

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE POSTGRADO



**ANÁLISIS DE INTERACCIÓN DE LOS POLIMORFISMOS CA-SSR-I, -216G>T, Y
R497K DEL GEN *EGFR*, ESTADO FUNCIONAL DEL GEN *OIPA* Y SU
RELACIÓN CON CÁNCER GÁSTRICO**

PAOLA ANDREA ANGARITA LOZANO

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN GENÉTICA

Director de Tesis: Prof. Dr. PATRICIO GONZÁLEZ HORMÁZABAL

2014

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. Factor de virulencia <i>OipA</i>	5
1.2. Gen <i>EGFR</i>	11
1.2.1. Polimorfismo CA-SSR-I.....	14
1.2.2. Polimorfismo SNP -216G>T (rs712829).....	15
1.2.3. Polimorfismo R497K (rs2227983).....	16
2. HIPÓTESIS.....	19
3. OBJETIVOS.....	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
4.1. Sujetos.....	22
4.1.1. Criterios de inclusión de casos y controles.....	22
4.1.2. Procedencia de los grupos muestrales.....	22
4.1.3. Muestras.....	23

4.1.4. Aspectos bioéticos.....	23
4.2. Análisis de laboratorio.....	23
4.2.1. Análisis del estado funcional del gen <i>OipA</i>	23
4.2.1.1. Extracción de DNA.....	23
4.2.1.2. Clasificación de los sujetos como <i>H.pylori</i> (+) y <i>H.pylori</i> (-).....	24
4.2.1.3. Tipificación de factores de virulencia mediante secuenciación del gen <i>OipA</i>	25
4.2.2. Análisis de polimorfismos del gen <i>EGFR</i>	25
4.2.2.1. Extracción de DNA.....	25
4.2.2.2. Análisis del polimorfismo CA-SSR-I.....	26
4.2.2.3. Análisis del polimorfismo R497K.....	27
4.2.2.4. Análisis del SNP -216G>T.....	27
4.3. Análisis estadístico aplicado al estudio.....	28
5. RESULTADOS.....	30
5.1. Características epidemiológicas de la población de estudio.....	30
5.1.1. Controles.....	30
5.1.1.1. Edad y sexo.....	30

5.1.1.2. Hallazgos endoscópicos.....	31
5.1.2. Casos.....	31
5.1.2.1. Edad y sexo.....	31
5.1.2.2. Descripción anatomopatológica.....	32
5.1.2.2.1. Localización y tamaño tumoral.....	32
5.1.2.2.2. Presentación macroscópica.....	34
5.1.2.2.3. Tipo histológico.....	35
5.1.2.2.4. Grado de diferenciación tumoral, estadio anatómico y grupo pronóstico.....	36
5.2. Clasificación de los sujetos según la presencia de infección por <i>Helicobacter pylori</i> (+).....	38
5.3. Genotipificación del gen <i>OipA</i> de <i>H. pylori</i>	39
5.4. Asociación del gen <i>OipA</i> de <i>Helicobacter pylori</i> con cáncer gástrico.....	42
5.5. Asociación de los polimorfismos del gen <i>EGFR</i> con cáncer gástrico.....	44
5.5.1. Asociación entre el polimorfismo CA-SSR-I del gen <i>EGFR</i> con cáncer gástrico.....	44
5.5.2. Asociación del polimorfismo R497K del gen <i>EGFR</i> con cáncer gástrico.....	53

5.5.3. Asociación del SNP -216G>T del gen <i>EGFR</i> con cáncer gástrico.....	55
5.6. Análisis de haplotipos definidos por los polimorfismos R497K y -216G>T.....	57
5.7. Interacción entre los polimorfismos del gen <i>EGFR</i> y el estado funcional “on” del gen <i>OipA</i>	58
5.7.1. Identificación de pares de factores que potencialmente interactúan.....	58
5.7.1.1. Interacción R497K - <i>OipA</i> “on”.....	59
5.7.1.2. Interacción -216G>T - <i>OipA</i> “on”.....	63
6. DISCUSIÓN.....	66
6.1. Asociación entre el gen <i>OipA</i> y cáncer gástrico	67
6.2. Asociación de los polimorfismos CA-SSR-I, -216G>T, y R497K del gen <i>EGFR</i> con cáncer gástrico.....	70
6.2.1. Polimorfismo CA-SSR-I.....	70
6.2.2. Polimorfismo R497K.....	72
6.2.3. Polimorfismo -216G>T.....	72
6.3. Interacción entre los polimorfismos del gen <i>EGFR</i> y el estado funcional “on” del gen <i>OipA</i>	73
7. CONCLUSIONES.....	77
8. ANEXOS.....	78
9. BIBLIOGRAFÍA.....	79

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Distribución de frecuencias por rango de edad y sexo en el grupo control.....	30
TABLA 2. Distribución de frecuencias de hallazgos endoscópicos en sujetos del grupo control.....	31
TABLA 3. Distribución de frecuencias de casos de cáncer gástrico clasificados por rango de edad y sexo.....	32
TABLA 4. Distribución de las frecuencias de casos de cáncer gástrico según la localización y el tamaño tumoral.....	34
TABLA 5. Frecuencia de casos de cáncer gástrico según su aspecto macroscópico.....	35
TABLA 6. Frecuencia de tumores clasificados según tipo histológico.....	36
TABLA 7. Frecuencia de casos de cáncer gástrico clasificados según el grado de diferenciación tumoral.....	37
TABLA 8. Frecuencia de tumores clasificados según etapas (estadio anatómico) y grupo pronóstico.....	38
TABLA 9. Frecuencia de infectados por <i>H. pylori</i> en casos de cáncer gástrico, según tipo histológico y controles.....	39

TABLA 10. Frecuencia de patrones de repetición del dinucleótido CT del gen <i>OipA</i> según su estado funcional en aislados de <i>H. pylori</i> de pacientes con cáncer gástrico y controles.....	42
TABLA 11. Frecuencia del estado funcional del gen <i>OipA</i> de <i>H. pylori</i> y su asociación con cáncer gástrico, según tipo histológico y controles.....	43
TABLA 12. Distribución de la frecuencia del estado funcional del gen <i>OipA</i> y <i>H. pylori</i> (-) y su asociación con cáncer gástrico.....	44
TABLA 13. Frecuencia alélica del polimorfismo CA-SSR-I del gen <i>EGFR</i> en casos de cáncer gástrico y controles.....	46
TABLA 14. Frecuencias genotípicas del polimorfismo CA-SSR-I del gen <i>EGFR</i> en casos de cáncer gástrico y controles.....	47
TABLA 15. . Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo CA-SSR-I del gen <i>EGFR</i> en casos de cáncer gástrico y controles tomando como punto de corte 16 repeticiones CA.....	49
TABLA 16. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo CA-SSR-I del gen <i>EGFR</i> en casos de cáncer gástrico y controles tomando como punto de corte 17 repeticiones CA.....	50
TABLA 17. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo CA-SSR-I del gen <i>EGFR</i> en casos de cáncer gástrico y controles tomando como punto de corte 18 repeticiones CA.....	51

TABLA 18. Frecuencia de la suma de alelos ≤ 32 del polimorfismo CA-SSR-I del gen <i>EGFR</i> en casos de cáncer gástrico y controles.....	52
TABLA 19. Frecuencia de la suma de alelos ≤ 34 del polimorfismo CA-SSR-I del gen <i>EGFR</i> en casos de cáncer gástrico y controles.....	53
TABLA 20. Frecuencia de la suma de alelos ≤ 36 del polimorfismo CA-SSR-I del gen <i>EGFR</i> en casos de cáncer gástrico y controles.....	53
TABLA 21. Frecuencias genotípicas y alélicas para el polimorfismo R497K del gen <i>EGFR</i> en casos de cáncer gástrico y controles.....	55
TABLA 22. Frecuencias genotípicas y alélicas para el SNP -216G>T del gen <i>EGFR</i> en casos de cáncer gástrico y controles.....	56
TABLA 23. Distribución de frecuencias de haplotipos en casos de cáncer gástrico y controles.....	57
TABLA 24. Ganancia de información para las diferentes combinaciones de pares de factores, de acuerdo al grado de diferenciación histológica.....	58
TABLA 25. Interacción entre el polimorfismo R497K del gen <i>EGFR</i> y el estado “on”-“off” del gen <i>OipA</i> de <i>H. pylori</i> en casos de cáncer gástrico según tipo histológico.....	62
TABLA 26. Interacción entre el polimorfismo -216G>T del gen <i>EGFR</i> y el estado “on”-“off” del gen <i>OipA</i> de <i>H. pylori</i> en casos de cáncer gástrico según tipo histológico.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Vías de señalización de <i>OipA</i> relacionadas con patogenicidad.....	9
FIGURA 2. Participación de <i>EGFR</i> , PI3K en la producción de IL-8 inducida por <i>H. pylori</i> en células epiteliales gástricas.....	10
FIGURA 3. Vías de señalización del receptor <i>EGFR</i>	13
FIGURA 4. Secuencia del gen <i>OipA</i> de <i>Helicobacter pylori</i> que representa el patrón de 6 repeticiones de dinucleótido CT en la región codificante 5'.....	39
FIGURA 5. Análisis del polimorfismo CA-SSR-I del gen <i>EGFR</i> mediante electroforesis capilar.....	45
FIGURA 6. Asociación entre la longitud de repeticiones CA y la expresión del gen <i>EGFR</i>	76

RESUMEN

El cáncer gástrico representa la tercera causa de mortalidad por cáncer en el mundo. La infección por *Helicobacter pylori* se relaciona con cáncer gástrico. Entre los factores de virulencia de esta bacteria se encuentra la proteína externa de membrana oipA. La expresión de la proteína activa oipA depende del número de repeticiones de dinucleótido CT en la región codificante 5' del gen. *OipA* activa la vía de señalización EGFR-PI3K. *EGFR* se encuentra sobre expresado en cáncer gástrico y la amplificación de su gen se correlaciona con un pobre pronóstico de la enfermedad. En esta tesis se estudió la asociación con cáncer gástrico e interacción entre los polimorfismos CA-SSR-I, -216G>T, y R497K del gen *EGFR*, y la presencia del gen *oipA* de *H.pylori* en estado funcional "on", mediante un estudio de 147 casos y 160 controles. El estado funcional de *oipA* se determinó mediante secuenciación. Se genotipificaron los polimorfismos propuestos mediante el ensayo 5'Exonucleasa (Taqman®) [R497K], RFLP [-216G>T] y electroforesis capilar [CA-SSR-I]. Los resultados indicaron que el estado funcional "on" de *oipA* de *H. pylori* se asoció con cáncer gástrico ($p < 0,0001$, OR: 9,82 [IC95% 3,25-29,62]). Esta asociación predominó en los tumores de alto grado histológico (OR: 25,71 [IC95%3,36-196,63]). Las variantes CA-SSR-I, R497K y -216G/T del gen *EGFR* no se asociaron con cáncer gástrico. Sin embargo se sugiere interacción entre *OipA* "on" y los polimorfismos R497K (OR: 2,35 [IC95 %1,18-4,70]) y -216G/T (OR: 4,73 [IC95% 1,00-22,34]).

ABSTRACT

Gastric cancer is the third leading cause of cancer mortality in the world. Infection with *Helicobacter pylori* is associated with this cancer. Outer membrane protein oipA is an H.pylori virulence factor. The expression of the active form of oipA depends on the number of CT dinucleotide repeats in 5' end of the gen coding region. This virulence factor activates the EGFR-PI3K signaling pathway. EGFR gene is overexpressed in gastric cancer and its amplification correlates with poor prognosis. In this study, we analyzed the association with gastric cancer and interaction between the CA-SSR-I, -216G/T and R497K polymorphisms of the EGFR gene, and the oipA functional status "on", through a study of 147 cases and 160 controls. OipA functional status was analyzed by sequencing. Genotyping was performed by 5'exonuclease assay (Taqman ®) for R497K, RFLP for -216G/T and capillary electrophoresis for CA-SSR-I. The results indicated that functional status "on" was associated with increased risk of gastric cancer ($p < 0.0001$, OR: 9.82 [95%CI 3.25 to 29.62]). This association was predominant in high grade tumors (OR: 25.71 [95%CI 3.36 to 196.63]). The CA-SSR -I, R497K and -216G>T polymorphisms was not associated with gastric cancer. However an interaction between *oipA* "on" and the SNPs R497K (OR: 2.35 [95%CI 1.18 to 4.70]) and -216G/T (OR: 4.73 [95%CI 1.00 to 22.34]) is proposed.

INTRODUCCIÓN

El cáncer gástrico es la tercera causa de mortalidad por cáncer a nivel mundial produciendo 723.000 muertes anuales, y es la quinta neoplasia más frecuente en el mundo (IARC, 2012).

En Chile el cáncer gástrico se ha convertido en un problema de salud pública, debido a que ocupa el primer lugar entre las causas de muerte por tumores malignos en hombres y la cuarta en mujeres (<http://www.deis.cl/estadisticas-mortalidad/>). De acuerdo a IARC, en Chile, en el año 2012 las tasas de mortalidad fueron: 17,1/100.000 hombres y 9,5/100.000 mujeres (IARC, 2012), ubicándose dentro de los 20 países con mayor incidencia y mortalidad por esta enfermedad en el mundo. Dentro del país, la distribución de la mortalidad es variable. Existen regiones con altas tasas de mortalidad (Araucanía, BíoBío) y otras con mortalidad baja (Arica, Antofagasta) (Ferrecio y cols., 2007).

El adenocarcinoma es el tipo de cáncer gástrico más frecuente, presentándose en el 90% de los casos. Puede ser de dos tipos: intestinal o diferenciado y difuso o mal diferenciado. El tipo intestinal es el más frecuente en las poblaciones de alto riesgo; y se considera que es el resultado final de una serie de cambios histopatológicos consecutivos que inician con una inflamación crónica de la mucosa gástrica que progresa a gastritis atrófica, metaplasia intestinal, displasia y finalmente cáncer gástrico (Correa, 1992). Su localización más frecuente es el antro gástrico, y las células tienden a organizarse en estructuras tubulares o glandulares. En contraste, el

tipo difuso a menudo se asocia con carcinoma de distribución familiar, se localiza con mayor frecuencia en el cardias y carece de formación glandular.

El principal factor de riesgo asociado a esta neoplasia es la infección por *Helicobacter pylori*: un bacilo Gram negativo en forma de espiral, microaerófilico, curvado, cuyo nicho ecológico es la mucosa gástrica humana.

Helicobacter pylori ha sido reconocido desde 1994 por la International Agency for Research on Cancer (IARC) y la OMS como carcinógeno tipo I. Es decir que existe suficiente evidencia para considerar que tiene una capacidad carcinogénica probada. Es responsable del 63,4% de todos los cánceres de estómago en todo el mundo (Parkin, 2006). *H. pylori* infecta a más de la mitad de la población humana y su distribución mundial es variable (IARC, 2012). En Chile, al año 2007 la prevalencia de la infección de *H. pylori*, estandarizada por la población mundial, fue estimada en 74,5% para la población entre 20 y 60 años de edad, siendo más alta en hombres que en mujeres (76,8% y 69,7%, respectivamente) (Ferreccio y cols., 2007).

A pesar de la fuerte asociación entre la infección por *Helicobacter pylori* y cáncer gástrico, muchas personas infectadas no desarrollan este tipo de cáncer. De hecho el 1-2% de los infectados desarrolla adenocarcinoma gástrico (Wen y Moss, 2009). Curiosamente, a pesar de la alta prevalencia de infección por *H. pylori* en África y Asia del Sur, la incidencia de cáncer gástrico en estas zonas es mucho menor que en otros países, lo que se conoce como los “enigmas africano y asiático” respectivamente (Malaty, 2007). La infección por *H. pylori* también se ha asociado a otras enfermedades como úlcera péptica y patologías extradi digestivas como anemia

ferropénica, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedades cardiovasculares y enfermedades hepatobiliares, entre otras (Mitchell y cols., 2010).

Se ha descrito la presencia de diferentes genes relacionados con la virulencia de *Helicobacter pylori*. Según Yamaoka (2002), estos factores de virulencia se clasifican en tres categorías: Isla de patogenicidad cag (cag PAI), Citotoxina vacA, y Proteínas externas de membrana (OMP). Se considera que el 4% del genoma de *H. pylori* contiene aproximadamente 32 genes que codifican para OMP (Ohno y cols., 2009). Éste es el grupo más grande e incluye adhesinas como *BabA* (*HopS*), *SabA* (*HopP*), *OipA* (*HopH*), *AlpAB* (*HopB* y *HopC*), *HopQ*, *HomA/HomB*. Este grupo de proteínas Hop (*Helicobacter outer membrane protein*) median la adhesión de *H. pylori* a las células epiteliales gástricas. Esta adhesión es necesaria para la colonización gástrica y para la inducción de la cascada inflamatoria y, finalmente cáncer gástrico (Backert y cols., 2010).

El gen *OipA* presenta variabilidad genética entre las diferentes cepas, y es una de las OMP más estudiadas.

1.1. Factor de virulencia *OipA*:

La proteína externa de membrana *OipA* es un importante factor de virulencia que actúa como una adhesina que participa en la unión de *H. pylori* a las células epiteliales gástricas. Yamaoka y colaboradores (2002) realizaron estudios en roedores para evaluar, entre otros, las funciones que desempeña el gen *OipA* en relación con la colonización e inflamación de la mucosa gástrica, encontrando que el

estado funcional del gen *OipA* está estrechamente relacionado con la capacidad de inducir inflamación gástrica y potencialmente juega un papel importante en el desarrollo de cáncer gástrico. Esta relación fue confirmada por Franco y colaboradores (2008) en un modelo animal. Inocularon la cepa silvestre de *OipA* (TN2) de *Helicobacter pylori* o la mutante isogénica para el gen *OipA*, en un grupo de jerbillos de Mongolia e hicieron seguimiento durante 12, 16 y 24 semanas. Encontraron que tras 16 semanas de seguimiento el 56% de los jerbillos infectados con la cepa silvestre desarrollaron displasia y/o carcinoma, frente a un 9% de los infectados con la cepa mutante que sólo desarrolló displasia. Al analizar a los roedores 24 semanas después de la inoculación, el 44% de los infectados con la cepa de tipo silvestre tenía adenocarcinoma en comparación con el 27% de los jerbillos infectados con la cepa mutante. Los roedores infectados con la cepa mutante que desarrollaron cáncer, tenían compromiso focal y de la submucosa superficial, en comparación con los infectados con la cepa silvestre, que presentaron lesiones más extensas. Los autores concluyeron que *OipA* juega un papel en la carcinogénesis gástrica inducida por *H. pylori*.

Este gen está localizado aproximadamente a 100 kb de la Isla de patogenicidad cag PAI de *Helicobacter pylori*. La producción de la proteína activa *OipA* y su expresión puede encontrarse en estado "on" u "off" (on: estado funcional y off: no funcional) en función del número de repeticiones de dinucleótido CT en la región 5' o secuencia señal del gen de *OipA* (Yamaoka y cols., 2002). Se ha encontrado que el gen funcional de *OipA* contiene 6 ó 9 repeticiones de dinucleótidos CT y que la secuencia del péptido mantiene el marco de lectura intacto, lo que permite la traducción de la

proteína completa, de tal manera que el estado del gen podría ser considerado como "on". En contraste, un estado no funcional contiene 5 ó 7 repeticiones de dinucleótidos CT y modifica el marco de lectura, produciendo un codón de término anticipado y generando una proteína no funcional, por lo tanto este número de repeticiones se considera que se encuentra en estado "off" (Yamaoka y cols., 2002).

A partir del estudio de líneas celulares de cáncer gástrico se ha asociado el estado funcional "on" de *OipA* con un aumento en la secreción de interleuquina-8 (IL-8) (Yamaoka y cols., 2002): un potente factor quimiotáctico y péptido activador de neutrófilos, monocitos y linfocitos T, que contribuye a la fosforilación de múltiples vías de señalización que normalmente interactúan con *CagA*, así como a un aumento en la respuesta inflamatoria *in vitro*. Además, la IL-8 también podría inducir angiogénesis, crecimiento tumoral, invasión y metástasis potencial en las células cancerosas (Maeda y cols., 1998). Por lo tanto, el estado funcional en el que se encuentre el gen *OipA* puede estar relacionado con la capacidad de *H. pylori* de inducir la carcinogénesis.

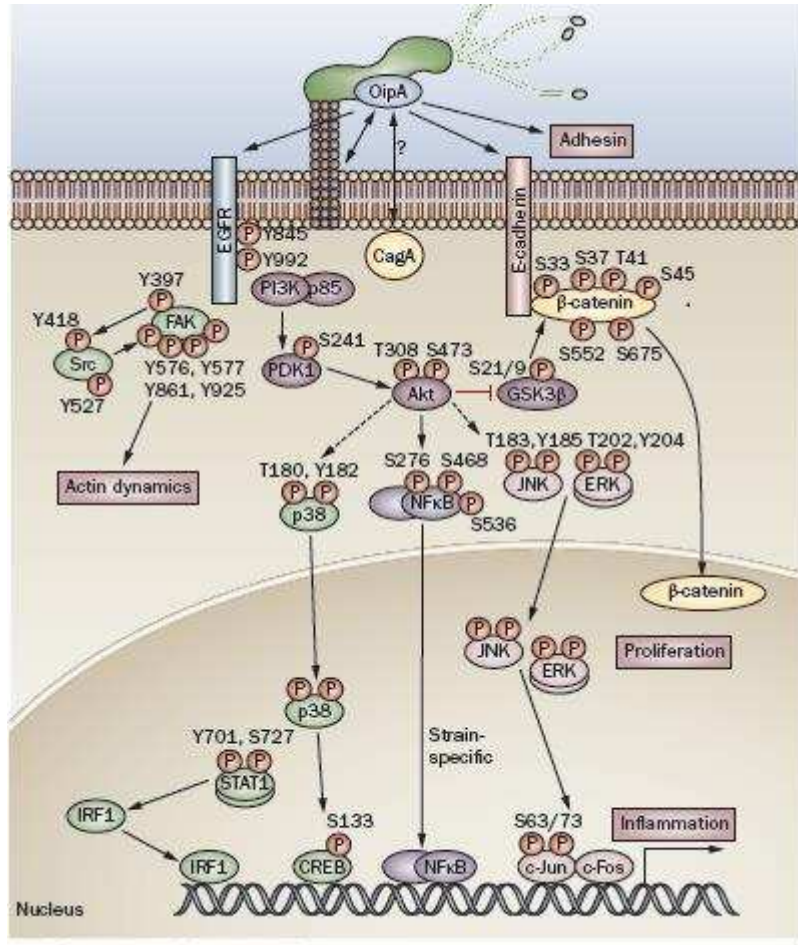
De acuerdo con diversos estudios hasta la fecha, es interesante observar que todas las cepas del Este de Asia se clasifican como *OipA* en estado funcional "on". Así, en Malasia y Singapur se encontró que 90-95% de las cepas están en estado funcional *OipA* "on". (Yamaoka y cols., 2000). Resultados similares obtuvieron Ando y cols. (2002) en Holanda, Dossumbekova y cols. (2006) en Alemania y Markovska y cols. (2011) en Bulgaria, donde encontraron una elevada prevalencia del estado funcional "on" del gen *OipA*. Se ha asociado el estado funcional del gen *OipA* con otros

factores de virulencia y diversos resultados clínicos. Cabe destacar que estos estudios asocian la presencia del gen *OipA* o el estado funcional de este gen con úlcera duodenal, y sólo existe un estudio hasta la fecha que lo asocia con cáncer gástrico. Yamaoka y colaboradores (2006) realizaron un estudio en 80 pacientes con úlcera duodenal, 80 pacientes con gastritis y 40 pacientes con cáncer gástrico. Encontraron que la expresión del factor de virulencia *OipA* se asoció significativamente con cáncer gástrico en comparación con gastritis [OR: 4,8 (IC 95% 1,4 a 16,8), $p=0,013$], y concluyen que *OipA* es un predictor independiente determinante de cáncer gástrico.

Se han realizado algunos estudios con el objetivo de identificar las cascadas de señalización inducidas por *OipA* sobre la célula epitelial (revisado por Yamaoka, 2010. Figura 1). En el año 2009, Tabassam y colaboradores sugirieron que *OipA* induce la producción de IL-8 a través de la activación de la vía de señalización EGFR-PI3K. Estos autores estudiaron a través del cultivo de líneas celulares de cáncer gástrico, que al inhibir la fosforilación de *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor) mediante un inhibidor farmacológico en las células infectadas con la cepa silvestre de *H. pylori* (*OipA*+) se redujo la producción de IL-8 en un 60% (Figura 2). Sin embargo, la inhibición de la activación de *EGFR* en los mutantes *OipA* o *cag PAI* reduce la producción de IL-8 en un 30% aproximadamente. Además, el tratamiento de las células infectadas con la cepa silvestre de *H.pylori* con un inhibidor farmacológico de PI3K reduce la producción de IL-8 en aproximadamente un 50%, mientras que la inhibición de la activación de PI3K en los mutantes *OipA* o *cag PAI* reduce la producción de IL-8 sólo en un 25%. Considerando estos resultados los

autores proponen que *OipA* y *cag PAI* inducen la producción de IL-8 en la célula epitelial de la mucosa gástrica a través de la activación de la vía EGFR-PI3K.

Figura 1. Vías de señalización de *OipA* relacionadas con patogenicidad.

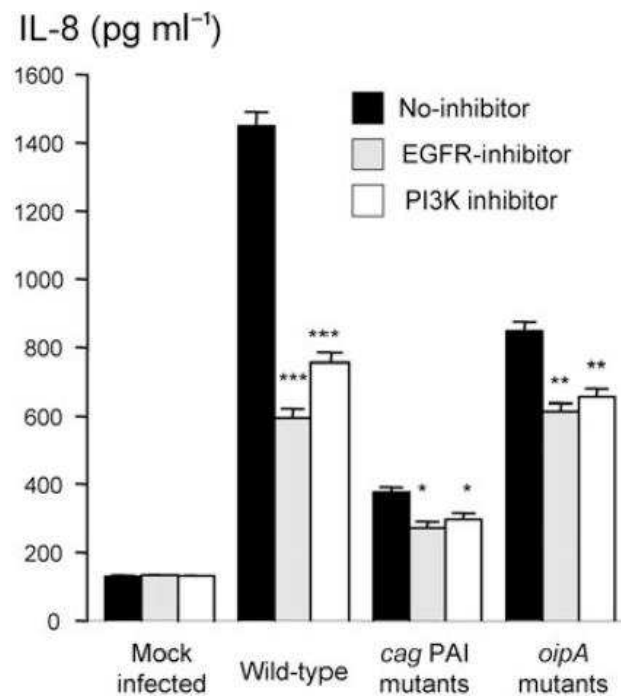


OipA regula diferentes vías de señalización en la célula epitelial. *OipA* es necesario para la activación completa del promotor de IL-8, que diverge río arriba de IRF. Participa en la activación de STAT1/IRF1/ISRE y la fosforilación de FAK. Tomado de Yamaoka (2010).

El *EGFR* se ha convertido en objeto de estudio en diversos tipos de cáncer debido a su importante participación en la biología tumoral. En cáncer gástrico, el *EGFR* se encuentra sobre expresado y se sabe que la amplificación de su gen se correlaciona

con un pobre pronóstico de la enfermedad (Zheng y colaboradores, 2004, Kim y colaboradores, 2008). Considerando que el gen *OipA* de *H. pylori* (en su estado funcional “on”) está relacionado con cáncer gástrico, y que esta proteína activa la vía de señalización de *EGFR*, es posible proponer que exista una interacción entre ambos genes sobre el riesgo de desarrollar cáncer gástrico.

Figura 2. Participación de *EGFR*, PI3K en la producción de IL-8 inducida por *H. pylori* en células epiteliales gástricas.



Se cultivaron líneas celulares AGS infectadas con la cepa silvestre de *H. pylori*, mutantes *cag* PAI y mutantes *OipA* durante 18 horas con o sin tratamiento previo con un inhibidor farmacológico de *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*) (AG1478) o un inhibidor de PI3K durante 2 horas. Al inhibir la fosforilación de *EGFR* se redujo la producción de IL-8 en un 60%, mientras que la inhibición de la activación de *EGFR* en los mutantes *cag* PAI o mutantes *OipA* redujo la producción de IL-8 en aproximadamente el 30%. Tomado de Tabassam y cols., (2009).

1.2. Gen *EGFR*:

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*) es un miembro de la familia de receptores tirosina quinasa de la familia erb-B, que incluyen a *EGFR* (ErbB-1 o HER-1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3), y ErbB4 (HER4), y está implicado en la regulación de la proliferación y diferenciación en varios tipos celulares (Han y Lo, 2012). El gen que codifica *EGFR* está localizado en el brazo corto del cromosoma 7 (7p12.1-12.3). Su producto es una glicoproteína de transmembrana de 170-kDa, que comúnmente se expresa en los tejidos humanos normales (entre ellos mucosa gástrica) y malignos (Keates y colaboradores, 2007).

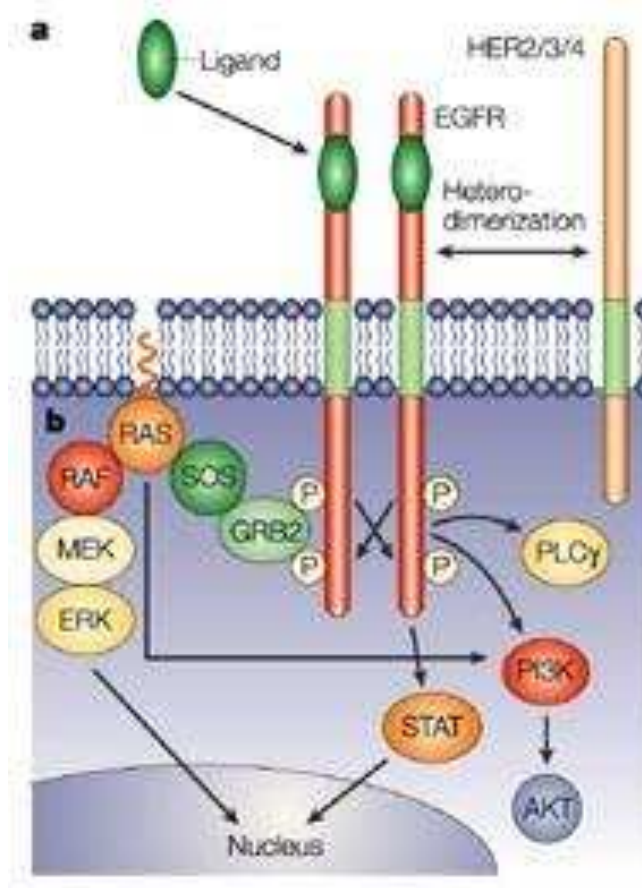
La activación del *EGFR* está relacionada con múltiples procesos biológicos, incluyendo la progresión del ciclo celular, la invasión y la diferenciación celular, que están estrechamente relacionados con la progresión tumoral (Mammano y colaboradores, 2006). La expresión de *EGFR* está aumentada en muchas enfermedades inflamatorias y cáncer, donde la inflamación es prevalente. Está presente en la superficie de las células cancerosas de varios tipos de tumores malignos, y se encuentra sobre expresado en aproximadamente 30% de los tumores primarios, asociándose significativamente con estadios avanzados de la enfermedad, pronóstico, supervivencia, y la respuesta a quimioterapia (Grandis y cols., 2004).

Esta familia de receptores comparte la misma estructura molecular. Tienen un dominio intracelular que se activa tras la unión del ligando al dominio extracelular de *EGFR* (Carpenter y Cohen, 1990). Esta unión conduce a la dimerización del receptor, por la activación del dominio citosólico del receptor tirosina quinasa y la

autofosforilación de los receptores, causando la activación de una cascada de transducción de señales que promueven la proliferación, diferenciación, invasión, migración, metástasis, angiogénesis e inhibición de la apoptosis. Sin embargo, hay varios mecanismos que conducen a la activación aberrante del receptor observado en el cáncer, incluyendo la sobre expresión de *EGFR*, la mutación en regiones codificantes para aminoácidos relacionados con la dimerización de ligando-receptor y la activación independiente del ligando (Laskin y colaboradores, 2004).

Se reconocen al menos tres vías principales de esta señalización, que están involucradas en el desarrollo y la progresión del cáncer (Figura 3): primero, a través de una vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), conduce a la activación de Akt y a la supresión de la apoptosis; segunda, una vía a través de Grb2 y Sos que conduce a la activación de Ras que estimula el ciclo celular, y tercero, a través de la fosforilación de fosfolipasa C- γ 1 que conduce a la reorganización de la actina relacionada con PIP2 (Brandt y colaboradores, 2006; Han y Lo, 2012). Además, el *EGFR* activado fosforila e interactúa directamente con el factor de transcripción STAT3. Activa su dimerización, el transporte nuclear y la regulación de sus genes. Se ha demostrado que STAT3 activado por *EGFR*, activa la expresión de un represor transcripcional de E-cadherina, TWIST, y, por consiguiente, promueve la transición epitelio-mesenquimal (Han y Lo, 2012).

Figura 3. Vías de señalización del receptor *EGFR*.



La unión del ligando al receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*) induce su dimerización a través de un mecanismo mediado por el receptor. La diversificación de la señal se genera por la presencia de múltiples ligandos similares a EGF y la formación de diferentes combinaciones de receptor dimérico. Tomado de Gschwind (2004).

Se han descrito algunos polimorfismos funcionales que han sido asociados con modificación de la expresión y funcionalidad de *EGFR*. Dentro de estos polimorfismos se encuentra una repetición polimórfica del dinucleótido CA en el intrón 1 (CA-SSR-I) y un polimorfismo de nucleótido único (SNP) en la región del promotor, -216G>T (Liu y colaboradores, 2005), mientras que un SNP en el codón 497 se

asocia con disminución en la actividad de *EGFR* (Moriai y colaboradores, 1994). Algunos autores han demostrado que estos polimorfismos: SNP -216G>T y CA-SSR-I de *EGFR* pueden predecir la efectividad del tratamiento con algunos fármacos inhibidores de la fosforilación de tirosina kinasa de *EGFR* como Gefitinib y Erlotinib (Jung y colaboradores, 2012) y Cetuximab, un anticuerpo monoclonal con afinidad por el dominio extracelular de *EGFR* (Glover y colaboradores, 2004).

1.2.1. Polimorfismo CA-SSR-I:

Se ha descrito un mecanismo de regulación de la transcripción *in vitro* e *in vivo* del *EGFR* en una región altamente polimórfica que depende de la longitud de la repetición de CA-SSR-I. Se considera un alelo corto menor o igual a 16 repeticiones CA y un alelo largo cuando es mayor a 17 repeticiones CA. La longitud de los alelos de este polimorfismo del dinucleótido CA se correlaciona inversamente con la actividad transcripcional del gen (Zhang y colaboradores, 2007). Gebhardt y colaboradores (1999) encontraron al estudiar líneas celulares, que el nivel de transcripción del alelo de 17 repeticiones se reduce en un 50% con respecto al de 16 repeticiones y, cuando hay 21 repeticiones, la transcripción disminuye en aproximadamente 80%, lo que resulta en una disminución de los niveles celulares de proteína EGFR.

En el año 2007, Zhang y colaboradores realizaron un estudio en 176 pacientes caucásicos con cáncer pulmonar y 161 controles, y demostraron que el menor número de repeticiones de CA en el intrón 1 de *EGFR* (CA-SSR-I) estuvo asociado con el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón [OR: 1,94, (IC95% 1,16-3,23) para ser

portador de un alelo con 16 repeticiones CA y (OR: 3,04, IC95% 1,53-6,04) para ser homocigoto para el alelo de 16 repeticiones]. Los autores concluyeron que este hallazgo permite identificar una posible población susceptible para desarrollar cáncer pulmonar.

1.2.2. Polimorfismo SNP -216G>T (rs712829):

En el año 2005, Liu y colaboradores encontraron un polimorfismo funcional en el promotor de *EGFR*; el SNP -216G>T. Éste se encuentra en un sitio de reconocimiento del factor de transcripción Sp1, que es una región crítica para la actividad del promotor, y sugieren que tiene una relevancia funcional, incluyendo la susceptibilidad a los inhibidores de *EGFR*. Estos autores transfectaron células de cáncer humano y líneas celulares de fibroblastos con vectores reporteros que contenían la secuencia del promotor de *EGFR* con este polimorfismo. La sustitución de G por T en la posición -216 aumentó la actividad del promotor en un 30% ($p<0,04$). Por lo tanto, es probable que el polimorfismo -216G>T puede, al menos en parte, contribuir a la variabilidad de la expresión del *EGFR*.

Spindler y colaboradores en el año 2006 encontraron que este polimorfismo funcional (-216G>T) se correlaciona con una actividad aumentada del promotor y una importante respuesta a la quimiorradiación en pacientes con cáncer de recto localmente avanzado. Los portadores del alelo -216T presentaron un mayor grado de regresión tumoral comparado con los homocigotos -216G ($p=0,023$). A pesar de existir evidencia funcional, hasta la fecha no se han publicado estudios que asocien este polimorfismo con el riesgo de cáncer gástrico u otros tipos de cáncer.

1.2.3. Polimorfismo R497K (rs2227983):

R497K es otro polimorfismo de *EGFR*. En 1993, Moriai y colaboradores demostraron que la sustitución de arginina por lisina en el codón 497 (R497K) en el dominio extracelular dentro del subdominio IV del gen *EGFR* tiene funciones atenuadas en la unión al ligando, activación de la tirosina quinasa, y la estimulación del crecimiento. En 1994, estos mismos autores demostraron en un estudio *in vitro* que el mutante 497K tiene funciones atenuadas en la unión a ligando, la estimulación del crecimiento, la activación de la tirosina quinasa, y la inducción de los protooncogenes *myc*, *fos*, y *jun* en comparación con el tipo silvestre 497R.

En el año 2005, Zhang y colaboradores evaluaron los polimorfismos CA-SSR-I y R497K en 59 pacientes con cáncer rectal avanzado, que fueron tratados con quimio y radioterapia adyuvante o neoadyuvante. Estudiaron estos polimorfismos en forma individual y combinada, y encontraron que los pacientes que tenían el genotipo homocigoto o heterocigoto para arginina (GA o GG) y tenían un número de repeticiones CA menor a 20 (ambos alelos <20) presentaban un mayor riesgo de recurrencia local ($p=0,05$), mientras que ningún paciente con el genotipo homocigoto para lisina (AA) presentó recidivas durante el período de seguimiento. Estos autores concluyeron que los polimorfismos CA-SSR-I y R497K pueden ser indicadores potenciales de radiosensibilidad en pacientes con cáncer rectal tratados con quimio y radioterapia. Wang y colaboradores, en el año 2007, analizaron el efecto de este polimorfismo en las características clínico-patológicas de 209 pacientes con carcinoma colorrectal. Encontraron que en pacientes con el genotipo homocigoto

para lisina se observa una marcada disminución en la fosforilación de *EGFR* (*PEGFR*), así, el homocigoto para arginina tiene un 75%, *EGFR* positivo, mientras que para lisina 85% es, *EGFR* negativo. Además encontraron que los portadores del alelo K tienen mayor sobrevida frente a los portadores del alelo R ($p < 0,01$). Concluyeron que el polimorfismo R497K podría ser un factor determinante para la reducción en la recurrencia tumoral de pacientes con carcinoma colorrectal avanzado que recibieron cirugía curativa y una mayor supervivencia de los pacientes con carcinoma colorrectal avanzado metastásico. Del mismo modo, Sasaki y colaboradores en el año 2009, analizaron el polimorfismo R497K en 225 casos de pacientes con carcinoma de pulmón excepto en carcinoma de células pequeñas (NSCLC). Encontraron que en los pacientes con ganglios negativos, R497K no se correlacionó con la evolución de la enfermedad. En pacientes con ganglios positivos, sin embargo, 497K se asoció significativamente con una mejor supervivencia global ($p = 0,0072$). Así, los pacientes con genotipo homocigoto para arginina tuvieron un peor pronóstico que los pacientes homocigotos o heterocigotos para lisina.

En conjunto estos antecedentes permiten proponer que el polimorfismo R497K se relaciona con las características clínico-patológicas de algunos tipos de cáncer. A pesar de que existen antecedentes que apoyan el efecto funcional de este polimorfismo sobre la función de *EGFR* y algunas consecuencias fenotípicas, a la fecha no existen estudios que investiguen la asociación de este polimorfismo con riesgo de algún tipo de cáncer.

Los factores de virulencia de *Helicobacter pylori* son de gran interés para la comunidad científica no sólo por su heterogeneidad genética sino por el potencial patogénico que les brinda esta variabilidad. Teniendo en cuenta estos antecedentes es pertinente establecer la asociación existente entre uno de estos factores de virulencia, *OipA*, su estado funcional “on” y los polimorfismos del receptor de factor de crecimiento epidérmico *EGFR* y la patogénesis del cáncer gástrico.

2. HIPÓTESIS

1. Los polimorfismos -216G>T, R497K y CA-SSR-I del gen *EGFR*, y el factor de virulencia *OipA* en estado funcional “on” de *H.pylori*, se asocian con cáncer gástrico.
2. La interacción entre los polimorfismos del gen *EGFR* y el factor de virulencia *OipA* en estado funcional “on” se asocia con cáncer gástrico.

3. OBJETIVOS

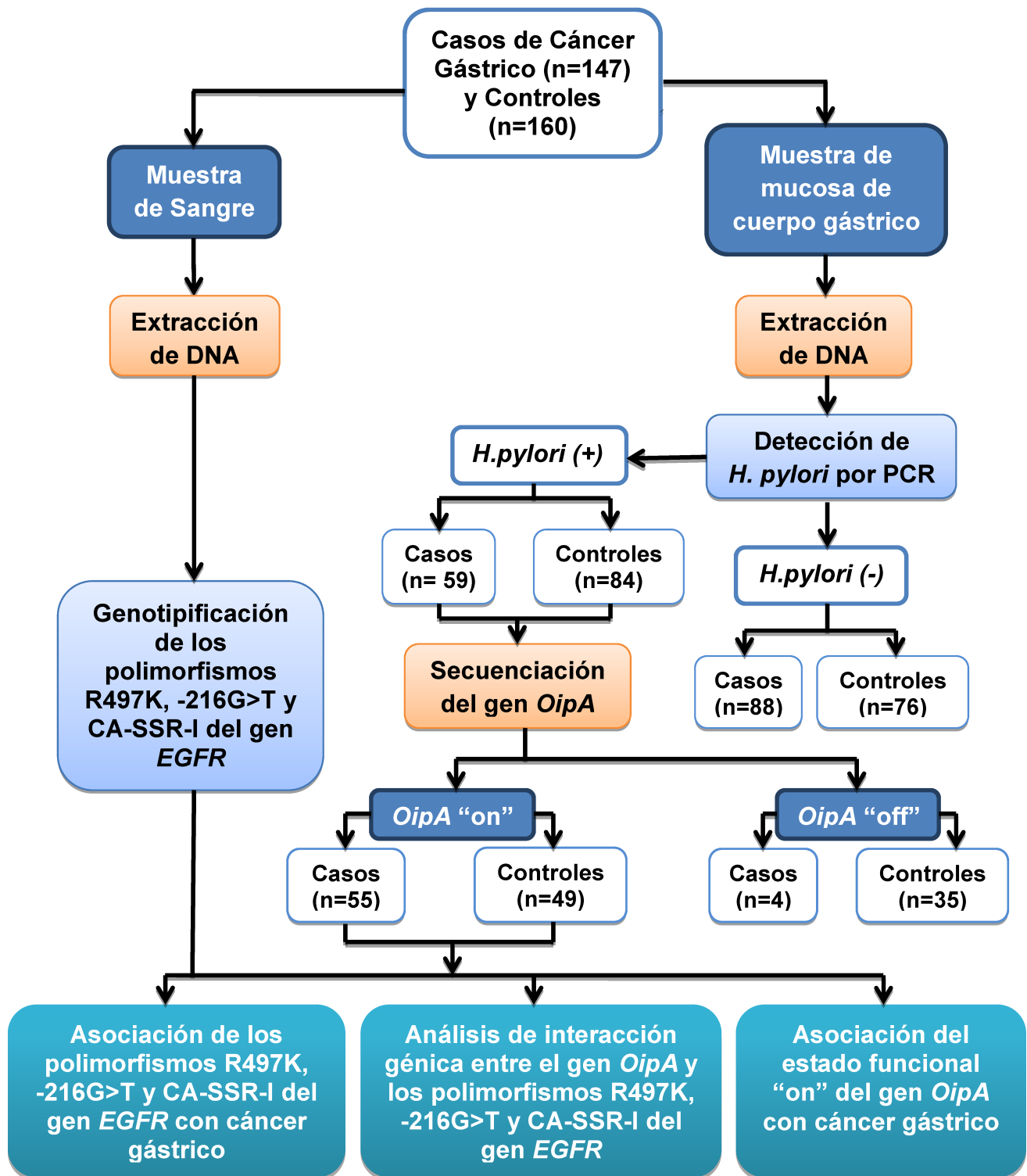
Objetivo General

Estudiar la asociación e interacción entre los polimorfismos CA-SSR-I, SNP -216G>T, R497K del gen *EGFR* del hospedero y la presencia del gen *OipA* en estado funcional “on” de *Helicobacter pylori*, con cáncer gástrico.

Objetivos Específicos

1. Realizar un estudio de casos y controles, para establecer si los polimorfismos CA-SSR-I, SNP -216G>T, R497K del gen *EGFR* del hospedero, y la presencia del gen *OipA* en estado funcional “on” en *H. pylori*, se asocian con cáncer gástrico.
2. Analizar la interacción entre los polimorfismos del gen *EGFR* y el estado funcional “on” del gen *OipA* y su asociación con cáncer gástrico.

DISEÑO EXPERIMENTAL/RESULTADOS



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Sujetos:

Se incorporaron 147 casos de cáncer gástrico y 160 controles. Los casos se seleccionaron entre aquellos pacientes con diagnóstico preoperatorio de cáncer gástrico a quienes se les realizó gastrectomía total para resección quirúrgica del tumor. Los controles incluidos en este estudio se seleccionaron entre los individuos a quienes se les realizó endoscopia digestiva alta y no fueron diagnosticados con cáncer gástrico.

4.1.1. Criterios de inclusión de casos y controles:

Casos de cáncer gástrico: El diagnóstico se confirmó mediante histopatología. Se excluyeron aquellos casos que pertenecían a familias que se ajustaban al criterio de otros síndromes de cáncer familiar: cáncer gástrico difuso hereditario (HDGC), cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HPNCC), y cáncer de mama hereditario.

Controles: Se incluyeron individuos que presentaban endoscopia digestiva alta dentro de límites normales o con patología gástrica diferente a cáncer gástrico. Se excluyeron sujetos con antecedentes familiares de cáncer gástrico.

4.1.2. Procedencia de los grupos muestrales:

Los pacientes con cáncer gástrico incluidos en este estudio provenían de diferentes centros hospitalarios: Hospital Clínico de la Universidad de Chile, Complejo Asistencial Barros Luco, Hospital San Juan de Dios y Hospital Salvador, localizados

todos ellos en la Región Metropolitana. Los controles se obtuvieron del Servicio de Gastroenterología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

4.1.3. Muestras:

De los casos se obtuvo una muestra de mucosa de la curvatura mayor del cuerpo gástrico a partir de la pieza quirúrgica extraída en pabellón y una muestra de 4 ml de sangre periférica mediante punción venosa del antebrazo, almacenados en un tubo vacutainer con anticoagulante EDTA. En los controles, la muestra de mucosa de la curvatura mayor del cuerpo gástrico se obtuvo mediante biopsia endoscópica. Las muestras de mucosa gástrica obtenidas en ambos grupos se transportaron y almacenaron en PBS a 4°C.

4.1.4. Aspectos bioéticos:

Los sujetos incorporados a este estudio firmaron un consentimiento informado aprobado por los Comités de Bioética de cada Hospital y la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Anexo 1).

4.2. Análisis de Laboratorio:

4.2.1. Análisis del estado funcional del gen *OipA*:

4.2.1.1. Extracción de DNA:

Se extrajo DNA a partir de muestras de mucosa gástrica obtenidas de los casos y los controles. La extracción de DNA se realizó mediante el equipo de reactivos Favor Prep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen, Corea).

4.2.1.2. Clasificación de los sujetos como *H.pylori* (+) y *H.pylori* (-):

Para detectar la presencia de genoma de *H.pylori* se utilizó el ensayo 5' Exonucleasa (Taqman®). Se elaboró una mezcla de reacción que contenía 2.0 ul de DNA (2.5 ng/ul), 5.0 ul de Universal Master Mix 2x de TaqMan® (AppliedBiosystem), 0.25 ul de Taqman® SNP Genotyping Assay (AppliedBiosystem) y 2.75 ul de agua libre de DNAasa, para un volumen final de 10 ul en cada pocillo. De los reactivos antes mencionados, el Universal Master Mix 2x de Taqman® contenía dNTPs, buffer, AmpliTaqGold® DNA Polimerasa y ROX™ referencia pasiva. El Ensayo para Genotipificación de Taqman® (*Taqman® Genotyping Master Mix*, Master Mix de genotipificación Taqman®), contenía 2 pares de cebadores: uno para amplificar el gen 16S de *H. pylori*, y el otro para amplificar el gen beta globina del genoma humano; y 2 sondas específicas: una para el gen 16S de *H. pylori* (TAMRA 5'-ATTACTGACGCTGATTGCGCGAAAGC-3' 6-FAM) y otra para el gen beta globina (TAMRA 5'- TGGCTAATGCCCTGGCCCACAA-3' HEX) (Kobayashi y cols., 2002). La reacción se realizó en un equipo de PCR en tiempo Real StepOne (AppliedBiosystem) con el siguiente protocolo de reacción: 60°C/0:30, 95°C/10:00, seguido de 50 ciclos de: 92°C/0:15 + 60°C/0:30 para finalizar con 60°C/0:30. Las sondas presentan en su extremo 3' una molécula que inhibe la fluorescencia o "quencher" (TAMRA) y en su extremo 5' el fluorocromo respectivo (VIC o 6-FAM). Por lo tanto al producirse la complementariedad con el DNA blanco y permitir el avance de la reacción, la polimerasa con actividad 5'- 3' Exonucleasa degradó la sonda, por lo que la señal de fluorescencia generada por la amplificación indicó la presencia o ausencia del gen 16S en la muestra.

4.2.1.3. Tipificación de factores de virulencia mediante secuenciación del gen *OipA*:

El número de repeticiones CT del gen *OipA* se analizó mediante PCR convencional y secuenciación, a partir del DNA extraído de las muestras de mucosa gástrica clasificadas como *H. pylori* positivo. Los partidores utilizados para amplificar el gen *OipA* fueron: *F*: 5'-CCATGAAAAAAGCTCTCTTACT-3' y *R*: 5'-GCCCTTTTACCCTTCGTTCAA-3' (Yamaoka y cols., 2002). La reacción se realizó en un volumen final de 30 µL conteniendo 1x buffer reacción RBC, 0,5 µM de cada partidor, 200 µM de desoxirribonucleósido trifosfato, 1,5 U de RBC® Taq DNA Polimerasa (RBC Biosciences), y 2µL de DNA. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador con el siguiente esquema de ciclos: 94°C/3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C/30 segundos, 56°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos, para concluir con una extensión final de 72°C por 5 minutos.

Los productos de PCR obtenidos se secuenciaron por el método de Sanger mediante el servicio ofrecido por Macrogen (Corea).

4.2.2. Análisis de polimorfismos del gen *EGFR*:

4.2.2.1. Extracción de DNA:

Para tipificar los polimorfismos del gen *EGFR* se extrajo DNA a partir de muestras de sangre periférica obtenidas de los casos y los controles. A cada participante se le extrajo 10 ml de sangre periférica mediante punción venosa del antebrazo, los que se colectaron en un tubo vacutainer con EDTA como anticoagulante. A partir de estas muestras se extrajo DNA genómico total utilizando la técnica de Chomczynski y cols.,

(2006). Para determinar la concentración y pureza del DNA obtenido se midió la absorbancia a 260nm y 280nm en un espectrofotómetro modelo Shimatzu. La concentración de DNA se calculó considerando que 1 unidad de absorbancia a 260nm corresponde a 50µg/ml. Las soluciones de trabajo tuvieron una concentración de 2.5ng/µl.

4.2.2.2. Análisis del polimorfismo CA-SSR-I:

Este polimorfismo se analizó mediante amplificación por PCR y posterior electroforesis capilar. La reacción de PCR se realizó utilizando los partidores: *F*: 5'-GTTTGAAGAATTTGAGCCAACC-3' y *R*: 5'-GCATGTTTCCCCTGTCAAGT-3' (Huang y cols., 2009). El partidador directo estaba marcado en su extremo 5' con el fluoróforo 6-FAM. Ambos partidores se alinean adyacentes a la región del intrón 1 del gen *EGFR* donde están presentes las repeticiones CA. La reacción se realizó en un volumen final de 30 µL conteniendo 1x buffer reacción RBC, 0,5 µM de cada partidador, 200 µM de desoxirribonucleósido trifosfato, 1,5 U de RBC® Taq DNA Polimerasa (RBC Biosciences), y 2µL de DNA. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador con el siguiente esquema de ciclos: 94°C/3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C/30 segundos, 56°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos, para concluir con una extensión final de 72°C por 5 minutos. El producto de PCR correspondió a un fragmento de aproximadamente 180 pares de bases. Finalmente, el producto de PCR se resolvió en un equipo de electroforesis capilar ABI 3730XL, utilizando el marcador 400HD como estándar de tamaño. Este último análisis se

realizó en Macrogen (Corea). Los tamaños exactos de los fragmentos obtenidos se estimaron utilizando el programa Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems).

4.2.2.3. Análisis del polimorfismo R497K (rs2227983):

Para genotipificar el SNP R497K del gen *EGFR* se utilizó el ensayo 5' Exonucleasa (Taqman®), utilizando un ensayo prediseñado disponible comercialmente (Applied Biosystem). El software StepOne V2.1 (AppliedBiosystem) realizó la discriminación alélica, en donde se registró el aumento de la fluorescencia en cada ciclo de reacción, visualizado en un gráfico el aumento de la fluorescencia en el tiempo. Los gráficos que mostraron curvas de fluorescencia para VIC y 6-FAM identificaron a individuos de genotipo heterocigoto (AG), una sola curva de fluorescencia para VIC, identifica los individuos de genotipo homocigoto del alelo 1 (AA) y fluorescencia para 6-FAM identifica a los individuos homocigotos para el alelo 2 (GG).

4.2.2.4. Análisis del SNP -216G>T (rs712829):

Este polimorfismo se analizó mediante la técnica PCR-RFLP de acuerdo al protocolo descrito por Liu y cols., (2005). La reacción de PCR se realizó utilizando los partidores 5'-TCTGCTCCTCCCGATCCCTCCT-3' y 5'-CAGGTGGCCTGTCGTCCGGTCT-3'. La reacción se realizó en un volumen final de 10 µL conteniendo 1x de Buffer Phusion® GC, 0,5 µM de cada partidor, 200 µM de desoxirribonucleósido trifosfato, 3% DMSO, 0,02 U de DNA Polimerasa Phusion® Hot Start II (FINNZYMES, Finlandia), y 1µL de dilución 1 en 10 del DNA. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador con el siguiente esquema de ciclos:

98°C/3 minutos, seguido de 35 ciclos de 98°C/15 segundos y 72°C por 15 segundos, para concluir con una extensión final de 72°C por 5 minutos. El producto de PCR correspondió a un fragmento de 220 pares de bases. El producto de PCR se digirió a 37°C durante toda la noche con 3 unidades de la enzima de restricción BseRI® (New England Biolabs). Finalmente los productos de digestión se resolvieron en electroforesis en gel de agarosa al 3%. Los individuos homocigotos (GG) presentaron un fragmento de 184 pares de bases. Los individuos heterocigotos (GT) generaron un fragmento de 184 pares de bases, uno de 112 pares de bases y otro de 86 pares de bases. Los individuos homocigotos (TT) presentaron bandas de 112 pares de bases y de 86 pares de bases.

4.3. Análisis estadístico aplicado al estudio:

Para comparar entre casos y controles las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen *EGFR* y la frecuencia de sujetos infectados con cepas *OipA* en estado “on” se utilizó el test exacto de Fisher de dos colas. Se consideró significativo valores de $p < 0.05$.

Se midió la fuerza de asociación con cáncer gástrico de cada polimorfismo de *EGFR* y del estado funcional “on” del gen *OipA*, utilizando la razón de paridad (OR, *Odds ratio*) con 95% de intervalo de confianza.

Se evaluó si las frecuencias genotípicas de los polimorfismos de *EGFR* observadas en los controles se ajustaban a lo esperado de acuerdo al equilibrio de Hardy-

Weinberg, utilizando el test de chi-cuadrado de Pearson con una significancia estadística de $p < 0.05$.

Todos los cálculos se realizaron utilizando el programa STATA 10 para Windows (Statistics Data Analysis).

Para evaluar potenciales interacciones entre los factores analizados se utilizó una aproximación estadística basada en minería de datos, implementada en el programa MDR v3.0.2 (<http://sourceforge.net/projects/mdr/>, Hahn y cols., 2003). El programa entrega valores de ganancia de información (IG). Un valor positivo de IG indica que ambos atributos en conjunto explican más que cada uno por separado. Se consideró un valor superior a 0,5% como sugerente de interacción.

5. RESULTADOS

5.1. Características epidemiológicas de la población de estudio:

5.1.1. Controles.

5.1.1.1. Edad y Sexo:

La tabla 1 muestra la distribución por rango de edad y sexo en el grupo control. La edad media de los sujetos del grupo control fue de 44,5 años, con un rango comprendido entre 15 y 89 años, y una desviación estándar de 16,0 años. El principal rango de edad entre los controles se encuentra entre los 50 y 60 años. El género femenino fue más prevalente en el grupo control, en una proporción 2:1.

Tabla 1. Distribución de frecuencias por rango de edad y sexo en el grupo control.

Rango de edad	Femenino n=110 (%)	Masculino n=50 (%)	Total n=160 (%)
15-19	4 (3,6%)	2 (4,0%)	6 (3,7%)
20-29	25 (22,7%)	7 (14,0%)	32 (20,0%)
30-39	14 (12,7%)	9 (18,0%)	23 (14,3%)
40-49	22 (20,0%)	6 (12,0%)	28 (17,5%)
50-59	28 (25,4%)	14 (28%)	42 (26,2%)
60-69	10 (9,0%)	8 (16,0%)	18 (11,2%)
70-79	6 (5,4%)	3 (6,0%)	9 (5,6%)
80-89	1 (0,9%)	1 (2,0%)	2 (1,2%)

5.1.1.2. Hallazgos endoscópicos.

La gastritis fue la patología más prevalente, principalmente de tipo erosivo antral. Un 22% de los sujetos presentó una endoscopia digestiva alta dentro de límites normales. Además se observó la presencia de otras patologías inflamatorias del tracto digestivo superior en menor proporción. Estos resultados indican que en el grupo control existen diversas patologías de tracto digestivo, donde predomina el componente inflamatorio, y la infección por *Helicobacter pylori*.

Tabla 2. Distribución de frecuencias de hallazgos endoscópicos en sujetos del grupo control.

Hallazgo endoscópico	Sujetos n= 160 (%)
Sin patología	36 (22,5%)
Esofagitis	13 (8,1%)
Hernia hiatal	5 (3,1%)
Gastritis	73 (45,6%)
Duodenitis	3 (1,8%)
Lesiones vasculares	6 (3,7%)
Otras	24 (15%)

5.1.2. Casos.

5.1.2.1. Edad y sexo:

La tabla 3 muestra la distribución de frecuencias por rango de edad y sexo en los

casos de cáncer gástrico. La edad media de los casos de cáncer gástrico fue de 66,5 años, con un rango comprendido entre 30 y 89 años, y una desviación estándar de 11,0 años.

Del total de casos, la mayoría fueron varones. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado en la literatura (Sipponen, P. y Correa, P., 2002), donde el cáncer gástrico es más frecuente en hombres, en zonas de alta incidencia y mortalidad por esta enfermedad.

Tabla 3. Distribución de frecuencias de casos de cáncer gástrico clasificados por rango de edad y sexo.

Rango de edad	Femenino n=46 (%)	Masculino n=101 (%)	Total n=147 (%)
30-39	2 (4,3%)	1 (0,9%)	3 (2,0%)
40-49	4 (8,6%)	5 (4,9%)	9 (6,1%)
50-59	9 (19,5%)	15 (14,8%)	24 (16,3%)
60-69	9 (19,5%)	34 (33,6%)	43 (29,2%)
70-79	19 (41,3%)	34 (33,6%)	53 (36,0%)
80-89	3 (6,5%)	12 (11,8%)	15 (10,2%)

5.1.2.2. Descripción anatomopatológica

5.1.2.2.1. Localización y tamaño tumoral

Respecto a la localización del tumor, se dividió anatómicamente el estómago en tercio proximal (corresponde al fondo gástrico), tercio medio (compromiso del cuerpo

gástrico), y tercio distal (incluye antro y píloro). Se excluyeron aquellos tumores presentes en la unión gastroesofágica, de acuerdo a la clasificación de la AJCC (American Joint Committee on Cancer), ya que algunos estudios han demostrado que los adenocarcinomas del cardias tienen una biología diferente, características clínico-patológicas distintas y un peor pronóstico en comparación con los adenocarcinomas de estómago distal (Hu y cols., 2012; Lee y cols., 2013).

La tabla 4 muestra la distribución de las frecuencias de casos de cáncer gástrico, según la localización y el tamaño tumoral. El compromiso tumoral más frecuente se presentó a nivel de los tercios medio e inferior gástrico. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado en la literatura, donde la localización más frecuente del adenocarcinoma gástrico se presenta a nivel de la curvatura mayor y en la región antral (Sutton, P. y Mitchell, H. 2010).

En cuanto al tamaño tumoral, clasificamos a los tumores de acuerdo a la clasificación propuesta por Adachi y cols. (1997) en 3 grupos: el primer grupo comprendió aquellos tumores que tenían un diámetro menor a 4 centímetros, el segundo grupo incluyó a los tumores entre 4 y 10 centímetros de diámetro, y el tercer grupo a los tumores mayores a 10 centímetros. Los tumores con un diámetro entre 4 y 10 centímetros fueron los más frecuentes. Estos resultados muestran que los casos de cáncer gástrico incluidos en este trabajo corresponden a estadios avanzados de la enfermedad, dado el tamaño y localización de los tumores.

Tabla 4. Distribución de las frecuencias de casos de cáncer gástrico según la localización y el tamaño tumoral.

Descripción anatómica	Casos cáncer gástrico
	n=147 (%)
Localización	
Tercio gástrico superior	12 (8,1%)
Tercio gástrico medio	69 (46,9%)
Tercio gástrico inferior	66 (44,8%)
Tamaño tumoral	
<4 cm	41 (27,8%)
4 cm-10 cm	81 (55,1%)
>10 cm	25 (17,0%)

5.1.2.2.2. Presentación macroscópica

Respecto al aspecto macroscópico del tumor se utilizó la clasificación Japonesa para los tumores incipientes y la clasificación de Borrmann ampliada para el estadiaje de los tumores avanzados. En la tabla 5 se muestra la frecuencia de casos de cáncer gástrico según su presentación macroscópica. El estadio más prevalente entre los casos de cáncer gástrico incipiente fueron el estadio IIb y III que corresponden a lesiones planas y ulceradas respectivamente. Respecto al cáncer gástrico avanzado, los tumores tipo III de Borrmann (tumores ulcerados con márgenes infiltrativos) fueron los más frecuentes. Estos hallazgos sugieren que en los casos incluidos en el presente estudio, los tumores más prevalentes al momento del diagnóstico

comprenden lesiones más avanzadas, lo cual difiere de países como Japón, donde el cáncer gástrico más frecuente es el cáncer incipiente (Lee y cols., 2012).

Tabla 5. Frecuencia de casos de cáncer gástrico según su aspecto macroscópico.

Aspecto macroscópico	Casos de cáncer gástrico n=147 (%)
Cáncer Incipiente	
Clasificación Japonesa	n= 24 (16,3%)
I	2 (8,3%)
IIa	3 (12,5%)
IIb	7 (29,1%)
IIc	5 (20,8%)
III	7 (29,1%)
Cáncer Avanzado	
Clasificación de Borrmann	n=123 (83,6%)
1	5 (4,0%)
2	15 (12,1%)
3	68 (55,2%)
4	27 (21,9%)
5	8 (6,5%)

5.1.2.2.3. Tipo histológico.

De acuerdo a la clasificación de Lauren (Lauren, 1965), clasificamos los tumores según su tipo histológico en intestinal y difuso. Según lo reportado por Zheng y cols. (2008), incluimos un tercer tipo histológico, el tipo mixto, el cual comparte características tanto de tipo intestinal como difuso. El adenocarcinoma de tipo

intestinal comprende los subtipos: tubular, papilar y mucinoso. El adenocarcinoma de tipo difuso puede tener o no células en anillo de sello. La tabla 6 muestra la frecuencia de tumores clasificados según tipo histológico, y observamos que el tipo intestinal fue el más prevalente entre los casos de cáncer gástrico, y de éstos, el más frecuente fue el subtipo tubular. Los tumores de tipo difuso presentaron en su mayoría células en anillo de sello. Sin embargo en los tumores de tipo histológico mixto predominó el componente difuso. Estos hallazgos indican que la distribución de los diferentes tipos histológicos tiende a ser homogénea en la población estudiada.

Tabla 6. Frecuencia de tumores clasificados según tipo histológico.

Tipo histológico	Casos de cáncer gástrico n=147 (%)
Intestinal	66 (44,8%)
Tubular	58 (87,8%)
Papilar	4 (6,0%)
Mucinoso	4 (6,0%)
Difuso	53 (36,0%)
Células en anillo de sello	36 (67,9%)
No informado	17 (32,0%)
Mixto	28 (19,0%)

5.1.2.2.4. Grado de diferenciación tumoral, estadio anatómico y grupo pronóstico:

El cáncer gástrico lo clasificamos de acuerdo a la OMS (IARC, 2013) según su diferenciación tumoral en dos subgrupos, alto y bajo grado (Tabla 7). Los tumores de alto grado fueron el subgrupo más prevalente, que corresponde a adenocarcinomas indiferenciados o poco diferenciados. Los tumores de bajo grado corresponden a los

adenocarcinomas moderadamente diferenciados o bien diferenciados. Estos resultados muestran que en la población estudiada predominan los tumores peor diferenciados al momento del diagnóstico.

Tabla 7. Frecuencia de casos de cáncer gástrico clasificados según el grado de diferenciación tumoral.

Casos de Cáncer Gástrico n= 147 (%)	
Diferenciación tumoral	
Alto grado	81 (55,1%)
Indiferenciado	6 (7,4%)
Poco diferenciado	75 (92,5%)
Bajo grado	66 (44,8%)
Moderadamente diferenciado	47 (71,2%)
Bien diferenciado	19 (28,7%)

La tabla 8 muestra la frecuencia de tumores clasificados según su estadio anatómico (clasificación TNM) y grupo pronóstico. Al analizar el total de la muestra, observamos que los estadios más avanzados fueron los más prevalentes en este grupo. Estos hallazgos indican que en los casos incluidos en el presente estudio, predominan las etapas de cáncer gástrico de peor pronóstico y los tumores más agresivos al momento del diagnóstico.

Tabla 8. Frecuencia de tumores clasificados según etapas (estadio anatómico) y grupo pronóstico.

Etapas/ grupo pronóstico	Casos Cáncer Gástrico n=147 (%)
IA	18 (12,2%)
IB	11 (7,4%)
IIA	11 (7,4%)
IIB	8 (5,4%)
IIIA	20 (13,6%)
IIIB	30 (20,4%)
IIIC	38 (25,8%)
IV	11 (7,4%)

5.2. Clasificación de los sujetos según la presencia de infección por *Helicobacter pylori* (+):

Para realizar esta clasificación, se determinó el estado de infección de cada individuo amplificando el gen 16S de *H. pylori* mediante PCR en tiempo real. La infección con *H. pylori* fue más prevalente entre los controles en comparación con los casos de cáncer gástrico. La frecuencia de los infectados por *H. pylori* fue mayor en los adenocarcinomas de alto grado en comparación con el subgrupo de bajo grado ($p=0,17$) (Tabla 9).

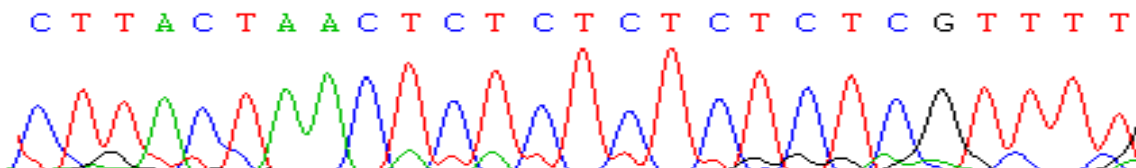
Tabla 9. Frecuencia de infectados por *H. pylori* en casos de cáncer gástrico y controles.

Estado de infección por <i>H. pylori</i>	Controles n= 160 (%)	Casos n=147 (%)	CG Alto Grado n=81 (%)	CG Bajo Grado n=66 (%)	Valor de <i>p</i>
<i>H. pylori</i> (-)	76 (47,5%)	88 (59,8%)	44 (54,3%)	44 (66,6%)	-
<i>H. pylori</i> (+)	84 (52,5%)	59 (40,1%)	37 (45,6%)	22 (33,3%)	0,17

5.3. Genotipificación del gen *OipA* de *H. pylori*:

De acuerdo al número de repeticiones de dinucleótido CT en la región codificante o secuencia señal del gen *OipA*, se pueden clasificar los aislados como “on” (codifican por *OipA* funcional) u “off” (codifican por *OipA* trunca no funcional). El número de repeticiones de dinucleótido CT del gen *OipA* se determinó mediante un análisis de secuenciación de DNA. En un caso y en 9 controles *H. pylori* (+) no fue posible determinar la presencia de repeticiones CT mediante secuenciación de nucleótidos, por lo cual se excluyeron del análisis.

Figura 4. Secuencia del gen *OipA* de *Helicobacter pylori* que representa el patrón de 6 repeticiones de dinucleótido CT en la región codificante 5’.



La tabla 10 muestra la frecuencia de repeticiones del dinucleótido CT del gen *OipA* según su estado funcional en casos de cáncer gástrico y controles. Entre las muestras de cáncer gástrico se observó un total de 10 patrones de repetición del dinucleótido CT: 1+4 repeticiones (un dinucleótido CT, seguido de TT y cuatro repeticiones CT consecutivas que no modifican el marco de lectura), 5+2 repeticiones (siete repeticiones CT no consecutivas, que no modifican el marco de lectura), 6 repeticiones, 6 (2+4) repeticiones (seis repeticiones CT que generan un codón de término), 7 repeticiones, 8 repeticiones, 8 (2+6) repeticiones (ocho repeticiones CT que no modifican el marco de lectura), 9 repeticiones, 9 (6+3) repeticiones (nueve repeticiones CT que no alteran el marco de lectura), y 10 repeticiones. En las muestras del grupo control se identificó un total de 14 patrones de repetición CT diferentes: 1+4 repeticiones, 2+3 repeticiones (dos repeticiones de dinucleótido CT, seguidas por el dinucleótido TT, que precede a 3 repeticiones consecutivas CT y no modifican el marco de lectura), 5 repeticiones, 5+2 repeticiones, 6 repeticiones, 6 (2+4) repeticiones, 7 repeticiones, 7 (2+5) repeticiones (siete repeticiones CT consecutivas que originan un codón de término), 8 repeticiones, 8 (2+6) repeticiones, 9 repeticiones, 9 (2+7) repeticiones (nueve repeticiones CT que inician prematuramente y generan un codón de término), 10 repeticiones, 10 (2+8) repeticiones (10 repeticiones CT consecutivas que alteran el marco de lectura). Entre las muestras de cáncer gástrico, el 93,2% de las cepas *H. pylori* (+) se encontraban en estado funcional “on”. El patrón más frecuente asociado a este estado funcional fue el que contenía 6 repeticiones CT (60%), seguido por el de 9 repeticiones (18,1%). Respecto al estado no funcional “off” del gen *OipA*, en las muestras de

cáncer gástrico, se encontraron patrones con 6 (2+4), 7, 8 y 10 repeticiones CT en una muestra cada uno. En las muestras de los controles, el 58,3% de las cepas se encontraban en estado funcional “on”. De éstas, el 73,4% tenía 6 repeticiones CT. En contraste, el 41,6% presentó estado no funcional “off” y en este grupo el patrón más frecuente fue el de 7 repeticiones CT (42,8%). Estos resultados indican que en pacientes chilenos infectados con *Helicobacter pylori* el estado funcional “on” de 6 repeticiones CT es el más frecuente, y que el estado no funcional “off” más prevalente corresponde al de 7 repeticiones CT.

Al analizar la distribución de frecuencias de cepas “on”, “off” y de individuos *H.pylori* (-), no se observaron diferencias estadísticamente significativas al estratificar por edad (en controles $X^2=3.02$, $p=0.22$, en casos $X^2=1,39$, $p=0.50$) o por sexo (en controles $X^2=1.55$, $p=0,46$, en casos $X^2=0,72$, $p=0,70$).

Tabla 10. Frecuencia de patrones de repetición del dinucleótido CT del gen *OipA* según su estado funcional en aislados de *H. pylori* de pacientes con cáncer gástrico y controles.

N° Patrón de repeticiones CT	Estado Funcional	N° de Aislados de cáncer gástrico <i>H. pylori</i> (+) (%)	N° de Aislados de controles <i>H. pylori</i> (+) (%)
1+4	On	5 (9,0%)	4 (8,1%)
2+3	On	0 (0,0%)	1 (2,0%)
6	On	33 (60,0%)	36 (73,4%)
5+2	On	4 (7,2%)	2 (4,0%)
8 (2+6)	On	1 (1,8%)	2 (4,0%)
9	On	10 (18,1%)	4 (8,1%)
9 (6+3)	On	2 (3,6%)	0 (0,0%)
Total:	On	55	49
5	Off	0 (0,0%)	6 (17,1%)
6 (2+4)	Off	1 (25,0%)	2 (5,7%)
7	Off	1 (25,0%)	15 (42,8%)
7 (2+5)	Off	0 (0,0%)	1 (2,8%)
8	Off	1 (25,0%)	4 (11,4%)
9 (2+7)	Off	0 (0,0%)	3 (8,5%)
10	Off	1 (25,0%)	3 (8,5%)
10 (2+8)	Off	0 (0,0%)	1 (2,8%)
Total:	Off	4	35

5.4. Asociación del gen *OipA* de *Helicobacter pylori* con cáncer gástrico:

La tabla 11 muestra la frecuencia del estado funcional “on” del gen *OipA*, en 59 casos de cáncer gástrico *H. pylori* (+), y en 84 controles *H. pylori* (+). Se observó que el estado funcional "on" fue el más prevalente entre los casos *H. pylori* (+) (93%) en comparación con los controles *H. pylori* (+) (58,3%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,0001$). Estos resultados indican que el estado

funcional “on” de *OipA* se asocia con cáncer gástrico en 9,82 veces (OR: 9,82 [IC95% 3,25-29,62]) en sujetos *H. pylori* (+).

Las células cancerosas pueden clasificarse de acuerdo a su grado de diferenciación de las células normales para determinar su probable crecimiento y diseminación. El adenocarcinoma gástrico puede ser de alto o bajo grado según el grado de diferenciación tumoral. El cáncer gástrico de alto grado comprende los tumores poco diferenciados e indiferenciados, y el adenocarcinoma gástrico de bajo grado incluye a los tumores moderadamente y bien diferenciados.

Respecto al subgrupo de cáncer gástrico de alto grado, el estado funcional “on” de *H. pylori* (+) se asoció significativamente con aumento en 25,7 veces (OR: 25,71 [IC95% 3,36-196,63]) del riesgo para cáncer gástrico. En el subgrupo de cáncer gástrico de bajo grado, el estado funcional “on” se asoció en 4,5 veces (OR: 4,52 [IC95%1,24-16,48]) con este tipo de cáncer.

Tabla 11. Frecuencia del estado funcional del gen *OipA* de *H. pylori* y su asociación con cáncer gástrico y controles.

Estado funcional <i>OipA</i>	Controles n=84 (%)	Casos CG n=59 (%)	Valor de p	OR (IC 95%)	CG Alto Grado n= 37 (%)	OR (IC 95%)	CG Bajo Grado n= 22 (%)	OR (IC 95%)
Off	35 (41,6%)	4 (6,7%)	-	1,00	1 (2,7%)	1,00	3 (13,6%)	1,00
On	49 (58,3%)	55 (93%)	<0,0001	9,82 (3,25-29,62)	36 (97,2%)	25,71 (3,36-196,63)	19 (86,3%)	4,52 (1,24-16,48)

CG: Cáncer gástrico, OR (IC 95%): Odds ratio (Intervalo de confianza 95%)

En la tabla 12 se muestra la distribución de la frecuencia del estado funcional del gen *OipA* en 147 casos de cáncer gástrico y en 160 controles. Se observó que el estado

funcional “on” del gen *OipA* fue más frecuente en los casos de cáncer gástrico (37,4%), en comparación con los controles (30,6%), pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa. En el subgrupo de cáncer gástrico de bajo grado no se observó una asociación significativa con cáncer de estómago (OR: 0,91 [IC95% 0,48-1,72]; $p=0,87$). Sin embargo, en el subgrupo de tumores de alto grado se observó una asociación significativa con cáncer gástrico en 1,8 veces (OR: 1,81 [IC95% 1,04-3,14]; $p=0,04$)

Tabla 12. Distribución de la frecuencia del estado funcional del gen *OipA* y *H. pylori*(-) y su asociación con cáncer gástrico, según tipo histológico.

Estado funcional <i>OipA</i> / <i>Hp</i> (-)	Controles n=160 (%)	CG n=147 (%)	Valor de <i>p</i>	OR (IC 95%)	CG Alto Grado n= 81 (%)	OR (IC 95%)	CG Bajo Grado n= 66 (%)	OR (IC 95%)
*Off+ <i>Hp</i> (-)	111 (69,3%)	92 (62,5%)	-	1,00	45 (55,5%)	1,00	47 (71,2%)	1,00
On	49 (30,6%)	55 (37,4%)	0,22	1,35 (0,84-2,17)	36 (44,4%)	1,81 (1,04-3,14)	19 (28,7%)	0,91 (0,48-1,72)

CG: Cáncer gástrico, *HP*(-): *H. pylori* negativo, OR (IC 95%): Odds ratio (Intervalo de confianza 95%)
 *Incluye individuos infectados con *H. pylori OipA* en estado off y a individuos no infectados por *H. pylori*.

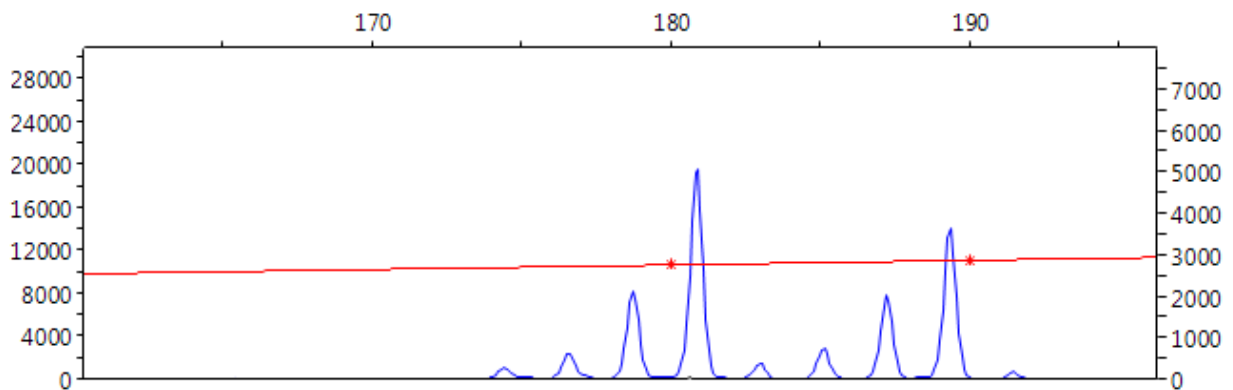
5.5. Asociación entre los polimorfismos del gen *EGFR* con cáncer gástrico:

5.5.1. Asociación entre el polimorfismo CA-SSR-I del gen *EGFR* con cáncer gástrico:

El gen *EGFR* contiene un polimorfismo en el intrón 1, el cual consiste en un número de repeticiones variable del dinucleótido CA (denominado CA-SSR-I). La actividad transcripcional del gen disminuye a mayor número de repeticiones. El número de repeticiones del dinucleótido CA se determinó por electroforesis capilar (Figura 5).

Al analizar el polimorfismo CA-SSR-I del gen *EGFR* en este grupo, encontramos que el número de repeticiones CA en el intrón 1 de *EGFR* varía en un rango entre 13 a 22 repeticiones CA.

Figura 5. Análisis del polimorfismo CA-SSR-I del gen *EGFR* mediante electroforesis capilar.



El eje X indica el tamaño del amplificado de PCR y el eje Y indica la intensidad de la fluorescencia de cada uno de los alelos. Los picos más altos representan el tamaño en pares de bases del número de repeticiones CA. Esta figura muestra un fragmento de 182 y 188 pares de bases que corresponde a alelos de 17 repeticiones y 20 repeticiones CA, respectivamente.

La tabla 13 muestra las frecuencias para los diferentes alelos del polimorfismo CA-SSR-I del gen *EGFR* en 147 casos de cáncer gástrico y 160 controles. El alelo de 16 repeticiones CA fue el más prevalente tanto en los controles como en los casos de cáncer gástrico, independiente de su tipo histológico.

Tabla 13. Frecuencia alélica del polimorfismo CA-SSR-I del gen *EGFR* en casos de cáncer gástrico y controles.

Alelo (repeticiones CA)	Controles n=320 (%)	Casos CG n= 294 (%)	CG Alto Grado n= 162 (%)	CG Bajo Grado n= 132 (%)
13	0 (0,0%)	1 (0,3%)	0 (0,0%)	1 (0,7%)
14	3 (0,9%)	3 (1,0%)	0 (0,0%)	3 (2,2%)
15	20 (6,2%)	4 (1,3%)	2 (1,2%)	2 (1,5%)
16	81 (25,3%)	86 (29,2%)	44 (27,1%)	42 (31,8%)
17	18 (5,6%)	12 (4,0%)	6 (3,7%)	6 (4,5%)
18	72 (22,5%)	72 (24,4%)	41 (25,3%)	31 (23,4%)
19	35 (10,9%)	28 (9,5%)	16 (9,8%)	12 (9,0%)
20	71 (22,1%)	70 (23,8%)	43 (26,5%)	27 (20,4%)
21	20 (6,2%)	15 (5,1%)	9 (5,5%)	6 (4,5%)
22	0 (0,0%)	3 (1,0%)	1 (0,6%)	2 (1,5%)

CG: Cáncer Gástrico; Alto Grado: Incluye a los tumores Indiferenciados o poco diferenciados; Bajo Grado: Incluye a los tumores Moderadamente diferenciados o bien diferenciados.

La tabla 14 muestra la distribución de genotipos para el polimorfismo CA-SSR-I del gen *EGFR* en 147 casos, según tipo histológico y 160 controles.

Al analizar el total de la muestra se encontró que la distribución de los genotipos fue similar tanto en los casos de cáncer gástrico como en el grupo control. Los genotipos más prevalentes fueron 16/18 y 16/20 en ambos grupos.

Tabla 14. Frecuencias genotípicas del polimorfismo CA-SSR-I del gen *EGFR* en casos de cáncer gástrico y controles.

Alelo 1/ Alelo 2	Controles n= 160 (%)	Casos CG n= 147 (%)	CG Alto Grado n= 81 (%)	CG Bajo Grado n= 66 (%)
13/16	0 (0,0%)	1 (0,6%)	0 (0,0%)	1 (1,5%)
14/16	0 (0,0%)	1 (0,6%)	0 (0,0%)	1 (1,5%)
14/18	1 (0,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
14/19	0 (0,0%)	2 (1,3%)	0 (0,0%)	2 (3,0%)
14/20	2 (1,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
15/16	7 (4,3%)	2 (1,3%)	0 (0,0%)	2 (3,0%)
15/17	1 (0,6%)	1 (0,6%)	1 (1,2%)	0 (0,0%)
15/18	3 (1,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
15/19	1 (0,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
15/20	8 (5,0%)	1 (0,6%)	1 (1,2%)	0 (0,0%)
16/16	6 (3,7%)	12 (8,1%)	5 (6,1%)	7 (10,6%)
16/17	2 (1,2%)	3 (2,0%)	2 (2,4%)	1 (1,5%)
16/18	20 (12,5%)	22 (14,9%)	13 (16,0%)	9 (13,6%)
16/19	9 (5,6%)	9 (6,1%)	5 (6,1%)	4 (6,0%)
16/20	25 (15,6%)	21 (14,2%)	14 (17,2%)	7 (10,6%)
16/21	6 (3,7%)	3 (2,0%)	0 (0,0%)	3 (4,5%)
17/17	1 (0,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
17/18	7 (4,3%)	3 (2,0%)	1 (1,2%)	2 (3,0%)
17/19	1 (0,6%)	2 (1,3%)	1 (1,2%)	1 (1,5%)
17/20	5 (3,1%)	1 (0,6%)	0 (0,0%)	1 (1,5%)
17/21	0 (0,0%)	2 (1,3%)	1 (1,2%)	1 (1,5%)
18/18	9 (5,6%)	8 (5,4%)	4 (4,9%)	4 (6,0%)
18/19	8 (5,0%)	7 (4,7%)	4 (4,9%)	3 (4,5%)
18/20	9 (5,6%)	20 (13,6%)	13 (16,0%)	7 (10,6%)
18/21	6 (3,7%)	3 (2,0%)	2 (2,4%)	1 (1,5%)
18/22	0 (0,0%)	1 (0,6%)	0 (0,0%)	1 (1,5%)
19/19	2 (1,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
19/20	10 (6,2%)	7 (4,7%)	5 (6,1%)	2 (3,0%)
19/21	2 (1,2%)	1 (0,6%)	1 (1,2%)	0 (0,0%)
20/20	3 (1,8%)	9 (6,1%)	5 (6,1%)	4 (6,0%)
20/21	6 (3,7%)	1 (0,6%)	0 (0,0%)	1 (1,5%)
20/22	0 (0,0%)	1 (0,6%)	0 (0,0%)	1 (1,5%)
21/21	0 (0,0%)	2 (1,36%)	2 (2,4%)	0 (0,0%)
21/22	0 (0,0%)	1 (0,6%)	1 (1,2%)	0 (0,0%)

Para realizar el estudio de asociación se compararon las frecuencias genotípicas del polimorfismo CA-SSR-I del gen *EGFR* entre casos y controles, usando 16, 17 y 18 repeticiones CA como el valor del punto de corte para definir alelo “corto” y “largo”. Al analizar la distribución de frecuencias genotípicas considerando 16 repeticiones CA como punto de corte, no se observaron diferencias estadísticamente significativas al estratificar por edad (en controles $X^2=0,93$, $p=0,63$, en casos $X^2=0,26$, $p=0,88$) o por sexo (en controles $X^2=1,49$, $p=0,48$, en casos $X^2=0,52$, $p=0,77$).

La tabla 15 muestra las frecuencias genotípicas y alélicas para el polimorfismo CA-SSR-I del gen *EGFR* considerando como el alelo corto (S) al menor o igual a 16 repeticiones CA, y como el alelo largo (L) al mayor a 16 repeticiones CA. Al analizar el total de la muestra, observamos que la distribución del alelo corto S, fue similar en casos y controles y no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p=0,93$). Las frecuencias genotípicas fueron similares en casos y controles.

En el subgrupo de tumores de alto grado, no se observó diferencias significativas en la frecuencia del alelo S tanto en los casos de cáncer gástrico (0,28) como en los controles (0,32). Las frecuencias genotípicas fueron similares en casos con tumores de alto grado en comparación a los controles ($p=0,40$).

En el subgrupo de tumores de bajo grado, la frecuencia del alelo S fue similar en comparación con los controles. El homocigoto SS mostró una frecuencia mayor en casos con tumores de bajo grado (16,6%) en comparación a los controles (8,1%), sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa (SS versus SL+LL, OR: 2,26 [IC95% 0,95-5,34]). Estos resultados sugieren que los alelos de 16 o menos

repeticiones CA no se asocian con el desarrollo de tumores gástricos.

Tabla 15. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo CA-SSR-I del gen *EGFR* en casos de cáncer gástrico y controles tomando como punto de corte 16 repeticiones CA.

Genotipo	Controles n=160 (%)	Casos CG n=147 (%)	OR (IC 95%)	CG Alto Grado n=81 (%)	OR (IC 95%)	CG Bajo Grado n=66 (%)	OR (IC 95%)
LL	69 (43,1%)	69 (46,9%)	1,00	40 (49,3%)	1,00	29 (43,9%)	1,00
SL	78 (48,7%)	62 (42,1%)	0,79 (0,49-1,27)	36 (44,4%)	0,79 (0,45-1,38)	26 (39,3%)	0,79 (0,42-1,47)
SS	13 (8,1%)	16 (10,8%)	(a)1,23 (0,55-2,75) (b)1,38 (0,64-2,98)	5 (6,1%)	(a)0,66 (0,22-1,99) (b)0,74 (0,25-2,16)	11 (16,6%)	(a) 2,01 (0,80-5,01) (b)2,26 (0,95-5,34)
SL+SS	91 (56,8%)	78 (53,0%)	0,85 (0,54-1,34)	41 (50,6%)	0,77 (0,45-1,32)	37 (56%)	0,96 (0,54-1,72)
L	216 (0,67)	200 (0,68)	1,00	116 (0,71)	1,00	84 (0,63)	1,00
S	104 (0,32)	94 (0,31)	0,97 (0,69-1,37)	46 (0,28)	0,82 (0,54-1,24)	48 (0,36)	1,18 (0,77-1,81)

CG: Cáncer gástrico, OR (IC 95%): Odds ratio (Intervalo de confianza 95%), (a) Vs. LL, (b) Vs. SL+LL

Posteriormente consideramos como S a los alelos de 17 o menos repeticiones CA, y L a los alelos con más de 17 repeticiones CA (Tabla 16).

Al analizar el total de la muestra, no hubo diferencia significativa en la frecuencia del alelo S tanto en los casos de cáncer gástrico (0,36) como en los controles (0,38) ($p=0,61$). No hubo diferencias en las frecuencias genotípicas entre todos los casos y controles ($p=0,23$).

En ambos subgrupos de cáncer gástrico (alto grado y bajo grado), la distribución de frecuencias genotípicas fue similar respecto a los controles ($p=1,00$ y $p=0,13$ respectivamente).

Tabla 16. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo CA-SSR-I del gen *EGFR* en casos de cáncer gástrico y controles tomando como punto de corte 17 repeticiones CA.

Genotipo	Controles n=160 (%)	Casos CG n=147 (%)	OR (IC 95%)	CG Alto Grado n=81 (%)	OR (IC 95%)	CG Bajo Grado n=66 (%)	OR (IC 95%)
LL	55 (34,3%)	61 (41,4%)	1,00	37 (45,6%)	1,00	24 (36,3%)	1,00
SL	88 (55%)	66 (44,8%)	0,67 (0,41-1,09)	36 (44,4%)	0,60 (0,34-1,07)	30 (45,4%)	0,78 (0,41-1,47)
SS	17 (10,6%)	20 (13,6%)	(a)1,06 (0,50-2,22) (b)1,32 (0,66-2,64)	8 (9,8%)	(a)0,69 (0,27-1,78) (b)0,92 (0,37-2,23)	12 (18,1%)	(a)1,61 (0,67-3,90) (b)1,86 (0,83-4,17)
SL+SS	105 (65,6%)	86 (58,5%)	0,73 (0,46-1,17)	44 (54,3%)	0,62 (0,36-1,07)	42 (63,6%)	0,91 (0,50-1,66)
L	198 (0,61)	188 (0,63)	1,00	110 (0,67)	1,00	78 (0,59)	1,00
S	122 (0,38)	106 (0,36)	0,91 (0,65-1,27)	52 (0,32)	0,76 (0,51-1,14)	54 (0,40)	1,12 (0,74-1,70)

CG: Cáncer gástrico, OR (IC 95%): Odds ratio (Intervalo de confianza 95%), (a) Vs. LL, (b) Vs. SL+LL.

Luego, consideramos como S a los alelos de 18 o menos repeticiones CA, y L a los alelos con más de 18 repeticiones CA (Tabla 17).

Al analizar el total de la muestra, no hubo diferencia significativa en la frecuencia del alelo S tanto en los casos de cáncer gástrico (0,60) como en los controles (0,60) ($p=1,00$). No hubo diferencias en las frecuencias genotípicas entre todos los casos y controles ($p=1,00$).

En ambos subgrupos de cáncer gástrico (alto grado y bajo grado) la distribución de las frecuencias genotípicas fue similar respecto a los controles ($p=0,66$ y $p=0,45$, respectivamente).

Estos resultados sugieren que el polimorfismo CA-SSR-I no se asocia con cáncer

gástrico cuando se considera como alelo corto a aquellos con 17 o menos repeticiones, o 18 o menos repeticiones.

Tabla 17. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo CA-SSR-I del gen *EGFR* en casos de cáncer gástrico y controles tomando como punto de corte 18 repeticiones CA.

Genotipo	Controles n=160 (%)	Casos CG n=147 (%)	OR (IC 95%)	CG Alto Grado n=81 (%)	OR (IC 95%)	CG Bajo Grado n=66 (%)	OR (IC 95%)
LL	23 (14,3%)	22 (14,9%)	1,00	14 (17,2%)	1,00	8 (12,1%)	1,00
SL	80 (50%)	72 (48,9%)	0,94 (0,48-1,83)	41 (50,6%)	0,84 (0,39-1,80)	31 (46,9%)	1,11 (0,45-2,75)
SS	57 (35,6%)	53 (36,0%)	(a)0,97 (0,48-1,94) (b)1,01 (0,63-1,62)	26 (32%)	(a)0,74 (0,33-1,68) (b)0,85 (0,48-1,50)	27 (40,9%)	(a)1,36 (0,53-3,43) (b)1,25 (0,69-2,25)
SL+SS	137 (85,6%)	125 (85,0%)	0,95 (0,50-1,79)	67 (82,7%)	0,80 (0,38-1,66)	58 (87,8%)	1,21 (0,51-2,88)
L	126 (0,39)	116 (0,39)	1,00	69 (0,42)	1,00	47 (0,35)	1,00
S	194 (0,60)	178 (0,60)	0,99 (0,72-1,37)	93 (0,57)	0,87 (0,59-1,28)	85 (0,64)	1,17 (0,77-1,79)

CG: Cáncer gástrico, OR (IC 95%): Odds ratio (Intervalo de confianza 95%), (a) Vs. LL, (b) Vs. SL+LL

Algunos autores como Gebhardt y cols. (1999), Buerger y cols. (2000) han demostrado que el nivel de expresión del gen *EGFR* es inversamente proporcional al número de repeticiones del dinucleótido CA en el intrón 1 del gen *EGFR* *in vivo* e *in vitro*. Se han propuesto diferentes métodos para el análisis de este polimorfismo. Amador y cols. (2004) propusieron el método de la suma de alelos, tomando como punto de corte la media del rango de la suma de repeticiones de dinucleótido CA.

De esta forma, clasificamos las muestras de acuerdo a la suma del número de repeticiones en ambos alelos, asignando como bajo número de repeticiones (mayor

expresión del gen) a las muestras cuya suma es ≤ 32 , ≤ 34 o ≤ 36 , y como alto número de repeticiones (menor expresión del gen) a la suma de alelos >32 , >34 o >36 respectivamente.

Las tablas 18, 19 y 20 muestran la distribución del polimorfismo CA-SSR-I del gen *EGFR* según la suma de los alelos en 147 casos de cáncer gástrico, según tipo histológico, en comparación con 160 muestras control. Al analizar el total de la muestra no se observaron diferencias significativas en las frecuencias de suma de alelos entre casos y controles: suma de alelos ≤ 32 , $p=0,70$; suma de alelos ≤ 34 , $p=0,80$; o suma de alelos ≤ 36 , $p=0,41$.

En los subgrupos tumorales (alto grado y bajo grado), no se observó diferencias significativas en la distribución de frecuencias genotípicas en los casos de cáncer gástrico respecto a los controles. Este resultado sugiere que la presencia de alelos con una suma ≤ 32 , ≤ 34 o ≤ 36 no se asocia con cáncer gástrico.

Tabla 18. Frecuencia de la suma de alelos ≤ 32 del polimorfismo CA-SSR-I del gen *EGFR* en casos de cáncer gástrico y controles.

Suma de alelos	Controles n=160 (%)	Casos CG n=147 (%)	Valor de p	OR (IC 95%)	CG Alto Grado n=81 (%)	OR (IC 95%)	CG Bajo Grado n=66 (%)	OR (IC 95%)
>32	145 (90,6%)	131 (89,1%)	-	1,00	75 (92,5%)	1,00	56 (84,8%)	1,00
≤ 32	15 (9,3%)	16 (10,8%)	0,70	1,18 (0,56-2,48)	6 (7,4%)	0,77 (0,28-2,07)	10 (15,1%)	1,72 (0,73-4,07)

CG: Cáncer gástrico, OR (IC 95%): Odds ratio (Intervalo de confianza 95%)

Tabla 19. Frecuencia de la suma de alelos ≤ 34 del polimorfismo CA-SSR-I del gen *EGFR* en casos de cáncer gástrico y controles.

Suma de alelos	Controles n=160 (%)	Casos CG n=147 (%)	Valor de p	OR (IC 95%)	CG Alto Grado n=81 (%)	OR (IC 95%)	CG Bajo Grado n=66 (%)	OR (IC 95%)
>34	116 (72,5%)	104 (70,7%)	-	1,00	60 (74%)	1,00	44 (66,6%)	1,00
≤ 34	44 (27,5%)	43 (29,2%)	0,80	1,09 (0,66-1,79)	21 (25,9%)	0,92 (0,50-1,69)	22 (33,3%)	1,31 (0,71-2,44)

CG: Cáncer gástrico, OR (IC 95%): Odds ratio (Intervalo de confianza 95%)

Tabla 20. Frecuencia de la suma de alelos ≤ 36 del polimorfismo CA-SSR-I del gen *EGFR* en casos de cáncer gástrico y controles.

Suma de alelos	Controles n=160 (%)	Casos CG n=147 (%)	Valor de p	OR (IC 95%)	CG Alto Grado n=81 (%)	OR (IC 95%)	CG Bajo Grado n=66 (%)	OR (IC 95%)
>36	57 (35,6%)	60 (40,8%)	-	1,00	34 (41,9%)	1,00	26 (39,3%)	1,00
≤ 36	103 (64,3%)	87 (59,1%)	0,41	0,80 (0,50-1,27)	47 (58%)	0,76 (0,44-1,32)	40 (60,6%)	0,85 (0,47-1,53)

CG: Cáncer gástrico, OR (IC 95%): Odds ratio (Intervalo de confianza 95%)

5.5.2. Asociación del polimorfismo R497K del gen *EGFR* con cáncer gástrico:

La tabla 21 muestra las frecuencias genotípicas y alélicas para el polimorfismo R497K del gen *EGFR* en 147 casos de cáncer gástrico y en 160 controles. El polimorfismo se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles ($p=0,27$). Al analizar la distribución de frecuencias genotípicas no se observaron diferencias estadísticamente significativas al estratificar por edad (en controles

$X^2=1,59$, $p=0,45$, en casos $X^2=1,73$, $p=0,42$) o por sexo (en controles $X^2=0,73$, $p=0,69$, en casos $X^2=0,16$, $p=0,92$). En el total de la muestra no se observó diferencias significativas en la frecuencia del alelo G tanto en los casos de cáncer gástrico (0,66) como en los controles (0,70) ($p=0,33$). Respecto a las frecuencias genotípicas, no se observó diferencias significativas en las frecuencias genotípicas entre ambos grupos ($p=0,30$). Estos resultados sugieren que la presencia del alelo G por sí solo no constituye un factor de riesgo para cáncer gástrico.

Al analizar la distribución de los casos según tipo histológico, se observó que el alelo G no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos histológicos (alto grado y bajo grado) en comparación con los controles ($p=0,58$ y $p=0,24$, respectivamente).

En el subgrupo de cáncer gástrico de alto grado, tanto los heterocigotos como los homocigotos GG no mostraron asociación significativa con cáncer gástrico (OR: 0,91 [IC95% 0,37-2,23] y OR: 0,78 [IC95% 0,32-1,88]), respectivamente.

En el subgrupo de cáncer gástrico de bajo grado, ni el heterocigoto ni el homocigoto GG mostró asociación significativa con cáncer gástrico. (OR: 1,23 [IC95% 0,46-3,29] y (OR: 0,82 [IC95% 0,31-2,20]), respectivamente. Estos resultados sugieren que el alelo G no modifica la asociación con cáncer gástrico en la población estudiada.

Tabla 21. Frecuencias genotípicas y alélicas para el polimorfismo R497K del gen *EGFR* en casos de cáncer gástrico y grupo control.

Genotipo	Controles n=160 (%)	Casos CG n=147 (%)	OR (IC 95%)	CG Alto grado n=81 (%)	OR (IC 95%)	CG Bajo Grado n=66 (%)	OR (IC 95%)
AA	17 (10,6%)	17 (11,5%)	1,00	10 (12,3%)	1,00	7 (10,6%)	1,00
AG	61 (38,1%)	64 (43,5%)	1,04 (0,49-2,24)	33 (40,7%)	0,91 (0,37-2,23)	31 (46,9%)	1,23 (0,46-3,29)
GG	82 (51,2%)	66 (44,9%)	(a)0,80 (0,38-1,69) (b)0,77 (0,49-1,21)	38 (46,9%)	(a)0,78 (0,32-1,88) (b)0,84 (0,49-1,43)	28 (42,4%)	(a)0,82 (0,31-2,20) (b)0,70 (0,39-1,25)
AG+GG	143 (89,3%)	130 (88,4%)	0,90 (0,44-1,85)	71 (87,6%)	0,84 (0,36-1,93)	59 (89,3%)	1,00 (0,39-2,54)
A	95 (0,29)	98 (0,33)	1,00	53 (0,32)	1,00	45 (0,34)	1,00
G	225 (0,70)	196 (0,66)	0,84 (0,60-1,18)	109 (0,67)	0,86 (0,57-1,30)	87 (0,65)	0,81 (0,52-1,25)

CG: Cáncer gástrico, OR (IC 95%): Odds ratio (Intervalo de confianza 95%), (a) Vs. AA (b) Vs. AA+AG

5.5.3. Asociación del SNP -216G>T del gen *EGFR* con cáncer gástrico.

Se logró genotipificar exitosamente un total de 148 sujetos. La tabla 22 muestra las frecuencias genotípicas y alélicas para el SNP -216G>T del gen *EGFR* en 92 casos de cáncer gástrico y 56 controles. El polimorfismo se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra de controles ($p=0,10$). Al analizar la distribución de frecuencias genotípicas no se observaron diferencias estadísticamente significativas al estratificar por edad (en controles $X^2=1,12$, $p=0,57$, en casos $X^2=1,93$, $p=0,38$) o por sexo (en controles $X^2=1,35$, $p=0,51$, en casos $X^2=0,88$, $p=0,64$).

Al analizar el total de la muestra, se observó que la distribución del alelo T fue similar tanto en los casos de cáncer gástrico (0,18) como en el grupo control (0,17), y esta

diferencia no fue significativa ($p=1,00$). Con respecto a las frecuencias genotípicas, se observó que un 5,4% de los casos de cáncer gástrico fueron homocigotos de riesgo (TT), mientras que en el grupo control ningún aislado contenía al homocigoto TT.

En ambos subgrupos de cáncer gástrico, la frecuencia del alelo T no presentó diferencias significativas entre los casos en comparación con los controles ($p=0,60$ y $p=0,84$, respectivamente).

Estos resultados sugieren que la presencia del alelo T, por sí sólo, no modifica la asociación con cáncer gástrico en los casos estudiados. Sin embargo el homocigoto TT se asocia a la presencia de cáncer gástrico.

Tabla 22. Frecuencias genotípicas y alélicas para el SNP -216G>T del gen *EGFR* en casos de cáncer gástrico y controles.

Genotipo	Controles n=56 (%)	Casos n=92 (%)	OR (IC95%)	CG Alto Grado n=48 (%)	OR (IC95%)	CG Bajo Grado n=44 (%)	OR (IC95%)
GG	36 (64,2%)	63 (68,4%)	1,00	32 (66,6%)	1,00	31 (70,4%)	1,00
GT	20 (35,7%)	24 (26%)	0,68 (0,33-1,41)	12 (25%)	0,67 (0,28-1,59)	12 (27,2%)	0,69 (0,29-1,65)
TT	0 (0%)	5 (5,4%)	-	4 (8,3%)	-	1 (2,2%)	-
GT+TT	20 (35,7%)	29 (31,5%)	0,82 (0,41-1,67)	16 (33,3%)	0,90 (0,39-2,02)	13 (29,5%)	0,75 (0,32-1,76)
G	92 (0,82)	150 (0,81)	1,00	76 (0,79)	1,00	74 (0,84)	1,00
T	20 (0,17)	34 (0,18)	1,04 (0,56-1,92)	20 (0,20)	1,21 (0,60-2,41)	14 (0,15)	0,87 (0,41-1,84)

CG: Cáncer gástrico, OR (IC 95%): Odds ratio (Intervalo de confianza 95%), (a)Vs. GG, (b)Vs. GG+GT

5.6. Análisis de haplotipos definidos por los polimorfismos R497K y -216G>T

Se define haplotipo como la combinación de alelos de loci ligados en un cromosoma y que segregan juntos. Para inferir los haplotipos presentes en el grupo de casos y controles se utilizó una aproximación de máxima verosimilitud (mediante el programa UNPHASED 3.0.7) a partir de los datos de genotipos de ambos grupos analizados. Se infirieron los 4 haplotipos posibles: A-G, A-T, G-G, y G-T. El coeficiente de desequilibrio de ligamiento (D') fue de 0,02. Si este coeficiente tiene un valor de 1 implica que están fuertemente correlacionados ambos SNPs, un valor igual a 0 indica independencia entre ambos SNPs. Por lo tanto, se puede concluir que estos polimorfismos no están correlacionados.

La tabla 23 muestra las frecuencias de los haplotipos en 92 casos de cáncer gástrico y en 56 controles. La distribución de frecuencias de haplotipos no fue significativamente diferente entre casos y controles ($p=0,34$). Al realizar el análisis de acuerdo al grado de diferenciación, no se observa asociación entre algún haplotipo con cáncer gástrico.

Tabla 23. Distribución de frecuencias de haplotipos en casos de cáncer gástrico y controles.

Haplotipos	Controles n=56 (%)	Casos n=92 (%)	OR (IC 95%)	CG Alto Grado n=48 (%)	OR (IC 95%)	CG Bajo Grado n=44 (%)	OR (IC 95%)
A-G	10 (17,9%)	25 (26,7%)	1,00	11 (23,3%)	1,00	14 (31,1%)	1,00
A-T	3 (6,1%)	6 (6,38%)	0,70 (0,16-3,06)	4 (7,8%)	0,98 (0,20-4,72)	2 (4,0%)	0,38 (0,04-3,44)
G-G	36 (64,1%)	50 (54,7%)	0,57 (0,29-1,13)	27 (55,7%)	0,66 (0,30-1,45)	23 (52,9%)	0,47 (0,21-1,04)
G-T	7 (11,7%)	11 (12,0%)	0,69 (0,28-1,65)	6 (12,9%)	0,84 (0,31-2,29)	5 (11,8%)	0,58 (0,20-1,64)

CG: Cáncer gástrico, OR (IC 95/): Odds ratio (Intervalo de confianza 95/)

5.7. Interacción entre los polimorfismos del gen *EGFR* y el estado funcional “on” del gen *OipA*.

5.7.1. Identificación de pares de factores que potencialmente interactúan.

La interacción gen-gen se evaluó mediante el cálculo de ganancia de información (IG). La tabla 24 muestra los valores de IG entre todos los pares de factores de riesgo analizados en este trabajo. De acuerdo al valor de $IG > 0,5\%$ como sugerente de interacción, se propone interacción entre *OipA* en estado funcional “on” y el polimorfismo R497K, y entre *OipA* “on” y el polimorfismo -216G>T. Por lo tanto, se procedió a evaluar si los polimorfismos R497K y -216G>T interactúan con *OipA* “on”.

Tabla 24. Ganancia de información para las diferentes combinaciones de pares de factores, de acuerdo al grado de diferenciación histológica.

Factor 1	Factor 2	CG	CG Alto Grado	CG Bajo Grado
CA-SSR-I	-216G>T	0,29%	0,11%	0,08%
R497K	-216G>T	-0,13%	-0,04%	-0,31%
R497K	CA-SSR-I	0,43%	0,03%	-0,43%
<i>OipA</i> “on”	-216G>T	-0,13%	-0,04%	0,73%
<i>OipA</i> “on”	CA-SSR-I	-0,02%	-0,46%	-0,13%
<i>OipA</i> “on”	R497K	1,91%	1,65%	1,35%

5.7.1.1. Interacción R497K - *OipA* “on”

Con el fin de analizar el efecto conjunto entre el polimorfismo R497K del gen *EGFR*, y la presencia del gen *OipA* en estado funcional “on” con cáncer gástrico, se realizó un análisis de interacción entre estos factores en 147 casos de cáncer gástrico y 160 controles.

La tabla 25 muestra el análisis combinado entre el polimorfismo R497K del gen *EGFR* y el estado funcional del gen *OipA* de *H. pylori*. En los sujetos portadores del genotipo GG e infectados con cepas en estado “off” o *Hp* (-) el OR fue de 0,54 [IC 95% 0,31-0,95]. En los sujetos con genotipo AG o AA, pero infectados con cepas en estado funcional “on” el OR fue de 0,84 [IC95% 0,43-1,63]. Sin embargo, en los sujetos con ambos factores de riesgo propuestos (portadores del genotipo GG e infectados con cepas “on”) el valor de OR fue mayor al de cada uno de los factores analizados por separado (OR: 1,24 [IC95% 0,63-2,42]). Sin embargo, este valor de OR no fue estadísticamente significativo.

Posteriormente, se analizó si el polimorfismo R497K modificaba la asociación con cáncer gástrico entre los sujetos infectados con cepas “on”. Se observó que aquellos infectados con cepas “on” y portadores del genotipo AG+AA (no riesgo) el valor de OR fue 1,11 [IC95% 0,60-2,05]. El valor de OR fue mayor en los infectados con cepas “on” pero portadores del genotipo GG (OR: 1,64), sin embargo este valor no fue significativo (IC95% 0,88-3,04).

Al realizar el análisis de los casos de cáncer gástrico según su tipo histológico, en el subgrupo de tumores de bajo grado, se observó que los infectados con cepas en estado “off” o *H. pylori* (-) y homocigotos GG, el OR fue de 0,57 [IC95% 0,28-1,15]. En los sujetos heterocigotos y homocigotos AA e infectados con cepas “on”, el OR fue de 0,67 [IC95% 0,28-1,59]. En los portadores de ambos factores de riesgo (GG y estado funcional “on”) el OR: 0,74. Este valor no fue significativo (IC95% 0,30-1,83). Luego, al analizar si el polimorfismo R497K modificaba la asociación con cáncer gástrico entre los sujetos infectados con cepas “on”, los portadores del genotipo AG+AA (no riesgo) e infectados con cepas “on”, el valor de OR fue 0,87 [IC95% 0,39-1,95]. En los portadores de ambos factores de riesgo, el valor de OR fue 0,96. Este valor no fue estadísticamente significativo (IC95% 0,41-2,25).

Respecto al subgrupo de tumores de alto grado, se observó que en aquellos portadores del genotipo GG e infectados con cepas en estado “off” o *H. pylori* (-), el OR fue de 0,51 [IC95% 0,25-1,04]. Entre los sujetos infectados con cepas “on” con genotipo heterocigoto u homocigoto AA (no riesgo) presentaron un OR: 1,01 [IC95% 0,46-2,21]. Los portadores de ambos factores de riesgo tuvieron un OR: 1,73 mayor a cada uno de los factores por separado. Sin embargo este valor no fue significativo (IC95% 0,81-3,70). Al analizar si el polimorfismo R497K modificaba la asociación con cáncer gástrico en aquellos infectados con cepas “on” y portadores del genotipo AG+AA (no riesgo) el valor de OR fue 1,37 [IC95% 0,66-2,81]. En los infectados con cepas “on” y portadores del genotipo GG el valor de OR fue 2,35. Este valor fue estadísticamente significativo [IC95% 1,18-4,70].

Estos resultados sugieren que el estado homocigoto del alelo G modifica el riesgo para cáncer gástrico en tumores de alto grado, y que en presencia del gen *OipA* en estado funcional “on” el polimorfismo R497 aumenta la asociación con cáncer gástrico, existiendo interacción entre ambos. De esta forma, se propone que existe una sinergia entre el polimorfismo R497 y la proteína activa del gen *OipA*, que conlleva a un aumento de la asociación con cáncer gástrico.

Tabla 25. Interacción entre el polimorfismo R497K del gen *EGFR* y el estado “on”-“off” del gen *OipA* de *H. pylori* en casos de cáncer gástrico según tipo histológico.

Genotipo/ OipA “on”-“off”	Controles n=160 (%)	CG n=147 (%)	OR (IC 95%)		CG Alto Grado n=81 (%)	OR (IC 95%)		CG Bajo Grado n=66 (%)	OR (IC 95%)	
AG+AA/ off+Hp(-)	51 (31,8%)	56 (38%)	1,00	1,00	28 (34,5%)	1,00	1,00	28 (42,4%)	1,00	1,00
GG/ off+Hp(-)	60 (37,5%)	36 (24,4%)	0,54 (0,31-0,95)		17 (20,9%)	0,51 (0,25-1,04)		19 (28,7%)	0,57 (0,28-1,15)	
AG+AA/ on	27 (16,8%)	25 (17%)	0,84 (0,43-1,63)	1,11 (0,60-2,05)	15 (18,5%)	1,01 (0,46-2,21)	1,37 (0,66-2,81)	10 (15,1%)	0,67 (0,28-1,59)	0,87 (0,39-1,95)
GG/on	22 (13,7%)	30 (20,4%)	1,24 (0,63-2,42)	1,64 (0,88-3,04)	21 (25,9%)	1,73 (0,81-3,70)	2,35 (1,18-4,70)	9 (13,6%)	0,74 (0,30-1,83)	0,96 (0,41-2,25)

HP(-): *H. pylori* negativo, CG: Cáncer gástrico, OR (IC 95%): Odds ratio (Intervalo de confianza 95%)

5.7.1.2. Interacción -216G>T – *OipA* “on”

La tabla 26 muestra el análisis combinado entre el polimorfismo -216G>T del gen *EGFR* y el estado funcional del gen *OipA* de *H. pylori*. En los sujetos portadores del genotipo GT+TT e infectados con cepas en estado “off” o *Hp* (-) el OR fue de 0,62 [IC 95% 0,26-1,44]. En los sujetos con genotipo GG, pero infectados con cepas en estado funcional “on” el OR fue de 1,41 [IC95% 0,60-3,28]. En los sujetos con ambos factores de riesgo propuestos (portadores del genotipo GT+TT e infectados con cepas “on”) el valor de OR fue mayor al de cada uno de los factores analizados por separado (OR: 3,94) sin embargo, este valor no fue estadísticamente significativo (IC95% 0,80-19,2). Posteriormente, se analizó si el polimorfismo -216G>T del gen *EGFR* modificaba la asociación con cáncer gástrico entre aquellos infectados con cepas “on”. Entre los infectados con cepas “on” y portadores del genotipo GG (no riesgo) el valor de OR fue 1,69 (IC95% 0,78-3,68). Sin embargo, en los portadores del genotipo GT+TT e infectados con cepas en estado funcional “on” el OR fue 2,46 (IC95% 1,02-5,93).

Al realizar el análisis combinado del polimorfismo -216G>T del gen *EGFR* según el tipo histológico, se observó que en el subgrupo de alto grado, los sujetos portadores del genotipo GT+TT e infectados con cepas en estado “off” o *Hp* (+), el OR fue 0,82 (IC95% 0,29-2,32). En los sujetos portadores de genotipo GG, infectados con cepas en estado “on”, el OR fue 2,27 (IC 95% 0,85-6,03). Sin embargo, en los sujetos que presentaban los dos factores de riesgo (GT+TT y cepas “on”) se observó un OR: 5,75 (IC 95% 1,04-31,6). Al analizar en este subgrupo la asociación con cáncer gástrico,

sólo entre las cepas en estado “on”, se observó que entre los infectados con cepas “on” y genotipo GG el OR fue 2,46 (IC 95% 1,02-5,93), mientras que en los portadores de cepas “on” y genotipo GT+TT, el OR fue 6,23 (IC 95% 1,19-32,57).

En el subgrupo de bajo grado se observó que los sujetos portadores del genotipo de riesgo (GT+TT) e infectados con cepas en estado “off” o *Hp* (-) el OR fue de 0,48 (IC 95% 0,17-1,35). En los portadores del genotipo GG, pero infectados con cepas en estado funcional “on” el OR fue de 0,84 (IC95% 0,30-2,32). En los sujetos portadores de los genotipos GT+TT e infectados con cepas “on”, el valor de OR fue mayor a cada factor por separado (OR: 2,73 [IC95% 0,47-15,6]). Luego, al analizar si el polimorfismo -216G>T del gen *EGFR* modifica la asociación con cáncer gástrico entre los infectados con cepas “on”, se observó que entre los infectados con cepas “on” y portadores del genotipo GG el valor de OR fue 1,08 (IC95% 0,41-2,81). En los portadores del genotipo de riesgo e infectados con cepas en estado funcional “on” el OR fue 3,53 (IC95% 0,64-19,49). En conjunto, estos resultados sugieren que el polimorfismo -216G>T del gen *EGFR*, en presencia del gen *OipA* de *H. pylori* en estado funcional “on”, aumenta la asociación con cáncer gástrico, y esta interacción es más evidente entre el subgrupo histológico de alto grado.

Tabla 26. Interacción entre el polimorfismo -216G>T del gen *EGFR* y el estado “on”-“off” del gen *OipA* de *H. pylori* en casos de cáncer gástrico según tipo histológico.

Genotipo/ OipA “on”- “off”	Controles n=56 (%)	Casos CG n=92 (%)	OR (IC 95%)		CG Alto Grado n=48 (%)	OR (IC 95%)		CG Bajo Grado n=44 (%)	OR (IC 95%)	
GG/ off+Hp(-)	23 (41%)	35 (38%)	-	1,00	14 (29,1%)	1,00	1,00	21 (47,7%)	1,00	1,00
GT+TT/ off+Hp(-)	18 (32,1%)	17 (18,4%)	0,62 (0,26-1,44)		9 (18,7%)	0,82 (0,29-2,32)		8 (18,1%)	0,48 (0,17- 1,35)	
GG/on	13 (23,2%)	28 (30,4%)	1,41 (0,60-3,28)	1,69 (0,78-3,68)	18 (37,5%)	2,27 (0,85-6,03)	2,46 (1,02-5,93)	10 (22,7%)	0,84 (0,30- 2,32)	1,08 (0,41- 2,81)
GT+TT/on	2 (3,5%)	12 (13%)	3,94 (0,80-19,2)	4,73 (1,00-22,34)	7 (14,5%)	5,75 (1,04-31,6)	6,23 (1,19-32,57)	5 (11,3%)	2,73 (0,47- 15,6)	3,53 (0,64- 19,49)

HP (-): *H. pylori* negativo, CG: Cáncer gástrico, OR (IC 95%): Odds ratio (Intervalo de confianza 95%)

6. DISCUSIÓN

El cáncer gástrico es la neoplasia de tubo digestivo más frecuente en el mundo. Varios factores han sido relacionados como agentes etiológicos, pero el único reconocido por la comunidad científica con capacidad carcinogénica probada es la infección por *Helicobacter pylori*. La consecuencia biológica a largo plazo de la colonización por *H. pylori* es un mayor riesgo de adenocarcinoma gástrico que puede desarrollarse muchos años después de la infección inicial. El resultado final de la infección por *H. pylori* está determinado por la interacción compleja de factores bacterianos, del huésped y del medio ambiente. Dentro de los factores bacterianos se encuentran distintos factores de virulencia que le confieren patogenicidad a *H. pylori*. Entre estos factores de virulencia está el gen *OipA*, que ha sido estudiado por diferentes autores, y se ha descrito su relación con mayor riesgo de diversas patologías gastrointestinales (Yamaoka y cols., 2006; Dossumbekova y cols., 2006; Matteo y cols., 2010; Markovska y cols., 2011).

A través de diferentes estudios (Yamaoka y cols., 2004; Tabassam y cols., 2009) se ha logrado establecer la participación de *H. pylori* en el aumento de la producción de IL-8, activando diferentes genes que participan en la cascada inflamatoria. Dentro de ellos, está el gen *EGFR*, el cual interviene en el crecimiento, desarrollo y proliferación celular. Este gen se encuentra sobre expresado en diferentes tumores primarios, y cumple un papel importante en la oncogénesis (Mammano y cols., 2006).

Considerando estos antecedentes, el objetivo de este trabajo de tesis fue estudiar la asociación e interacción entre los polimorfismos CA-SSR-I, -216G>T, y R497K del gen *EGFR*, y la presencia del gen *OipA* en estado funcional “on” de *H.pylori*, con cáncer gástrico, mediante un estudio de casos y controles. Se compararon aislados de *H. pylori* obtenidos de pacientes chilenos con adenocarcinoma gástrico frente a muestras de pacientes sin cáncer gástrico. A la fecha no existen reportes de publicaciones que analicen estos polimorfismos con riesgo para cáncer gástrico.

6.1. Asociación del gen *OipA* de *Helicobacter pylori* con cáncer gástrico:

Los resultados de esta tesis permiten proponer que el estado funcional “on” del gen *OipA* de *Helicobacter pylori* se asocia a cáncer gástrico en la población estudiada, y que el patrón de 6 repeticiones CT es el más frecuente para este estado funcional, similar a lo reportado por otros autores en población caucásica. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Yamaoka y colaboradores (2002), quienes analizaron 247 pacientes colombianos y estadounidenses con gastritis crónica, úlcera duodenal y cáncer gástrico. Dentro de sus hallazgos el patrón de 6 repeticiones de dinucleótidos CT fue el más prevalente entre las cepas en estado funcional “on”, y el de 7 repeticiones CT fue el más frecuente para el estado no funcional “off”. Ellos también encontraron que el resultado clínico se relaciona con el estado funcional “on” u “off”, no con el número de repeticiones dentro de cada estado funcional. Nuestros resultados también concuerdan con lo reportado por Dossumbekova y colaboradores (2006), quienes encontraron en un grupo de 58 pacientes alemanes con gastritis crónica, que el patrón de repeticiones más frecuente era el que tenía 6 repeticiones

CT (50%), seguido por el patrón 5+2 (26,5%), mientras que las cepas en estado no funcional “off” presentaban con mayor frecuencia un patrón de 8 repeticiones CT (45,8%). Por su parte, Matteo y colaboradores (2010) estudiaron 40 pacientes argentinos con gastritis, erosión gástrica y úlcera gástrica, y encontraron que el patrón “on” de 6 repeticiones fue el más frecuente (55,8%) entre la población estudiada, mientras que para el estado no funcional “off”, el patrón de 7 repeticiones fue el más prevalente (21,5%). Asimismo, Markovska y colaboradores (2011) estudiaron 70 pacientes búlgaros con úlcera duodenal, úlcera gástrica, gastritis crónica y reflujo gastroesofágico para determinar, entre otros, el estado funcional del gen *OipA* de acuerdo con estas características clínicas. Observaron 9 patrones diferentes, siendo el de 6 repeticiones de dinucleótido CT el más frecuente (69%, 39/56). En cuanto al estado no funcional “off” el patrón de 7 repeticiones CT fue el más frecuente (46,1%, 6/13).

En síntesis, nuestros resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, donde el patrón de 6 repeticiones CT es el más frecuente en los aislados con estado funcional “on”, independientemente del lugar geográfico estudiado. A su vez, el patrón de 7 repeticiones fue el más frecuente en los aislados en estado no funcional “off”, similar a lo reportado por otros autores, a excepción de lo observado por Dossumbekova y cols, quienes encontraron que el patrón de 8 repeticiones fue el más prevalente en pacientes alemanes.

En el presente trabajo encontramos asociación entre el estado funcional “on” del gen *OipA* y cáncer gástrico con tumores de alto grado, (OR: 1,81 [IC 95% 1,04–3,14]).

Sólo un trabajo ha analizado la asociación entre infección con cepas en estado funcional “on” y cáncer gástrico. Yamaoka y cols., (2006) estudiaron aislados de *H.pylori* provenientes de 200 pacientes estadounidenses y colombianos con gastritis crónica, úlcera duodenal y cáncer gástrico. Encontraron que el estado funcional “on” se asocia con cáncer gástrico (OR: 4,8 [IC 95% 1,4–16,8]). Estos autores concluyen que la presencia del gen *OipA* fue un factor determinante predictor de cáncer gástrico frente a gastritis ($p=0,013$).

Hasta el momento, no existen reportes en la literatura que hagan el análisis de asociación entre el gen *OipA* de *H. pylori* y los subtipos histológicos de cáncer gástrico. Franco y cols. (2008), demostraron que *OipA* induce la translocación de Beta-catenina y E-cadherina al núcleo celular, lo cual produce una disrupción en las uniones adherentes de las células y por lo tanto una histología poco diferenciada. Se sabe que el adenocarcinoma gástrico de tipo histológico difuso (que se caracteriza por ser de alto grado) presenta inactivación de E-cadherina, ya sea por mutaciones o silenciamiento epigenético del gen CDH1 que codifica para esta proteína (Paredes y cols., 2012). Éste puede ser un mecanismo a través del cual *H. pylori* interrumpe la función de la barrera gástrica y promueve la progresión de la enfermedad a estadios más avanzados. Por lo tanto, el estado funcional en el que se encuentre el gen *OipA* puede influir tanto en las características clínicas como en la virulencia bacteriana de *H. pylori*.

6.2. Asociación de los polimorfismos CA-SSR-I, -216G>T, y R497K del gen *EGFR* con cáncer gástrico:

Los resultados de esta tesis permiten proponer que los polimorfismos CA-SSR-I, R497K y -216G>T del gen *EGFR* no se asocian, por sí solos con riesgo de cáncer gástrico en la población estudiada.

6.2.1. Polimorfismo CA-SSR-I:

Respecto a las frecuencias alélicas, se observó para el total de la muestra, que el alelo más frecuente en casos de cáncer gástrico y en controles fue el de 16 repeticiones, y no hubo diferencias entre los subtipos histológicos de cáncer gástrico, lo cual concuerda con lo reportado por Liu y cols. (2003), quienes estudiaron la distribución alélica del polimorfismo CA-SSR-I en 333 individuos de diferentes grupos étnicos (183 Caucásicos, 84 Afroamericanos y 66 Asiáticos), y observaron que el alelo de 16 repeticiones es el más frecuente en población caucásica y afroamericana, mientras que el alelo de 20 repeticiones fue el más prevalente entre individuos asiáticos.

Se han descrito distintos métodos para analizar este polimorfismo, ya que no está claramente definido cuales alelos corresponden a los que producen alta expresión de *EGFR*, y no existe consenso aún acerca de cuál es el mejor método para su estudio. En este trabajo de tesis se realizó el análisis de este polimorfismo mediante 2 métodos reportados en la literatura, el método de los genotipos tomando como referencia diferentes puntos de corte, y el método de la suma del número de

repeticiones de los alelos del genotipo.

Encontramos que este polimorfismo no se asocia con cáncer gástrico. A la fecha no se han publicado estudios que analicen la asociación entre el polimorfismo CA-SSR-I con cáncer gástrico. Sin embargo, existen estudios que han analizado esta asociación en otros tipos de cáncer.

Costa y cols. (2011), realizaron un estudio de 196 casos y 168 controles portugueses, para analizar diferentes polimorfismos del gen *EGFR* y su asociación con glioma. Encontraron que independiente del punto de corte para definir el alelo corto, el genotipo SS se asoció a mayor riesgo de glioma (OR: 2,38 [IC 95% 1,42-3,98]) en la población estudiada. Sin embargo, mediante el método de suma de alelos no se observó una asociación significativa con mayor riesgo para este tipo de cáncer. Estos hallazgos contrastan con lo reportado por Zhang y cols., (2007), quienes en un estudio de casos y controles en 176 pacientes caucásicos con cáncer pulmonar, utilizaron los métodos descritos previamente para analizar el polimorfismo CA-SSR-I. Encontraron una asociación significativa entre la presencia del alelo S (SL+SS Versus LL) y cáncer pulmonar (OR: 2,15 [IC 95% 1,31-3,52], $p=0,002$). Así, al utilizar el método de la suma de alelos, encontraron una asociación significativa ($p=0,001$) entre genotipos cuya suma de repeticiones CA era <36 y mayor riesgo de cáncer pulmonar (OR: 2,25 [IC95% 1,38-3,66]).

Existe un estudio que asocia la presencia de dos alelos largos >19 repeticiones CA con aumento de riesgo para cáncer de mama en mujeres jóvenes, con antecedentes familiares de cáncer de mama, y además asociado a ciertos factores dietarios, (OR:

10,68 [IC95%, 1,57–72,58]) (Brandt y cols., 2004). Sin embargo, estos autores no encontraron una asociación significativa entre la longitud de los alelos y riesgo para cáncer de mama en el total de casos y controles (OR: 1,13 [IC95%, 0,78–1,62]).

6.2.2. Polimorfismo R497K:

Se observó que la presencia del alelo G por sí solo no constituye un factor de riesgo para cáncer gástrico. Estos resultados están de acuerdo con los hallazgos de Zhang y cols. (2013), quienes en un estudio de 387 casos y 392 controles en población china, analizaron la asociación entre siete polimorfismos del gen *EGFR*, entre ellos R497K (rs2227983), y estilo de vida con riesgo de cáncer gástrico. Hasta el momento, el alelo G no se ha asociado con riesgo para algún tipo de cáncer, aunque se ha descrito como factor pronóstico de sobrevida (Nomura y cols., 2007).

Los autores no encontraron asociación significativa entre este polimorfismo y mayor riesgo de cáncer gástrico ($p=0,428$). Otros autores han descrito a este polimorfismo como factor pronóstico en cáncer colorrectal (Wang y cols., 2007) y cáncer pulmonar (Sasaki y cols., 2009).

6.2.3. Polimorfismo -216G>T:

En el presente estudio, la presencia del alelo T, por sí sólo, no modifica el riesgo para cáncer gástrico en los casos estudiados. Sin embargo el homocigoto TT sólo se presentó en los casos de cáncer gástrico. El análisis de este polimorfismo se realizó en un grupo menor de casos y controles, en comparación con los otros polimorfismos, por lo cual las estimaciones son menos precisas. Costa y cols. (2011),

mediante un estudio de casos y controles en 196 pacientes con glioma, analizaron el polimorfismo -216G>T del gen *EGFR* y encontraron que este polimorfismo no se asocia a mayor riesgo de glioma en población portuguesa ($p>0,05$).

El polimorfismo -216G>T del gen *EGFR* se ha asociado a riesgo de metástasis de ciertos tipos de cáncer y la respuesta a inhibidores de tirosina quinasa (Ichihara y cols., 2007), pero hasta ahora no existe asociación con riesgo para algún tipo de cáncer, lo cual sugiere que a pesar de encontrarse en un sitio crítico para la regulación de la actividad del promotor del gen *EGFR*, su importancia radica en la variabilidad en las características biológicas del tumor.

6.3. Interacción entre los polimorfismos del gen *EGFR* y el estado funcional “on” del gen *OipA*.

El factor de virulencia *OipA* activa la vía de señalización EGFR-PI3K que media la producción de IL-8 y la cascada inflamatoria que participa en la biología tumoral. Los trabajos realizados a la fecha reportan que el *EGFR* se encuentra sobre expresado en cáncer gástrico. Los resultados presentados sugieren que el polimorfismo CA-SSR-I de *EGFR* no modifica el riesgo de cáncer gástrico que produce el estado funcional "on" del gen *OipA* de *H.pylori*. Sin embargo, se pudo proponer interacción entre el polimorfismo -216G>T y el estado funcional “on” del gen *OipA* de *H.pylori*, en casos con tumores de alto grado (OR: 6,23 [IC 95% 1,19-32,57]). Tanto el polimorfismo CA-SSR-I como el -216G>T se han relacionado con regulación de la expresión de *EGFR*. El primero se ubica en el intrón 1 del gen y se propone que aumenta o disminuye la expresión de *EGFR* actuando como un “enhancer” o

repressor, o bien interfiriendo en la elongación del RNA por la formación de estructuras secundarias (Gebhardt y cols., 1999). Solo un trabajo (Han y cols., 2010) analiza la expresión de este gen en tumores de carcinoma gástrico en relación al número de repeticiones del polimorfismo CA-SSR-I. Encontraron que la expresión tiende a disminuir a medida que aumenta el número de repeticiones (coeficiente de correlación=0,49, $p=0,01$). Sin embargo, como se observa en la Figura 6, no existe una correlación perfecta, así, tumores con 16 repeticiones CA tienen el mismo grado de expresión que otros con 20 repeticiones. Esto podría explicar que no se evidencie interacción entre el estado funcional “on” del gen *OipA* y el polimorfismo CA-SSR-I.

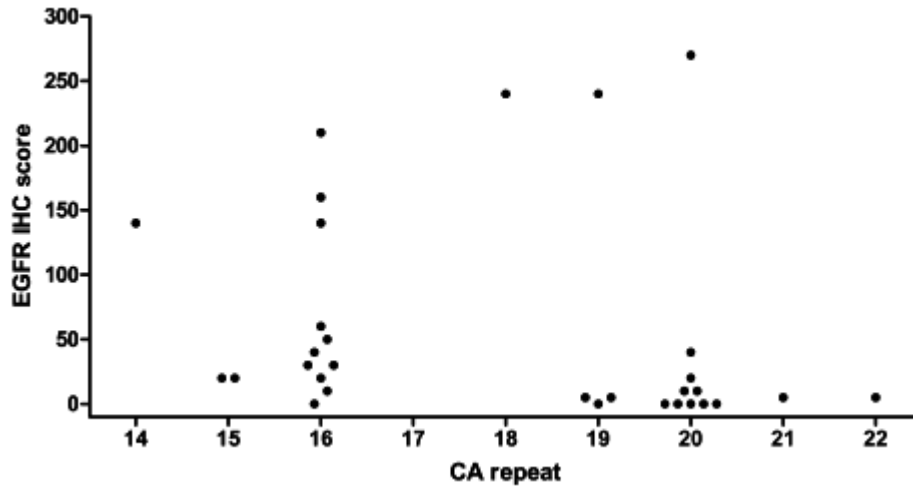
El polimorfismo -216G>T pertenece al promotor del gen, y se ubica en un sitio de unión al factor transcripcional Sp1 que es esencial para la transcripción de *EGFR* (Liu y cols., 2005). Los homocigotos TT y heterocigotos presentan una mayor expresión de *EGFR* en comparación con los homocigotos GG (Liu y cols., 2005, Nomura y cols., 2007). Maciorkowska y cols. (2009) observaron que la expresión de *EGFR* en mucosa gástrica de niños infectados con *H.pylori* es significativamente mayor que en controles no infectados ($p<0,001$). Respecto a los posibles mecanismos de este aumento de la expresión inducida por *H.pylori*, un estudio (Ashktorab y cols., 2007), muestra que *H.pylori* promueve la expresión de *EGFR* en una línea celular de carcinoma gástrico (AGS), y que un elemento del promotor de *EGFR* (sitio de unión al factor de transcripción AP-1, en la posición -900 respecto del gen *EGFR*) sería necesario para promover la expresión inducida por *H.pylori*. Considerando que *H.pylori* induce la expresión de *EGFR*, se puede proponer que una mayor expresión de este gen inducida por cepas en estado “on” del gen *OipA* se asocia con cáncer

gástrico.

Los resultados de esta tesis muestran que el polimorfismo R497K de *EGFR* modifica el riesgo de cáncer gástrico en los infectados con cepas en estado "on". Esta interacción se presenta principalmente en los tumores gástricos de alto grado (OR: 2,35 [IC 95% 1,18-4,70]). Como se mencionó anteriormente, la pérdida de función de E-cadherina está relacionada con tumores de tipo histológico difuso (que se caracterizan por ser de alto grado). E-cadherina es una molécula reguladora de la señalización intracelular, fundamental en el mantenimiento de la adhesión celular y la arquitectura epitelial.

La activación de *EGFR* resulta en la desregulación de E-cadherina mediante diferentes mecanismos. E-cadherina es un blanco de fosforilación por parte de *EGFR*, lo cual disminuye su función de mantener la estructura tisular (Roura y cols., 1999). La activación de *EGFR* también produce la internalización de E-cadherina por endocitosis (Le y cols., 1999). También se ha propuesto que *EGFR* disminuye la expresión de E-cadherina (Conacci-Sorrel y cols., 2002). Estos antecedentes permiten explicar que la interacción propuesta se presente para casos con tumores de alto grado.

Figura 6. Asociación entre la longitud de repeticiones CA y la expresión del gen *EGFR*.



Se analizó el polimorfismo CA-SSR-I y la expresión de *EGFR* mediante inmunohistoquímica, para ver cómo la longitud de los alelos afecta la expresión de *EGFR* en 31 pacientes con cáncer gástrico, que tenían al menos un alelo de 20 repeticiones CA. Los pacientes con alelos largos tendían a expresar niveles más bajos de *EGFR*. No se encontró correlación entre la longitud de repeticiones CA y el nivel de *EGFR* en suero (Spearman $p = 0,010$). Tomado de Han y cols., (2010).

7. CONCLUSIONES

- Los polimorfismos CA-SSR-I, R497K y -216G>T del gen *EGFR* no se asocian por sí solos con cáncer gástrico en pacientes chilenos.
- El estado funcional “on” del gen *OipA* se asocia a cáncer gástrico en pacientes chilenos.
- El polimorfismo CA-SSR-I del gen *EGFR* no interactúa con el estado funcional “on” del gen *OipA* de *H.pylori*.
- Los polimorfismos R497K y -216G>T del gen *EGFR* modifican la asociación con cáncer gástrico de las cepas en estado "on". Esta interacción se asocia con adenocarcinomas gástricos de alto grado.

8. Anexos



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CHILE

HOSPITAL CLINICO
UNIVERSIDAD DE CHILE



14 NOV. 2011

**CONSENTIMIENTO INFORMADO
PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE CÁNCER GÁSTRICO**

"Estudio de factores genéticos, determinantes de virulencia de *Helicobacter pylori* y su relación con cáncer gástrico"

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

Patricio González Hormazábal
Facultad de Medicina, Universidad de Chile
Fono: 9786845
e-mail: pgonzalez@med.uchile.cl

Antes de tomar la decisión de participar en la investigación, lea atentamente este formulario.

Mi médico tratante me ha informado que padezco cáncer gástrico. Me someteré a cirugía como parte del tratamiento de mi enfermedad, y se me ha invitado a participar del estudio "Factores genéticos, determinantes de virulencia de *Helicobacter pylori*, y su relación con cáncer gástrico".

El investigador principal del estudio me informó que está realizando un estudio de la relación entre factores genéticos y la infección con determinados tipos de bacteria *Helicobacter pylori*. Las conclusiones de este estudio serán de utilidad para comprender mejor las causas del cáncer gástrico y la posibilidad de identificar aquellas personas que tengan alto riesgo de desarrollar esta enfermedad con el fin de prevenir su aparición.

Se me ha informado que mi participación en calidad de paciente afectado de cáncer gástrico consiste en (a) responder una encuesta que recopila información de mis datos personales e historia familiar de cáncer, (b) donar 3 biopsias gástricas que se obtendrán desde la pieza quirúrgica que se me extirpará durante la cirugía, desde las cuales se obtendrá material genético (DNA) de la bacteria *Helicobacter pylori* y se analizará el efecto de los factores genéticos analizados, (c) donar 1 biopsia del tumor que se obtendrá desde la pieza quirúrgica que se me extirpará durante la cirugía, desde la cual se analizará el efecto de los factores genéticos analizados, y (d) donar una muestra de sangre tomada desde una vena de su antebrazo, desde la cual se obtendrá material genético (DNA) y suero.

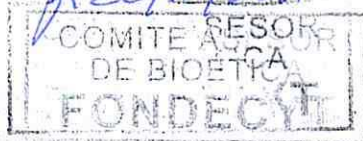
Se me informó que mi participación en este estudio no me representará gastos adicionales, ni a mi ni a mi sistema de salud, a lo ya cancelado por las prestaciones que se me han realizado por orden de mi médico tratante.

Se me ha informado que la toma de muestra de sangre que se me realizará podría producir molestas tales como dolor, hemorragia, o reacción alérgica por el antiséptico utilizado. Sin embargo, la muestra será tomada por una Enfermera Universitaria con experiencia en este tipo de procedimientos, quien tomará todas las precauciones para minimizar las posibilidades de que esto ocurra.

Se me ha informado que las biopsias gástricas se obtendrán desde la pieza quirúrgica que se me extirpará durante la cirugía, por lo cual la toma de biopsias está exenta de riesgos.

Se me ha informado que las muestras y toda mi información personal serán identificadas con un código numérico para su uso actual o futuro. Los resultados individuales serán anónimos, se mantendrán en reserva y sólo serán de uso y conocimiento del investigador.

Se me ha informado que mi participación en este estudio no me otorga ningún beneficio médico o compensación económica alguna. Sin embargo, se me comunicó que la donación voluntaria de muestras e información destinadas a realizar esta investigación, podrá ser beneficiosa para futuras generaciones.



14 NOV. 2011

Estoy en conocimiento que, en caso de decidir no participar en este estudio, tengo la libertad de manifestar mi decisión y ésta no cambiará en nada las prestaciones normales que pudiera requerir por parte del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Estoy en conocimiento que puedo retirarme del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones por ello, y que en ese caso, la información recogida y las muestras no serán utilizadas para la investigación.

14 NOV 2011

Se me ha informado que el Investigador Principal, la Universidad de Chile y el Hospital Clínico de la Universidad de Chile velarán por que se proteja la confidencialidad de mi identidad, registro médico y resultados de esta investigación.

Por último he leído este formulario y se me permitió realizar todas las preguntas que consideré pertinentes y de mi interés, las que fueron contestadas a mi entera satisfacción. Se me ha permitido consultar con mi médico de familia o pedir la opinión de otro profesional en relación a mi participación en este estudio. Entiendo que se me dará copia de este documento.

Consiento en participar de la investigación "Estudio de factores genéticos y su relación con cáncer gástrico".

Acepto que parte de las muestras se congelen y almacenen para estudios futuros que puedan surgir en relación al estudio de factores genéticos y su relación con cáncer gástrico. SI NO
Para utilizar las muestras e información en otros estudios con fines diferentes al presente estudio, el Investigador Responsable debe solicitar la firma de un nuevo consentimiento informado.

¿Desea conocer los resultados de la investigación?. SI NO

Nombre del participante: _____

R.U.T.: _____ Firma : _____

Nombre del investigador: _____

R.U.T.: _____ Firma : _____

Nombre del delegado del Director del Hospital (Ministro de Fé): _____

R.U.T.: _____ Firma : _____

Santiago, ____ de ____ de 20__

Cualquier duda o consulta que tenga sobre este estudio, o experimenta cualquier problema, siéntase libre de comunicarse con el Investigador.

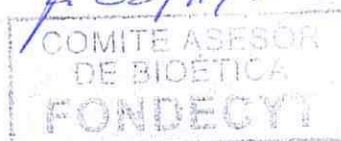
Frente a cualquier duda respecto a aspectos legales y éticos de este estudio, siéntase libre de comunicarse con:
Dr. Juan Jorge Silva. Presidente del Comité de Ética. Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

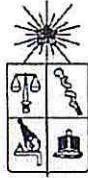
Av. Santos Dumont 999, Santiago. Fono 9789008.

Dr. Manuel Oyarzún. Presidente del Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos.

Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Av. Independencia 1027, Santiago. Fono 9786923.

Con copia a: - Participante - Investigador





UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CHILE

HOSPITAL CLINICO
UNIVERSIDAD DE CHILE



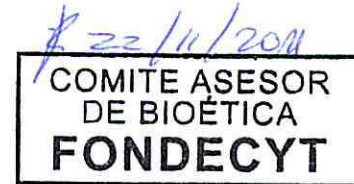
14 NOV. 2011

CONSENTIMIENTO INFORMADO
CONTROLES SANOS

"Estudio de factores genéticos, determinantes de virulencia de *Helicobacter pylori*
y su relación con cáncer gástrico"

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

Patricio González Hormazábal
Facultad de Medicina, Universidad de Chile
Fono: 9786845
e-mail: pgonzalez@med.uchile.cl



Antes de tomar la decisión de participar en la investigación, lea atentamente este formulario.

Me someteré a un procedimiento de endoscopia digestiva alta por orden de mi médico tratante, y se me ha invitado a participar en el estudio "Factores genéticos, determinantes de virulencia de *Helicobacter pylori*, y su relación con cáncer gástrico", en calidad de individuo control sano no afectado de cáncer gástrico, en la eventualidad que mi endoscopia digestiva alta resulte normal. El fin de mi participación será comparar mis resultados con los obtenidos a partir del grupo de pacientes con cáncer gástrico.

El investigador principal del estudio me informó que está realizando un estudio de la relación entre factores genéticos y la infección con determinados tipos de bacteria *Helicobacter pylori*. Las conclusiones de este estudio serán de utilidad para comprender mejor las causas del cáncer gástrico y la posibilidad de identificar aquellas personas que tengan alto riesgo de desarrollar esta enfermedad con el fin de prevenir su aparición.

Se me ha informado que mi participación en calidad de individuo control sano no afectado de cáncer gástrico consiste en: (a) responder una encuesta que recopila información de mis datos personales e historia familiar de cáncer, (b) donar tres muestras de biopsias gástricas endoscópicas, desde las cuales se analizará el efecto que tienen los factores genéticos en el estómago, y además se obtendrá material genético (DNA) de la bacteria *Helicobacter pylori*, y (c) donar una muestra de sangre tomada desde una vena de su antebrazo, desde la cual se obtendrá material genético (DNA) y suero.

Se me informó que mi participación en este estudio no me representará gastos adicionales, ni a mi ni a mi sistema de salud, a lo ya cancelado por las prestaciones que se me han realizado por orden de mi médico tratante.

Se me ha informado que las biopsias gástricas se obtendrán durante la misma endoscopia digestiva alta. El procedimiento tiene un pequeño riesgo de sangrado en el sitio de la biopsia (menor a 1 caso por cada 1.000 sujetos). La muestra será tomada por un Médico Cirujano especialista en Gastroenterología y con experiencia en endoscopia digestiva alta.

Se me ha informado que la toma de muestra de sangre que se me realizará podría producir molestas tales como dolor, hemorragia, o reacción alérgica por el antiséptico utilizado. Sin embargo, la muestra será tomada por una Enfermera Universitaria con experiencia en este tipo de procedimientos, quien tomará todas las precauciones para minimizar las posibilidades que esto ocurra.

Se me ha informado que las muestras y toda mi información personal serán identificadas con un código numérico para su uso actual o futuro. Los resultados individuales serán anónimos, se mantendrán en reserva y sólo serán de uso y conocimiento del investigador.



09 NOV. 2011

Se me ha informado que mi participación en este estudio no me otorga ningún beneficio médico o compensación económica alguna. Sin embargo, se me comunicó que la donación voluntaria de muestras e información destinadas a realizar esta investigación, podrá ser beneficiosa para futuras generaciones.

Estoy en conocimiento que, en caso de decidir no participar en este estudio, tengo la libertad de manifestar mi decisión y ésta no cambiará en nada las prestaciones normales que pudiera requerir por parte del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Estoy en conocimiento que puedo retirarme del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones por ello, y que en ese caso, la información recogida y las muestras no serán utilizadas para la investigación.

Se me ha informado que el investigador principal, la Universidad de Chile y el Hospital Clínico de la Universidad de Chile velarán por que se proteja la confidencialidad de mi identidad, registro médico y resultados de esta investigación.

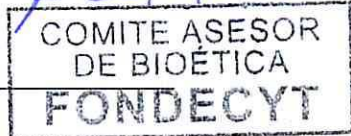
Por último he leído este formulario y se me permitió realizar todas las preguntas que consideré pertinentes y de mi interés, las que fueron contestadas a mi entera satisfacción. Se me ha permitido consultar con mi médico de familia o pedir la opinión de otro profesional en relación a mi participación en este estudio. Entiendo que se me dará copia de este documento.

Consiento en participar de la investigación "Estudio de factores genéticos, determinantes de virulencia de *Helicobacter pylori* y su relación con cáncer gástrico".

Acepto que parte de las muestras se congelen y almacenen para estudios futuros que puedan surgir en relación al estudio de factores genéticos, determinantes de virulencia de *Helicobacter pylori* y su relación con cáncer gástrico. SI NO

Para utilizar las muestras e información en otros estudios con fines diferentes al presente estudio, el Investigador Responsable debe solicitar la firma de un nuevo consentimiento informado.

¿Desea conocer los resultados de la investigación? SI NO



Nombre del participante: _____

R.U.T.: _____ Firma : _____

Nombre del investigador: _____

R.U.T.: _____ Firma : _____

Nombre del delegado del Director del Hospital (Ministro de Fé): _____

R.U.T.: _____ Firma : _____

Santiago, ____ de ____ de 20__

Cualquier duda o consulta que tenga sobre este estudio, o experimenta cualquier problema, siéntase libre de comunicarse con el Investigador.

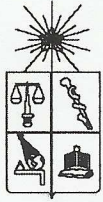
Frente a cualquier duda respecto a aspectos legales y éticos de este estudio, siéntase libre de comunicarse con:
Dr. Juan Jorge Silva. Presidente del Comité de Ética. Hospital Clínico de la Universidad de Chile.
Av. Santos Dumont 999, Santiago. Fono 9789008.

Dr. Manuel Oyarzún. Presidente del Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos.
Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Av. Independencia 1027, Santiago. Fono 9786923.

Con copia a: - Participante - Investigador



09 NOV. 2011



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CHILE



**CONSENTIMIENTO INFORMADO
PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE CÁNCER GÁSTRICO**

"Estudio de factores genéticos, determinantes de virulencia de *Helicobacter pylori* y su relación con cáncer gástrico"

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

Dr. Patricio González Hormazábal
Facultad de Medicina, Universidad de Chile
Fono: 9786845
e-mail: pgonzalez@med.uchile.cl

Antes de tomar la decisión de participar en la investigación, lea atentamente este formulario.

Mi médico tratante me ha informado que padezco cáncer gástrico. Me someteré a cirugía como parte del tratamiento de mi enfermedad, y se me ha invitado a participar del estudio "Factores genéticos, determinantes de virulencia de *Helicobacter pylori*, y su relación con cáncer gástrico".

El investigador principal del estudio me informó que está realizando un estudio de la relación entre factores genéticos y la infección con determinados tipos de la bacteria *Helicobacter pylori*. Las conclusiones de este estudio serán de utilidad para comprender mejor las causas del cáncer gástrico y la posibilidad de identificar aquellas personas que tengan alto riesgo de desarrollar esta enfermedad con el fin de prevenir su aparición.

Se me ha informado que mi participación en calidad de paciente afectado de cáncer gástrico consiste en (a) responder una encuesta que recopila información de mis datos personales e historia familiar de cáncer, (b) donar 3 biopsias gástricas que se obtendrán desde la pieza quirúrgica que se me extirpará durante la cirugía, desde las cuales se obtendrá material genético (DNA) de la bacteria *Helicobacter pylori* y se analizará el efecto de los factores genéticos analizados, (c) donar 1 biopsia del tumor que se obtendrá desde la pieza quirúrgica que se me extirpará durante la cirugía, desde la cual se analizará el efecto de los factores genéticos analizados, y (d) donar una muestra de sangre tomada desde una vena de su antebrazo, desde la cual se obtendrá material genético (DNA) y suero.

Se me informó que mi participación en este estudio no me representará gastos adicionales, ni a mi ni a mi sistema de salud, a lo ya cancelado por las prestaciones que se me han realizado por orden de mi médico tratante.

Se me ha informado que la toma de muestra de sangre que se me realizará podría producir molestas tales como dolor, hemorragia, o reacción alérgica por el antiséptico utilizado. Sin embargo, la muestra será tomada por una Enfermera Universitaria con experiencia en este tipo de procedimientos, quien tomará todas las precauciones para minimizar las posibilidades que esto ocurra.

Se me ha informado que las biopsias gástricas se obtendrán desde la pieza quirúrgica que se me extirpará durante la cirugía, por lo cual la toma de biopsias está exenta de riesgos.

Se me ha informado que las muestras y toda mi información personal serán identificadas con un código numérico para su uso actual o futuro. Los resultados individuales serán anónimos, se mantendrán en reserva y sólo serán de uso y conocimiento del investigador.

Se me ha informado que mi participación en este estudio no me otorga ningún beneficio médico o compensación económica alguna. Sin embargo, se me comunicó que la donación voluntaria de muestras e información destinadas a realizar esta investigación, podrá ser beneficiosa para futuras generaciones.

Estoy en conocimiento que, en caso de decidir no participar en este estudio, tengo la libertad de manifestar mi decisión y ésta no cambiará en nada las prestaciones normales que pudiera requerir por parte del Hospital del Salvador. Estoy en conocimiento que puedo retirarme del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones por ello, y que en ese caso, la información recogida y las muestras no serán utilizadas para la investigación.

Se me ha informado que el Investigador Principal, la Universidad de Chile y el Hospital del Salvador velarán por que se proteja la confidencialidad de mi identidad, registro médico y resultados de esta investigación.

Por último he leído este formulario y se me permitió realizar todas las preguntas que consideré pertinentes y de mi interés, las que fueron contestadas a mi entera satisfacción. Se me ha permitido consultar con mi médico de familia o pedir la opinión de otro profesional en relación a mi participación en este estudio. Entiendo que se me dará copia de este documento.

Consiento en participar de la investigación "Estudio de factores genéticos y su relación con cáncer gástrico".

Acepto que parte de las muestras se congelen y almacenen para estudios futuros que puedan surgir en relación al estudio de factores genéticos y su relación con cáncer gástrico. SI ___ NO ___

En caso que su respuesta sea afirmativa, el Investigador Responsable almacenará parte de las muestras bajo su custodia, por un período no superior a 5 años, en el Laboratorio en donde se realizan los análisis para esta investigación. Para utilizar las muestras e información en otros estudios con fines diferentes al presente estudio, el Investigador Responsable debe solicitar la firma de un nuevo consentimiento informado.

¿Desea conocer los resultados de la investigación?. SI ___ NO ___

Nombre del participante: _____

R.U.T.: _____

Firma : _____

Nombre del investigador: _____

R.U.T.: _____

Firma : _____

Nombre del delegado del
Director del Hospital (Ministro de Fé): _____

R.U.T.: _____

Firma : _____

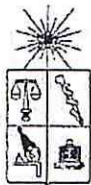
Santiago, ____ de _____ de 20__

Cualquier duda o consulta que tenga sobre este estudio, o experimenta cualquier problema, siéntase libre de comunicarse con el Investigador.

Frente a cualquier duda respecto a aspectos legales y éticos de este estudio, siéntase libre de comunicarse con:
Dr. Andrés Stuardo. Presidente del Comité Ético Científico. Servicio de Salud Metropolitano Oriente. Av. Salvador 364, Santiago. Fono 5753735
Dr. Manuel Oyarzún. Presidente del Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos. Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Av. Independencia 1027, Santiago. Fono 9786923.

Con copia a: - Participante - Investigador





UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CHILE



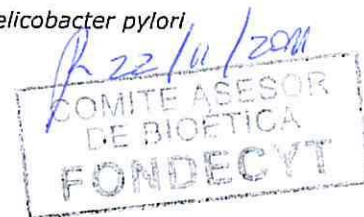
14 NOV 2011

**CONSENTIMIENTO INFORMADO
PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE CÁNCER GÁSTRICO**

"Estudio de factores genéticos, determinantes de virulencia de *Helicobacter pylori* y su relación con cáncer gástrico"

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

Dr. Patricio González Hormazábal
Facultad de Medicina, Universidad de Chile
Fono: 9786845
e-mail: pgonzalez@med.uchile.cl



Antes de tomar la decisión de participar en la investigación, lea atentamente este formulario.

Mi médico tratante me ha informado que padezco cáncer gástrico. Me someteré a cirugía como parte del tratamiento de mi enfermedad, y se me ha invitado a participar del estudio "Factores genéticos, determinantes de virulencia de *Helicobacter pylori*, y su relación con cáncer gástrico".

El investigador principal del estudio me informó que está realizando un estudio de la relación entre factores genéticos y la infección con determinados tipos de la bacteria *Helicobacter pylori*. Las conclusiones de este estudio serán de utilidad para comprender mejor las causas del cáncer gástrico y la posibilidad de identificar aquellas personas que tengan alto riesgo de desarrollar esta enfermedad con el fin de prevenir su aparición.

Se me ha informado que mi participación en calidad de paciente afectado de cáncer gástrico consiste en (a) responder una encuesta que recopila información de mis datos personales e historia familiar de cáncer, (b) donar 3 biopsias gástricas que se obtendrán desde la pieza quirúrgica que se me extirpará durante la cirugía, desde las cuales se obtendrá material genético (DNA) de la bacteria *Helicobacter pylori* y se analizará el efecto de los factores genéticos analizados; (c) donar 1 biopsia del tumor que se obtendrá desde la pieza quirúrgica que se me extirpará durante la cirugía, desde la cual se analizará el efecto de los factores genéticos analizados, y (d) donar una muestra de sangre tomada desde una vena de su antebrazo, desde la cual se obtendrá material genético (DNA) y suero.

Se me informó que mi participación en este estudio no me representará gastos adicionales, ni a mi ni a mi sistema de salud, a lo ya cancelado por las prestaciones que se me han realizado por orden de mi médico tratante.

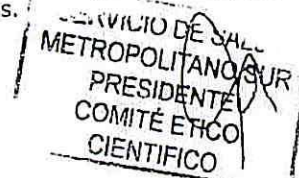
Se me ha informado que la toma de muestra de sangre que se me realizará podría producir molestas tales como dolor, hemorragia, o reacción alérgica por el antiséptico utilizado. Sin embargo, la muestra será tomada por una Enfermera Universitaria con experiencia en este tipo de procedimientos, quien tomará todas las precauciones para minimizar las posibilidades que esto ocurra.

Se me ha informado que las biopsias gástricas se obtendrán desde la pieza quirúrgica que se me extirpará durante la cirugía, por lo cual la toma de biopsias está exenta de riesgos.

Se me ha informado que las muestras y toda mi información personal serán identificadas con un código numérico para su uso actual o futuro. Los resultados individuales serán anónimos, se mantendrán en reserva y sólo serán de uso y conocimiento del investigador.

Se me ha informado que mi participación en este estudio no me otorga ningún beneficio médico o compensación económica alguna. Sin embargo, se me comunicó que la donación voluntaria de muestras e información destinadas a realizar esta investigación, podrá ser beneficiosa para futuras generaciones.

25 OCT 2011



**FONDECYT
COMITE ASESOR
DE BIOETICA**

14 NOV 2011



Estoy en conocimiento que, en caso de decidir no participar en este estudio, tengo la libertad de manifestar mi decisión y ésta no cambiará en nada las prestaciones normales que pudiera requerir por parte del Complejo Asistencial Barros Luco-Truedau. Estoy en conocimiento que puedo retirarme del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones por ello, y que en ese caso, la información recogida y las muestras no serán utilizadas para la investigación.

Se me ha informado que el Investigador Principal, la Universidad de Chile y el Complejo Asistencial Barros Luco-Trudeau velarán por que se proteja la confidencialidad de mi identidad, registro médico y resultados de esta investigación.

Por último he leído este formulario y se me permitió realizar todas las preguntas que consideré pertinentes y de mi interés, las que fueron contestadas a mi entera satisfacción. Se me ha permitido consultar con mi médico de familia o pedir la opinión de otro profesional en relación a mi participación en este estudio. Entiendo que se me dará copia de este documento.

Consiento en participar de la investigación "Estudio de factores genéticos y su relación con cáncer gástrico".

Acepto que parte de las muestras se congelen y almacenen para estudios futuros que puedan surgir en relación al estudio de factores genéticos y su relación con cáncer gástrico. SI ___ NO ___

En caso que su respuesta sea afirmativa, el Investigador Responsable almacenará parte de las muestras bajo su custodia, por un período no superior a 5 años, en el Laboratorio en donde se realizan los análisis para esta investigación. Para utilizar las muestras e información en otros estudios con fines diferentes al presente estudio, el Investigador Responsable debe solicitar la firma de un nuevo consentimiento informado.

¿Desea conocer los resultados de la Investigación? SI ___ NO ___

Nombre del participante: _____

R.U.T.: _____

Firma : _____

Nombre del investigador: _____

R.U.T.: _____

Firma : _____

Nombre del delegado del Director del Hospital (Ministro de Fé): _____

R.U.T.: _____

Firma : _____

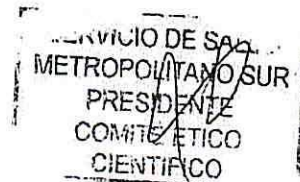
Santiago, ____ de ____ de 20__

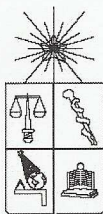
Cualquier duda o consulta que tenga sobre este estudio, o experimenta cualquier problema, siéntase libre de comunicarse con el Investigador.

Frente a cualquier duda respecto a aspectos legales y éticos de este estudio, siéntase libre de comunicarse con:
QF. Verónica Rivera. Presidente del Comité de Evaluación Ético Científico. Servicio de Salud Metropolitano Sur. Av. Santa Rosa 3453, Santiago. Fono 5763733 - 5763850.
Dr. Manuel Oyarzún. Presidente del Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos. Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Av. Independencia 1027, Santiago. Fono 9786923.

Con copia a: - Participante - Investigador

25 OCT 2011





UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CHILE



Hospital San Juan de Dios - CDT
"El Primero de Chile"

CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE CÁNCER GÁSTRICO

"Estudio de factores genéticos, determinantes de virulencia de *Helicobacter pylori*
y su relación con cáncer gástrico"

INVESTIGADOR PRINCIPAL:

Dr. Patricio González Hormazábal
Facultad de Medicina, Universidad de Chile
Fono: 9786845
e-mail: pgonzalez@med.uchile.cl

La condición clínica o enfermedad que usted tiene es condición necesaria para la realización de este estudio y es de nuestro interés que usted participe en ella. Por este motivo es que le estamos solicitando que se incorpore a esta investigación clínica. Antes de tomar la decisión de participar en la investigación, lea atentamente este formulario.

Mi médico tratante me ha informado que padezco cáncer gástrico. Me someteré a cirugía como parte del tratamiento de mi enfermedad, y se me ha invitado a participar del estudio "Factores genéticos, determinantes de virulencia de *Helicobacter pylori*, y su relación con cáncer gástrico".

El investigador principal del estudio me informó que está realizando un estudio de la relación entre factores genéticos y la infección con determinados tipos de la bacteria *Helicobacter pylori*. Las conclusiones de este estudio serán de utilidad para comprender mejor las causas del cáncer gástrico y la posibilidad de identificar aquellas personas que tengan alto riesgo de desarrollar esta enfermedad con el fin de prevenir su aparición.

Se me ha informado que mi participación en calidad de paciente afectado de cáncer gástrico consiste en (a) responder una encuesta que recopila información de mis datos personales e historia familiar de cáncer, (b) donar 3 biopsias gástricas que se obtendrán desde la pieza quirúrgica que se me extirpará durante la cirugía, desde las cuales se obtendrá material genético (DNA) de la bacteria *Helicobacter pylori* y se analizará el efecto de los factores genéticos analizados, (c) donar 1 biopsia del tumor que se obtendrá desde la pieza quirúrgica que se me extirpará durante la cirugía, desde la cual se analizará el efecto de los factores genéticos analizados, y (d) donar una muestra de sangre tomada desde una vena de su antebrazo, desde la cual se obtendrá material genético (DNA) y suero.

Se me informó que mi participación en este estudio no me representará gastos adicionales, ni a mi ni a mi sistema de salud, a lo ya cancelado por las prestaciones que se me han realizado por orden de mi médico tratante.

Se me ha informado que la toma de muestra de sangre que se me realizará podría producir molestas tales como dolor, hemorragia, o reacción alérgica por el antiséptico utilizado. La muestra será tomada por una Enfermera Universitaria.

Se me ha informado que las biopsias gástricas se obtendrán desde la pieza quirúrgica que se me extirpará durante la cirugía, por lo cual la toma de biopsias está exenta de riesgos.

19 ABR. 2012



Se me ha informado que las muestras y toda mi información personal serán identificadas con un código numérico para su uso actual o futuro. Los resultados individuales serán anónimos, se mantendrán en reserva y sólo serán de uso y conocimiento del investigador.

Se me ha informado que mi participación en este estudio no me otorga ningún beneficio médico o compensación económica alguna. Sin embargo, se me comunicó que la donación voluntaria de muestras e información destinadas a realizar esta investigación, podrá ser beneficiosa para futuras generaciones.

Estoy en conocimiento que, en caso de decidir no participar en este estudio, tengo la libertad de manifestar mi decisión y ésta no cambiará en nada las prestaciones normales que pudiera requerir por parte del Hospital San Juan de Dios. Estoy en conocimiento que puedo retirarme del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones por ello, y que en ese caso, la información recogida y las muestras no serán utilizadas para la investigación.

Se me ha informado que el Investigador Principal, la Universidad de Chile y el Hospital San Juan de Dios velarán por que se proteja la confidencialidad de mi identidad, registro médico y resultados de esta investigación.

Por último he leído este formulario y se me permitió realizar todas las preguntas que consideré pertinentes y de mi interés, las que fueron contestadas a mi entera satisfacción. Se me ha permitido consultar con mi médico de familia o pedir la opinión de otro profesional en relación a mi participación en este estudio. Entiendo que se me dará copia de este documento.

Acepto que parte de las muestras se congelen y almacenen para estudios futuros que puedan surgir en relación al estudio de factores genéticos y su relación con cáncer gástrico. SI NO

En caso que su respuesta sea afirmativa, el Investigador Responsable almacenará parte de las muestras bajo su custodia, por un período no superior a 5 años, en el Laboratorio en donde se realizan los análisis para esta investigación. Para utilizar las muestras e información en otros estudios con fines diferentes al presente estudio, el Investigador Responsable debe solicitar la firma de un nuevo consentimiento informado.

¿Desea conocer los resultados de la investigación?. SI NO

Consiento en participar de la investigación "Estudio de factores genéticos y su relación con cáncer gástrico". SI NO

Nombre del participante: _____

R.U.T.: _____ Firma : _____

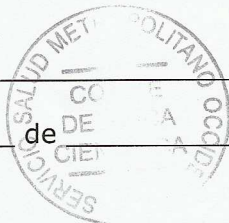
Nombre del investigador: _____

R.U.T.: _____ Firma : _____

Nombre del delegado del Director del Hospital (Ministro de Fé): _____

R.U.T.: _____ Firma : _____

Santiago, _____ de _____ de 20_____



19 ABR. 2012

Cualquier duda o consulta que tenga sobre este estudio, o experimenta cualquier problema, siéntase libre de comunicarse con el Investigador.

Frente a cualquier duda respecto a aspectos legales y éticos de este estudio, siéntase libre de comunicarse con:

Dr. Ítalo Bellifémine. Presidente del Comité Ético de la Investigación Científica. Servicio de Salud Metropolitano Occidente. Alameda 2429, Santiago. Fono 5741010

Dr. Manuel Oyarzún. Presidente del Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos. Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Av. Independencia 1027, Santiago. Fono 9786923.

IMPORTANTE:

INFORMACIÓN PARA LAS PERSONAS SUJETOS DE INVESTIGACION CLÍNICA

Comité Ético de la Investigación Científica Occidente (CEIC Occ.), es un equipo de personas especializadas en Bioética, reconocidas y autorizadas por la Autoridad de Salud, cuya labor y objetivo es proteger los **derechos** de todo individuo que participe como sujeto de investigación en estudios científicos que se realicen en seres humanos, en establecimientos del Servicio de Salud Metropolitano Occidente.

Esta función se cumple como el atento y permanente resguardo que efectúa el CEC Occ., de la observación y respeto de los Derechos y Libertades esenciales que emanan de la naturaleza humana, reconocidos como tales, tanto por la Constitución Política de la República como por los tratados internacionales ratificados por Chile y que se encuentren vigentes, a que está obligado todo investigador clínico.

El CEIC Occ., está al servicio de todos quienes han sido o podrían ser elegidos como sujetos de alguna investigación clínica, pudiendo éstos libremente y en cualquier momento consultarlo para aclarar cualquier duda relacionada con el estudio, o tratamiento al que será sometido o en el cual ya está participando.

Con copia a: - Participante - Investigador

19 ABR. 2012



9. BIBLIOGRAFÍA:

- AbdRaboh, N.R.; Shehata, H.H.; Ahmed, M.B.; Bayoumi, F.A. "HER1 R497K and HER2 I655V polymorphisms are linked to development of breast cancer". *Dis. Markers*. 34(6): 407-417, 2013.
- Adachi, Y.; Oshiro, T.; Mori, M.; Maehara, Y.; Sugimachi, K. "Tumor size as a simple prognostic indicator for gastric carcinoma". *Annals of Surgical Oncology*. 4: 137-140, 1997.
- Akanuma, M.; Maeda, S.; Ogura, K.; Mitsuno, Y.; Hirata, Y.; Ikenoue, T.; Otsuka, M.; Watanabe, T.; Yamaji, Y.; Yoshida, H.; Kawabe, T.; Shiratori, Y. and Omata, M. "The evaluation of putative virulence factors of *Helicobacter pylori* for gastroduodenal disease by use of a short-term Mongolian gerbil infection model". *Journal Infectious Diseases*. 185: 341-7, 2002.
- Amador, M.L.; Oppenheimer, D.; Perea, S.; Maitra, A.; Cusati, G.; Iacobuzio-Donahue, C.; Baker, S.D.; Ashfaq, R.; Takimoto, C.; Forastiere, A. and Hidalgo, M. "An Epidermal Growth Factor Receptor Intron 1 Polymorphism Mediates Response to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors" *Cancer Res*. 64: 9139-9143, 2004.
- Ando, T.; Peek, R.; Pride, D.; Levine, S.M.; Takata, T.; Lee, Y.C.; Kusugami, K.; Van der Ende, A.; Kuipers, E.J.; Kusters, J.G. and Blaser, M.J. "Polymorphisms

of *Helicobacter pylori* HP0638 reflect geographic origin and correlate with *cagA* status". *Journal of Clinical Microbiology*. 239-246, 2002.

- Ashktorab, H.; Darempouran, M.; Wilson, M.; Siddiqi, S.; Lee, E.L.; Rakhshani, N.; Malekzadeh, R.; Johnson, A.C.; Hewitt, S.M. and Smoot, D.T. "Transactivation of the EGFR by AP-1 is induced by *Helicobacter pylori* in gastric cancer". *Am J Gastroenterol*. 102(10): 2135-2146, 2007.
- Atherton, J.C. "The Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-Induced Gastroduodenal diseases". *Annu. Rev. Pathol*. 1: 63-96, 2006.
- Atmaca, A.; Werner, D.; Pauligk, C.; Steinmetz, K.; Wirtz, R.; Altmannsberger, H.M.; Jäger, E. and Al-Batran, S.E. "The prognostic impact of epidermal growth factor receptor in patients with metastatic gastric cancer". *BMC Cancer*. 12:524, 2012.
- Backert, S.; Mimuro, H.; Israel, D. and Peek, R. "Virulence factors of *Helicobacter pylori*". En Philip Sutton. (Ed), *Helicobacter pylori in the 21st Century*. CABI. 5: 212-237, 2010.
- Beswick, E. and Reyes, V. "Macrophage Migration Inhibitory Factor and Interleukin-8 Produced by Gastric Epithelial Cells during *Helicobacter pylori* Exposure Induce Expression and Activation of the Epidermal Growth Factor Receptor". *Infection and Immunity*. 76: 3233-3240, 2008.

- Brandt, B.; Hermann, S.; Straif, K.; Tidow, N.; Buerger, H. and Chang-Claude, J. "Modification of breast cancer risk in young women by a polymorphic sequence in the EGFR gene". *Cancer Res.* 64: 7-12, 2004.
- Brandt, B.; Meyer-Staeckling, S.; Schmidt, H.; Agelopoulos, K. and Buerger, H. "Mechanisms of EGFR gene transcription modulation: relationship to cancer risk and therapy response". *Clin. Cancer Res.* 12: 7252-7260, 2006.
- Buerger, H.; Gebhardt, F.; Schmidt, H.; Beckmann, A.; Kirsten Hutmacher, K.; Simon, R.; Lelle, R.; Boecker, W. and Brandt, B. "Length and loss of heterozygosity of an intron 1 polymorphic sequence of EGFR is related to cytogenetic alterations and epithelial growth factor receptor expression". *Cancer Res.* 60: 854-857, 2000.
- Buisine, M.P.; Wacrenier, A.; Mariette, C.; Leteurtre, E.; Escande, F.; Aissi, S.; Ketele, A.; Leclercq, A.; Porchet, N. and Lesuffleur T. "Frequent mutations of the CA simple sequence repeat in intron 1 of EGFR in mismatch repair-deficient colorectal cancers". *World J. Gastroenterol.* 14: 1053-1059, 2008.
- Carpenter, G. and Cohen, S. "Epidermal growth factor". *J. Biol. Chem.* 15: 7709-7712, 1990.
- Chiarini, A.; Calà, C.; Bonura, C.; Gullo, A.; Giuliana, G.; Peralta, S.; D'Arpa, F. and Giammanco, A. "Prevalence of virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori* and correlation with severity of gastric pathology in patients from western Sicily, Italy". *J. Clin. Microbiol. Infect.* 28: 437-446, 2009.

- Chomczynski, P. and Sacchi, N. "The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on". *Nat Protoc.* 1: 581-585, 2006.
- Conacci-Sorrell, M.; Zhurinsky, J. and Ben-Ze'ev, A. "The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer". *J Clin Invest.* 109(8): 987-991, 2002.
- Correa, P. "Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention". *Cancer Res.* 52: 6735-6740, 1992.
- Correa, P.; Piazuelo, M.B. and Camargo, M. "The future of gastric prevention". *Gastric Cancer.* 7: 9-16, 2004.
- Correa, P. and Piazuelo, M.B. "Evolutionary history of the *Helicobacter pylori* genome: implications for gastric carcinogenesis". *Gut.* 6: 21-28, 2012.
- Costa, B.M.; Viana-Pereira, M.; Fernandes, R.; Costa, S.; Linhares, P.; Vaz, R.; Pinheiro, C.; Lima, J.; Soares, P.; Silva, A.; Pardal, F.; Amorim, J.; Nabiço, R.; Almeida, R.; Alegria, C.; Pires, M.M.; Pinheiro, C.; Carvalho, E.; Oliveira, P.; Lopes, J.M. and Reis, R.M. "Impact of EGFR genetic variants on glioma risk and patient outcome". *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 20: 2610-2617, 2011.

- Departamento de Estadísticas e Información de salud. Ministerio de salud. Gobierno de Chile. <http://www.deis.cl>, 2010.
- Dossumbekova, A.; Prinz, C.; Mages, J.; Lang, R.; Kusters, J.G.; Van Vliet A.H.; Reindl, W.; Backert, S.; Saur, D.; Schmid, R.M. and Rad, R. "Helicobacter pylori hopH (OipA) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomic analysis of hopH gene polymorphisms". J. Infect. Diseases. 194: 1346-55, 2006.
- Edge, S.B.; Byrd, D.R.; and Compton, C.C. "AJCC Cancer Staging Manual". 7th ed. New York: Springer-Verlag. 103-115, 2009.
- Ferreccio, C.; Rollán, A.; Harris, P.; Serrano, C.; Gederlini, A.; Margozzini, P.; Gonzalez, C.; Aguilera, X.; Venegas, A. and Jara, A. "Gastric cancer is related to early Helicobacter pylori infection in a high-prevalence country". Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 16: 662-7, 2007.
- Franco, A.; Johnston, E.; Krishna, U.; Yamaoka, Y.; Israel, D.; Nagy, T.; Wroblewski, L.; Piazuelo, M.B.; Correa, P. and Peek, R.M. "Regulation of Gastric Carcinogenesis by Helicobacter pylori Virulence Factors". Cancer Res. 68(2): 379-387, 2008.
- Gebhardt, F.; Burger, H. and Brandt, B. "Modulation of EGFR gene transcription by secondary structures, a polymorphic repetitive sequence and mutations: a link between genetics and epigenetics". Histol. Histopathol. 15: 929-936, 1999.

- Glover, K. Y.; Perez-Soler, R. and Papadimitradopoulou, V. "A review of small-molecule epidermal growth factor receptor-specific tyrosine kinase inhibitors in development for non-small cell lung cancer". *Semin. Oncol.* 31: 83-92, 2004.
- Grandis, J. and Sok, J. "Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy". *Pharmacol. Ther.* 102: 37-46, 2004.
- Gschwind, A.; Fischer, O.M. and Ullrich, A. "The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy". *Nature Reviews Cancer.* 4, 361-370, 2004.
- Guo, H.; Xing, Y.; Liu, R.; Chen, S.; Bian, X.; Wang, F.; Yang, C. and Wang, X. "-216G/T (rs712829), a functional variant of the EGFR promoter, is associated with the pleural metastasis of lung adenocarcinoma". *Oncol. Lett.* 6(3): 693-698, 2013.
- Hahn, L.W.; Ritchie, M.D. and Moore, J.H. "Multifactor dimensionality reduction software for detecting gene-gene and gene-environment interactions". *Bioinformatics.* 19(3): 376-382, 2003.
- Han, S.W.; Jeon, Y.K.; Lee, K.H.; Keam, B.; Hwang, P.G.; Oh, D.Y.; Lee, S.H.; Kim, D.W.; Im, S.A.; Chung, D.H.; Heo, D.S.; Bang, Y.J. and Kim, T.Y. "Intron 1 CA dinucleotide repeat polymorphism and mutations of epidermal growth factor receptor and gefitinib responsiveness in non-small cell lung cancer". *Pharmacogenet. Genomics.* 17: 313-319, 2007.

- Han, S.W.; Oh, D.Y.; Im, S.A.; Park, S.R.; Lee, K.W.; Song, H.S.; Lee, N.S.; Lee, K.H.; Choi, I.S.; Lee, M.H.; Kim, M.A.; Kim W.H.; Bang, Y.J. and Kim, T.Y. “Epidermal growth factor receptor intron 1 CA dinucleotide repeat polymorphism and survival of advanced gastric cancer patients treated with cetuximab plus modified FOLFOX6”. *Cancer Science*. 101: 793-799, 2010.
- Han, W. and Lo, H. “Landscape of EGFR signaling network in human cancers: biology and therapeutic response in relation to receptor subcellular locations. Mini-review”. *Cancer Letters*. 318: 124-134, 2012.
- Hu, B.; El-Hajj, N.; Sittler, S.; Lammert, N.; Barnes, R. and Meloni-Ehrig, A. “Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology”. *J. Gastrointest. Oncol.* 3(3): 251-261, 2012.
- Huang, C.L.; Yang, C.H.; Yeh, K.H.; Hu, F.C.; Chen, K.Y.; Shih, J.Y.; Lin, Z.Z.; Yu, C.J.; Cheng, A.L. and Yang, P.C. “EGFR intron 1 dinucleotide repeat polymorphism is associated with the occurrence of skin rash with gefitinib treatment”. *Lung Cancer*. 64(3): 346-51, 2009.
- IARC, International Agency for Research on Cancer. “GLOBOCAN”. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/stomach.asp>, 2012.
- IARC, International Agency for Research on Cancer. <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb2/bb2-chap3.pdf>, 2013.

- Ichihara, S.; Toyooka, S.; Fujiwara, Y.; Hotta, K.; Shigematsu, H.; Tokumo, M.; Soh, J.; Asano, H.; Ichimura, K.; Aoe, K.; Aoe, M.; Kiura, K.; Shimizu, K.; Date, H. and Shimizu, N. "The impact of epidermal growth factor receptor gene status on gefitinib-treated Japanese patients with non-small cell lung cancer". *Int. J. Cancer*. 120(6): 1239-1247, 2007.
- Israel, D. and Peek, R. "Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation [review article]". *Aliment. Pharmacol. Ther.* 15: 1271-1290, 2001.
- Jonjic, N.; Kovac, K.; Krasevic, M.; Valković, T.; Ernjak, N.; Sasso, F. and Melato, M. "Epidermal growth factor-receptor expression correlates with tumor cell proliferation and prognosis in gastric cancer". *Anticancer Res.* 17: 3883-3888, 1997.
- Jung, M.; Chul, C.B.; Chul, H.L.; Soon, H.P.; Ae, Y.K.; Kyu, S. K.; Chang, J.; Jun, D. K.; Young, S.R.; Hang, J.K. and Hyun, J. L. "EGFR Polymorphism as a predictor of clinical outcome in advanced lung cancer patients treated with EGFR-TKI". *Yonsei Med. J.* 53 (6): 1128-1135, 2012.
- Keates, S.; Keates, A.; Katchar, K.; Peek, R. and Kelly C. "*Helicobacter pylori* induces up-regulation of the epidermal growth factor receptor in AGS gastric epithelial cells". *The journal of Infectious Diseases.* 196: 95-103, 2007.
- Kersting, C.; Agelopoulos, K.; Schmidt, H.; Korsching, E.; August, C.; Gosheger, G.; Dirksen, U.; Juergens, H.; Winkelmann, W.; Brandt, B.; Bielack, S.; Buerger, H. and Gebert, C. "Biological importance of a polymorphic

CA sequence within intron 1 of the epidermal growth factor receptor gene (EGFR) in high grade central osteosarcomas". *Genes Chromosomes Cancer*. 47: 657-64, 2008.

- Kim, M.; Lee, H.; Jeon, Y.; Yang, H. and Kim, W. "EGFR in gastric carcinomas: prognostic significance of protein overexpression and high gene copy number". *Histopathology*. 52: 738–746, 2008.
- Kimura, T.; Maesawa, C.; Ikeda, K.; Wakabayashi, G. and Masuda, T. "Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in gastrointestinal tract tumor cell lines". *Oncol. Rep.* 15: 1205-1210, 2006.
- Kobayashi, D.; Eishi, Y.; Ohkusa, T.; Ishige, Suzuki.; T.; Minami, J.; Yamada, T.; Takizawa, T. and Koike, M. "Gastric mucosal density of *Helicobacter pylori* estimated by real-time PCR compared with results of urea breath test and histological grading". *J Med Microbiol.* 51(4):305-11, 2002.
- Kudo, T.; Nurgalieva, Z.Z.; Conner, M.E.; Crawford, S.; Odenbreit, S.; Haas, R.; Graham, D.Y. and Yamaoka, Y. "Correlation between *Helicobacter pylori* OipA protein expression and OipA gene switch status". *J. Clin. Microbiol.* 2279-2281, 2004.
- Laskin, J. and Sandler, A. "Epidermal growth factor receptor: A promising target in solid tumors". *Cancer Treat. Rev.* 30: 1-17, 2004.

- Lauren, P. "The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so called intestinal-type carcinoma: an attempt at a histo-clinical classification". *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 64: 31-49, 1965.
- Le, T.L.; Yap, A.S. and Stow, J.L. "Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics". *J Cell Biol.* 146(1): 219-232, 1999.
- Lee, S.M.; Kim, K.M. and Ro, J. "Gastric Carcinoma: Morphologic Classifications and Molecular Changes". <http://dx.doi.org>, 2013.
- Lee, J.H.; Kim, K.; Cheong, J.; and Noh, S. "Current Management and Future Strategies of Gastric Cancer". *Yonsei Med. J.* 53(2): 248-257, 2012.
- Liu, W.; Innocenti, F.; Chen, P.; Das, S.; Cook, E.H. Jr. and Ratain, M.J. "Interethnic difference in the allelic distribution of human epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism". *Clin. Cancer Res.* 9(3): 1009-1012, 2003.
- Liu, W.; Innocenti, F.; Wu, M.H.; Desai, A.A.; Dolan, M.E.; Cook, E.H. Jr. and Ratain, M.J. "A functional common polymorphism in a Sp1 recognition site of the epidermal growth factor receptor gene promoter". *Cancer Res.* 65: 46-53, 2005.
- Liu, W.; Wu, X.; Zhang, W.; Montenegro, R.C.; Fackenthal, D.L.; Spitz, J.A.; Huff, L.M.; Innocenti, F.; Das, S.; Cook, E.H. Jr.; Cox, N.J.; Bates, S.E.

and Ratain, M.J. "Relationship of EGFR mutations, expression, amplification, and polymorphisms to epidermal growth factor receptor inhibitors in the NCI60 cell lines". Clin. Cancer Res. 13: 6788-6795, 2007.

- Lo, H.W.; Hsu, S.C.; Xia, W.; Cao, X.; Shih, J.Y.; Wei, Y.; Abbruzzese, J.L.; Hortobagyi, G.N. and Hung, M.C. "Epidermal Growth Factor Receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via Up-regulation of *TWIST* gene expression". Cancer Res. 67: 9066-9076, 2007.
- Maeda, S.; Ogura, K.; Yoshida, H.; Kanai, F.; Ikenoue, T.; Kato, N.; Shiratori, Y. and Omata, M. "Major virulence factors, VacA and CagA, are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan". Gut. 42: 338-343, 1998.
- Maciorkowska, E.; Guzińska-Ustymowicz, K.; Ryszczuk, E.; Kemoná, A. and Kaczmarski, M. "The EGFR expression in gastric mucosa of children infected with *Helicobacter pylori*". Advances in Medical Sciences. 54(2): 187-193, 2009.
- Malaty, H. "Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection". Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology. 21: 205-214, 2007.
- Mammano, E.; Belluco, C.; Sciro, M.; Mencarelli, R.; Agostini, M.; Michelotto, M.; Marchet, A. and Nitti, D. "Epidermal growth factor receptor (EGFR): mutational and protein expression analysis in gastric cancer". Anticancer Research. 26: 3547-3550, 2006.

- Markovska, R.; Boyanova, L.; Yordanov, D.; Gergova, G. and Mitov, I. “*Helicobacter pylori* OipA genetic diversity and its associations with both disease and cagA, vacA s, m, and i alleles among Bulgarian patients”. *Microbiol. Infect. Disease*. 335-340, 2011.
- Matteo, M.J.; Armitano, R.I.; Granados, G.; Wonaga, A.D.; Sánchez, C.; Olmos, M. and Catalano, M. “*Helicobacter pylori* OipA, vacA and dupA genetic diversity in individual hosts”. *J. Med. Microbiol.* 59: 89-95, 2010.
- Mateus, A.R.; Seruca, R.; Machado, J.C.; Keller, G.; Oliveira, M.J.; Suriano, G. and Lubet, B. “EGFR regulates RhoA-GTP dependent cell motility in E-cadherin mutant cells”. *Human Molecular Genetics*. 16: 1639–1647, 2007.
- Mitchell, H.; Kaakoush, N. and Sutton, P. “Extragastric manifestations of *Helicobacter pylori* infection”. En Philip Sutton. (Ed), *Helicobacter pylori in the 21st Century*. CABI. 5: 69-93, 2010.
- Moriai, T.; Kobrin, M.S. and Korc, M. “Cloning of a variant epidermal growth factor receptor”. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191(3): 1034-1039, 1993.
- Moriai, T.; Kobrin, M.; Hope, C.; Speck, L. and Korc, M. “A variant epidermal growth factor receptor exhibits altered type a transforming growth factor binding and transmembrane signaling”. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA. Cell Biology*. 91: 10217-10221, 1994.

- Nomura, M.; Shigematsu, H.; Li, L.; Suzuki, M.; Takahashi, T.; Estess, P.; Siegelman, M.; Feng, Z.; Kato, H.; Marchetti, A.; Shay, J.W.; Spitz, M.R.; Wistuba, II.; Minna, J.D. and Gazdar, A.F. "Polymorphisms, mutations, and amplification of the EGFR gene in non-small cell lung cancers". 4: 125, 2007.
- Ohno, T.; Sugimoto, M.; Nagashima, A.; Ogiwara, H.; Vilaichone, R.K.; Mahachai, V.; Graham, D.Y. and Yamaoka, Y. "Relationship between Helicobacter pylori hopQ genotype and clinical outcome in Asian and Western populations". Journal of Gastroenterology and Hepatology. 24: 462-468, 2009.
- Paredes, J.; Figueiredo, J.; Albergaria, A.; Oliveira, P.; Carvalho, J.; Ribeiro, A.S.; Caldeira, J.; Costa, A.M.; Simões-Correia, J.; Oliveira, M.J.; Pinheiro, H.; Pinho, S.S.; Mateus, R.; Reis, C.A.; Leite, M.; Fernandes, M.S.; Schmitt, F.; Carneiro, F.; Figueiredo, C.; Oliveira, C. and Seruca, R. "Epithelial E- and P-cadherins: role and clinical significance in cancer". Biochim Biophys Acta. 1826(2):297-311, 2012.
- Parkin, D.M. "The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002". Int. J. Cancer. 15: 3030-3044, 2006.
- Pece, S. and Gutkind, J.S. "Signaling from E-cadherins to the MAPK Pathway by the recruitment and activation of Epidermal Growth Factor Receptors upon cell-cell contact formation". J. Biol. Chem. 275: 41227-41233, 2000.
- Ritchie, M.D.; Hahn, L.W.; Roodi, N.; Bailey, L.R.; Dupont, W.D.; Parl, F.F. and Moore, J.H. "Multifactor-Dimensionality Reduction Reveals High-Order

Interactions among Estrogen-Metabolism Genes in Sporadic Breast Cancer”.
Am. J. Hum. Genet. 69(1): 138-147, 2001.

- Roura, S.; Miravet, S.; Piedra, J.; García de Herreros, A. and Duñach, M. “Regulation of E-cadherin/catenin association by tyrosine phosphorylation” J Biol Chem. 274(51): 36734-36740, 1999.
- Santos, J.L. “Epidemiología Genética, principios y métodos”. Editorial Mediterráneo. 1: 168, 2010.
- Sasaki, H.; Okuda, K.; Shimizu, S.; Takada, M.; Kawahara, M.; Kitahara, N.; Okumura, M.; Matsumura, A.; Iuchi, K.; Kawaguchi, T.; Kubo, A.; Kawano, O.; Yukiue, H.; Yano, M. and Fujii, Y. “EGFR R497K polymorphism is a favorable prognostic factor for advanced lung cancer”. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 135(2): 313-318, 2009.
- Savage, S.; Abnet, C.; Haque, K. et al. “Polymorphisms in interleukin -2, -6, and -10 are not associated with gastric cardia or esophageal cancer in a high-risk Chinese population”. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 13: 1547-1549, 2004.
- Sipponen, P. and Correa, P. “Delayed rise in incidence of gastric cancer in females results in unique sex ratio (M/F) pattern: etiologic hypothesis”. Gastric Cancer. 5: 213-219, 2002.

- Spano, J.P.; Fagard, R.; Soria, J.C.; Rixe, O.; Khayat, D. and Milano, G. "Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives". *Annals of Oncology*. 16: 189-194, 2005.
- Spindler, K.; Nielsen, J.; Lindebjerg, J.; Brandslund, I. and Jakobsen, A. "Prediction of response to chemoradiation in rectal cancer by a gene polymorphism in the epidermal growth factor receptor promoter region". *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 66: 500, 2006.
- Sueoka-Aragane, N.; Imai, K.; Komiya, K.; Sato, A.; Tomimasu, R.; Hisatomi, T.; Sakuragi, T.; Mitsuoka, M.; Hayashi, S.; Nakachi, K. and Sueoka, E. "Exon 19 of EGFR mutation in relation to the CA-repeat polymorphism in intron 1". *Cancer Sci.* 99: 1180-1187, 2008.
- Sutton, P. and Mitchell, H. "Helicobacter Pylori In the 21st Century, advances In Molecular and Cellular Biology". Vol. 17. CABI, 2010.
- Tabassam, F.; Graham, D. and Yamaoka, Y. "Helicobacter pylori activate epidermal growth factor receptor and phosphatidylinositol 3-OH kinase-dependent Akt and glycogen synthase kinase 3 β phosphorylation". *Cell Microbiol.* 11(1): 70–82, 2009.
- Terrés, A.M.; Pajares, J.M.; O'Toole, D.; Ahern, S. and Kelleher, D. "H. pylori infection is associated with downregulation of E-cadherin, a molecule involved in epithelial cell adhesion and proliferation control". *J Clin Pathol.* 51:410–412, 1998.

- Thariat, J.; Etienne-Grimaldi, M.C.; Grall, D.; Bensadoun, R.J.; Cayre, A.; Penault-Llorca, F.; Veracini, L.; Francoual, M.; Formento, J.L.; Dassonville, O.; De Raucourt, D.; Geoffrois, L.; Giraud, P.; Racadot, S.; Morinière, S.; Milano, G. and Van Obberghen-Schilling, E. "Epidermal Growth Factor Receptor Protein Detection in Head and Neck Cancer Patients: A Many-Faceted Picture". *Clin. Cancer Res*, 2012.
- Tzeng, C.W.; Frolov, A.; Frolova, N.; Jhala, N.C.; Howard, J.H.; Vickers, S.M.; Buchsbaum, D.J.; Heslin, M.J. and Arnoletti, J.P. "Pancreatic cancer epidermal growth factor receptor (EGFR) intron 1 polymorphism influences postoperative patient survival and in vitro erlotinib response". *Ann. Surg. Oncol.* 14: 2150-2158, 2007.
- Vashist, Y.K.; Trump, F.; Gebauer, F.; Kutup, A.; Güngör, C.; Kalinin, V.; Muddasar, R.; Vettorazzi, E.; Yekebas, E.F.; Brandt, B.; Pantel, K. and Izbicki, J.R. "EGFR intron-1 CA repeat polymorphism is a predictor of relapse and survival in complete resected only surgically treated esophageal cancer". *Targ. Oncol.* 2013.
- Wang, W.S.; Chen, P.M.; Chiou, T.J.; Liu, J.H.; Lin, J.K.; Lin, T.C.; Wang, H.S. and Su, Y. "Epidermal growth factor receptor r497k polymorphism is a favorable prognostic factor for patients with colorectal carcinoma". *Clin. Cancer Res.* 13: 3597-3604, 2007.

- Wen, S. and Moss, S. “*Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis”. Elsevier Cancer Lett. 282(1): 1-8, 2009.
- Yamaoka, Y.; Dong, H.K. and Graham D.Y. “Mr 34,000 proinflammatory outer membrane protein (OipA) of *Helicobacter pylori*”. Stanford University. 97: 7533-7538, 2000.
- Yamaoka, Y.; Kikuchi, S.; El-Zimaity, H.M.; Gutierrez, O.; Osato, M.S. and Graham, D.Y. “Importance of *Helicobacter pylori* OipA in clinical presentation. Gastric inflammation, and mucosal Interleukin-8 production”. *Gastroenterology*. 123: 414-424, 2002.
- Yamaoka, Y.; Kita, M.; Kodama, T.; Imamura, S.; Ohno, T.; Sawai, N.; Ishimaru, A.; Imanishi, J. and Graham, D.Y. “*Helicobacter pylori* infection in mice: role of outer membrane proteins in colonization and inflammation”. *Gastroenterology*. 123: 1992-2004, 2002.
- Yamaoka, Y.; Kudo, T.; Lu, H.; Casola, A.; Brasier, A.R. and Graham, D.Y. “Role of Interferon-Stimulated Responsive Element-like Element in Interleukin-8 Promoter in *Helicobacter pylori* Infection”. *Gastroenterology*. 126: 1030-1043, 2004.
- Yamaoka, Y.; Ojo, O.; Fujimoto, S.; Odenbreit, S.; Haas, R.; Gutierrez, O.; El-Zimaity, H.M.; Reddy, R.; Arnqvist, A. and Graham, D.Y. “*Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease”. *Gut*. 55: 775-781, 2006.

- Yamaoka, Y. "Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. Review". Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 7(11): 629-641, 2010.
- Yamaoka, Y. "Pathogenesis of Helicobacter pylori-related gastroduodenal diseases from molecular epidemiological studies". Review article Gastroenterology Research and Practice. 2012.
- Zhang, W.; Park, D.J.; Lu, B.; Yang, D.Y.; Gordon, M.; Groshen, S.; Yun, J.; Press, O.A.; Vallböhmer, D.; Rhodes, K. and Lenz, H.J. "Epidermal growth factor receptor gene polymorphisms predict pelvic recurrence in patients with rectal cancer treated with chemoradiation". Clin Cancer Res. 11: 600-605, 2005.
- Zhang, W.; Weissfeld, J.L.; Romkes, M.; Land, S.R.; Grandis, J.R. and Siegfried, J.M. "Association of the EGFR intron 1 CA repeat length with lung cancer risk". Mol Carcinog. 46(5): 372-380, 2007.
- Zhang, J.; Zhan, Z.; Wu, J.; Zhang, C.; Yang, Y.; Tong, S.; Sun, Z.; Qin, L.; Yang, X. and Dong, W. "Association among Polymorphisms in EGFR Gene Exons, Lifestyle and Risk of Gastric Cancer with Gender Differences in Chinese Han Subjects". PLoS ONE. 8(3): e59254, 2013.
- Zheng, L.; Wang, L.; Ajani, J. and Xie, K. "Molecular basis of gastric cancer development and progression". Gastric Cancer. 7: 61-77, 2004.

- Zheng, H.; Li, X.; Hara, T.; Masuda S.; Yang, X.; Guan, Y. and Takano, Y. “Mixed-type gastric carcinomas exhibit more aggressive features and indicate the histogenesis of carcinomas”. *Virchows Arch.* 452: 525-534, 2008.