:1166-74.

- Warzocha K, Salles G, Bienvenu J, Bastion Y, Dumontet C, Renard N, Neidhardt-Berard EM, Coiffier B. Tumor necrosis factor ligand-receptor system can predict treatment outcome in lymphoma patients. *J Clin Oncol* 1997; 15:499.
- Wu J, Song Y, Bakker ABH, Bauer S, Spies T, Lanier LL, Phillips JH. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 1999; 285:730.
- Yoshitake S, Okada M, Kimura A, Sasazuki T. Contribution of major histocompatibility complex genes to susceptibility and resistance in *Helicobacter pylori* related diseases. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 1999 11:875.
- Yu J, Leung WK, Go MY. Relationship between *Helicobacter pylori* babA2 status with gastric epithelial cell turnover and premalignant gastric lesions. *Gut* 2002; 51:480.
- Zambon CF, Basso D, Navaglia F, Belluco C, Falda A, Fogar P, Greco E, Gallo N, Rugge M, Di Mario F, Plebani M. Pro- and anti-inflammatory cytokines gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection: interactions influence outcome. *Cytokine* 2005;29:141–52.
- Zhang X, Chen Y, Liu Y, Zhou X, Fan D. Local cytokines profile in gastric cancer lesions. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2002; 24:14–6.
- Zhang J, Dou C, Song Y, Ji C, Gu S, Xie Y, Mao Y. Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha are associated with increased susceptibility to gastric cancer: a metaanalysis. *J Hum Genet* 2008; 53:479–89.

Polymorphisms in *TNF* and *HSP-70* show a significant association with gastric cancer and duodenal ulcer

Oswaldo Partida-Rodríguez¹, Javier Torres², Lourdes Flores-Luna³, Margarita Camorlinga², Miriam Nieves-Ramírez¹, Eduardo Lazcano³ and Martha Perez-Rodríguez¹

¹ Immunology Research Unity, Pediatric Hospital, CMN S-XXI, IMSS, Mexico City CP 06720, Mexico

² Infectious Diseases Research Unity, Pediatric Hospital, CMN S-XXI, IMSS, Mexico City CP 06720, Mexico

³ Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos CP 62100, Mexico

Tumour Necrosis Factor (TNF) and Heat Shock Protein 70 (HSP70) are important molecules in inflammatory, infectious and tumoral processes. The genes codifying these molecules are polymorphic and certain alleles have been associated with susceptibility to disease. Gastric cancer is associated with an *Helicobacter pylori*-induced chronic inflammatory response. The aim of this work was to analyze whether polymorphisms in inflammation-related genes are associated with the development of gastric cancer. We studied 447 Mexican adult patients including 228 with non-atrophic gastritis, 98 with intestinal metaplasia, 63 with gastric cancer and 58 with duodenal ulcer, and 132 asymptomatic individuals as well. DNA from peripheral white blood cells was typed for the Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) -308 of *TNF- α* , +252 of *TNF- β* , +190 of *HSP70-1*, +1267 of *HSP70-2* and +2437 of *HSP70-HOM*. Compared with the asymptomatic group, we found a significant association of *TNF- β *A* and *HSP70-1*G* alleles with gastric cancer (OR 5.69 and 3.76, respectively) and *HSP70-1*G* with duodenal ulcer (OR 3.08). Genotype *TNF- β G/G* showed a significant gene-dose effect with gastric cancer (OR 0.09); whereas *HSP70-1 C/G* showed significant association with both, gastric cancer (OR 13.31) and duodenal ulcer (OR 16.19). Polymorphisms in *TNF* and *HSP70* showed a significant severity-dose-response as risk markers from preneoplastic lesions to gastric cancer in Mexican population, probably because of their association with an intense and sustained inflammatory response.

H. pylori infects human stomach for long periods of time, usually decades and this long lasting infection causes a chronic inflammation of the gastric mucosa. The gastric epithelium of *H. pylori* infected patients has increased expression of pro-inflammatory molecules such as *TNF- α* , *IL-1 α/β* and *IL-6*, as well as increased mRNA levels of *IL-8*, *GRO- α* , *MCP-1*, and *MIP-1 α* .¹⁻³ A long-standing immune-inflammatory response may cause sustained tissue injury and may be a risk factor for the development of distal gastric cancer.⁴ The

initial non-atrophic gastritis may evolve to atrophic gastritis, intestinal metaplasia, dysplasia and eventually to intestinal type of gastric cancer.⁵ On the other hand, when inflammation is predominant in the antrum, it may cause an increased secretion of acid, leading the appearance of duodenal ulcer and "protecting" against the development of gastric cancer.⁶

In addition to *H. pylori* infection, other multifactorial causes affect the development of gastric cancer, including environmental and host factors. Host genetic factors may influence the nature and intensity of the inflammatory and immune response. The importance of the innate immune response in *H. pylori* infection is not limited to the early stages of infection but also after decades of chronic infection. In fact, polymorphisms in genes associated with the inflammatory response in the gastric mucosa, such as *IL-1 β* , *TNF- α* and *IL-10*, have shown to be associated with a higher risk for duodenal ulcer and gastric cancer.⁷⁻⁹

Examples of other genes involved in the innate and acquire immune response are those located in the Major Histocompatibility Complex in chromosome 6. Thus, polymorphisms in HLA have been linked to different outcomes of gastric diseases.¹⁰ In addition, within the Class III region of the Major Histocompatibility Complex, there are non-HLA genes involved in several immunological and inflammatory processes, like *TNF α* and β ,¹¹ and three *HSP70* genes.¹² Several Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) have been

Key words: gastric cancer, duodenal ulcer, Tumour Necrosis Factor, Heat Shock Protein 70, genetic polymorphism

Abbreviations: TNF, Tumour Necrosis Factor; HSP70, Heat Shock Protein 70; SNP, Single nucleotide Polymorphism

Grant sponsor: The Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología;

Grant number: CONACYT-6957; **Grant sponsor:** The

Coordinación de Investigación en Salud; **Grant sponsor:** Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS); **Grant number:** (2002/110, 2005/1/003) Mexico

DOI: 10.1002/ijc.24773

History: Received 23 Mar 2009; Accepted 7 Jul 2009; Online 22 Jul 2009

Correspondence to: Martha Perez-Rodríguez, Immunology Research Unity, Pediatric Hospital 3rd Floor, CMN S-XXI, IMSS, Cuauhtemoc 330, Col Doctores, CP 06720, Mexico City, Mexico, E-mail: meperezrodriguez@yahoo.com.mx

described in the *TNF* region; and the most studied is located at position -308 of the *TNF- α* promoter region;¹³ the G→A substitution in this SNP is associated with an increase in *TNF- α* production.¹⁴ There is also a G→A SNP at position +252 of the first intron of *TNF- β* , which is associated with an overexpression of *TNF- β* ¹⁵ and *TNF- α* .¹⁶ *HSP70* genes are also polymorphic, they present SNPs located at positions +190 of *HSP70-1* (G→C), +1267 of *HSP70-2* (A→G) and +2437 of *HSP70-HOM* (T→C),¹⁷ which have been related to inflammatory and tumoral diseases.^{18,19}

Chronic long-lasting inflammatory response in the gastric mucosa of *H. pylori* infected patients plays a major role in the progress to gastric cancer;⁴ because of this, there is a need to study polymorphisms in inflammation-related genes in different populations to elucidate if they represent a risk factor for severe disease. Thus, the aim of the present work was to study the frequency of SNPs in inflammation-related genes in Mexican patients with precancerous lesions, gastric cancer or duodenal ulcer.

Material and Methods

Population studied

We studied 447 Mexican Mestizo patients attending the Gastroenterology Unit of the Hospital General de Mexico, Secretaria de Salud (SSA) and the Oncology Hospital, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), both in Mexico City, from October 1999 to July 2002. We selected patients older than 30 years, who consulted because of gastroduodenal symptoms or because of a probable gastric cancer (Oncology Hospital), programmed for endoscopy and biopsy for diagnostic purposes. Subjects who had received cancer treatment, as well as those who had taken antibiotics, bismuth compounds, proton pump inhibitors and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) two weeks prior to the study were excluded. Those with other severe chronic diseases or mental illness were also excluded. The protocol was approved by the Research and Ethics Committee of the Hospital General de México, SSA, and the Oncology Hospital at IMSS. An informed consent letter was signed by all the participants in the study. Patients were diagnosed based on endoscopy findings and histopathology study, according to the Sydney classification,²⁰ and intestinal metaplasia patients were subdivided in complete intestinal metaplasia and incomplete colonic metaplasia, based on Giemsa and hematoxyline-eosine staining, and with periodic acid-Schiff staining when metaplasia was suspected.

Collection of specimens

Biopsies were obtained from both lesser and greater curvature of the antrum and corpus. In order to increase sensitivity in the detection of precancerous lesions and *H. pylori* infection, seven biopsies, four from antrum and three from corpus, were processed for histology. Mucosal inflammation was graded according to Karttunen classification.²¹ A sample of 10 ml of blood was drawn from each patient and mononuclear cells were purified by centrifugation through a Ficoll-

Hypaque density gradient. DNA was isolated from these cells using the salting out microtechnique²² and frozen at -70°C until tested.

H. pylori infection

Serum samples were analyzed in order to detect IgG antibodies against *H. pylori* and against CagA protein using an enzyme-linked immunoassay previously described.²³ Infection was defined with both, positive ELISA and histology in the gastric biopsies (seven per patient, see above).

TNF and HSP70 SNPs typing

DNA samples were genotyped for *TNF- α* -308, *TNF- β* +252, *HSP70-HOM* +2437, *HSP70-1* +190 and *HSP70-2* +1267, using previously described primers. *TNF- α* was amplified by PCR in 25 μ l of reaction with 0.15 μ g of DNA, 0.75 unit of Taq Polymerase (Invitrogene, California, USA), 0.5 pmol of each primer,¹³ 1.5 mM of MgCl₂, 0.2 mM of dNTPS, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4) and 50 mM KCl. Amplification conditions were 94°C for 3 min, 61°C for 1 min, 72°C for 1 min, followed for 35 cycles of 94°C for 1 min, 61°C for 1 min and 72°C for 1 min, and a final cycle of 94°C for 1 min, 61°C for 1 min and 72°C for 5 min. *TNF- β* was amplified using 0.0125 μ g of DNA, 1 unit of Taq Polymerase and 1 pmol of each primer.²⁴ PCR conditions were one cycle at 95°C for 10 min, following of 30 cycles at 94°C for 1 min, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min with one extension cycle at 72°C for 8 min.

Amplifications for *HSP70-1*, -2 and -HOM were performed in 25 μ l containing 0.016 μ g of DNA, 0.05 unit of Taq Polymerase (Invitrogene, California, USA), 0.5 pmol of each primer,¹⁸ 3 mM of MgCl₂, 0.076 mM of dNTPS, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4) and 50 mM KCl. Amplification conditions for the *HSP70* genes were as previously reported.²⁵

The biallelic polymorphism of *TNF* and *HSP70* SNPs was analyzed using a Restriction Fragment Length Polymorphism technique. Cleaved PCR products were electrophoresed on 2.0% agarose gel and size of fragments interpreted as previously described.^{13,18,24}

Statistical analysis

For the statistical analysis, only *H. pylori* infected patients and asymptomatics were included. Gene and haplotype frequencies in patients with intestinal metaplasia, gastric cancer and duodenal ulcer were compared with asymptomatic and non-atrophic gastritis groups by either the X² or Fisher's exact test with 2x2 contingency tables, using the STATA 9.0 (Stata Corporation College Station, TX) program. The *p* values were corrected (*pc*) by the Bonferroni method, according to the number of specificities (groups of patients multiplied by the number of alleles or haplotypes) tested,²⁶ and the level of significance was established at *pc* ≤ 0.05. The magnitude of association was assessed using the odds ratio (OR) and confidence intervals of 95% (95% CI) were calculated. OR values were corrected for gender and age using the

Table 1. Characteristics of the groups of patients with gastroduodenal disease studied for polymorphisms in inflammation associated genes

Diagnosis group	Num. of patients studied	Average age, years (SD)	Male/Female	<i>H. pylori</i> seropositivity n (%)	CagA seropositivity n (%)
Asymptomatic	132	31.9 (8.59)	97/35	106 (80.3)	77 (58.3)
Non-atrophic Gastritis	228	47.9 (12.23)	75/153	172 (75.4)	148 (64.9)
Intestinal Metaplasia	98	57.6 (13.31)	34/64	80 (81.6)	78 (79.6)
Gastric Cancer	63	60.7 (13.31)	39/24	42 (66.7)	43 (68.2)
Duodenal Ulcer	58	51.8 (12.42)	31/27	51 (87.9)	43 (74.1)
All patients	447	52.3 (13.61)	179/268	345 (77.2)	312 (69.8)

SD, standard deviation.

logistic regression model.²⁷ Chi square analysis was used in order to test for any deviation of genotype distribution from Hardy-Weinberg (H-W) equilibrium.²⁸ The OR for each genotype and disease group was calculated defining as a reference the homozygote G/G for the studied polymorphisms in both, *TNF- α* , and *HSP70* and the homozygote A/A for *TNF- β* . The gene-dose effect was determined with a lineal trend analysis and the chi square test was performed using the Epidat 3.1 Software,²⁹ with a level of significance of $p \leq 0.05$.

Results

Population Studied

A total of 447 patients were studied: 228 with non-atrophic gastritis, 98 with intestinal metaplasia, 63 with gastric cancer and 58 with duodenal ulcer. A group of 132 ethnically matched, healthy blood donors without symptoms or previous diagnosis of gastroduodenal diseases comprised the asymptomatic group. The demographic and clinical characteristics of the study population are presented in Table 1, *H. pylori* seroprevalence was similar in all groups of patients, except for the gastric cancer group which had a lower frequency (66.7%). The asymptomatic group had a high *H. pylori* seroprevalence; which agrees with the reported data in Mexican adult population.³⁰ When compared with the asymptomatic group, seroprevalence to CagA was higher in intestinal metaplasia ($p = 0.0006$) and in duodenal ulcer patients ($p = 0.0375$). For all following analysis of polymorphisms only *H. pylori* infected cases were considered. All studied disease groups were in H-W equilibrium, for all the SNP's studied, with no significant differences when the observed and the expected genotype frequencies were compared. In the asymptomatic group, the SNPs in *HSP70-2* and *HSP70-HOM* were also in equilibrium, however, interestingly in this group SNP's *TNF- α* , *TNF- β* and *HSP70-1* showed a slight deviation from equilibrium.

SNPs in *TNF- α*

In our population, the frequency of *TNF- α* -G allele at position -308 was higher than the A allele (92.0% and 8.0%, respectively), similar to reports in other populations. Although no significant differences were observed between

patients and the asymptomatic group, a significant association of allele A was observed with duodenal ulcer when compared with the non-atrophic gastritis group ($p = 0.0208$, OR 3.31, 95% CI 1.48–7.39). A trend analysis was not applicable for this polymorphism since no cases with the homozygote A/A genotype were found in the disease groups intestinal metaplasia, gastric cancer and duodenal ulcer.

SNPs in *TNF- β*

When the frequency of the *TNF- β* polymorphism at position +252 was compared with the asymptomatic group, a higher frequency of the allele A was found in gastric cancer patients ($p = 0.016$, OR 5.69, 95% CI 1.88–17.19), but not in the duodenal ulcer group. In a trend analysis taking the A/A genotype as reference, the G/G genotype was found strongly associated with gastric cancer (OR 0.09) with a significant trend ($p = 0.0000$, Table 2), showing a gene-dose effect for the G allele. Similarly, a significant trend was observed when gastric cancer was compared with both, non-atrophic gastritis ($p = 0.0288$) and with intestinal metaplasia ($p = 0.0012$). A significant trend ($p = 0.0228$) for the allele G with the duodenal ulcer (Table 2) was also observed, showing a gene-dose effect for this allele in duodenal ulcer too.

SNPs in *HSP70*

When compared with the asymptomatic group, allele C of *HSP70-1* polymorphism at position +190, showed an increasing significant association from non-atrophic gastritis ($p = 0.104$, OR 1.92, 95% CI 1.14–3.21), to preneoplastic intestinal metaplasia ($p = 0.056$, OR 3.13, 95% CI 1.36–7.19), to gastric cancer ($p = 0.048$, OR 3.76, 95% CI 1.46–9.65). Allele C was also associated with duodenal ulcer ($p = 0.032$, OR 3.08, 95% CI 1.44–6.62). On the other hand, the C/G genotype (Table 3) was notoriously associated with gastric cancer (OR 13.31) and duodenal ulcer (OR 16.19), and to a lesser extent with the preneoplastic intestinal metaplasia group (OR 3.45). Concerning the C/C genotype, it showed significant association with non-atrophic gastritis (OR 4.37) and intestinal metaplasia (OR 4.91), but not with gastric cancer or duodenal ulcer; in fact, in a trend analyses a gene-dose effect was observed for the preneoplastic intestinal metaplasia lesion and for non-atrophic gastritis (Table 3).

Table 2. Associations of *TNF-β* +252 genotypes with gastroduodenal diseases in *H. pylori* seropositive patients

Studied groups (No. of patients)	Genotypes					p trend [†]
	A/A*	A/G		G/G		
	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	n (%)	OR (95% CI)	
Asymptomatic (106)	19 (17.9)	78 (73.6)		9 (8.5)		
Non-atrophic Gastritis (172)	66 (38.4)	90 (52.3)	0.33 (0.18–0.60)	16 (9.3)	0.51 (0.19–1.34)	0.0072
Intestinal Metaplasia (75)	20 (26.7)	45 (60.0)	0.55 (0.26–1.13)	10 (13.3)	1.06 (0.35–3.16)	0.6425
Gastric Cancer (42)	23 (54.8)	18 (42.9)	0.19 (0.09–0.42)	1 (2.4)	0.09 (0.01–0.79)	<0.0001
Duodenal Ulcer (50)	17 (34.0)	31 (62.0)	0.44 (0.20–0.96)	2 (4.0)	0.25 (0.05–1.31)	0.0228

Comparisons were made using the asymptomatic group as reference.

*A/A genotype was used as reference category.

[†]χ².

Table 3. Associations of *HSP70-1* + 190 genotypes with gastroduodenal diseases in *H. pylori* seropositive patients

Studied groups (No. of patients)	Genotypes					p trend [†]
	G/G*	C/G		C/C		
	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	n (%)	OR (95% CI)	
Asymptomatic (106)	59 (55.7)	41 (38.7)		6 (5.7)		
Non-atrophic Gastritis (163)	63 (38.7)	72 (44.2)	1.64 (0.98–2.77)	28 (17.2)	4.37 (1.69–11.30)	0.0009
Intestinal Metaplasia (78)	20 (25.6)	48 (61.5)	3.45 (1.79–6.66)	10 (12.8)	4.91 (1.58–15.25)	0.0001
Gastric Cancer (42)	4 (9.5)	37 (88.1)	13.31 (4.40–40.22)	1 (2.4)	2.46 (0.23–25.69)	<0.001
Duodenal Ulcer (50)	4 (8.0)	45 (90.0)	16.19 (5.40–48.51)	1 (2.0)	2.46 (0.23–25.69)	<0.001

Comparisons were made using the asymptomatic group as reference.

*G/G genotype was used as reference category.

[†]χ².

The study of polymorphisms in *HSP70-2* at position +1267 and in *HSP70-HOM* at position +2437 showed a lack of association of alleles or genotypes with any disease group (data not shown).

Combined genotypes

We analyzed if combinations of the studied genotypes of *TNF-α* and *TNF-β* would show increased risk for the disease groups when they were compared with the asymptomatic group, and found a protective association of G/G–A/G with gastric cancer ($p = 0.036$, OR 0.02, 95% CI 0.002–0.23). Moreover, when we analyzed combinations of *HSP70-1* with *HSP70-2* and *HSP70-HOM* genotypes, we found that the combination G/G–A/G–T/T was absent in gastric cancer patients whereas its frequency in the other groups was 25.5% in asymptomatic, 14.0% in non-atrophic gastritis, 13.7% in intestinal metaplasia and 4.7% in duodenal ulcer.

Haplotypes

TNF-α–*TNF-β* and *HSP70-1*–*HSP70-2*–*HSP70-HOM* haplotypes were analyzed too. For *TNF*, the *TNF-α*–G–*TNF-β*–A haplotype was the most common in all groups studied followed by the G–G haplotype. When comparisons were made with the asymptomatic group we found that whereas *TNF-α*–G–*TNF-β*–A was a risk factor for gastric cancer ($p = 0.04$, OR 3.93, 95% CI 1.59–9.66), *TNF-α*–G–*TNF-β*–G was protec-

tive for the same gastric cancer group ($p = 0.0048$, OR 0.16, 95% CI 0.055–0.45). In contrast, the *HSP70-1*–*HSP70-2*–*HSP70-HOM* haplotypes showed no association with any disease group.

SNPs in complete versus incomplete intestinal metaplasia

Since there are different types of intestinal metaplasia and one has been more associated with the natural history of intestinal gastric cancer, we next analyzed the frequency of alleles, genotypes and haplotypes between the intestinal metaplasia groups, complete intestinal metaplasia ($n = 51$) and incomplete colonic metaplasia ($n = 29$). When the two types of metaplasia were compared with the asymptomatic group and with the non-atrophic gastritis group, no significant associations were found in alleles and haplotypes of *TNF-α*, *TNF-β* and *HSP70-1*; and the genotypes in *TNF-α* and *TNF-β* did not show any significant trend. On the other hand, in *HSP70-1* a trend for risk was observed with complete intestinal metaplasia ($p = 0.0005$ (C/G OR 3.32, 95% CI 1.54–7.12; C/C OR 5.29, 95% CI 1.52–18.38)). In contrast, when the two types of metaplasia were compared with non-atrophic gastritis patients, the *TNF-β* +252 G/G genotype showed a significant trend for risk in incomplete colonic metaplasia patients ($p = 0.0372$ (A/G OR 1.15, 95% CI 0.42–3.13; G/G OR 4.12, 95% CI 1.27–13.44)), but not for complete intestinal metaplasia.

Discussion

Inflammation is a driving force in the pathogenesis of *H. pylori*-associated gastric cancer, and genes involved in the innate immune response are key players in this process. Since SNPs in genes related with inflammation vary across populations, it becomes necessary to study the frequency of their polymorphisms in different populations. Accordingly, in this study we searched for polymorphisms in some inflammation-related genes of chromosome 6 in a Mestizo Mexican population, searching for possible association with severe gastroduodenal diseases.

In the study of SNP -308, located in the promoter of *TNF- α* , we did not find any association with the allele A and gastric cancer, which is contrary to previous reports,³¹ although the frequency of the A/G genotype did increase in accordance to the severity of disease, from non-atrophic gastritis to intestinal metaplasia and to gastric cancer, suggesting a gradient risk from normal to preneoplastic to cancer lesions. The A/G genotype was also associated with duodenal ulcer, which suggests that this polymorphism is a risk for both gastroduodenal diseases. It should be noted that in a previous study in the North of Mexico, no association between this genotype and gastric cancer was found.³² The difference between our result and the previous results might be due to the fact that the population of Mexico is genetically diverse;³³ alternatively, size of the population studied (we studied considerably larger groups of patients) or differences in methods could explain the observed differences. Whereas studies in countries like Colombia,³⁴ Hungary,³⁵ China,³⁶ Korea³⁷ and Japan³⁸ have not found associations of SNPs in *TNF- α* with gastric cancer or duodenal ulcer, others have found association with the *TNF- α* -308 A/G genotype.⁷ Moreover, in recent meta-analysis, mostly in Caucasian populations, significant association of *TNF- α* -308 *A allele³¹ and of -308 A/A genotype with gastric cancer has been found.³⁹ This SNP has been linked to a change in the transcriptional activity of the gene and the allele A is associated with a higher production of *TNF- α* *in vitro*.¹⁴ An excess of *TNF- α* would cause a more severe inflammation in the gastric mucosa, hence increasing the risk for both, gastric cancer and duodenal ulcer as found in our study, suggesting that this genotype is a risk factor for diseases caused by a chronic long-lasting inflammatory injury of the gastroduodenal mucosa.

When the *TNF- β* SNP +252 was studied, we found a significant association of the allele A with gastric cancer (OR 5.69); the A allele was not observed as a risk for duodenal ulcer, which suggests that this SNP selectively favours the development of more serious neoplastic gastric lesions. In addition to the above evidences, a trend analyses showed a strong and significant gene-dose effect of the G/G +252 polymorphism against gastric cancer development, further supporting the role of this SNP as a possible protection factor for gastric cancer. This SNP has been mainly studied in Asia, a study in Chinese population reported the association of A/G genotype with susceptibility to develop gastric cancer in *H. pylori* infected individuals,³⁶ which is in agreement with our results.

Studies in other populations have not reported any association with gastric cancer.⁴⁰ On the other hand, the *TNF- β* +252 SNP A allele has been associated with an increase of mRNA and protein levels of *TNF- β* ;¹⁵ and an increased production of *TNF* would expose the gastric mucosa to more cell damage.

Altogether, these evidences show that *TNF* SNPs might be influencing gastroduodenal diseases related to *H. pylori*, and that the differences in the alleles and genotypes associations may be due to genetic background differences among populations.

Although the *HSP70-1* gene is constitutively expressed at low levels, during stress conditions its expression is increased.¹⁷ When polymorphisms in the *HSP70* genes were studied, only the allele C SNP +190 of *HSP70-1* was found significantly associated with both, gastric cancer and duodenal ulcer. Moreover, the OR for genotype C/G +190 increased from non-atrophic gastritis (1.64) to intestinal metaplasia (3.45), to gastric cancer (13.31), such a gradient of association further strengthens the observation that this SNP is a risk factor for gastric cancer. Even more, and similar to *TNF- β* , for the C/C homozygous of the +190 SNP we found a gene-dose effect for the preneoplastic stage intestinal metaplasia; these results add further evidence that the C/C genotype is a risk factor for the development of gastric cancer.

The +190 SNP is located in the 5'UTR of the gene and although it does not alter the amino acid sequence, this region plays a role in the control of cellular location, stability and translational efficiency of eukaryotic mRNA;⁴¹ thus, it may have a major regulatory role in the expression and function of *HSP70* protein. This suggests that the association we found for *HSP70-1* SNP +190 with gastric cancer and duodenal ulcer may be because this polymorphism causes modifications in the expression and location of *HSP70*, which would lead to increase risk of tissue damage and progress to more serious diseases. We should note that there are no previous studies on the association of this SNP with gastric cancer. Still, there are reports on the overproduction of *HSP70* in intestinal type adenocarcinoma⁴² and in other tumours;⁴³ which would strengthen our results, and suggest that this SNP might constitute a risk factor for gastric cancer and other tumours. A significant association of *HSP70-2* SNP at position +1267 with gastric cancer in Japanese women has been recently reported.⁴⁴ Authors worked with 223 gastric cancer patients (64 women) and a heterogeneous control group comprised of 200 patients with some other gastroduodenal disease (60 women). Although in our study we did not find such an association, this discrepancy might be due to differences in the genetic background between Japanese and Mexican populations.

Expression of *TNF* and *HSP70* in the gastric mucosa is affected by *H. pylori* infection; *TNF* is over expressed,^{1,45} while *HSP70* is down regulated.⁴⁶ Whereas in patients with gastric cancer, levels of both *TNF- α* ^{47,48} and *HSP70* have shown to be increased.⁴⁹ *TNF* is a powerful angiogenic factor,

which induces the expression of adhesion molecules involved in the motility and invasive-metastatic behaviour of tumour cells.⁵⁰ HSP70 acts as a chaperone molecule for antigenic peptides derived from tumour cells, leading to an antitumour immune recognition by cytotoxic T lymphocytes;⁵¹ it also induces TNF- α production,^{52,53} and has been found to protect tumour cells from TNF-mediated cytotoxicity.⁵⁴ In addition, HSP70 is induced in tumour cells to overcome the stressful conditions faced by the tumour, such as lack of nutrients, oxygen, or antitumour immune response contributing to their survival.⁵⁵ Moreover, some reports suggest possible linkage disequilibrium between *HSP70* and *TNF* SNPs, since *TNF* and *HSP70* gene families are located just 600 kb apart from each other.^{56,57} These reports suggest that TNF and HSP70 may act as endogenous tumour promoters *in vivo*.

Although we did not find any association of individual SNPs in *HSP70-2* and *HSP70-HOM* with gastric cancer or duodenal ulcer, when the frequency of the different *HSP70* genotype combinations was analyzed, we found that the *HSP70-1* G/G - *HSP70-2* A/G - *HSP70-HOM* T/T combination was absent in all gastric cancer patients, whereas it was relatively frequent in the other groups. This would suggest that this genotype combination may be a protective factor against the development of gastric cancer; an observation which, as far as we know, has not been reported previously.

It is known that among the different types of intestinal metaplasia, the incomplete colonic type is more associated with the intestinal type of distal gastric cancer.⁵⁸ Based on this, we studied whether these SNPs had associations with a specific type of metaplasia, but we did not find any polymorphism significantly associated with the incomplete colonic metaplasia. On the contrary, we found that *TNF- β* +252 genotype A/A was associated with protection against the incomplete colonic metaplasia, which is the preceding lesion for gastric cancer; this novel observation should be confirmed in a larger population.

One limitation of our study is the sample size; however, in spite of the reduced number of patients studied, we were able to observe statistically significant differences in the *TNF- β* and *HSP70-1* haplotypes, strongly suggesting they are associated with disease. Furthermore, using the frequencies of the asymptomatic group, we determined the statistical power of the gastric cancer sample and found it was over 90% for both, the *TNF- β* A/G and G/G genotypes and for the *HSP70-1* C/G genotypes. Still, we acknowledge that the results of this study should be confirmed with a larger number of patients. Regarding the disequilibrium observed in the asymptomatic group for *TNF- β* and *HSP70-1*, we have no clear explanation, although we suggest it might be due to

sample size or to the composition of this group, as we included only *H. pylori* positive individuals. In this particular group family studies are necessary to further explore the reason for deviation from H-W equilibrium.

In the group of gastric cancer patients the number of CagA seropositive subjects was larger than that of *H. pylori* seropositive subjects. The presence of cases seronegative for *H. pylori*, but seropositive for CagA has been documented previously by us⁵⁹ and others,⁶⁰ and it has been suggested that patients with advanced gastric cancer lesions keep a positive antibody responses to CagA even after the infection has been cleared and the antibody response to other *H.pylori* antigens has declined. *H. pylori* is able to colonize only normal gastric epithelia. If there is a mucosal damage, for example with preneoplastic lesions, the *H. pylori* colonization normally tends to disappear. Fading of the infection would alter diagnostic tests results, and those testing the memory of infection, such as humoral immune response would show a gradual decline.⁶¹

In summary, we found in a Mexican Mestizo population novel evidence of SNPs in the inflammation-related genes *TNF- α* , *TNF- β* and *HSP70-1* as possible risk factors for the development of precancerous lesions, gastric cancer and duodenal ulcer, probably because of their association with an intense and sustained inflammatory response. The significant severity-dose-response for the SNP's in *TNF* as risk markers from preneoplastic lesions to gastric cancer agrees with the natural history of distal gastric cancer described by Correa *et al.*⁶² and suggests that these SNPs may be useful as biomarkers of risk factors for gastric cancer. Further studies are necessary to determine what are the effects of these SNPs in the expression or regulation of these genes to better know the role they play in the driven inflammatory response as in the pathogenesis of severe chronic gastroduodenal diseases. This study also illustrates the diversity in the dose-response observed with the studied SNP's in different populations and stress and the need to conduct more studies in different populations. To our knowledge, this is the first study that documents SNP's in *TNF- β* and in *HSP70* as risk factors for gastric cancer and duodenal ulcer.

Acknowledgements

The authors thank Ruben B. Palomares for supplying the blood samples of the asymptomatic group, Dr. Julio Granados for his useful comments and Juan M. Mejia-Arangure for his assistance in part of the data analysis. JT is a recipient of an exclusivity scholarship from Fundacion IMSS, Mexico. O Partida-Rodriguez was supported by CONACYT. This work is dedicated to the memory of Dr. Roberto Kretschmer, a friend and stimulating colleague.

References

1. Crabtree JE, Shallcross TM, Heatley RV, Wyatt JL. Mucosal tumour necrosis factor α and interleukin-6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Gut* 1991;32:147-77.
2. Noach LA, Bosma NB, Jansen J, Hoek FJ, van Deventer SJ, Tytgat GN. Mucosal tumor necrosis factor α , interleukin 1 β , and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 1994;29:425-9.
3. Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Tanahashi T, Kashima K, Imanishi J. Chemokines in the gastric mucosa in

- Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1998;42:609–17.
4. Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest* 2007;117:60–9.
 5. Correa P. Human Gastric Carcinogenesis: A multistep and multifactorial process – First American Cancer Society award lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Res* 1992;52:6735–40.
 6. Khulusi S, Badve S, Patel P, Lloyd R, Marrero JM, Finlayson C, Mendall MA, Northfield TC. Pathogenesis of gastric metaplasia of the human duodenum: role of *Helicobacter pylori*, gastric acid, and ulceration. *Gastroenterology* 1996;110:452–8.
 7. Zambon CF, Basso D, Navaglia F, Belluco C, Falda A, Fogar P, Greco E, Gallo N, Rugge M, Di Mario F, Plebani M. Pro- and anti-inflammatory cytokines gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection: interactions influence outcome. *Cytokine* 2005;29:141–52.
 8. El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Schoenberg JB, Stanford JL, Mayne ST, Goedert J, Blot WJ, Fraumeni JF Jr, Chow WH. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology* 2003;124:1193–201.
 9. Camargo MC, Mera R, Correa P, Peek RM Jr, Fontham ET, Goodman KJ, Piazuelo MB, Scinicchi L, Zabaleta J, Schneider BG. Interleukin-1 β and Interleukin-1 Receptor Antagonist gene polymorphisms and gastric cancer: A meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:1674–87.
 10. Azuma T, Ito S, Sato F, Yamazaki Y, Miyaji H, Ito Y, Suto H, Kuriyama M, Kato T, Kohli Y. The role of the HLA-DQA1 gene in resistance to atrophic gastritis and gastric adenocarcinoma induced by *Helicobacter pylori* infection. *Cancer* 1998;82:1013–8.
 11. Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens* 2004;64:631–49.
 12. Sargent CA, Dunham I, Trowsdale J, Campbell RD. Human Major Histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:1968–72.
 13. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNF- α) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Human Mol Genet* 1992;1:353.
 14. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3195–9.
 15. Messer G, Spengler U, Jung MC, Honold G, Blömer K, Pape GR, Riethmüller G, Weiss EH. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF- β gene correlates with a variant amino acid in position 26 and reduced level of TNF- β production. *J Exp Med* 1991;173:209–19.
 16. Stüber F, Petersen M, Bokelmann F, Schade U. A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor- α concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 1996;24:381–4.
 17. Milner CM, Campbell RD. Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* 1990;32:242–51.
 18. Vargas-Alarcón G, Londoño JD, Hernández-Pacheco G, Gamboa R, Castillo E, Pacheco-Tena C, Cardiel MH, Granados J, Burgos-Vargas R. Heat shock protein 70 gene polymorphism in Mexican patients with spondyloarthropathies. *Ann Rheum Dis* 2002;61:48–51.
 19. Jalbout M, Bououina N, Gargouri J, Corbex M, Ben AS, Chouchane L. Polymorphism of the stress protein HSP70-2 gene is associated with the susceptibility to the nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett* 2003;193:75–81.
 20. Rugge M, Correa P, Dixon MF, Fiocca R, Hattori T, Lechago J, Leandro G, Price AB, Sipponen P, Solcia E, Watanabe H, Genta RM. Gastric mucosal atrophy: interobserver consistency using new criteria for classification and grading. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1249–59.
 21. Genta RM. Chap 8. Inflammatory disorders of the stomach. In: Odze R, Goldblum J, Crawford JM eds. *Surgical Pathology of the GI tract, liver, biliary tract and pancreas*. China: Saunders. 2004. 169 p.
 22. Miller SA, Dykes KK, Plesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acid Res* 1988;16:1215.
 23. Camorlinga M, Torres J, Perez-Perez G, Leal-Herrera Y, Gonzalez-Ortiz B, Madrazo de la Garza A, Gomez A, Muñoz O. Validation of a serologic test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and the immune response to urease and CagA in children. *Am J Gastroenterol* 1998;93:1264–70.
 24. Yamaguchi E, Itoh A, Hizawa N, Kawakami Y. The gene polymorphism of tumor necrosis factor-beta, but not that of tumor necrosis factor-alpha, is associated with the prognosis of sarcoidosis. *Chest* 2001;119:753–61.
 25. Milner CM, Campbell RD. Polymorphic analysis of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* 1992;36:357–62.
 26. Svejgaard A, Ryder LP. HLA and disease associations: Detecting the strongest association. *Tissue Antigens* 1994;43:18–27.
 27. Petrie A, Sabin C. *Medical statistics at a glance*. Massachusetts: Blackwell Science Ltd, 2000. 138 p.
 28. Sham P. *Statistics in human genetics*. Arnold Applications of Statistics. New York: Oxford University Press Inc. 2001.
 29. Hervada VX, Santiago PM, Vázquez FE, Castillo SC, Loyola EE, Silva ALC. Epidat 3.0 programa para análisis epidemiológico de datos tabulados. *Rev. Esp. Salud Publica* 2004;78:277–80.
 30. Torres J, Leal-Herrera Y, Perez-Perez G, Gomez A, Camorlinga-Ponce M, Cedillo-Rivera R, Tapia-Conyer R, Muñoz O. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J Infect Dis* 1998;178:1089–94.
 31. Zhang J, Dou C, Song Y, Ji C, Gu S, Xie Y, Mao Y. Polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha are associated with increased susceptibility to gastric cancer: a meta-analysis. *J Hum Genet* 2008;53:479–89.
 32. Garza-Gonzalez E, Bosques-Padilla FJ, El-Omar E, Hold G, Tijerina-Menchaca R, Maldonado-Garza HJ, Pérez-Pérez GL. Role of polymorphic IL-1B, IL-1RN and TNF-A genes in distal gastric cancer in Mexico. *Int J Cancer* 2005;114:237–41.
 33. Gorodezky C, Alaez C, Vázquez-García MN, de la Rosa G, Infante E, Balladares S, Toribio R, Pérez-Luque E, Muñoz L. The Genetic structure of Mexican Mestizos of different locations: tracking back their origins through MHC genes, blood group systems, and microsatellites. *Hum Immunol* 2001;62:979–91.
 34. Torres MM, Acosta CP, Sicard DM, Groot de Restrepo H. Genetic susceptibility and risk of gastric cancer in a human population of Cauca, Colombia. *Biomedica* 2004;24:153–62.
 35. Gyulai Z, Klausz G, Tiszai A, Lenart Z, Toth Kasa I, Lonovics J, Mandi Y. Genetic polymorphism of interleukin-8 (IL-8) is associated with *Helicobacter pylori*-induced duodenal ulcer. *Eur Cytokine Netw* 2004;15:353–8.
 36. Li C, Xia B, Yang Y, Li J, Xia HH. TNF gene polymorphism and *Helicobacter pylori* infection in gastric carcinogenesis in Chinese population. *Am J Gastroenterol* 2005;100:290–4.
 37. Kim N, Cho SI, Yim JY, Kim JM, Lee DH, Park JH, Kim JS, Jung HC, Song IS. The effects of genetic polymorphism of IL-1 and TNF-A on *Helicobacter pylori*-induced

- gastrointestinal diseases in Korea. *Helicobacter* 2006;11:105-12.
38. Sugimoto M, Furuta T, Shirai N, Nakamura A, Xiao F, Kajimura M, Sugimura H, Hishida A. Different effects of polymorphisms of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β on development of peptic ulcer and gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:51-9.
 39. Gorouhi F, Islami F, Bahrami H, Kamangar F. Tumour-necrosis factor- α polymorphism and gastric cancer risk: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2008;98:1443-51.
 40. Seno H, Satoh K, Tsuji S, Shiratsuchi T, Harada Y, Hamajima N, Sugano K, Kawano S, Chiba T. Novel interleukin-4 and interleukin-1 receptor antagonist gene variations associated with non-cardia gastric cancer in Japan: comprehensive analysis of 207 polymorphisms of 11 cytokine genes. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:279-37.
 41. Curtis D, Lehman R, Zamore PD. Translational regulation in development. *Cell* 1995;81:171-8.
 42. Canoz O, Beleni O, Patiroglu TE. General features of gastric carcinomas and comparison of HSP70 and NK cell immunoreactivity with prognostic factors. *Pathol Oncol Res* 2002;8:262-9.
 43. Kawanishi K, Shiozaki H, Doki Y, Sakita I, Inoue M, Yano M, Tsujinaka T, Shamma A, Monden M. Prognostic significance of heat shock proteins 27 and 70 in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1999;85:1649-57.
 44. Shibata T, Arisawa T, Tahara T, Yoshioka D, Maruyama N, Fujita H, Kamiya Y, Nakamura M, Nagasaka M, Iwata M, Takahama K, Watanabe M, et al. Protective role of genetic polymorphism of heat shock protein 70-2 for gastric cancer risk. *Dig Dis Sci* 2009;54:70-4.
 45. Suganuma M, Yamaguchi K, Ono Y, Matsumoto H, Hayashi T, Ogawa T, Imai K, Kuzuhara T, Nishizono A, Fujiki H. TNF- α -inducing protein, a carcinogenic factor secreted from *H. pylori*, enters gastric cancer cells. *Int J Cancer* 2008;123:117-22.
 46. Targosz A, Pierzchalski P, Krawiec A, Szczyrk U, Brzozowski T, Konturek SJ, Pawlik WW. *Helicobacter pylori* inhibits expression of heat shock protein 70 (HSP70) in human epithelial cell line. Importance of Cag A protein. *J Physiol Pharmacol* 2006;57:265-78.
 47. Izutani R, Katoh M, Asano S, Ohyanagi H, Hirose K. Enhanced expression of manganese superoxide dismutase mRNA and increased TNF α mRNA expression by gastric mucosa in gastric cancer. *World J Surg* 1996;20:228-33.
 48. Zhang X, Chen Y, Liu Y, Zhou X, Fan D. Local cytokines profile in gastric cancer lesions. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2002;24:14-6.
 49. Isomoto H, Oka M, Yano Y, Kanazawa Y, Soda H, Terada R, Yasutake T, Nakayama T, Shikuwa S, Takeshima F, Udono H, Murata I, et al. Expression of heat shock protein (Hsp) 70 and Hsp 40 in gastric cancer. *Cancer Lett.* 2003;198:219-28.
 50. Leek RD, Landers R, Fox SB, Ng F, Harris AL, Lewis CE. Association of tumour necrosis factor α and its receptors with thymidine phosphorylase expression in invasive breast carcinoma. *Br J Cancer* 1998;77:2246-51.
 51. Suto R, Srivastava PK. A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned-peptides. *Science* 1995;269:1585-8.
 52. Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 2000;6:435-442.
 53. Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 2002;277:15028-15034.
 54. Jäättelä M. Overexpression of major heat shock protein HSP70 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of phospholipase A2. *J Immunol* 1993;151:4286-94.
 55. Soti C, Csermely P. Molecular chaperones in the etiology and therapy of cancer. *Pathol Oncol Res* 1998;4:316-21.
 56. Chouchane L, Ahmed SB, Baccouche S, Remadi S. Polymorphism in the tumor necrosis factor- α promoter region and in the heat shock protein 70 genes associated with malignant tumors. *Cancer* 1997;80:1489-96.
 57. Mestiri S, Bouaoualou N, Ahmed SB, Khedhaler A, Belhadj B, Couchane L. Genetic variation in the Tumor Necrosis Factor- α promoter region and in the stress protein hsp70-2: Susceptibility and prognostic implications in breast carcinoma. *Cancer* 2001;91:672-8.
 58. Ruol A, Parenti A, Zaninotto G, Merigliano S, Costantini M, Cagol M. Intestinal metaplasia is the probable common precursor of adenocarcinoma in Barrett esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia. *Cancer* 2000;88:2520-8.
 59. Torres J, Perez-Perez GI, Leal-Herrera Y, Muñoz O. Infection with CagA+ *Helicobacter pylori* strains as a possible predictor of risk in the development of gastric adenocarcinoma in Mexico. *Int J Cancer* 1998;78:298-300.
 60. Klaamas K, Held M, Wadström T, Lipping A, Kurtenkov O. IgG immune response to *Helicobacter pylori* antigens in patients with gastric cancer as defined by ELISA and immunoblotting. *Int J Cancer* 1996;67:1-5.
 61. Camorlinga-Ponce M, Flores-Luna L, Lazcano-Ponce E, Herrero R, Bernal-Sahagún F, Abdo-Francis JM, Aguirre-García J, Muñoz N, Torres J. Age and severity of mucosal lesions influence the performance of serologic markers in *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal pathologies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17:2498-504.
 62. Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: state of the art. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996;5:477-81.