

Papel de los polimorfismos de algunas citocinas en el cáncer gástrico en México. Resultados preliminares

Dra. Elvira Garza-González,* Dra. Georgina Hold,** Dr. Guillermo Ignacio Pérez-Pérez,***
Dr. Francisco Javier Bosques-Padilla,**** Dr. Rolando Tijerina-Menchaca,*
Dr. Héctor Jesús Maldonado-Garza,**** Dr. Emad El-Omar**

* Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, U.A.N.L. ** Department of Medicine and Therapeutics, Aberdeen University, Scotland.

*** Departments of Medicine and Microbiology, New York University School of Medicine.

**** Servicio de Gastroenterología, Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González", U.A.N.L.

Correspondencia: Dr. Francisco J. Bosques Padilla. Av. Madero y Gonzalitos s/n, Colonia Mitras Centro, Monterrey, N. L. México, C.P. 64460.

Tel: 8346-2310. Fax: 8333-3664. Correo electrónico fbosques58@hotmail.com

Recibido para publicación: 14 de septiembre de 2002.

Aceptado para publicación: 14 de mayo de 2003.

RESUMEN Antecedentes: la interleucina (IL)-10, el factor de necrosis tumoral α (TNF α), la IL-1 β y el receptor antagonista de la IL-1 β modulan la respuesta inflamatoria en la infección por *Helicobacter pylori*. Los genotipos de interleucina-10 (IL-10-592, -1082), TNF α (TNF α -308), L-1B y el receptor antagonista de IL-1 β (IL-1B-31*C e IL-1RN*2/*2) han sido asociados a un mayor riesgo de cáncer gástrico en pacientes caucásicos. El objetivo de este trabajo fue investigar si esos mismos genotipos están relacionados con una mayor susceptibilidad al desarrollo de cáncer gástrico en la población mexicana. **Material y métodos:** se estudiaron 33 pacientes con ascendencia mexicana de, al menos, dos generaciones sin parentesco entre sí y con cáncer gástrico confirmado histológicamente (n = 25) o displasia de alto grado (n = 8) (media de edad 62.7, M/H = 0.37), así como 25 controles étnicamente similares y sin cáncer gástrico (media de edad = 39.9, M/H = 3.12). Todos los casos y controles tenían evidencia de infección por *H. pylori* por el resultado positivo de al menos dos de las siguientes pruebas diagnósticas: prueba rápida de ureasa, cultivo, histología o la detección de anticuerpos IgG anti-*H. pylori*. Se tipificaron los polimorfismos -592, -1082 en el gen IL-10, el -308 en el gen TNF α y el polimorfismo -31 en el gen IL-1B mediante el empleo del ensayo de PCR 5' nucleasa (TaqMan) y el polimorfismo en el número de repeticiones en tándem en el intron 2 del gen IL-1RN se tipificó por PCR de acuerdo con el método descrito previamente (Nature 2000; 404: 398). **Resultados:** el ser portador del alelo IL-1B-31*C se asoció con un mayor riesgo a desarrollar cáncer gástrico o displasia de alto grado (RM: 8.7, intervalo de confianza [IC] 95% = 1.5-66.9). No se encontró asociación entre los genotipos de IL-

SUMMARY Background: Interleukin-10, tumor necrosis factor α , Interleukin-1 β and interleukin-1 receptor antagonist cytokines modulate the inflammatory response in presence of *Helicobacter pylori*. Pro-inflammatory interleukin 10 (IL-10-592, -1082), TNF α (TNF α -308), interleukin-1 β and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1B-31*C and IL-1RN*2/*2) genotypes have been associated with higher risk of gastric cancer in Caucasians. The aim of this study was to investigate whether these same genotypes are involved in susceptibility to gastric cancer in Mexican population. **Materials and methods:** DNA from 33 unrelated Mexican patients with histologically confirmed gastric cancer (n = 25) or high-grade dysplasia (n = 8) (mean age 62.7, F/M = 0.37) and 25 ethnically matched healthy controls (mean age = 39.9, F/M = 3.12) were studied. All cases and controls had evidence of *H. pylori* infection as shown by at least two positive results from the following diagnostic tests: rapid urease test; culture; histology, or detection of IgG anti-*H. pylori* antibodies. The -592, -1082 polymorphism in IL-10 gene, the -308 in TNF α gene, and the -31 polymorphism in the IL-1B gene were typed by 5' nuclease PCR assays (TaqMan) and the variable number of tandem repeats polymorphism in intron 2 of the IL-1RN gene was typed by PCR and amplicon sizing as previously described (Nature 2000; 404: 398). **Results:** Carriage of the pro-inflammatory IL-1B-31*C allele was associated with increased risk of gastric cancer or high-grade dysplasia (OR: 8.7, 95% confidence interval [CI] = 1.5-66.9). No association was found between any IL-1RN, IL-10 or TNF α genotypes and gastric cancer or high-grade dysplasia. Logistic regression analysis identified male gender and carriage of IL-1B-31*C as independent risk fac-

IRN, IL-10 o TNF α y el desarrollo de cáncer gástrico o displasia de alto grado. El análisis de regresión logística identificó el género masculino y el ser portador de alelo IL-1B-31*C como factores independientes de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico (RM = 9.2, IC 95% = 2.4-34.5 y RM = 10, IC 95% = 1.6-64, respectivamente). **Conclusiones:** los resultados de este estudio preliminar confirman que el polimorfismo de IL-1B, así como el género masculino, son factores de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico en la población mexicana estudiada.

Palabras clave: citocinas, *Helicobacter pylori*, cáncer gástrico, interleucina-1 β .

tors for gastric cancer (OR = 9.2, 95% CI = 2.4-34.5, and OR = 10, 95% CI = 1.6-64, respectively). **Conclusions:** The results of this preliminary study confirm that the pro-inflammatory IL-1B genotypes, as well as male gender, are risk factors for development of gastric cancer in Mexican population.

Key words: Cytokines, *Helicobacter pylori*, gastric cancer, interleukin-1 β .

ANTECEDENTES

La infección por *Helicobacter pylori* está asociada al desarrollo de enfermedad ulceropéptica, linfoma gástrico, así como al desarrollo de adenocarcinoma gástrico. Sin embargo, la mayoría de los individuos infectados con esta bacteria no desarrollan ninguna enfermedad y permanecen asintomáticos por el resto de su vida.¹

Las razones de la divergencia clínica se comprenden muy poco hasta ahora, pero se cree que algunos factores de la bacteria, algunos del hospedero, así como factores ambientales, pueden contribuir a este proceso.

La inflamación local en la infección por *H. pylori* se caracteriza por la infiltración de neutrófilos y linfocitos en la mucosa gástrica, así como una producción incrementada de algunas citocinas. Ahora se reconoce que la variación entre los individuos de la expresión de estas citocinas es, al menos, parcialmente explicada por algunos polimorfismos en los genes que codifican para estas proteínas. Esto ha sido empleado en el estudio de la respuesta del hospedero a la infección por *H. pylori* y su relación con las presentaciones clínicas relacionadas con la infección, incluyendo el cáncer gástrico.

El gen que codifica para la interleucina-1 (IL-1) contiene tres genes relacionados (*IL-1A*, *IL-1B* e *IL1-RN*), los cuales codifican para las citocinas proinflamatorias IL-1 α , IL-1 β , así como el receptor antagonista IL-1ra, respectivamente.²

La IL-1 β es regulada positivamente en presencia de *H. pylori* y es importante en el inicio y amplificación de la respuesta inflamatoria a esta infección.

La IL-1 β es también un potente inhibidor de la secreción de ácido en el estómago.³ Un polimorfismo bialélico

en la posición -31 en el promotor del gen *IL-1B* ha sido asociado con el desarrollo de cáncer gástrico en pacientes caucásicos y asiáticos.²⁻⁵

El gen que codifica para la IL-1ra es polimórfico. Una región en el segundo intrón contiene un número variable de repeticiones en tándem de 86 pares de bases (pb) y se han identificado cinco diferentes alelos.

La presencia del alelo 2 correlaciona con una mayor producción de las proteínas IL-1ra e IL-1 β , y también se ha asociado con el desarrollo de cáncer gástrico en pacientes caucásicos.^{2,5}

Algunos polimorfismos en el promotor del gen que codifica para el factor de necrosis tumoral (*TNF- α 308*) e interleucina 10 (*IL-10-592* e *IL-10-1082*) también tienen un papel importante en la gastritis inducida en la infección por *H. pylori* y se ha encontrado que modifican el riesgo al desarrollo de cáncer gástrico en pacientes caucásicos.

El objetivo de este trabajo fue investigar si los polimorfismos de estas citocinas están involucrados en la susceptibilidad al desarrollo de cáncer gástrico en la población mexicana.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 33 pacientes mexicanos no relacionados entre sí con diagnóstico histológico de cáncer gástrico (n = 25) o displasia de alto grado (n = 8) y 25 controles sin cáncer étnicamente apareados (*Cuadro 1*), los cuales fueron sometidos a una endoscopia gastroduodenal en el Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González", Universidad Autónoma de Nuevo León. Se obtuvieron biopsias de antro y cuerpo del estómago, las cuales fueron empleadas para el cultivo

CUADRO 1
 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE LOS PACIENTES CON CÁNCER GÁSTRICO O DISPLASIA DE ALTO GRADO Y DEL GRUPO CONTROL SIN CÁNCER GÁSTRICO

	Media de edad \pm DE (años)	Femenino:Masculino	Margen (años)
Pacientes con displasia de alto grado o cáncer gástrico (n = 33)	62.7 \pm 14	0.37	33-84
Controles sin cáncer (n = 25)	39.9 \pm 16.7	3.12	16-70

de *H. pylori*, el análisis histológico y la prueba rápida de ureasa (PRU). Se obtuvo, además, muestra de suero, el cual fue congelado a -20 °C hasta su análisis.

Todos los casos y controles tenían evidencia de infección por *H. pylori* por el resultado positivo de al menos dos de las siguientes pruebas diagnósticas: cultivo, análisis histológico, PRU o la detección de anticuerpos IgG anti-*H. pylori*.

Cultivo de *H. pylori*

Las biopsias gástricas se sembraron en agar Columbia (Becton Dickinson, Cockeysville, MD) con sangre al 10% y fueron incubadas a 37 °C por 96 horas en condiciones de microaerobiosis. Las cepas se identificaron por la tinción de Gram, y las pruebas de oxidasa, catalasa y ureasa.⁶

Análisis histológico

Durante la endoscopia se obtuvieron ocho biopsias para el análisis histológico: dos de curvatura mayor, dos de curvatura menor, dos de incisura angular y dos de región prepilórica. Todas las biopsias analizaron por procedimientos estándares.

Prueba rápida de ureasa

Una biopsia de antro se colocó en un vial de prueba, se incubó a 37 °C y se leyó después de un máximo de 24 horas. Un cambio de color de naranja a rosa indicó una prueba positiva. La ausencia de cambio de color se interpretó como una prueba negativa.

Serología

Se empleó el ensayo inmunoabsorbente con enzima unida (ELISA) para la determinación de anticuerpos totales anti-*H. pylori* de acuerdo con el método previamente descrito.⁷

Extracción del ADN genómico humano

El ADN genómico humano se extrajo de 250 μ L de sangre completa, la cual se suspendió en amortiguador de lisis (100 mM Tris-HCl [pH 8.0], 5 mM EDTA, 0.2% dodecil sulfato de sodio [SDS], 200 mM NaCl). El ADN se extrajo dos veces en un volumen de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), y la fase superior se precipitó con etanol al 100% y se lavó dos veces con etanol al 70%. El ADN se dejó secar al aire y se resuspendió en 200 μ L de amortiguador Tris-EDTA.

Detección del polimorfismo -592, -1082 de *IL-10*, el -308 de *TNF-A* y -31 de *IL-1B*

Los polimorfismos fueron tipificados por el ensayo de PCR 5' nucleasa (TaqMan) de acuerdo con el método descrito previamente.¹ Las pruebas marcadas en 5' con los colorantes fluorescentes 6-carboxifluoresceína (FAM) o VIC y marcadas en 3' con 6-carboxi-tetrametil rodamina (TAMRA) se obtuvieron de Perkin Elmer Applied Biosystems. El ensayo se llevó a cabo con el equipo ABI PRISM Sequence Detection System (PE Applied Biosystems) empleando 50 ng de ADN en un volumen total de 25 μ L que contenía 1 x TaqMan Universal Master Mix (PE Applied Biosystems), 200 nM de cada prueba y 900 nM de cada iniciador. La amplificación se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos con las siguientes condiciones: 2 min a 50 °C y 10 min a 95 °C, seguida de 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min de apareamiento y extensión a 62 °C.

Detección del polimorfismo en el número variable de repeticiones en tándem del gen *IL-1RN*

La región polimórfica en el intrón 2 del gen *IL-1RN* se amplificó empleando la PCR de acuerdo con el método previamente descrito¹ (Cuadro 2). El tamaño de los

productos amplificados se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio al 0.1% (Figura 1). Los alelos fueron definidos de acuer-

do con las frecuencias observadas en individuos sin cáncer gástrico. Los alelos 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente, representan cuatro repeticiones, dos repeticiones, cinco repeticiones, tres repeticiones y seis repeticiones de la secuencia de 86 pb.

CUADRO 2
INICIADORES Y MEZCLA
DE REACCIÓN EMPLEADA PARA LA DETECCIÓN DEL
POLIMORFISMO EN EL NÚMERO VARIABLE DE
REPETICIONES EN TÁNDEM
DEL GEN *IL-RN*

Volumen de reacción	20- μ L
Iniciadores	80 pmol
	5'-CCCCTCAGCAACTCC-3'
	5'-GTCAGAAGGGCAGAGA3'
ADN genómico	50 ng
Taq ADN polimerasa	1 unidad
dNTP's	200 mM
MgCl ₂	1.5 mM

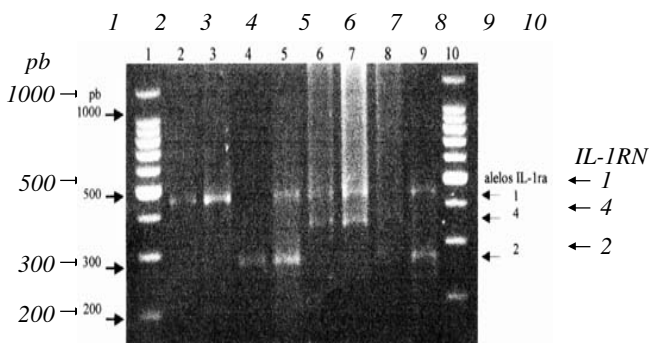


Figura 1. Gel de agarosa que muestra los diferentes patrones para los genotipos de *IL-1RN*. Carril 1 y 10 son marcadores de peso molecular (1Kb ADN), los carriles 2 al 9 son muestras de pacientes. Los carriles 2 y 3 son genotipo 1,1; el carril 4: 2,2; carriles 5 y 9: 1,2; carriles 6 y 7: 1,4 y carril 8: 2,4.

Análisis estadístico

Se determinó si existían diferencias significativas en la frecuencia de cada uno de los polimorfismos estudiados entre los grupos de estudio mediante la prueba t de Student, la prueba de Ji cuadrada (χ^2) exacta de Fisher de dos colas de acuerdo con el tamaño de la muestra. Una probabilidad (p) < 0.05 se consideró estadísticamente significativa. Se realizó, además, un análisis de regresión logística empleando el Software Epi-Info 2000 (versión 1.0.5; Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.).

RESULTADOS

Análisis univariado

Las frecuencias de los genotipos para cada polimorfismo se determinaron tanto para el grupo de pacientes con cáncer o displasia de alto grado como en los pacientes sin cáncer (controles). Las frecuencias obtenidas para los genes *IL-1B* e *IL-RN* genes se muestran en el cuadro 3.

El ser portador del alelo proinflamatorio *IL-1B-31* C* se asoció a un mayor riesgo al desarrollo de cáncer gástrico o displasia (RM: 8.7, 95% intervalo de confianza [IC] = 1.5-66.9).

No se observó diferencia significativa entre la frecuencia de alelos de los polimorfismos estudiados de los genes *IL-1RN*, *IL-10* o *TNF α* .

CUADRO 3
FRECUENCIAS DE LOS POLIFORMISMOS EN LOS PACIENTES CON DISPLASIA DE ALTO GRADO O CÁNCER GÁSTRICO Y CONTROLES SIN CÁNCER GÁSTRICO EN LOS GENES *IL-1B* E *IL RN*

Alelo	Controles (n = 25)		Casos (n = 33)	
	ILI-B-31 n (%)	IL RN n (%)	ILI-B-31n (%)	IL RN n (%)
1,1	9 (36)	10 (40)	2 (6)	18 (54.6)
1,2	7 (28)	14 (56)	17 (51.6)	11 (33.3)
2,2	9 (36)	1 (4)	14 (42.4)	2 (6.1)
1,4	-	0	-	1 (3.0)
2,4	-	0	-	1 (3.0)

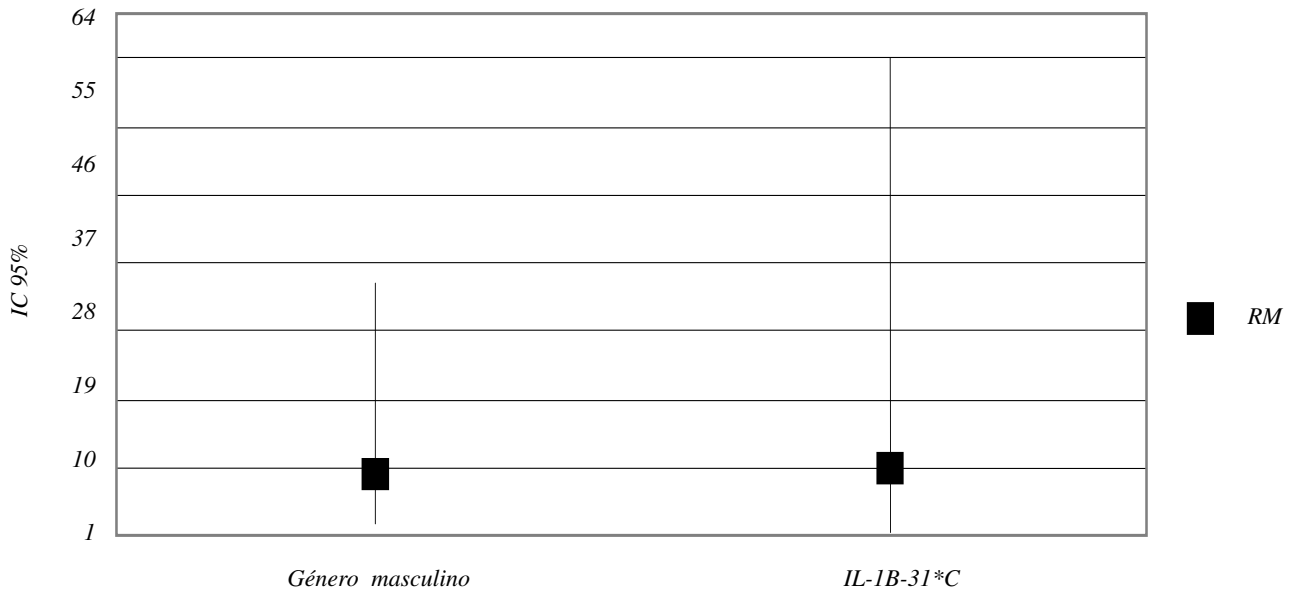


Figura 2. Razón de momios (RM) e intervalo de confianza del 95% (IC 95%) obtenidos en el análisis de regresión logística para las variables género y presencia del alelo IL-1B-31*C.

Análisis multivariado

Se llevó a cabo un análisis de regresión logística tomando en cuenta la presencia de cáncer gástrico o displasia de alto grado como variables independientes y el ser portador del alelo-31*C en el gen *IL-1B* y el género masculino como variables dependientes.

El análisis multivariado identificó el género masculino y el ser portador del alelo *IL-1B-31*C* como factores independientes para el riesgo a desarrollar cáncer gástrico (RM = 9.2, 95% CI = 2.4-34.5 y RM = 10, 95% CI = 1.6-64, respectivamente) (Figura 2).

DISCUSIÓN

El cáncer gástrico es una enfermedad compleja que es considerada de etiología multifactorial. Además de los factores bacterianos y del medio ambiente se han estudiado los factores genéticos de un individuo.⁸

Los genes *IL-1B* e *IL-1RN* son posibles factores del hospedero, porque codifican las citocinas IL-1 β e IL-1 α , respectivamente, las cuales tienen un papel muy importante en algunas funciones gástricas y en el mantenimiento de la integridad de la mucosa gástrica.^{2,9}

La IL-1 β tiene un papel central en la inflamación inducida por la infección por *H. pylori*, porque inhibe la migración de neutrófilos y es un potente inhibidor de la secreción de ácido y pepsinógeno en el estóma-

go.^{8,9} Se ha postulado que la producción de esta citocina altera la topografía de la infección y promueve la inflamación y consecuente atrofia del cuerpo gástrico, además, se ha demostrado que la producción de esta citosina se incrementa en la infección por *H. pylori* y los niveles se reducen luego de la erradicación de la bacteria.^{8,9}

La presencia del polimorfismo *IL-1B-31*C* se ha relacionado con el desarrollo de cáncer gástrico o lesiones precancerosas.²⁻⁴ En este trabajo realizado en población mexicana se confirma que el polimorfismo proinflamatorio IL-1B-31 confiere un aumento en el riesgo al desarrollo de cáncer. En este trabajo no se confirmó la asociación entre un mayor riesgo al desarrollo de cáncer gástrico y las frecuencias en los polimorfismos estudiados de los genes *IL-10*, *TNF α* o el *IL-1RN*, sin embargo, es necesario estudiar una población con un número mayor de casos antes de descartar cualquier asociación.

La confirmación de la importancia de IL- β en pacientes caucásicos y asiáticos^{2,4} y ahora en población mexicana apoya la idea del papel central de esta citosina en la respuesta del hospedero a la infección por *H. pylori* y el riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico.

Los resultados de este estudio proporcionan evidencia de que los factores genéticos, tal como el ser portador del polimorfismo *IL-1B-31*31C* son importantes en el desarrollo del cáncer gástrico, además de que la genotipificación del gen *IL-1B* podría ayudar a identi-

ficar factores de riesgo potenciales para el desarrollo de cáncer gástrico empleando métodos accesibles y no invasivos.

El conocimiento actual de la participación de algunas citocinas en la patogénesis del cáncer gástrico se encuentra aún en etapas tempranas, es necesario realizar estudios posteriores para determinar la influencia relativa de los factores genéticos del hospedero en la etiología del cáncer gástrico.

REFERENCIAS

1. Cremonini F, Gasbarrini A, Armizzi A, Gasbarrini G. *Helicobacter pylori* related diseases. *Eur J Clin Invest* 2001; 31: 431-7.
2. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000; 404: 398-402.
3. El-Omar EM. The importance of interleukin 1beta in *Helicobacter pylori* associated disease. *Gut* 2001; 48: 743-7.
4. Furuta T, El-Omar EM, Xiao F, et al. Effect of genetic polymorphism in Interleukin-1 β on gastritis, gastric juice pH, and recurrence of peptic ulcer disease in Japanese subjects. *Gastroenterology* 2002; 123: 92-106.
5. Machado JC, Pharoah P, Sousa S, et al. Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2001; 121: 823-9.
6. Pérez-Pérez GI. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. Culture, including transport. *Gastroenterol Clin North Am* 2000; 29: 879-84.
7. Blaser MJ, Pérez-Pérez G, Kleianthous H, et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995; 55: 2111-5.
8. Calam J, Baron JH. ABC of the upper gastrointestinal tract. Pathophysiology of duodenal and gastric ulcer and gastric cancer. *BMJ* 2001; 980-2.
9. Yamaoka Y, Kodama T, Kita M, et al. Relation between cytokines and *Helicobacter pylori* in gastric cancer. *Helicobacter* 2001; 6: 116-24.