

ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES DE *IL 1β-511*  
Y *TNFα-308* CON LESIONES PRECURSORAS DE CÁNCER GÁSTRICO EN PACIENTES  
INFECTADOS CON *Helicobacter pylori* DEL MUNICIPIO DE TUMACO-NARIÑO

Presentado por:

JAVIER ANTONIO CHALEAL CULTID  
STEPHANY CAROLINA ROSERO ROJAS

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
SAN JUAN DE PASTO

2016

ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES IL  $1\beta$ -511 Y  
*TNF $\alpha$ -308* CON LESIONES PRECURSORAS DE CÁNCER GÁSTRICO EN PACIENTES  
INFECTADOS CON *Helicobacter pylori* DEL MUNICIPIO DE TUMACO-NARIÑO

Presentado por:

JAVIER ANTONIO CHALEAL CULTID

STEPHANY CAROLINA ROSERO ROJAS

Directores:

ALVARO PAZOS MONCAYO

Ciencias Biomédicas, M.Sc. Ph.D.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

CAROL YOVANNA ROSERO GALINDO

Ciencias-Biología, M.Sc. Ph.D.

UNIVERSIDAD COOPERATIVA DE COLOMBIA

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo

Modalidad Trabajo de Investigación

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

SAN JUAN DE PASTO

2016

## **NOTA DE RESPONSABILIDAD**

“Las ideas y conclusiones aportadas en este trabajo de grado, son responsabilidades exclusivas de los autores”

Artículo primero del acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado por el Honorable Consejo Superior de la Universidad de Nariño.

## NOTA DE ACEPTACIÓN

---

---

---

---

---

---

---

---

Álvaro Jairo Pazos Moncayo, PhD.  
Firma del Director del Trabajo de Grado

---

Carol Yovanna Rosero Galindo, PhD.  
Firma de la Directora del Trabajo de Grado

---

Edith Mariela Burbano Rosero, PhD.  
Firma del Jurado

---

Leidy Alejandra Ordoñez, BSc.  
Firma del Jurado

San Juan de Pasto, 3 de Marzo de 2016

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a mis padres, quienes siempre han sido los impulsores en la conquista de mis objetivos y metas, y más que nada por ser siempre mi ejemplo de vida. También quiero dedicar este trabajo a mis hermanos, que debido a mis compromisos académicos y mis innumerables ausencias me he perdido de sus mejores momentos. Gracias por su paciencia y comprensión que me han permitido llegar hasta donde hoy estoy.

Javier Antonio Chaleal

Dedico esta investigación a mis padres Fernando y Rosalba, que son el motor de mi vida y han sabido creer en mí pese a las dificultades, cada uno de mis triunfos son la recompensa de su admirable entereza, tenacidad esfuerzo y dedicación constantes. A mis hermanos Luis y Tatiana, que con su increíble cariño y amistad me dieron ánimos para no rendirme. Gracias familia por su inagotable paciencia, sé que el camino ha sido largo de recorrer, pero su infinito amor es la fuerza que me ha permitido salir adelante para culminar esta etapa de mi vida.

Stephany Rosero.

## AGRADECIMIENTOS

A DIOS por darnos la fuerza y la entereza para no desistir y seguir adelante, porque los caminos que nos trazas siempre son perfectos.

A nuestros padres, por permitirnos alcanzar nuestros sueños, su sacrificio y trabajo duro nos han permitido realizarnos como profesionales.

A COLCIENCIAS por la financiación de esta investigación enmarcada en el proyecto “Biomarcadores de susceptibilidad humana a cáncer gástrico en el departamento de Nariño”.

A nuestro director Álvaro Pazos, por darnos la oportunidad de desarrollar esta investigación bajo su orientación y brindar los medios suficientes para desarrollo de la misma. Su sabiduría, aportes e ideas oportunas siempre enmarcadas en su rigurosidad han sido clave de nuestro buen desempeño. Gracias profe por enseñarnos a ver más allá de los logros propuestos.

A nuestra codirectora, Carol Rosero, por ofrecer todo lo que estuvo al alcance de sus manos para realizar las actividades propuestas y permitirnos culminar con éxito nuestro trabajo. Por enseñarnos el valor del esfuerzo y su ejemplar forma de transmitir que con amor y dedicación se puede alcanzar cualquier meta. Mil gracias profe por su cariño, apoyo incondicional y paciencia. Cada una de sus palabras, consejos y regaños han forjado y enriquecido nuestra formación académica y sobretodo personal.

A él profesor Arsenio Hidalgo, por sus importantes asesorías y aportes en la parte del análisis estadístico.

A los jurados Edith Mariela Burbano y Alejandra Ordoñez, por su oportuna atención, apoyo y aportes en el desarrollo del trabajo de grado.

A Liz Mejía por sus palabras de aliento, paciencia y compañía en las arduas jornadas de trabajo. Por enseñarnos que el trabajo en equipo es un pilar en el laboratorio y sobre todo gracias por brindarnos tu valiosa y sincera amistad.

Al equipo de “Biomarcadores”. A Camilo y Vanesa por su constante apoyo y animo a lo largo del tiempo. A Felipe, Aura y Ronald, por su colaboración en la ejecución del trabajo de campo. A

Andrés Matta por sus enseñanzas en la estandarización de algunos métodos de biología molecular. Sin ustedes no hubiera sido posible realizar esta investigación.

A Esteban Durango, porque tu amor siempre me lleno de energía para seguir adelante, gracias por ser paciente y entender cada situación. A mis buenos amigos Mario Erazo y Darío Paz, por facilitar la búsqueda de los programas, libros y artículos necesarios para el desarrollo del trabajo (atm: Stephany Rosero).

A los pacientes incluidos en esta investigación, quienes, con su actitud, y su colaboración desinteresada accedieron a participar en este estudio.

A la Universidad Cooperativa de Colombia, por acogernos en sus magníficas instalaciones y permitirnos ejecutar el trabajo en el laboratorio de Biología Molecular. Y a todas las personas que nos colaboraron en las actividades realizadas, y en especial al analista del laboratorio Diego Mora por su gentileza y amabilidad.

Al Hospital San Andrés de Tumaco, por permitir el acceso a sus instalaciones y ejecutar el trabajo de campo.

## RESUMEN

El cáncer gástrico continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial. En Colombia es la principal causa de muerte por cáncer, sin embargo, el riesgo y la incidencia de la patología en el país es contrastante con la altitud. En la región andina del departamento de Nariño la tasa de incidencia de cáncer gástrico es una de las más altas en el mundo 150/100.000 habitantes, mientras que en la costa pacífica la incidencia de la enfermedad es baja CG 6/100.000 habitantes. En Tumaco, población costera de Nariño, el bajo riesgo de cáncer gástrico podría explicarse en parte por la infección por cepas africanas de *Helicobacter pylori* de baja virulencia, la baja prevalencia de cepas virulentas (*cagA* +; *vacA* *s1*, *m1*), la alta infección parasitaria con helmintos que posiblemente modifica el tipo de respuesta inmune contra *H. pylori* a Th-2 y la coevolución del microorganismo-hospedero, sin embargo, la susceptibilidad genética al CG propia del hospedero, como factor de riesgo de la enfermedad, podría incidir en la patogénesis de la enfermedad y aún no se encuentra documentada en la población. Por lo anterior en el presente estudio, se determinó la asociación de los polimorfismos de los genes de las citoquinas proinflamatorias *IL 1β-511* y *TNFα-308* con las lesiones precursoras de cáncer gástrico en pacientes infectados con *H. pylori* del municipio de Tumaco-Nariño. Se estudiaron 81 muestras de sangre de pacientes con gastritis crónica no atrófica (n=63) y lesiones precursoras de cáncer gástrico (n=18), provenientes de una zona de bajo riesgo para la patología. La genotipificación se realizó por medio de la técnica PCR-RFLP's. Para los análisis genéticos se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg y para los análisis estadísticos se aplicaron pruebas de  $\chi^2$  por tabla de contingencia, análisis bivariado y regresión logística binomial. Los resultados indicaron que el alelo mutante T de la *IL-1β-511* (odds ratio = 0,7) no presenta riesgo relativo de asociarse con lesiones precursoras de malignidad. No se calculó el riesgo relativo para el polimorfismo *TNF-α-308*, ya que posiblemente se presentó un proceso de fijación del alelo normal G. Otros factores como el género (hombres: OR=4,27) y la no vinculación al régimen de salud (OR=6,72), presentaron un alto riesgo de asociación con lesiones precursoras de malignidad de cáncer gástrico. Los resultados permitieron inferir que los genes evaluados en este estudio no son marcadores informativos para establecer la predisposición de los pobladores de Tumaco a padecer lesiones precursoras de malignidad de CG.

**PALABRAS CLAVE:** *Helicobacter pylori*, lesiones precursoras de cáncer gástrico, cáncer gástrico, polimorfismos, PCR-RFLP's, *IL-1β-511*, *TNF-α-308*.



## ABSTRACT

Gastric cancer continues to be a public health problem worldwide. In Colombia is the leading cause of death by cancer; however, the risk and incidence of the disease in the country is contrasting with altitude. In the Andean region of Nariño the incidence rate of GC is one of the highest in the world 150 / 100,000 inhabitants, while in the Pacific Coast the incidence of the disease is low GC 6 / 100,000. In Tumaco, a coastal town of Nariño, low risk of gastric cancer could be explained in part by infection with low virulent *H. pylori* African strains, the low prevalence of virulent strains (*cagA* +, *vacA s1, m1*), the high parasitic infection with helminth possibly changes the type of immune response against *H. pylori* to Th-2 and coevolution of the host- microorganism; however, genetic susceptibility to GC proper of the host as a risk factor for the disease could influence on the pathogenesis of the disease and is not yet documented in the population. Therefore in the present study, the association of polymorphisms of genes of proinflammatory cytokines *IL-1 $\beta$*  and *TNF-308* 511 with precursor lesions of gastric cancer in *H. pylori* infected patients from the municipality of Tumaco-Nariño was determined. 81 blood samples from patients with non-atrophic chronic gastritis (n = 63) and gastric cancer precursor lesions (n = 18) from an area of low risk for the disease were studied. The Genotyping was performed by PCR-RFLP method. For the genetic analysis Hardy-Weinberg equilibrium was calculated and for statistical analyzes  $\chi^2$  tests were applied by contingency table, bivariate analysis and binomial logistic regression. The results indicated that the mutant allele T of *IL-1 $\beta$ -511* (odds ratio = 0; 7) does not present relative risk of banding together with precursor lesions of malignancy. the relative risk for *TNF- $\alpha$*  polymorphism-308 was not calculated, since possibly a normal setting process of G allele took place. Other factors such as gender (men: OR = 4.27) and no link to the health regime (OR = 6.72) presented a high risk of association with precursor lesions of malignancy of gastric cancer. The results allowed to infer that the evaluated genes in this study are not informative markers to establish the willingness of the people of Tumaco to suffer from malignant precursor lesions of GC. In addition, not enough evidence was found to claim that *H. pylori* infection affects the overexpression of the genes studied in the town of Tumaco.

**KEY WORDS:** *Helicobacter pylori*, precursor lesions of gastric cancer, gastric cancer, polymorphisms, PCR-RFLP, *IL-1 $\beta$ -511*, *TNF- $\alpha$ -308*.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	25
1 JUSTIFICACIÓN	27
2 MARCO TEÓRICO	29
2.1 ASPECTOS GENERALES DEL CÁNCER GÁSTRICO	29
2.2 ETIOLOGÍA Y PATOGÉNESIS DEL CÁNCER GÁSTRICO	29
2.3 RESPUESTA INMUNE A LA INFECCIÓN POR <i>Helicobacter pylori</i>	31
2.4 POLIMORFISMOS DEL HOSPEDERO Y CÁNCER GÁSTRICO	32
2.4.1 Aspectos generales de las citoquinas	32
2.4.2 Citoquinas proinflamatorias	33
2.4.3 Polimorfismos de Nucleótido Sencillo (SNP)	34
2.4.4 Caracterización de polimorfismos genéticos	34
2.4.5 Polimorfismos en genes de citoquinas proinflamatorias y riesgo de cáncer gástrico	34
2.4.5.1 <i>Interleucina-1<math>\beta</math> (IL-1<math>\beta</math>): Polimorfismos IL-1<math>\beta</math>-511 C/T</i>	35
2.4.5.2 <i>Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-<math>\alpha</math>)</i>	37
2.5 CÁLCULO DE FRECUENCIAS ALÉLICAS	39
2.5.1 Equilibrio Hardy-Weinberg	39
2.5.2 Pruebas para calcular la desviación del Equilibrio Hardy-Weinberg	40
3 ESTADO DEL ARTE DE LA INVESTIGACIÓN	42
4 OBJETIVOS	45

4.1 OBJETIVO GENERAL	45
4.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
Objetivo específico 1	45
Objetivo específico 2	45
5 METODOLOGÍA	46
5.1 ZONA DE ESTUDIO	46
5.2 DISEÑO DE ESTUDIO	47
5.2.1 Criterios de inclusión	47
5.2.2 Criterios de exclusión	47
5.2.3 Estimación del tamaño de la muestra	48
5.3 CONSIDERACIONES ÉTICAS	49
5.4 TRABAJO DE CAMPO	49
5.4.1 Procedimiento de captación de pacientes	49
5.4.2 Procedimiento para obtener firma de consentimiento informado y diligenciamiento de la encuesta	50
5.4.3 Toma de muestras de sangre	51
5.5 PROCEDIMIENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	51
5.5.1 Extracción de ADN genómico de sangre humana	51
5.5.2 Cuantificación de ADN genómico de sangre humana	52
5.5.3 Selección de polimorfismos humanos	52
5.5.4 Detección de Polimorfismos de Nucleótido Único (SNPs)	52
5.5.5 Polimorfismo -511 C/T del gen IL-1 $\beta$	53

5.5.5.1 Estandarización de la PCR del gen <i>IL-1<math>\beta</math></i>	53
5.5.5.2 Electroforesis para productos de amplificación por PCR del gen <i>IL-1<math>\beta</math></i>	56
5.5.5.3 Detección del polimorfismo -511 C/T del gen <i>IL-1<math>\beta</math></i> por PCR-RFLP	57
5.5.5.4 Electroforesis de fragmentos de restricción del gen <i>IL-1<math>\beta</math></i> con la enzima <i>AvaI</i>	57
5.5.6 Polimorfismo -308 G/A del gen <i>TNF-<math>\alpha</math></i> .	58
5.5.6.1 Estandarización de la PCR para el gen <i>TNF-<math>\alpha</math></i>	58
5.5.6.2 Electroforesis para productos de amplificación por PCR del gen <i>TNF-<math>\alpha</math></i>	60
5.5.6.3 Detección del polimorfismo -308 G/A del gen <i>TNF-<math>\alpha</math></i> por PCR-RFLP	61
5.5.6.4 Electroforesis de fragmentos de restricción del gen <i>TNF-<math>\alpha</math></i> con la enzima <i>NcoI</i>	61
5.6 ANÁLISIS GENÉTICO	62
5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	62
6. RESULTADOS	64
6.1 CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN	64
6.2 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE HUMANA	66
6.3 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS GENES <i>IL-1<math>\beta</math></i> Y <i>TNF-<math>\alpha</math></i>	66
6.3.1 Amplificación del gen <i>IL-1</i>	66
6.3.2 Amplificación del gen <i>TNF-<math>\alpha</math></i>	68
6.4 DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	70
6.4.1 Detección del polimorfismo -511 C/T del gen <i>IL-1<math>\beta</math></i> por PCR-RFLP	70

6.4.2 Detección del polimorfismo -308 G/A del gen <i>TNF-<math>\alpha</math></i> por PCR-RFLP	71
6.5 FRECUENCIAS ALÉLICAS DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES <i>IL-1<math>\beta</math>-511</i> Y <i>TNF-<math>\alpha</math>-308</i> EN PACIENTES DE TUMACO.	72
6.5.1 Frecuencias de alelos y de polimorfismos de los genes <i>IL-1<math>\beta</math>-511</i> y <i>TNF-<math>\alpha</math>-308</i>	72
6.5.1.1 Polimorfismo de la región <i>IL-1<math>\beta</math> -511 (C/T)</i>	73
6.5.1.2 Polimorfismo de nucleótido único <i>TNF-<math>\alpha</math>-308 (G/A)</i>	74
6.5.2 EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG	74
6.6 PERFILES POLIMÓRFICOS DE <i>IL-1<math>\beta</math>-511</i> <i>TNF-<math>\alpha</math>-308</i> Y LAS LESIONES PRECURSORAS DE CÁNCER GÁSTRICO EN TUMACO	76
6.6.1 Polimorfismos de <i>IL-1<math>\beta</math>-511</i> y <i>TNF-<math>\alpha</math>-308</i> según tipo de gastritis	76
6.6.2 Genotipos de <i>IL-1<math>\beta</math>-511</i> y <i>TNF-<math>\alpha</math>-308</i> según riesgo de gastritis no atrófica o lesión precursora de cáncer gástrico	77
7. DISCUSIÓN	80
7.1 FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES <i>IL-1<math>\beta</math>-511</i> Y <i>TNF-<math>\alpha</math>-308</i> EN PACIENTES DE TUMACO.	81
7.1.1 Polimorfismo de la región <i>IL-1<math>\beta</math> -511 (C/T)</i>	81
7.1.2 Polimorfismo de nucleótido único <i>TNF-<math>\alpha</math>-308 (G/A)</i>	82
7.2 EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG	82
7.2.1 Polimorfismo -511 C/T del gen <i>IL-1<math>\beta</math></i>	82
7.2.2 Polimorfismo -308 G/A del gen <i>TNF-<math>\alpha</math></i>	83
7.3 GENOTIPOS DE <i>IL-1<math>\beta</math>-511</i> Y <i>TNF-<math>\alpha</math>-308</i> SEGÚN RIESGO DE GASTRITIS NO ATRÓFICA O LESIÓN PRECURSORA DE CÁNCER GÁSTRICO	84

7.3.1 Riesgo relativo (OR) de <i>IL-1<math>\beta</math>-511</i> frente a lesiones precursoras de CG	84
7.3.2 Riesgo relativo (OR) de <i>TNF-<math>\alpha</math>-308</i> frente a lesiones precursoras de CG	85
7.3.3 Riesgo relativo (OR) de otros factores frente a lesiones precursoras de CG	87
7.3.4 Biomarcadores evolutivos y polimorfismos humanos	87
CONCLUSIONES	89
RECOMENDACIONES	90
PRODUCTOS ASOCIADOS	91
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
ANEXOS	104

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Iniciadores, secuencias y sentido para la amplificación por PCR del gen <i>IL-1<math>\beta</math></i>	53
<b>Tabla 2.</b> Variación de los componentes de PCR para estandarización de la amplificación por PCR del gen <i>IL-1<math>\beta</math></i>	54
<b>Tabla 3.</b> Condiciones de reacción para la PCR del gen <i>IL-1<math>\beta</math></i>	55
<b>Tabla 4.</b> Condiciones de digestión del gen <i>IL-1<math>\beta</math></i> con la enzima de restricción <i>AvaI</i>	57
<b>Tabla 5.</b> Iniciadores, secuencias y tamaño del amplicón por PCR del gen <i>TNF-<math>\alpha</math></i>	58
<b>Tabla 6.</b> Variación de los componentes de PCR para la estandarización de la amplificación del gen <i>TNF-<math>\alpha</math></i> .	59
<b>Tabla 7.</b> Condiciones de digestión del gen <i>TNF-<math>\alpha</math></i> con la enzima de restricción <i>NcoI</i>	61
<b>Tabla 8.</b> Características sociodemográficas de 81 pacientes del municipio de Tumaco, zona de bajo riesgo de CG	64
<b>Tabla 9.</b> Características sociodemográficas según lesiones precursoras de cáncer gástrico	65
<b>Tabla 10.</b> Frecuencias de genotipos y alelos de los genes <i>IL-1<math>\beta</math>-511</i> y <i>TNF-<math>\alpha</math>-308</i>	73
<b>Tabla 11.</b> Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos <i>IL-1<math>\beta</math>-511</i> y <i>TNF-<math>\alpha</math>-308</i> en gastritis no atrófica y lesiones precursoras de CG	74
<b>Tabla 12.</b> Polimorfismos de <i>IL-1<math>\beta</math>-511</i> y <i>TNF-<math>\alpha</math>-308</i> según genotipos y tipo de lesión gástrica	76
<b>Tabla 13.</b> Polimorfismos de <i>IL-1<math>\beta</math>-511</i> y <i>TNF-<math>\alpha</math>-308</i> según genotipos y tipos de gastritis	77

<b>Tabla 14.</b>	Genotipos de <i>IL-1<math>\beta</math>-511</i> y <i>TNF-<math>\alpha</math>-308</i> según riesgo a gastritis atrófica y no atrófica en pacientes de Tumaco	78
<b>Tabla 15.</b>	Riesgo de lesión precursora de cáncer gástrico según género y seguridad social	79



## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Factores de <i>H. pylori</i> , del hospedero y externos que determinan el riesgo de CG	30
<b>Figura 2.</b> Consecuencias de la infección por <i>H. pylori</i> .	30
<b>Figura 3.</b> Mapa de la región 2q12-q21 del cromosoma 2 humano.	36
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática del mapa de los genes de <i>IL-1<math>\beta</math></i> .	37
<b>Figura 5.</b> Localización y organización del gen de <i>TNF-<math>\alpha</math></i> .	38
<b>Figura 6.</b> Zonas de incidencia de CG en el departamento de Nariño.	46
<b>Figura 7.</b> Programa de amplificación para el gen <i>IL-1B</i> .	56
<b>Figura 8.</b> Programa de amplificación para el gen <i>TNF-<math>\alpha</math></i>	60
<b>Figura 9.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ADN total de sangre de pacientes de Tumaco	66
<b>Figura 10.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 2% del gen <i>IL-1<math>\beta</math></i>	67
<b>Figura 11.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 2% del gen <i>IL-1<math>\beta</math></i>	68
<b>Figura 12.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 2% del gen <i>TNF-<math>\alpha</math></i>	69
<b>Figura 13.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 2% del gen <i>TNF-<math>\alpha</math></i>	70
<b>Figura 14.</b> Patrón electroforético de productos de digestión por PCR-RFLP del gen <i>IL-1<math>\beta</math></i> con la enzima de restricción <i>AvaI</i> en gel de agarosa al 4 %	71
<b>Figura 15.</b> Patrón electroforético de productos de digestión por PCR-RFLP del gen <i>TNF-<math>\alpha</math></i> con la enzima de restricción <i>NcoI</i> en gel de agarosa al 4 %	72

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
<b>Anexo 1.</b> Aval del comité de ética del proyecto “BIOMARCADORES DE SUCEPTIBILIDAD HUMANA A CÁNCER GÁSTRICO EN EL DEPARTAMENTO DE NARIÑO”	104
<b>Anexo 2.</b> Forma de consentimiento informado	106
<b>Anexo 3.</b> Protocolo de extracción de ADN a partir de muestras de sangre usando el kit Ultra Clean Blood spin (Mobio)	109
<b>Anexo 4.</b> Sitio de corte de la enzima de restricción <i>AvaI</i> para el polimorfismo <i>IL-1<math>\beta</math>-511</i>	110
<b>Anexo 5.</b> Sitio de corte de la enzima de restricción <i>NcoI</i> para el polimorfismo <i>TNF-<math>\alpha</math>-308</i>	112

## LISTA DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

A: Adenina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

C: Citoquina

*CagA*: Gen A asociado a la citotoxina. CagA: Citotoxina.

*CDH1*: gen cadherina 1. CDH1: Cadherina 1

CG: Cáncer Gástrico

COX-1: Ciclooxigenasa 1

COX-2: Ciclooxigenasa 2

DG: Displasia gástrica

dNTP's: desoxirribonucleótidos trifosfato

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

E H-W: Equilibrio Hardy-Weinberg

Esp: Frecuencias esperadas

*et al*: Y otros (Colaboradores)

G: Guanina

GCNA: Gastritis No Crónica Atrófica

GCA: Gastritis Crónica Atrófica

GSTM: Glutación S-transferasa Mu

GSTT1: Glutación S-transferasa teta 1 [*Homo sapiens*]

*H. pylori*: *Helicobacter pylori*

ID: Identificación

*IFN-γ*: Gen interferón gamma. IFN-γ: Interferón gamma

*IL-1β*: Gen interleuquina 1- beta. IL-1β: Interleuquina 1- beta.

*IL-10*: Gen interleuquina 10. IL-10: Interleuquina 10

*IL-12*: Gen interleuquina 12. IL-12: Interleuquina 12.

*IL-14*: Interleuquina 14. IL-14: Interleuquina 14

*IL-1 $\beta$  511*; Polimorfismo-Interleuquina-1 $\beta$ -511

*IL-4*: gen interleuquina 4. IL-4: Interleuquina 4

iNOS: Óxido Nítrico Sintasa

MCHIII: Complejos Mayores de Histocompatibilidad III

MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de Magnesio

MI: Metaplasia Intestinal

MP: Marcador de Peso molecular

MTHFR: Gen Metilentetrahidrofolato Reductasa.

NAT1: N-acetil-1 Transferasa

NAT2: N-acetiltransferasa 2 (arilamina N-acetiltransferasa)

Obs: Frecuencias observadas

OGG1: 8-Oxoguanina Glicosilasa

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Odds ratio

PAF: Factor activador de plaquetas

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PGs: Prostaglandinas

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

r.p.m: Revoluciones Por Minuto

seg: segundo

SNPs: *Single Nucleotide Polymorphisms*

T: Timina

TAE: Tris Acetato EDTA

Tau-a: Proteína microtubular a

TGFβ1: Factor de Crecimiento Transformante Beta 1

TGFβR2: Receptor del factor de crecimiento transformante beta 2

Th0: Prolinfocito virgen el cual no tiene función específica.

Th1: Respuesta inmune proinflamatoria

Th2: Respuesta inmune anti-inflamatoria

*TNF-α*: gen Factor de Necrosis Tumoral alfa

*TNF-α-308*: Polimorfismo factor de necrosis tumoral alfa - 308

*vacA m1*: Gen asociado a la citotoxina vacuolizante - m1

$X^2$ : Chi cuadrado

XRCC1: Reparación de rayos X en células defectuosas 1

UCC: Universidad Cooperativa de Colombia

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

**CROMOSOMA:** Estructura en que se organiza la cromatina nuclear y que tienen una expresión dinámica en las distintas fases del ciclo celular.

**ENFERMEDAD BENIGNA:** Afección, tumor, o neoplasia que no es grave, es decir, no es cancerosa.

**EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG:** Modelo teórico que establece una distribución aleatoria de genotipos. El Equilibrio se basa en la siguiente hipótesis:

- Los apareamientos ocurren al azar y todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse.
- La población es de tamaño infinito.
- No existe migración, mutación o selección natural.
- Las frecuencias alélicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación

**FRECUENCIA ALÉLICA:** Proporción de copias genéticas en la población que corresponden a un alelo determinado.

**FRECUENCIA GENOTÍPICA:** Frecuencia o proporción de genotipos en una población.

**GEN:** Es una unidad de información de ADN en un locus que codifica un producto funcional, además de ser la unidad de herencia molecular.

**INCIDENCIA:** Número de casos nuevos de la enfermedad a estudiar que aparecen en un periodo de tiempo, previamente determinado.

**LESIONES PRECURSORES DE MALIGNIDAD O CG:** Alteración histopatológica detectable que posee capacidad y/o potencial de riesgo relativo o absoluto de evolucionar, asociarse o transformarse con el tiempo en una neoplasia maligna

**LOCUS:** Espacio físico de un gen o secuencia de ADN sobre un cromosoma.

**MARCADOR MOLECULAR:** Herramienta usada para localizar y aislar genes de interés.

**Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):** Técnica de laboratorio que permite amplificar fragmentos de ADN.

**POLIMORFISMO:** Frecuencia de uno de los alelos en una población superior al 1%.

**POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO ÚNICO (SNP):** Tipo de polimorfismo que produce una variación en un solo par de bases.

**PREVALENCIA:** Proporción de la población que padece la enfermedad a estudiar en un momento determinado.

**ORIGEN ÉTNICO:** clasificación de las personas con base en una combinación de características compartidas como la nacionalidad, el origen geográfico, la lengua, la religión las costumbres ancestrales y la tradición.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer gástrico es un proceso multifactorial complejo que resulta de la interacción de factores ambientales, factores genéticos dependientes del hospedero y la infección por la bacteria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (Martínez & García, 2010). Este organismo catalogado como carcinógeno tipo I por la Organización Mundial de la Salud (OMS), coloniza la mucosa gástrica de aproximadamente la mitad de la población mundial, sin embargo, menos del 3% de los sujetos infectados por la bacteria y con inflamación crónica de la mucosa gástrica progresan de forma consecutiva hacia gastritis crónica atrófica (GCA), metaplasia intestinal (MI), displasia gástrica (DG) y solo una pequeña fracción (<1%) en el mundo desarrollan adenocarcinoma gástrico (Martínez, et al., 2014; Kodaman, et al., 2014).

El CG es la tercera causa de mortalidad por cáncer a nivel mundial (GLOBOCAN, 2012) y en Colombia es la principal causa de mortalidad por la enfermedad, sin embargo, el riesgo y la incidencia de la patología en diferentes regiones del país es contrastante en relación con la altitud (Martínez, et al., 2014).

Una de las hipótesis sobre la epidemiología de la enfermedad en la región andina aduce que la incidencia de CG en el departamento de Nariño es una de las más altas en el mundo 150/100.000 habitantes, contrario a las cifras de la costa pacífica en la cual la incidencia es baja 6/100.000 habitantes; aunque la prevalencia de la infección por *H. pylori* es alta y similar en ambas zonas (Correa, 2011). Esta hipótesis es comparable con el “enigma asiático y africano”, que describen que poblaciones ubicadas en el este de Asia presentan alta prevalencia de la infección por *H. pylori* y alta incidencia de CG, caso contrario ocurre en África y el sur de Asia, donde la prevalencia de la infección es alta pero la incidencia de CG es baja (Correa & Piazuelo, 2012; Torres, 2012; Kodaman, et al., 2014).

En Tumaco, población costera de Nariño (zona de bajo riesgo CG), se replica de manera semejante el “enigma Africano”; donde los pobladores infectados lo están con cepas africanas de *H. pylori* de baja virulencia (posiblemente por un mayor tiempo de coevolución con su hospedero) (Kodaman, et al., 2014), baja prevalencia de cepas de *H. pylori* con genotipo virulento (*cagA* +; *vacA s1, m1*) y alta infección parasitaria con helmintos que posiblemente modifica el tipo de respuesta inmune contra *H. pylori* a Th-2 (antiinflamatoria) (Martínez & García, 2010; Bedoya, et



al.,2012). Estos fenómenos aunados a la coevolución del microorganismo-hospedero explican en parte el bajo riesgo de CG en la población de estudio (Kodaman, et al., 2014), sin embargo, la susceptibilidad genética al CG propia del hospedero, como factor de riesgo de la enfermedad, podría incidir en la patogénesis de la enfermedad y aún no está documentada en la población de Tumaco.

Biomarcadores de susceptibilidad humana a CG involucran los polimorfismos de citoquinas proinflamatorias característicos de una respuesta inmune de tipo Th1, como la *IL-1-β 511* y el *TNF-α-308*, que se sobre-expresan en pacientes infectados por filogenotipos de *H. pylori* y los exponen a un mayor riesgo de desarrollar hipoclorhidria, procesos inflamatorios más severos y lesiones precursoras de CG: como atrofia gástrica, displasia y adenocarcinoma gástrico (Marín, 2013; Martínez, et al., 2014).

Por lo anterior, el propósito del presente estudio fue el de determinar la asociación de los polimorfismos de los genes de las citoquinas proinflamatorias *IL-1β-511* y *TNFα-308* con las lesiones precursoras de CG en pacientes infectados con *H. pylori* del Municipio de Tumaco-Nariño.

## 1. JUSTIFICACIÓN

En Colombia el CG es la primera causa de mortalidad por cáncer. La distribución geográfica de esta enfermedad es contrastante en relación con la altitud (Martínez, et al., 2014). En el norte y suroccidente de la zona andina del departamento de Nariño la tasa de incidencia de CG es alta, por el contrario, en la costa pacífica la incidencia de la enfermedad es baja; pero la prevalencia de la infección por *H. pylori* es alta y similar en ambas zonas (Correa, 2011; Bedoya, et al., 2012). Las razones para este contraste se desconocen y la sola infección por la bacteria no parece justificar las diferencias del riesgo de CG entre las regiones (Santos, Ladeira, Pedrazzoli, & Ribeiro, 2012).

La variación geográfica en el riesgo de CG en Nariño posiciona este departamento como un modelo biológico para explicar la carcinogénesis gástrica asociada a la infección crónica por *H. pylori*. El CG es de etiología multifactorial e involucra factores de riesgo que podrían estar asociados al desarrollo de la enfermedad, entre los cuales la dieta, factores socioculturales e higiénicos sanitarios, la respuesta inmune anti-inflamatoria (Th2) y la susceptibilidad genética del hospedero podrían explicar el bajo riesgo de CG en la zona Pacífica Nariñense (Correa, 2011).

Los factores genéticos que involucran polimorfismos de citoquinas característicos de la respuesta inmune proinflamatoria de tipo Th1 ante la infección por filogenotipos de *H. pylori*, como la *IL-1-β 511* y el *TNF-α-308* pueden relacionarse a mayor riesgo de CG (Torres, 2004; Martínez, et al., 2014). Estos factores importantes en la patogénesis gástrica no se han estudiado en la región costera de Tumaco-Nariño, por lo cual, es pertinente e importante evaluar la distribución de las frecuencias alélicas de los polimorfismos humanos de CG, que podrían variar de acuerdo al componente étnico de la población y explicar la baja predisposición de los pobladores de Tumaco al desarrollo de la enfermedad. La detección de los polimorfismos objetos de estudio contribuirá en la identificación, en un futuro, de individuos que estén a mayor riesgo de la enfermedad y facilitar su tamizaje como herramienta de prevención temprana.

Por lo anterior, esta investigación planteó dar respuesta a la siguiente pregunta de investigación:

¿Los polimorfismos de los genes que codifican para las citoquinas proinflamatorias *IL-1β-511* y *TNF-α-308* están relacionados con las lesiones precursoras de CG en pacientes infectados con *H. pylori* del municipio de Tumaco (población de bajo riesgo de CG)?

## 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 ASPECTOS GENERALES DEL CÁNCER GÁSTRICO

El adenocarcinoma gástrico es un tumor originado en el epitelio glandular de la mucosa gástrica que invade la pared del tejido epitelial estomacal. La progresión del CG consiste de varios procesos que incluyen la proliferación y la diferenciación celular, la angiogénesis y la degradación de la matriz extracelular (Sugimoto, et al., 2007; Cumbal, 2010).

Como muchos tipos de cáncer, el CG es el resultado final de un largo proceso carcinogénico multifactorial que se desarrolla en distintas etapas y en el que intervienen un elevado número de factores ambientales y genéticos (Marín, 2013; Kodaman, et al., 2014). El CG se constituye en la tercera causa más común de muerte por cáncer en todo el mundo, lo que representa aproximadamente un estimado de 723.000 muertes anuales y cerca de un millón de casos nuevos por año, con variaciones significativas en las tasas de mortalidad en los diferentes países (GLOBOCAN, 2012).

### 2.2 ETIOLOGÍA Y PATOGÉNESIS DEL CÁNCER GÁSTRICO

En la patogénesis del CG la fuerza que promueve el proceso precanceroso es la infección por *H. pylori*, que sigue el modelo epidemiológico de causalidad y esta modulado por la interacción de tres grupos de fuerzas etiológicas, Figura 1. En primera instancia las asociadas a la susceptibilidad del hospedero (los polimorfismos humanos), en los que juegan un papel importante procesos de detoxificación, antioxidación y reparación de ADN.

La infección por *H. pylori* y específicamente cepas virulentas, se considera el segundo grupo, y están asociadas a lesiones precursoras de CG, como la atrofia glandular y metaplasia intestinal. Algunas cepas de *H. pylori* tienen genes de patogenicidad que causan daño a la mucosa gástrica y se asocian a diferentes tipos de gastritis, úlceras y adenocarcinoma gástrico, Figura 2 (Correa, 2011). Por último, los factores socioeconómicos, higienicosanitarios, la dieta y la infección por helmintos (respuesta protectora Th2), se deben considerar como otros determinantes medioambientales del riesgo de CG Figura 1. (Correa, 2011).

Figura 1. Factores de *H. pylori*, del hospedero y externos que determinan el riesgo de CG.  
 Fuente: Correa, P. (2011). Cáncer gástrico: Una enfermedad infecciosa. *Rev. colomb. Cir.*, 26(2), 111-117.

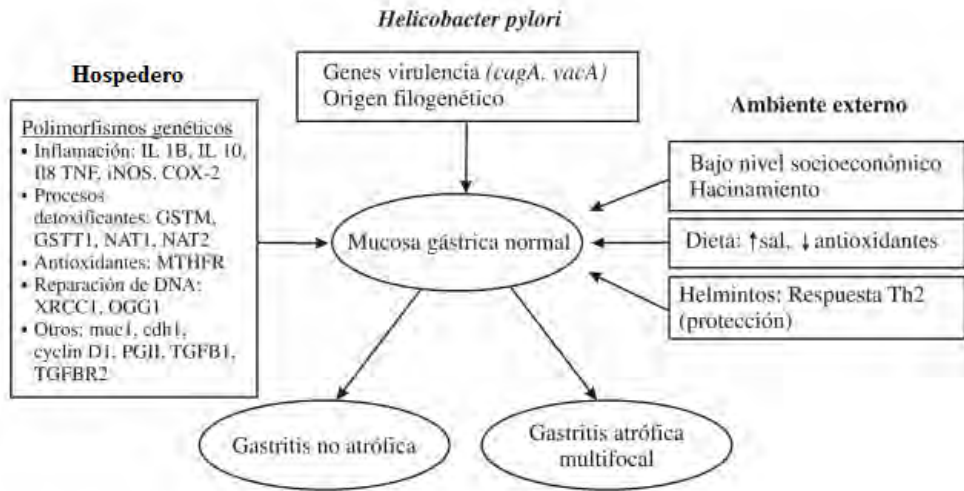
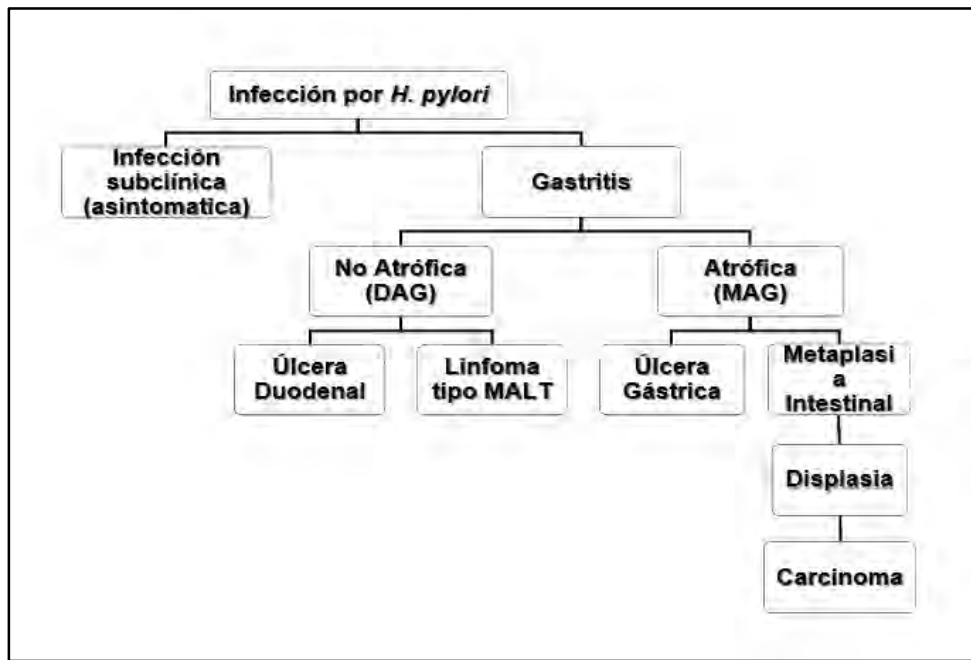


Figura 2. Consecuencias de la infección por *H. pylori*. DAG: gastritis antral difusa, MAG: gastritis atrófica multifocal, Linfoma MALT: linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa.  
 Fuente: Correa, P. (2011). Cáncer gástrico: Una enfermedad infecciosa. *Rev. colomb. Cir.*, 26(2), 111-117.



Las consecuencias de la infección por *H. pylori* son bastante variables. Aunque más de la mitad de la población mundial está infectada por esta bacteria, no todos los individuos desarrollan la enfermedad clínica evidente, de estos, una proporción que supera el 50% son asintomáticos (Ramírez & Sánchez, 2008; Serrano, Hernández, De la Garza, & Herrera, 2009).

Los infectados por cepas virulentas de *H. pylori* que padecen afecciones gástricas, permanecen como tal o presentan cambios evolutivos a través del tiempo que llevan a complicaciones secundarias en un buen número de los casos (Rodríguez & Vanegas, 2009). La infección por *H. pylori* causa un proceso inflamatorio denominado gastritis (Correa, 2011). Un estudio encontró que las cepas de diferente origen evolutivo al hospedero se asocian con lesiones precursoras de CG más avanzadas que las cepas de igual origen ancestral del hospedero (Kodaman, et al., 2014).

El modelo de patogénesis del CG descrito por Correa. (2011), indica que la infección de pacientes que viven en regiones de bajo riesgo de CG es asintomática y frecuentemente la gastritis es de tipo no atrófica. La infección prolongada y severa puede resultar en la formación de úlceras y/o pérdida de tejido glandular (atrofia). Los sujetos que desarrollan úlceras duodenales no están en riesgo aumentado de CG. Por el contrario, pacientes con úlceras gástricas suelen tener gastritis atrófica multifocal y alto riesgo de CG. Algunos pacientes con gastritis atrófica desarrollan metaplasia intestinal y eventualmente un porcentaje muy pequeño de ellos avanza a displasia y adenocarcinoma, (Figura 2). Menos del 1% de los sujetos infectados desarrollan CG.

### **2.3 RESPUESTA INMUNE A LA INFECCIÓN POR *H. pylori***

La infección por *H. pylori* puede persistir durante toda la vida del individuo y causar o no manifestaciones clínicas, pero siempre ocasiona una respuesta inmunitaria que va desde un leve infiltrado inflamatorio hasta el desarrollo de ulceraciones e inclusive neoplasias (Sánchez, Giono, & Maldonado, 2010).

El daño tisular está mediado por residuos de ureasa, mucinasa (desdobla la mucina del moco gástrico), fosfolipasas, y las citotóxicas *vacA* y *cagA*, que inducen el daño de las células

epiteliales y junto a los lipopolisacáridos bacterianos estimulan la respuesta de tipo inflamatorio (Th1) (Marcano, Infante, Rangel, Rojas, & Vivas, 2006).

*H. pylori* es capaz de activar y promover la diferenciación de linfocitos Th0 (CD4+) los cuales, según el patrón de citoquinas presentes en el medio y de las condiciones inmunológicas propias del individuo, pueden diferenciarse en Th1 mediando una respuesta inflamatoria de tipo celular o bien Th2 con una respuesta de tipo humoral. Las respuestas celulares mediadas a través de citoquinas tipo Th1 tales como: interferón- $\gamma$  (*IFN- $\gamma$* ), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* ) e *IL-1* conducen a una respuesta celular; mientras que las citoquinas tipo Th2 como *IL-4* e *IL-5* promueven una respuesta de tipo humoral. Esto debido a que en algunos pacientes suele encontrarse una respuesta de tipo protectora (Th2), persistente sin daños mayores, mientras que en otros puede existir una respuesta celular proinflamatoria (Th1), que tiene implicaciones en la patogénesis del CG (Marcano, et al., 2006).

## **2.4 POLIMORFISMOS DEL HOSPEDERO Y CÁNCER GÁSTRICO**

La infección con *H. pylori* juega un papel importante en la patogénesis del CG, sin embargo, la progresión hacia el cáncer probablemente depende de los efectos patogénicos de la bacteria, la susceptibilidad del hospedero y de los factores ambientales. En este contexto, varios factores genéticos del hospedero se estudian como posibles determinantes de riesgo de CG. Los polimorfismos genéticos más estudiados con relación a un mayor riesgo de CG son los relacionados con la protección de la mucosa (*MUC-1* y *MUC-6*), con la respuesta inflamatoria (*IL-1 $\beta$*  y *TNF- $\alpha$* ) y genes del complejo mayor de histocompatibilidad (Correa, 2003).

### **2.4.1 Aspectos generales de las citoquinas**

Una característica esencial del sistema inmune es la capacidad que tienen sus diferentes componentes de interactuar directa o indirectamente, mediante contacto célula – célula o mediadores llamados citoquinas. Las citoquinas son glicoproteínas solubles de bajo peso molecular secretadas por células del sistema inmune o por células de otros órganos y sistemas como respuesta a estímulos específicos. Estos mediadores son capaces de generar, estimular y

favorecer la diferenciación de distintas líneas celulares y de regular la síntesis de otras citoquinas y mediadores humorales del sistema inmune (Kuchroo, Sarvetnick, Hafler, & Nicholson, 2001; Razelle & Moshe, 2006).

En los mecanismos de activación de la inmunidad innata e inflamación se producen citoquinas que estimulan o inhiben el crecimiento de procesos tumorales; las denominadas proinflamatorias promueven el desarrollo tumoral, mientras que las anti inflamatorias interfieren en la regulación del proceso (Kuchroo, et al., 2001). En la respuesta de activación inmune adaptativa, las citoquinas estimulan el crecimiento y la diferenciación de los linfocitos. Adicionalmente, en la fase efectora de la inmunidad innata y adaptativa activan células efectoras para eliminar microorganismos y otros antígenos de manera específica (Rojas, Aristizabal, Cano, Gómez, & Lopera, 2007).

#### **2.4.2 Citoquinas proinflamatorias**

Las citoquinas proinflamatorias son distribuidas a través del torrente sanguíneo hacia diversos tejidos donde ejercen su actividad desencadenando un fenómeno de gran importancia clínica llamado: respuesta de fase aguda. En una segunda fase, los linfocitos T sintetizan citoquinas que contribuyen al desarrollo de la respuesta adaptativa y a amplificar la respuesta inflamatoria (Mora & Corado, 2003; Abbas, Lichtman, & Pillai, 2012).

La activación de células de la respuesta inmune inflamatoria esta mediada por citoquinas proinflamatorias. Las interleuquinas  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$  e  $IL-1$  inducen la activación de macrófagos, mientras que el  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1$  e  $IL-12$  se encargan de la activación de linfocitos T. Estas citoquinas producen la síntesis de otros mediadores solubles como prostaglandinas (PGs), LTs, factor activador de plaquetas (PAF) y bradikinina. Existen otras citoquinas como  $IL-4$ ,  $IL-14$ ,  $IL-10$ ,  $TGF-\beta$  que se denominan antiinflamatorias debido a que inhiben la activación de las células inflamatorias regulando antagónicamente la acción de las proinflamatorias (Soria, 2009).



### **2.4.3 Polimorfismos de Nucleótido Sencillo (SNP)**

Existen varios tipos de polimorfismos (inserciones, deleciones, cambios en el número de secuencias repetid-as), pero los más frecuentes son los [SNP's].

La gran mayoría de los SNP's tienen dos alelos los cuales están representados por una sustitución de base por otra. Los SNP's pueden estar presentes en regiones codificantes y provocar un cambio en un aminoácido; a este tipo de SNP's les conoce como "no sinónimos". Puesto que este tipo de SNP's afecta directamente la función de la proteína, muchos investigadores han centrado su atención en estudios de asociación genética en este tipo de variaciones (Checa, 2007).

Se encuentran variaciones funcionales que producen alguna enfermedad o susceptibilidad a desarrollarla. Estas variaciones se pueden localizar en la región promotora del gen, influenciando la actividad transcripcional (modulando la unión de factores de transcripción), en intrones (modulando la estabilidad de la proteína), en sitios de "splicing" (sitios donde ocurre el corte de intrones y empalme de exones) o en regiones intragénicas (Björklund, 2005; Checa, 2007).

### **2.4.4 Caracterización de polimorfismos genéticos**

Aproximadamente el 99,9% de la secuencia del ADN de dos individuos diferentes es la misma (Checa, 2007). Sin embargo, una proporción significativa de las diferencias encontradas en los individuos radica en el 0,1 % de variación, a este tipo de variaciones genéticas se les conoce como polimorfismos genéticos, los cuales representan diferentes formas en las secuencias de ADN y se distinguen de las mutaciones por su frecuencia que es mucho mayor que la de estas. Un polimorfismo es considerado como tal, cuando la frecuencia de uno de sus alelos en la población es superior al 1% (Gomes, et al., 1999).

### **2.4.5 Polimorfismos en genes de citoquinas proinflamatorias y riesgo de cáncer gástrico**

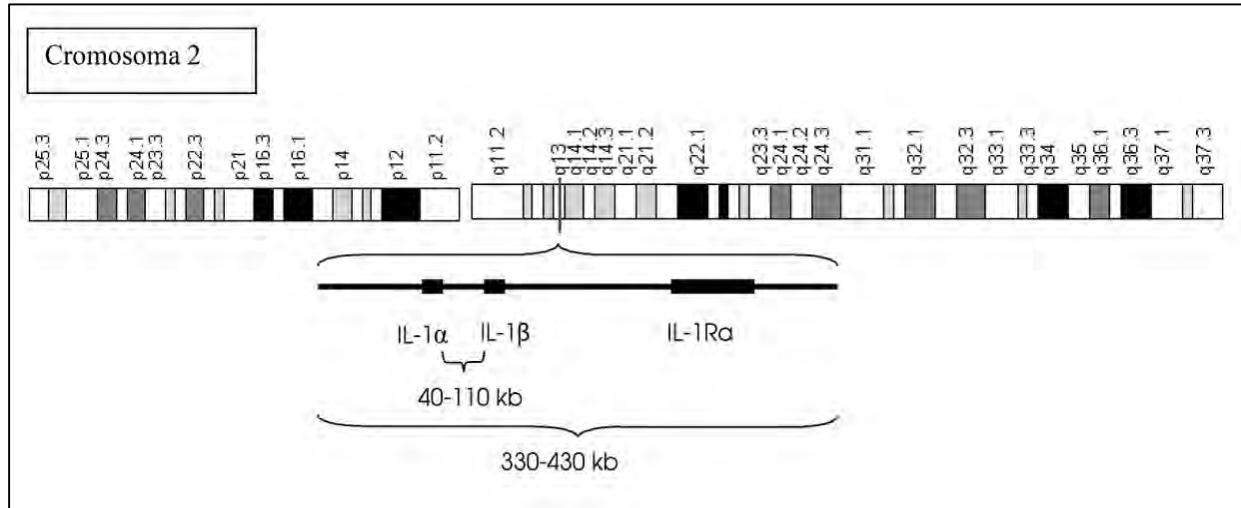
Los niveles de expresión de varias citoquinas que participan en la respuesta inflamatoria asociada con la respuesta inmune, tanto innata como adquirida, se incrementan durante la infección con *H. pylori*. Esto se debe a que los genes que codifican estas citoquinas tienen regiones

polimórficas que modifican la transcripción génica influyendo en el proceso inflamatorio que se da en respuesta a la infección. Algunos de estos polimorfismos se describen y evalúan como factores de riesgo de CG; entre ellos se encuentran los polimorfismos que afectan los niveles de expresión de los genes de las citoquinas como *IL-1β* y *TNF-α* (Bidwell, et al., 1999).

#### **2.4.5.1 Interleucina-1 (IL-1β): Polimorfismos -511 C/T**

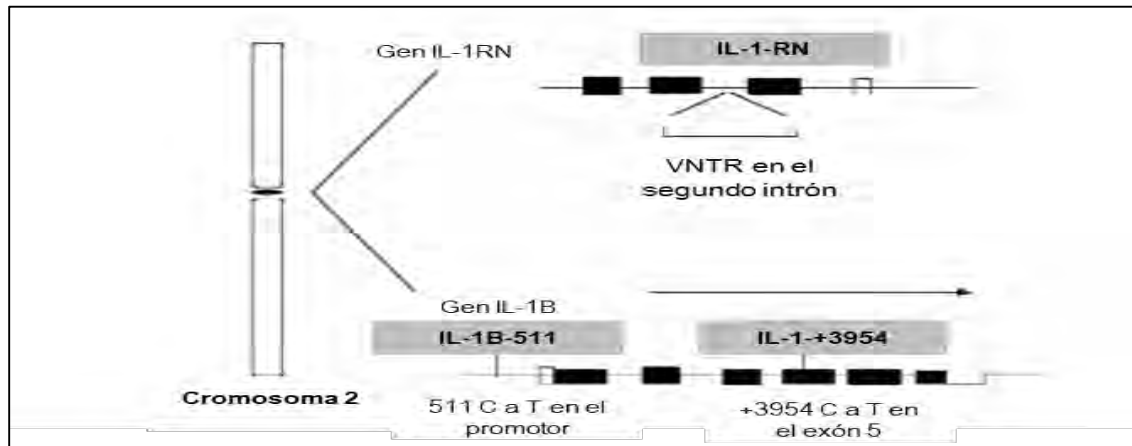
La familia de la *IL-1* comprende un grupo de genes localizados en el cromosoma 2q responsables de la producción de proteínas muy importantes en el control del proceso inflamatorio y también en la regulación de los niveles de ácido en el estómago, (Figura 3). Esta familia contiene tres genes relacionados *IL1-α*, *IL1-β* e *IL1-RN*, que codifican las citoquinas proinflamatorias IL1- $\alpha$ , IL1- $\beta$  y IL-1Ra (Mbulaiteye, Hisada, & El-Omar, 2009). La IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  son codificadas por dos genes distintos de longitudes diferentes (*IL-1A*=12 kb; *IL-1B* = 9,7 kb) con organización similar que comprende 7 exones y con una homología a nivel de ADN entre ambos de aproximadamente 45 %. El promotor de la *IL-1β* contiene una caja TATA, un motivo típico de los genes inducibles, mientras que la *IL-1α* no tiene ninguna (Dinarello, 1996). El gen de la *IL-1Ra* (receptor antagonista de la *IL-1*) también se ubica en el brazo largo del cromosoma 2 y tiene una longitud de 19.6 kb y presenta 5 exones en su estructura, Figura 4. (Hwang, et al., 2002).

Figura 3. Mapa de la región 2q12-q21 del cromosoma 2 humano. El esquema representa los brazos: corto (p) y largo (q) del cromosoma 2. La línea indica la región del brazo largo que se describe en detalle. Los genes de la *IL-1 $\alpha$* , *IL-1 $\beta$*  e *IL-1Ra* están separados aproximadamente 430 kb. El gen de *IL-1 $\beta$*  está localizado entre 40 y 110 kb de *IL-1 $\alpha$* . La distancia entre *IL-1 $\alpha$*  e *IL-1Ra* es entre 330 y 430 kb. Fuente: Vélez, S., Camargo, J., & Correa., P. (2004). Bases moleculares de la familia de la interleuquina-1. Revista Colombiana de Reumatología, 11(1), 11-39.



Durante la infección por *H. pylori* se incrementa la expresión de la *IL-1 $\beta$*  dando lugar al inicio de la respuesta inflamatoria frente a la infección y posteriormente a la amplificación de la misma. La *IL-1 $\beta$*  inhibe la secreción de ácido en la mucosa gástrica y estimula la producción de *TNF- $\alpha$* , otra citoquina asociada con un mayor riesgo de CG. Para el gen de *IL-1 $\beta$*  se describen dos polimorfismos de nucleótido único (SNP), el -31 T/C y el -511 C/T, siendo este último de particular interés en el desarrollo de CG (Figura 4) (Dinarello, 1996; Hwang, et al., 2002; Morán, et al., 2009). Este corresponde a un SNP del tipo transición Citosina/Timina en la posición -511 (-C511T). Eso significa que la base pirimidínica citosina (C) es reemplazada por la base pirimidínica adenina (T), dando lugar a dos alelos denominados *IL $\beta$  1* (alelo C normal) y *IL $\beta$  2* (alelo T mutante) (Acosta, et al., 2012).

Figura 4. Representación esquemática del mapa de los genes de *IL-1*. El esquema representa los polimorfismos del gen *IL-1RN* e *IL-1B*. Las flechas indican el sentido de la transcripción. Fuente: Morán, Y., Cañas, M., Grimán, P., Camargo, M., Rivero, M., y Chiurillo, M. (2009). Distribución de polimorfismos genéticos de interleuquina-1 en individuos de la región centroccidental de Venezuela. *Acta biol. Colomb*, 14(1), 185-194.



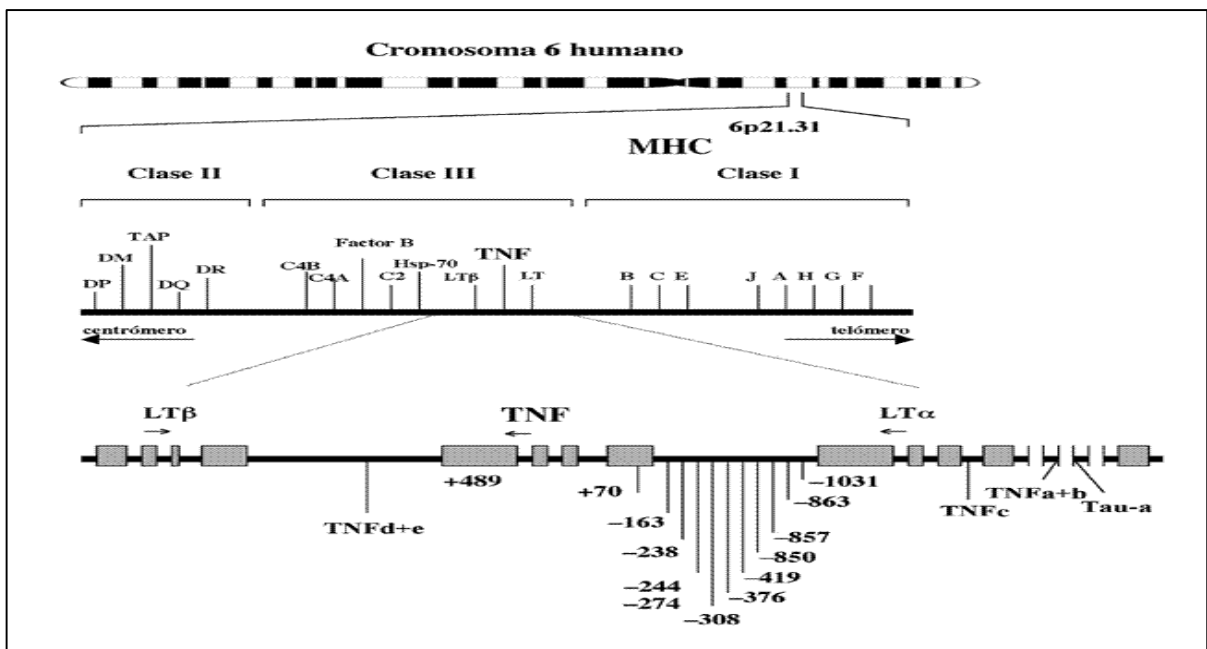
#### 2.4.5.2 Factor de Necrosis Tumoral-alfa ( $TNF-\alpha$ ): Polimorfismo -308 G/A

La sobreexpresión del Factor de Necrosis Tumoral-alfa ( $TNF-\alpha$ ) contribuye al desarrollo de varios tipos de patologías. En el caso de la infección por *H. pylori*, el  $TNF-\alpha$  incrementa la transcripción de otras citoquinas proinflamatorias y quimiocinas amplificando la cascada inflamatoria. Esta respuesta no solo resulta ineficaz para erradicar la infección, sino que paradójicamente facilita la colonización de la bacteria debido a que el  $TNF-\alpha$ , inhibe la producción de ácido en el estómago creando un ambiente que favorece la diseminación de *H. pylori*. Niveles elevados de  $TNF-\alpha$  se asocian a un mayor riesgo de CG y otras lesiones precancerosas (Beales & Calam, 1998; Aguilón, Cruzat, Cuenca, & Cuchacovich, 2002).

El aumento de la expresión de  $TNF-\alpha$  con el consiguiente desarrollo de enfermedades crónicas inflamatorias y autoinmunes se explica por la presencia de polimorfismos en su gen (Zhang, WU, Herrle, Niedergethmann, & Keese, 2012). El gen que codifica el  $TNF-\alpha$  está ubicado en el segmento correspondiente a las moléculas MHC de clase III en la región central del MHC del brazo corto del cromosoma 6 y posee una variedad de sitios polimórficos tanto en regiones codificantes como no codificantes, como se muestra en la Figura 5. Estas variantes polimórficas

pueden ser de dos tipos: la primera variante corresponde a polimorfismos mononucleotídicos (SNP's: single nucleotide polymorphisms) que implican cambios de un nucleótido en cualquier lugar del ADN, ya sea en las secuencias regulatorias en el extremo 5' (promotor), después de la región codificante (región no transcrita del extremo 3') o dentro del ADN que codifica la proteína. La segunda variante polimórfica es el ADN microsatélite que corresponde a secuencias repetitivas de ADN (generalmente C y T) no transcritas y de longitud variable ubicadas en regiones no codificantes. A pesar que estas secuencias no se transcriben a RNA mensajeros, su inserción puede alterar el plegamiento del ADN dificultando la unión de proteínas y enzimas al ADN y por consecuencia el nivel transcripcional (Botstein & Risch, 2003). Una de las mutaciones más importantes en el promotor, es la correspondiente a un SNP del tipo transición Guanina/Adenina en la posición -308 (-G308A). Eso significa que la base púrica guanina (G) es reemplazada por una base púrica adenina (A), dando lugar a dos alelos denominados *TNF 1* (alelo G normal) y *TNF 2* (alelo A mutante) (Acosta, et al., 2010).

Figura 5. Localización y organización del gen de *TNF- $\alpha$* . Ubicado en el MHC clase III, en el brazo corto del cromosoma 6 humano. Los cuadros representan exones. Se muestra la ubicación en el mapa de los microsatélites (CT)<sub>n</sub> *TNFb*, c, d y e, el microsatélite (CA)<sub>n</sub> *TNF-a* y el microsatélite Tau-a (11 ó 14 GTs). Se indica el sitio de inserción de una C en la posición +70, las transiciones G/A en las posiciones +489, -163, -238, -244, -274, -308 y -376, C/T en las posiciones -850 y -863, T/C en la posición -1031 y las transversiones G/C y C/A en las posiciones -419 y -863, respectivamente. Fuente: Aguillón, Cruzat, Cuenca, & Cuchacovich, (2002).



## **2.5 CÁLULO DE FRECUENCIAS ALÉLICAS**

Una población desde el punto de vista genético es no sólo un grupo de individuos, sino un grupo reproductivo, de forma que la constitución genética de los individuos se transmite de una generación a la siguiente. Durante dicha transmisión los genotipos de los padres se disocian y un nuevo grupo de genotipos se constituye en la progenie. Los genes transmitidos en la población de esta forma tienen continuidad de generación en generación (Björklund, 2005).

Se puede definir la frecuencia alélica o génica como el cociente resultante de dividir el número de alelos iguales en una población por el número total de alelos. El cálculo de las frecuencias alélicas se hace por recuento directo de los alelos presentes, asumiendo que la observación de un solo alelo se corresponde con la condición de homocigosis, por lo tanto, que no hay alelos nulos (Björklund, 2005).

### **2.5.1 Equilibrio Hardy-Weinberg (EH-W)**

Para describir la constitución genética de una población tendríamos que determinar sus genotipos y decir cuántos individuos existen de cada uno de ellos, pero la genética de una población no solo se refiere a la constitución genética de los individuos, sino también a la transmisión de los alelos de una generación a la siguiente. En dicha transmisión los genotipos de los padres se disocian y un nuevo grupo de genotipos se constituye en los hijos con los alelos transmitidos por los gametos, de esta forma los alelos tienen continuidad de generación en generación, pero no los genotipos portadores. La constitución genética de una población referida a los alelos se describe por el conjunto de frecuencias alélicas es decir por la especificación de los alelos presentes en cada locus y el número o proporción de los diferentes alelos en cada locus (Björklund, 2005).

Una población diploide se considera que está en equilibrio Hardy-Weinberg para un locus genético polimórfico si la proporción de genotipos observados en la población puede ser completamente definida por las frecuencias alélicas del locus en cuestión. En otras palabras, los

alelos del locus están distribuidos al azar en la población y no existe asociación entre el par de alelos que un hijo recibe de sus padres (Björklund, 2005).

En un estudio sobre variación genética debe determinarse si hay desviaciones significativas del EH-W en los *loci* estudiados. Si la proporción de genotipos para un solo locus no está en EH-W se puede atribuir a la acción de la selección sobre dicho *locus* o a la existencia de alelos nulos, pero si son varios *loci* independientes los que se desvían significativamente del EH-W, este fenómeno puede deberse a que dentro de la población existen subdivisiones, a que existe migración o flujo de genes desde una fuente externa o se están produciendo apareamientos dirigidos (no aleatorios) (Checa, 2007).

La diferencia entre la heterocigosidad observada y la heterocigosidad esperada calculada a partir de las frecuencias alélicas bajo la asunción de EH-W puede usarse como un método muy básico para detectar desequilibrios en la estructura de una población. No obstante, un método mucho más exacto es comparar la distribución de genotipos observados con la distribución esperada si la población estuviera en EH-W. Cualquier desviación significativa indicará que la población está subdividida, que existe una consanguinidad significativa o que existe un flujo de genes de otra población. Estas circunstancias pueden ser estudiadas usando test exactos o procedimientos de proporción de verosimilitud (Björklund, 2005).

### **2.5.2 Pruebas para calcular la desviación del Equilibrio Hardy-Weinberg**

Una forma clásica de comprobar la existencia de desviaciones del EH-W consiste en la comparación de los genotipos observados con los esperados dentro de una muestra. Este sistema es adecuado para polimorfismos que se caracterizan por tener pocos alelos, como es el caso de las proteínas (Björklund, 2005).

Se usa el estadístico  $\chi^2$  para detectar la discordancia de las frecuencias genotípicas para cada combinación locus/población. Se construye una tabla de contingencia de genotipos y se hace un cálculo de  $\chi^2$  con los datos de los genotipos observados frente a los esperados. Con este procedimiento se obtienen resultados aceptables cuando el tamaño de la muestra es grande y el

número de alelos de cada locus es pequeño. Cuando el tamaño de la muestra es pequeño y el número de alelos grande los valores de  $\chi^2$  no son fiables (Raymond & Rousset, 1995).

Estos inconvenientes se evitan utilizando programas informáticos que generan una distribución sintética de la población a partir de los genotipos observados. Se usan métodos como el Monte Carlo que unen alelos aleatoriamente en genotipos, repitiendo esta operación por ejemplo 1.000 veces, con lo que se produce una serie de nuevas poblaciones que son testadas para el EH-W haciendo un cálculo de  $\chi^2$ . La proporción de veces que estos  $\chi^2$  exceden el valor observado, verifica la probabilidad de equivocarse al rechazar la hipótesis nula (no desviación del EH-W). Como alternativa se pueden usar algoritmos en cadena de Markov para un cálculo no sesgado de la probabilidad exacta (Malfertheiner, et al., 2007).



### 3. ESTADO DEL ARTE DE LA INVESTIGACIÓN

*H. pylori* infecta la mucosa gástrica de la mitad de la población mundial y es el principal factor de riesgo para CG (El-Omar, et al., 2003; Correa, 2011; Correa & Piazzuelo, 2012). Menos del 1% de los individuos infectados acaban desarrollando CG. Este hecho, junto con la no existencia de una cepa que se asocie de forma específica al desarrollo de CG, hace presuponer que los factores genéticos dependientes del hospedero pueden influir en la génesis de la enfermedad. (Matínez & García, 2010).

En los últimos años se reporta un considerable interés por el papel de la susceptibilidad genética del hospedero, representada por el análisis de polimorfismos implicados en el control de la respuesta inmune, probablemente como consecuencia de la importancia que el equilibrio entre mediadores pro y antiinflamatorios tiene en el mantenimiento de la integridad de la mucosa gastrointestinal (Matínez & García, 2010).

Polimorfismos de genes que codifican para citoquinas con características proinflamatorias como *IL-1 $\beta$ -511* y *TNF- $\alpha$ -308*, cuyos valores están aumentados en la mucosa gástrica de pacientes con infección por *H. pylori* (Schneider, Weydig, & Wessler, 2009; Arango, Jaramillo, Montealegre, & Bohórquez-Delgado, 2010). Además, estas variantes polimórficas han sido el foco de más de 200 estudios y representan un importante papel en la investigación de la carcinogénesis gástrica (Wex, Bornschein, & Malfertheiner, 2009; Santos, Ladeira, Pedrazzoli, & Ribeiro, 2012).

El-Omar y colaboradores (2002) publicaron por primera vez la asociación del gen *IL-1 $\beta$*  promotor de los polimorfismos *IL-1 $\beta$ -511* y -31 con un incremento en el riesgo de desarrollar CG. Según los autores, aquellos individuos portadores de *IL1 $\beta$ -31* presentaban un riesgo mayor de desarrollar hipoclorhidria crónica en respuesta a la infección por *H. pylori*. Posteriormente, los mismos autores en el año 2003, describen un perfil genético proinflamatorio que incluyó las variantes alélicas *IL1 $\beta$ -511T* y *TNF- $\alpha$ -308A* como un factor de riesgo asociado con el desarrollo de CG de localización distal, independiente del tipo histológico. Estos estudios fueron confirmados por (Machado, et al., 2001; Furuta, et al., 2004).

Sin embargo, los resultados de los estudios varían dependiendo de las poblaciones muestreadas, sin que haya un consenso claro sobre su rol en la patogenia del CG. Furuta, et al. (2004), realizaron un meta-análisis que reporta una asociación positiva de los alelos T del polimorfismo de nucleótido único *IL1 $\beta$ -511* con CG en individuos caucásicos, pero no en asiáticos. Estudio que se confirmó por Wang, et al. (2007), en el que comparan por meta-análisis estudios efectuados por diversos autores en países de Europa, Asia y América, mostrando que existe un mayor riesgo de presentar CG cuando el alelo T del polimorfismo *IL-1 $\beta$  -511* se presenta.

Lo anterior contrasta notablemente con lo descrito por Kamangar, et al. (2006) y García, et al. (2007) en poblaciones caucásicas, donde no se encontró asociación estadísticamente significativa entre *IL1 $\beta$ -511* y el riesgo de CG. Por lo tanto, estos estudios no apoyan la hipótesis que los polimorfismos implicados en la respuesta inflamatoria confieran diferencias en el riesgo de CG entre los diferentes individuos.

Estas discrepancias en los resultados obtenidos podrían explicarse por variaciones en las frecuencias de los “alelos de riesgo” en las diferentes poblaciones analizadas (Martínez *et al.*, 2014). Zambon, et al. (2004) ponen de manifiesto la necesidad de realizar grandes estudios poblacionales en diferentes áreas geográficas para realmente determinar la influencia de dichos polimorfismos en la susceptibilidad del CG.

Por otra parte, los resultados asociados al aumento de riesgo de cáncer y lesiones preneoplásicas en portadores del alelo *TNF- $\alpha$ -308* e infectados por *H. pylori* son controversiales. El estudio de Kato, et al. (2006) y el meta-análisis de Peleteiro, et al. (2010) no hallaron asociación entre el genotipo *TNF- $\alpha$ -308* con las lesiones preneoplásicas. Un estudio realizado en Brasil revela que no hay asociación entre los genotipos de *TNF- $\alpha$ -308* y el desarrollo de CG y atribuyen esta discrepancia a la heterogeneidad de la población (Santos, et al., 2012). Resultados similares se reportan en poblaciones de Europa, Asia y Centroamérica (Rad, et al., 2003; Li, et al., 2005; Garza-González, et al., 2005).

En contraste Gorouhi, et al. (2008), concluyen que *TNF- $\alpha$*  genotipo -308 AA se asocia con un aumento de riesgo CG estadísticamente significativo. Además, Machado, et al. (2003) y El-Omar, et al. (2003) en sus trabajos asocian al alelo A de este polimorfismo con mayor secreción de *TNF- $\alpha$*  y mayor riesgo de CG.

En Colombia son pocos los estudios que han analizado la susceptibilidad genética al CG. Arango, et al. (2010) observaron la prevalencia del gen *IL-1β* en enfermedades gástricas benignas y malignas, encontrando que el genotipo CC en la región polimórfica -31, se encontró con mayor frecuencia en los pacientes con enfermedades benignas. Torres, et al. (2004) estudiaron la asociación de *TNF-α-308* con CG, ellos encontraron que la frecuencia del polimorfismo G/A del *TNF-α* en las personas infectadas con *H. pylori* fue de 18% en la población con CG y de 7% en el grupo control.

Los resultados encontrados por Martínez & García (2011) sugieren que la respuesta pro-inflamatoria y la virulencia de la bacteria son factores relacionados con los diferentes desenlaces ocasionados por la infección por *H. pylori* en la población estudiada; así, el polimorfismo *IL-1β-511* es un factor relacionado con CG y ulcera duodenal.

Martínez y colaboradores (2014) realizaron un estudio de varios polimorfismos (*1β-511*, *1RN*, *10-819*, *10-1082*, *TNF-α-308*) y encontraron asociación entre el genotipo *IL-1β-511TT* y metaplasia intestinal (MI), sin otras asociaciones entre los diferentes polimorfismos y las lesiones preneoplásicas. Los resultados del estudio aceptaron la hipótesis nula de no asociación con las lesiones preneoplásicas gástricas, por lo que se hace necesarios estudios futuros que incluyan la ancestría genética para un mejor análisis de estos polimorfismos que se caracterizan por gran variabilidad en las frecuencias alélicas de acuerdo con las poblaciones ancestrales, al igual que se necesitan investigaciones que evalúen la asociación hallada de *IL1β-511* con la MI.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la asociación de los polimorfismos de los genes de las citoquinas proinflamatorias *IL-1 $\beta$ -511* y *TNF $\alpha$ -308* con las lesiones precursoras de CG en pacientes infectados con *H. pylori* del Municipio de Tumaco-Nariño.

#### 4.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

##### - Objetivo específico 1

Estimar las frecuencias alélicas de los polimorfismos de los genes de citoquinas *IL-1 $\beta$ -511* y *TNF $\alpha$ -308* en pacientes infectados con *H. pylori* provenientes del municipio de Tumaco (zona de bajo riesgo de CG).

Hipótesis 1: Las frecuencias alélicas de los polimorfismos de los genes de citoquinas proinflamatorias *IL-1 $\beta$ -511* y *TNF $\alpha$ -308* en pacientes provenientes del municipio de Tumaco (zona de bajo riesgo de CG) se encuentran en EH-W.

##### - Objetivo específico 2

Analizar los perfiles polimórficos de *IL-1 $\beta$ -511* y *TNF $\alpha$ -308*, y su posible asociación con lesiones precursoras de GC en la población estudiada de Tumaco-Nariño.

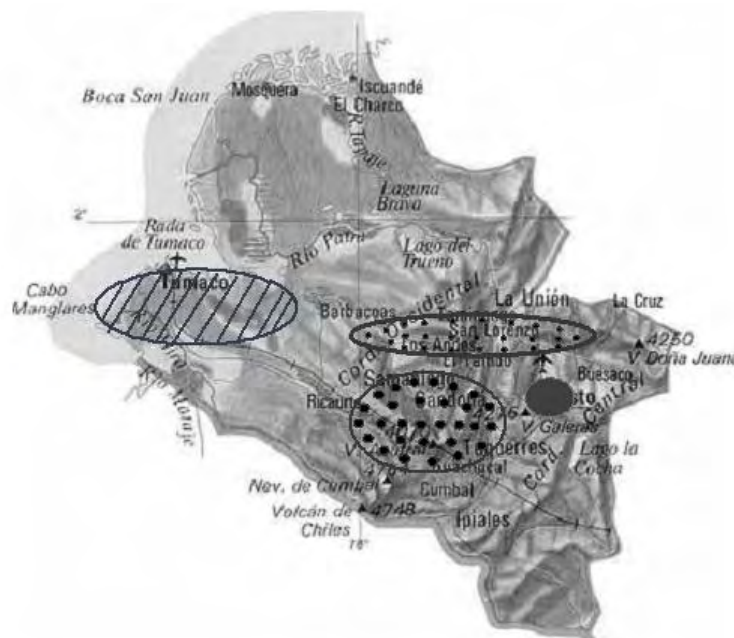
Hipótesis 2: Los polimorfismos de los genes de las citoquinas *IL-1 $\beta$ -511* y *TNF $\alpha$ -308* están asociados con las lesiones precursoras de CG observadas en la población de estudio.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 ZONA DE ESTUDIO

El presente estudio se realizó en el municipio de Tumaco ubicado en la costa Pacífica Nariñense, caracterizada por la baja incidencia de CG, menor prevalencia de lesiones precursoras de malignidad (gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal y displasia) y alta prevalencia de infección por *H. pylori*. Las características culturales, sociales, étnicas, geográficas, ambientales y genéticas de los pobladores de la zona de estudio son factores que la definen como una zona de baja incidencia de CG (6/100.000 habitantes) (Figura 6). Por el contrario, existen otras dos zonas de Nariño que se caracterizan por alta prevalencia de la infección por el patógeno y la alta incidencia de CG: La zona Andina (150/100.000 habitantes), y zona de Pasto y municipios circunvalares (46/100.000 habitantes). Este fenómeno de contraste en la incidencia de CG en el departamento de Nariño se conoce como “enigma Nariñense” o “enigma costeño” (Figura 6) (Correa, 2003).

Figura 6. Zonas de incidencia de CG en el departamento de Nariño. Círculos punteados: Zona da alta incidencia de CG. Círculo con líneas perpendiculares: Zona de baja incidencia. Círculo relleno: Zona de incidencia intermedia Fuente: Tomado y modificado de Bedoya, U. A., Sansón, F., Yépez, Y., Santacruz, C., Cifuentes, Y., Calvache, D., & Bedoya, G. A. (2012). Prevalencia y severidad de las lesiones precursoras de malignidad en un área de alto riesgo de cáncer gástrico. *Rev Col Gastroenterol*, 27(4), 275-281.



## **5.2 DISEÑO DE ESTUDIO**

El estudio realizado fue de tipo cuantitativo, transversal prospectivo, con elección de pacientes por conveniencia de un estudio previo (Bravo & Pazos, 2010), provenientes del municipio de Tumaco del departamento de Nariño-Colombia. Fueron considerados dentro del estudio todos los pacientes que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

### **5.2.1 Criterios de inclusión**

1. Firma del consentimiento informado.
2. Hombres y mujeres mayores de 40 años.
3. Pacientes con infección por *H. pylori*.
4. Pacientes con condición médica y física estable.
5. Pacientes con síntomas de dispepsia.

### **5.2.2 Criterios de exclusión**

Fueron excluidos todos los pacientes que no cumplieron con los criterios de inclusión, además de:

6. Pacientes con CG u otro tipo de cáncer.
7. Pacientes que decidieron retirarse del estudio.
8. Pacientes con enfermedades crónicas.
9. Pacientes con terapia específica contra *H. pylori*.

### 5.2.3 Estimación del tamaño de la muestra

Se determinó que el tamaño de muestra fue de 81 pacientes de Tumaco que participaron en el proyecto previo "Susceptibilidad antimicrobial según factores de virulencia de aislados de *H. pylori* en pacientes con gastritis crónica" (Bravo & Pazos, 2010), proyecto financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación COLCIENCIAS (1106-40820549, Contrato RC. No.301-2007) y la Universidad del Valle.

El tamaño de la muestra se calculó según la fórmula de comparación de dos proporciones (Marrugat, Vila, Pavesi, & Sanz, 1998), con base en las frecuencias del polimorfismo *IL-1β-511* reportadas en Martínez, et al., (2014), los valores de las frecuencias fueron de 0,76 y 0,59 ( $p < 0,05$ ) para pacientes con GCNA y pacientes con GCA respectivamente, provenientes de zona de riesgo alto y otra de riesgo bajo para CG.

Para el cálculo se estableció una confiabilidad del 92% y una potencia del 80%, valores mínimos considerables para realizar el cálculo del tamaño de la muestra y ser aceptado (Llopis, 2012): La proporción 7:2 (3,5) se determinó según el estudio previo, donde el grupo de individuos con GCNA es 3,5 veces mayor que el grupo de individuos con GCA.

$$n = \frac{(Z_{\alpha}(\pi(1 + \theta)(1 - \pi))^{\frac{1}{2}} + Z_{\beta}(\theta\pi_1(1 - \pi_1) + \pi_2(1 - \pi_1))^{\frac{1}{2}})^2}{\theta\delta^2}$$

$p_1$  = Prevalencia en el grupo con GCNA

$p_2$  = Prevalencia en el grupo con GCA

$Z_{\alpha}$  = Riesgo deseado (92% de confiabilidad)

$Z_{\beta}$  = Riesgo deseado (80 % de potencia).

$\Phi = 3,5$

### **5.3 CONSIDERACIONES ÉTICAS**

Esta investigación es parte del macroproyecto titulado “Biomarcadores de susceptibilidad humana a cáncer gástrico en el departamento de Nariño” Contrato RC # 693-2014, suscrito entre la Universidad de Nariño y Programa Nacional de Ciencia y Tecnología en Salud-COLCIENCIAS y cuenta con el aval del Comité de Ética de la Universidad de Nariño (Anexo 1).

### **5.4 TRABAJO DE CAMPO**

#### **5.4.1 Procedimiento de captación de pacientes**

El objetivo de esta actividad fue identificar pacientes adultos sintomáticos incluidos en el estudio. El sitio destinado para este fin fue el Hospital San Andrés de Tumaco, como entidad coejecutora. Se apoyó esta actividad con tres personas entrenadas para la captación, el diligenciamiento de la encuesta y la firma de consentimiento informado y con recursos físicos, como el calendario del trabajo de campo e información previa sobre lista de participantes de Tumaco y un manual de procedimientos de captación de pacientes que se obtuvo de la investigación “Susceptibilidad antimicrobial según factores de virulencia de aislados de *H. pylori* en pacientes con gastritis crónica” (SV) (Bravo & Pazos, 2010). Con la información requerida se construyó una base de datos con nombres y apellidos, dirección, barrio, comuna, número de celular y código del paciente de la cohorte SV. Con estos datos un Biólogo, una Tecnóloga en Promoción de la Salud y una enfermera fueron contratados para tal fin. Los profesionales de apoyo residentes en el municipio de Tumaco, se contactaron con los pacientes por vía telefónica y visita domiciliaria según comuna, barrios, y lugar de residencia para explicar los objetivos del estudio y planificar su participación. Las personas que mostraron interés en participar en la investigación se les asignó una cita con fecha y hora en el hospital San Andrés de Tumaco.



#### **5.4.2 Procedimiento para obtener firma de consentimiento informado y diligenciamiento de la encuesta.**

El objetivo de esta actividad fue la obtención del consentimiento. Al inicio del estudio, a los participantes se les explicó en qué consiste el formato de consentimiento. Una enfermera entrenada, el personal científico de apoyo que incluyó los estudiantes de pregrado del programa de Biología, bajo la coordinación del investigador principal aplicaron los procedimientos para obtener el consentimiento y diligenciamiento de la encuesta. Las siguientes formas se encuentran disponibles en los archivos del proyecto: Registro local de participantes, consentimiento informado y encuesta diligenciada.

Se programaron de 15 a 20 pacientes por día, a cada uno se les asignó un turno según la hora; la atención se realizó de manera individual, ofreciendo un saludo cordial y expresando agradecimiento por el tiempo prestado para participar en el estudio. Las preguntas formuladas al paciente se relacionaron con sus datos sociodemográficos, familiares, alimentarios, antecedentes de salud, de vivienda y la evolución de la enfermedad gástrica después de haber participado en el estudio previo.

A cada participante se le realizó la lectura de manera clara y en voz alta de la forma de consentimiento (Anexo 2), relacionada con los objetivos, tipo y cantidad de muestras y características del estudio actual. Las personas que accedieron a la firma del consentimiento informado y ser parte del estudio se les solicitó el documento de identidad para corroborar sus datos personales. Las dudas existentes acerca de este documento fueron aclaradas durante la lectura del mismo.

Se dio a conocer a cada participante que tendría libertad de negarse a continuar con las actividades del estudio en cualquier momento, derecho a una copia de la forma de consentimiento si surgían dudas posteriores; que los procedimientos de toma de muestra de sangre y moleculares no tendrían ningún costo y que la encuesta fue de carácter anónimo y confidencial.

### **5.4.3 Toma de muestras de sangre**

La obtención de muestras de sangre de los participantes estuvo a cargo de personal de enfermería, este procedimiento se llevó a cabo por punción de la vena media cubital en condiciones asépticas, basales y en ayunas. Previa rotulación de los tubos de colección de sangre según protocolo de rotulación y almacenaje, se recolectaron 3 alícuotas de 5 mL de sangre en una sola venopunción en tubos (No high altitude, Vacutainer) tapa lila con anticoagulante (EDTA) y un tubo con 5 ml de sangre total sin anticoagulante tapa roja. Para reducir la probabilidad de hemolisis y la formación de micro-coágulos, se agitaron levemente los tubos.

Los tubos fueron previamente rotulados con el ID del paciente (ejemplo: 001), iniciales de nombres y apellidos (ejemplo: JACC), la fecha de extracción de la sangre y el número del tubo (Tx1, Tx2, Tx3).

Las muestras fueron transportadas en posición vertical en neveras de icopor con geles y pilas refrigerantes (4°C – 8°C) para conservar la integridad de las muestras, hasta su posterior almacenamiento y procesamiento en el laboratorio de Microbiología Molecular de la Universidad de Nariño y de Biología Molecular de la Universidad Cooperativa de Colombia (UCC) de la ciudad de Pasto.

## **5.5 PROCEDIMIENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

### **5.5.1 Extracción de ADN genómico de sangre humana**

El ADN genómico fue obtenido a partir de sangre periférica total mediante el kit de extracción DNA isolation Kit Ultra Clean Blood Spin (MO BIO, Mobio Technologies Inc, San Diego, EU), siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 3). Las muestras de ADN se almacenaron en un freezer (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) a una temperatura de -20 °C.

Para visualizar el ADN genómico se corrió en un gel de agarosa al 1,5 % (Bioline, Meridian Life Science, Inc, Memphis, US), en buffer TAE 1X (40mM Tris acetate, 1 mM EDTA) (MO BIO, Mobio Laboratorios Inc, San Diego, US). Las muestras se prepararon con 2 µL de buffer de carga

(Fermentas, Thermo Fisher scientific, Waltham, US), 2  $\mu$ L de agente intercalante (EZ-vision, AMRESCO, Solon, US) y 5  $\mu$ L de ADN. La corrida electroforética se realizó en una cámara de electroforesis HU-10 (Topac, Topac Inc, Cohasset, US) con buffer TAE 1X (MO BIO, Mobio Laboratorios Inc, San Diego, US) a 100 V durante 40 min. Para determinar el tamaño del ADN se utilizó un marcador de tamaño molecular de 1000 pb (Bioline, Meridian Life Science, Inc, Memphis, US). La visualización de las bandas se realizó por exposición de los geles a luz ultravioleta con un sistema de foto documentación DigiDoc-It System (UVP, Analytik Jena, Thuringia, DE).

### **5.5.2 Cuantificación de ADN de sangre humana**

La cuantificación de la concentración de ADN extraído de las muestras se determinó por espectrofotometría usando la relación de  $Abs_{260}/Abs_{280}$ , que es de 1,8-2 para el ADN puro en espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific). Como blanco para la medición se utilizó el buffer o solución B5 del kit de extracción de ADN y la unidad de D.O a 260 para 50  $\mu$ g/mL de ADN.

### **5.5.3 Selección de los polimorfismos humanos**

El principal criterio de selección de los polimorfismos analizados se basó en su funcionalidad, determinada en numerosos estudios. En la actualidad, hay aproximadamente más de 1.400 publicaciones en PubMed que cubren más de 100 genes diferentes con polimorfismos ligados a CG. Los estudios de genes que codifican citoquinas representan aproximadamente una cuarta parte de estas publicaciones. Dentro de este subconjunto de publicaciones, los genes *IL-1 $\beta$*  y *TNF- $\alpha$*  son el foco de más de 200 estudios y representan un objetivo importante para la investigación sobre la carcinogénesis gástrica (Santos, et al., 2012).

### **5.5.4 Detección de Polimorfismos de Nucleótido Único (SNPs)**

La determinación de los polimorfismos se realizó mediante PCR-RFLP; que consistió en la combinación de dos métodos básicos en el trabajo molecular. En primer lugar, se realizó una

amplificación por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) del gen de interés, y posteriormente se realizó la digestión (o corte en fragmentos) del producto amplificado con enzimas de restricción, para ver los fragmentos resultantes o fragmentos de restricción de ese gen (Criado, 2010).

### 5.5.5 Polimorfismo -511 C/T del gen *IL-1β*

Para el estudio del polimorfismo *IL-1β-511*, se realizó la amplificación del gen *IL-1β* usando los iniciadores descritos por Arango, Jaramillo, Montealegre, & Bohórquez-Delgado, (2010), que amplificaron una secuencia de 305 pb aproximadamente (Tabla 1), la región contiene la posición variable polimórfica -511 que se caracteriza por la transición de una timina por una citosina (C/T) y hace parte del fragmento reconocido por la enzima de restricción *AvaI* (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, US).

Tabla 1

Iniciadores, secuencias y sentido para la amplificación por PCR del gen *IL-1β*

Gen	Forward	Reverse	Tamaño
<i>IL-1β</i>	5'-TGGCATTGATCTGGTTCATC-3'	5'-GTTTAGGAATCTTCCCCTT-3'	305 pb

Fuente: Arango, et al.,2010

#### 5.5.5.1 Estandarización de la PCR del gen *IL-1β*

La estandarización del protocolo de amplificación del gen *IL-1β* se determinó mediante 5 ensayos. Las concentraciones establecidas en los ensayos son modificaciones de las condiciones descritas por Arango, Jaramillo, Montealegre, & Bohórquez-Delgado, (2010). Para los ensayos 1, 2, 3 y 4 se realizaron cambios en la concentración de  $MgCl_2$ , DNTP's, iniciadores y volumen de ADN respectivamente, en el ensayo 5 se disminuyeron las concentraciones de los componentes de la PCR ( $MgCl_2$ , DNTP's, iniciadores) y volumen de ADN, Tabla 2.

Tabla 2

Variación de los componentes de PCR para estandarización de la amplificación por PCR del gen *IL-1 $\beta$*

Ensayos	1	2	3	4	5
Variación	MgCl <sub>2</sub>	dNTP's	Iniciadores	ADN	MgCl <sub>2</sub> , dNTP's, Iniciadores DNA
Componente	Concentración de trabajo				
ADN (vol.)	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L
Buffer	0,5 X	1X	1X	1X	1X
MgCl <sub>2</sub>	0,2 mM	1 mM	1 mM	1 mM	0,5 mM
dNTP's	0,5 $\mu$ M	0,1 $\mu$ M	0,2 $\mu$ M	0,2 $\mu$ M	0,1 $\mu$ M
Primer F	0,5 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	0,25 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	0,25 $\mu$ M
Primer R	0,1 U/ $\mu$ L	0,5 $\mu$ M	0,25 $\mu$ M	0,5 $\mu$ M	0,25 $\mu$ M
Taq Polimerasa	0,25U/ $\mu$ L	0,1 U/ $\mu$ L	0,1 U/ $\mu$ L	0,1 U/ $\mu$ L	0,1 U/ $\mu$ L

Fuente: Arango, et al.,2010

Se seleccionó el ensayo 5 por presentar los mejores resultados en el proceso de amplificación del gen, Figura 10. La reacción de amplificación para el gen *IL-1 $\beta$*  se llevó a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ L, bajo las condiciones de amplificación descritas en la Tabla 3.

Tabla 3

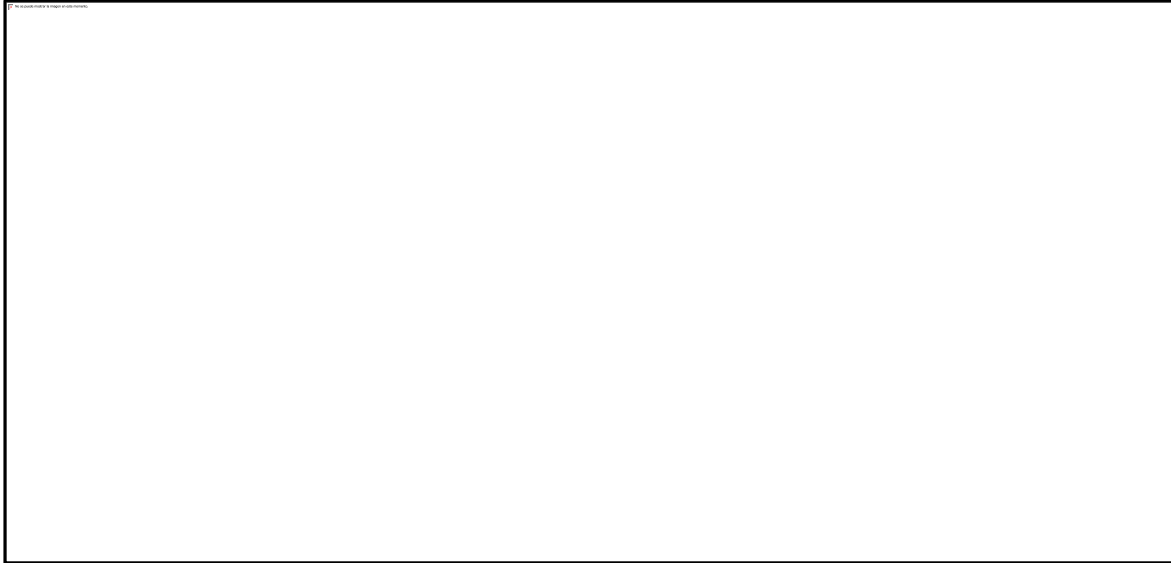
Condiciones de reacción para la PCR del gen *IL-1 $\beta$*

Componentes PCR	[Stock]	[Trabajo]	1Rx
ADN	-	-	1 $\mu$ L
Buffer de PCR	5X	1X	5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	0,5 mM	0,5 $\mu$ L
dNTP's	10 mM	0,1 mM	0,25 $\mu$ L
Primer Forward	10 $\mu$ M	0,25 $\mu$ M	0,625 $\mu$ L
Primer Reverse	10 $\mu$ M	0,25 $\mu$ M	0,625 $\mu$ L
Taq polimerasa	5 U/ $\mu$ L	0,1 U/ $\mu$ L	0,5 $\mu$ L
Agua	-	-	16,5 $\mu$ L
Volumen final			25 $\mu$ L

Fuente: Arango, et al.,2010

Como blancos se utilizaron los mismos componentes de la reacción de PCR y agua grado molecular (MOBIO, Mobio Laboratorios Inc, San Diego, EU). La reacción de amplificación para el gen *IL-1 $\beta$*  se realizó en un termociclador (G-STORM, Somerton, UK), con el programa de amplificación que se detalla en la Figura 7.

Figura 7. Programa de amplificación para el gen *IL-1B*. 1. Fase de denaturación inicial, 2. Fase de alineamiento, 3. Fase de extensión final, 4. Fase de almacenamiento. Fuente: Arango, et al. (2010). Genotipificación de los polimorfismos -511, -31 y +3954 del gen de la interleucina-1  $\beta$  humana en una población colombiana con cuadro de dispepsia. *Biomédica*, 30, 199-206



#### **5.5.5.2 Electroforesis para productos de amplificación por PCR del gen *IL-1 $\beta$***

Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% (Bioline, Meridian Life Science, Inc, Memphis, US), con buffer TAE 1X (40 mM Tris acetato, 1 mM EDTA) (MO BIO, Mobio Laboratorios Inc, San Diego, US) y 1  $\mu$ L de agente intercalante (GelRed, Biotium Inc, Hayward, US). Las muestras se prepararon con 2  $\mu$ L de buffer de carga 6X (Fermentas, Thermo Fisher scientific, Waltham, US) y 5  $\mu$ L de producto amplificado. La corrida electroforética se realizó en una cámara de electroforesis HU-10 (Topac, Topac Inc, Cohasset, US) con TAE 1X (MO BIO, Mobio Laboratorios Inc, San Diego, US) a 80 V durante 70 min. Para determinar el tamaño de las bandas resultantes se utilizó el marcador de tamaño molecular de 100 pb (Bioline, Meridian Life Science, Inc, Memphis, US). Las bandas se visualizaron por exposición de los geles a luz ultravioleta con un sistema de foto documentación DigiDBIoc–It System (UVP, Analytik Jena, Thuringia, DE).}

### 5.5.5.3 Detección del polimorfismo -511 C/T del gen *IL-1β* por PCR-RFLP

El polimorfismo *IL-1β-511* correspondió a un SNP localizado en la región promotora del gen *IL-1β* en la posición -511 (Cumbal, 2010). La reacción de digestión se realizó con la enzima de restricción *AvaI* en un volumen final de 30,2 μL durante 16 h a 37 °C, los componentes para la digestión del gen *IL-1β-511* se describen en la Tabla 4.

Tabla 4

Condiciones de digestión del gen *IL-1β* con la enzima de restricción *AvaI*

Componentes de digestión	1Rx
Amplificado de PCR	10 μL
Agua grado molecular	18 μL
Buffer Tango 10X	2 μL
<i>AvaI</i>	0,2 μL
Volumen final	30,2 μL

Fuente: Condiciones del fabricante. *Thermo Scientific*

### 5.5.5.4 Electroforesis de fragmentos de restricción del gen *IL-1β* con la enzima *AvaI*

Los productos digeridos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 3% (Bioline, Meridian Life Science, Inc, Memphis, US), con buffer TAE 1X (40mM Tris acetate, 1 mM EDTA) (MO BIO, Mobio Laboratorios Inc, San Diego, US) y 1 μL de agente intercalante (GelRed, Biotium Inc, Hayward, US). Las muestras se prepararon con 2 μL de buffer de carga 6X (Fermentas, Thermo Fisher scientific, Waltham, US) y 3 μL de producto digerido. La corrida electroforética se realizó en una cámara de electroforesis HU-10 (Topac, Topac Inc, Cohasset, US) con TAE 1X (MO BIO, Mobio Laboratorios Inc, San Diego, US) a 80 V durante 90 min. Para determinar el tamaño de las bandas resultantes se utilizó el marcador de tamaño molecular de 100 pb (Bioline, Meridian Life Science, Inc, Memphis, US). Las bandas se visualizaron por exposición de los geles a luz ultravioleta con un sistema de foto documentación DigiDoc-It System (UVP, Analytik Jena, Thuringia, DE).



La digestión de los productos de amplificación del gen *IL-1β* generó tres posibles genotipos. El genotipo homocigoto CC observado como 2 bandas de 190 y 115 pb. El genotipo heterocigoto CT observado como 3 bandas y el genotipo homocigoto TT observado como una sola banda de 305 pb aproximadamente (Cumbal, 2010) (Anexo 4).

### 5.5.6 Polimorfismo -308 G/A del gen *TNF-α*

Para el estudio del polimorfismo -308, se realizó la amplificación por PCR del gen *TNF-α* usando los iniciadores descritos por Acosta, et al., (2010), que amplifican una secuencia de 107 pb aproximadamente Tabla 5. La región contiene la posición variable -308 G/A que se caracteriza por la transición de una guanina por una adenina y hace parte del fragmento reconocido por la enzima de restricción *NcoI* (Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, US).

Tabla 5

Iniciadores, secuencias y tamaño del amplicón por PCR del gen *TNF-α*.

Gen	Forward	Reverse	Tamaño
<i>IL-1β</i>	5'AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3'	5' TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'	107 pb

Fuente: Acosta et al., 2010

#### 5.5.6.1 Estandarización de la PCR del gen *TNF-α*

La estandarización del protocolo de amplificación por PCR del gen *TNF-α* requirió de 4 ensayos. Las concentraciones definidas en el ensayo 1, (Tabla 6) son condiciones descritas por Criado, (2010).

Para los protocolos de amplificación por PCR de los demás ensayos se optó por seguir las recomendaciones establecidas por Serrato, Flores, Aportela, & Sierra, (2014) y reducir la concentración de iniciadores, MgCl<sub>2</sub>, y Taq polimerasa, Tabla 6.

Las concentraciones de los ensayos 2, 3 y 4 son modificaciones realizadas a partir de lo establecido por Arango, et al. (2010). En los ensayos 2 y 3 se usaron las concentraciones descritas en el ensayo 5 para la amplificación del gen *IL-1 $\beta$*  Tabla 4.

Tabla 6

Variación de los componentes de PCR para la estandarización de la amplificación del gen *TNF- $\alpha$* .

Ensayos	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo4
Variación	Volumen final 12,5uL	MgCl <sub>2</sub> , DNTP's, Iniciadores y DNA (vol 25 uL)	MgCl <sub>2</sub> , DNTP's, Iniciadores y DNA (vol 12,5uL)	Buffer de PCR y MgCl <sub>2</sub>
Componentes	Concentración de Trabajo			
ADN	0,5 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
Buffer de PCR	1 X	1 X	1 X	0,5X
MgCl <sub>2</sub>	3 mM	0,5 Mm	0,5 Mm	1,5 Mm
DNTP's	0,2 mM	0,1 Mm	0,1 Mm	0,1 Mm
Primer Forward	0,5 $\mu$ M	0,25 $\mu$ M	0,25 $\mu$ M	0,25 $\mu$ M
Primer Reverse	0,5 $\mu$ M	0,25 $\mu$ M	0,25 $\mu$ M	0,25 $\mu$ M
Taq polimerasa	0,5 U/ $\mu$ L	0,1 U/ $\mu$ L	0,1 U/ $\mu$ L	0,1 U/ $\mu$ L

Fuente: Criado, 2010; Arango, et al., 2010; Serrato, et al., 2014

Se escogió el ensayo 4 por presentar los mejores resultados en el proceso de amplificación del gen, como el protocolo óptimo de amplificación del gen *TNF- $\alpha$* , ver Figura 12.

La reacción de amplificación se llevó a cabo usando las mismas cantidades de la mezcla para la amplificación del gen *IL-1 $\beta$*  descritas en la Tabla 3.

Como blancos se utilizaron los mismos componentes de la reacción de PCR y agua grado molecular (MOBIO, Mobio Laboratorios Inc, San Diego, EU). La reacción de amplificación se realizó en un termociclador (G-STORM, Somerton, UK), con el programa que se detalla en la Figura 8.

Figura 8. Programa de amplificación para el gen *TNF- $\alpha$* . 1. Fase de denaturación inicial, 2. Fase de alineamiento, 3. Fase de extensión final, 4. Fase de mantenimiento. Fuente: Acosta, O., Solano, L., Oré, D., Salazar, A., Sandoval, J., & Fujita, O. (2010). Polimorfismo -308 G/A en la región promotora del gen factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) en diferentes subpoblaciones peruanas. Revista Horizonte Médico, 10(1), 47-54.



#### **5.5.6.2 Electroforesis para productos de amplificación por PCR del gen *TNF- $\alpha$***

Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% (Bioline, Meridian Life Science, Inc, Memphis, US), con buffer TAE 1X (40 mM Tris acetato, 1 mM EDTA) (MO BIO, Mobio Laboratorios Inc, San Diego, US) y 1  $\mu$ L de agente intercalante (GelRed, Biotium Inc, Hayward, US). Las muestras se prepararon con 2  $\mu$ L de buffer de carga 6X (Fermentas, Thermo Fisher scientific, Waltham, US) y 5  $\mu$ L de producto amplificado. La corrida electroforética se realizó en una cámara de electroforesis HU-10 (Topac, Topac Inc, Cohasset, US) con TAE 1X (MOBIO, Mobio Laboratorios Inc, San Diego, US) a 80 V durante 70 min. Para determinar el tamaño de las bandas resultantes se utilizó el marcador de tamaño molecular de 100 pb (Bioline, Meridian Life Science, Inc, Memphis, US). Las bandas se visualizaron por exposición de los geles a luz ultravioleta con un sistema de foto documentación DigiDoc-It System (UVP, Analytik Jena, Thuringia, DE).

### 5.5.6.3 Detección del polimorfismo -308 G/A del gen *TNF- $\alpha$* por PCR-RFLP

El polimorfismo del gen *TNF- $\alpha$ -308*, correspondió a un SNP localizado en la región promotora del gen *TNF- $\alpha$*  en la posición -308 (Criado, 2010). La región polimórfica -308 fue reconocida en los productos de amplificación del gen *TNF- $\alpha$*  con la enzima de restricción *NcoI*. La digestión con la enzima se llevó a cabo durante 16 h a 37 °C. Los componentes necesarios para la reacción de digestión se describen en la Tabla 7.

Tabla 7

Condiciones de digestión del gen *TNF- $\alpha$*  con la enzima de restricción *NcoI*

Componentes de digestión	1Rx
Amplificado de PCR	10 $\mu$ L
Agua grado molecular	18 $\mu$ L
Buffer Tango 10X	2 $\mu$ L
Enzima de restricción <i>NcoI</i>	0,3 $\mu$ L
Volumen final	30,3 $\mu$ L

Fuente: Condiciones del fabricante. *Thermo Scientific*

### 5.5.6.4 Electroforesis de fragmentos de restricción del gen *TNF- $\alpha$* con la enzima *NcoI*

Los productos digeridos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 4% (Bioline, Meridian Life Science, Inc, Memphis, US), con buffer TAE 1X (40mM Tris acetato, 1 mM EDTA) (MO BIO, Mobio Laboratorios Inc, San Diego, US) y 1  $\mu$ L de agente intercalante (GelRed, Biotium Inc, Hayward, US). Las muestras se prepararon con 2  $\mu$ L de buffer de carga 6X (Fermentas, Thermo Fisher scientific, Waltham, US) y 3  $\mu$ L de producto digerido. La corrida electroforética se realizó en una cámara de electroforesis HU-10 (Topac, Topac Inc, Cohasset, US) con TAE 1X (MO BIO, Mobio Laboratorios Inc, San Diego, US) a 80 V durante 90 min. Para determinar el tamaño de las bandas resultantes se utilizaron marcadores de tamaño molecular de 50 y 100 pb (Bioline, Meridian Life Science, Inc, Memphis, US). Las bandas se visualizaron por exposición de los geles a luz

ultravioleta con un sistema de foto documentación DigiDoc–It System (UVP, Analytik Jena, Thuringia, DE).

El corte con la enzima de restricción *NcoI* generó bandas características para cada genotipo. Para el genotipo normal homocigoto del alelo G (GG) se obtuvieron fragmentos de 20 y 87 pb; el genotipo heterocigoto (AG) generó fragmentos de 107, 87 y 20 pb; mientras que el genotipo homocigoto para el alelo A (AA) generó un fragmento no digerido de 107 pb (Acosta, et al., 2010) (Anexo 5).

## 5.6 ANÁLISIS GENÉTICO

Objetivo específico 1: Una vez determinado el genotipo de los individuos, se estimaron las frecuencias alélicas calculando la proporción de cada alelo en la muestra. Las frecuencias genotípicas se determinaron calculando la proporción de individuos con cada genotipo presente en cada uno de los polimorfismos estudiados. El equilibrio de Hardy-Weinberg se calculó con base en las frecuencias alélicas y genotípicas esperadas y observadas mediante el uso del software Arlequín versión 3.01 y mediante el método de Cadenas de Markov con 100000 permutaciones (Guo & Thompson, 1992).

## 5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Objetivo específico 2: Para conocer la posible asociación entre un genotipo o alelo específico de cada uno de los polimorfismos y el riesgo de presentar lesiones precursoras de CG en presencia de *H. pylori* se aplicó el modelo de regresión logística binomial. Para poder usar este modelo se establecieron las variables significativas que podrían estar relacionadas con las lesiones precursoras de malignidad, por lo cual se realizó un análisis estadístico bivariado y una tabla de contingencia que se contrastó mediante un test de chi cuadrado ( $\chi^2$ ).

Análisis bivariado: Se determinó el valor de chi cuadrado ( $\chi^2$ ) mediante un análisis estadístico bivariado, que permitió tener una idea global sobre la asociación de los genotipos con la enfermedad gástrica. Se definieron como variables dependientes los tipos de gastritis: atrófica y no atrófica y como variables independientes los genotipos. Para este análisis se realizaron 2

pruebas: primero se incluyó el grupo con gastritis no atrófica GCNA y las lesiones precursoras de malignidad, gastritis atróficas (GCA con MI y GCA sin MI) frente a los genotipos de riesgo de CG y segundo se realizó una prueba alterna en caso de no determinar un nivel de significancia importante entre las variables evaluadas; para este análisis se incluyó un solo grupo de individuos con lesiones precursoras de CG (grupo fusionado de gastritis atrófica con y sin metaplasia), los pacientes diagnosticados con gastritis no atrófica (GCNA) y los genotipos de riesgo de CG.

Tabla de contingencia para variables sociodemográficas: Para observar el peso de otros factores de riesgo, se realizó una tabla de contingencia que de acuerdo a una prueba de  $\chi^2$  ( $p \leq 0,05$ ), permitió establecer la distribución de las variables sociodemográficas.

Regresión logística binomial: El modelo de regresión logística binomial se aplicó para conocer la posible asociación entre un genotipo o alelo específico de cada uno de los polimorfismos y el riesgo de presentar lesiones precursoras de CG en presencia de *H. pylori*, expresada como odds ratio (OR) con un intervalo de confianza del 95% (IC 95%). La regresión logística binomial se ajustó por las variables sociodemográficas significativas y por todos los polimorfismos de manera simultánea para controlar posibles efectos de unos sobre otros. Para la estimación de los OR se tomaron como referentes la población con diagnóstico de GCNA y los genotipos silvestres (no mutados) de cada polimorfismo (OR=1). El software empleado para todos los análisis estadísticos fue el SPSS Statistics versión 22.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN

En el presente estudio se analizaron un total de 81 muestras de sangre de individuos infectados por *H. pylori* provenientes del municipio de Tumaco. Se identificó que la edad promedio de los participantes fue de aproximadamente 54 años, con un rango mínimo de 41 años y un máximo de 72 años (desviación estándar:  $\pm 8,06$ ). La muestra presentó cierto predominio del género femenino, 49 mujeres (60,5%) frente a 32 hombres (39,5%). El mayor porcentaje de los individuos muestreados presentó nivel educativo bajo (77,7%). Respecto a la seguridad social el 66,7% de la muestra se encontró al momento de la encuesta afiliada al régimen subsidiado de seguridad social y vinculada (sin afiliación) que rigen a la población sin capacidad de pago al Sistema General de Seguridad Social en Salud, Tabla 8.

Tabla 8

Características sociodemográficas de 81 pacientes del municipio de Tumaco, zona de bajo riesgo de CG

Sexo (n=81)	Escolaridad (n=81)	Seguridad Social (n=81)
n (%)	n (%)	n (%)
Hombres: 32 (39,55%)	Ninguno: 15 (18,5%)	Vinculado: 12 (14,8 %)
Mujeres: 49 (60,5%)	Primaria: 24 (29,6%)	Subsidiado: 42 (51,9%)
	Bachillerato: 24 (29,6%)	Contributivo: 27 (33,3%)
	Técnico: 9 (11,1 %)	
	Tecnólogo: 1 (1,2 %)	
	Universitario: 8 (9,9 %)	

Fuente: Esta investigación

Las características sociodemográficas de los pacientes en relación a GCNA y las lesiones precursoras de CG se presentan en la Tabla 9. La mayoría de los individuos evaluados presentaron diagnóstico histológico de GCNA (77,78%), mientras que 18 (22,22%) pacientes presentaron GCA, de los cuales 13 individuos se diagnosticaron GCA con MI y 5 con GCA sin MI; resultados

concordantes de una población con características de baja prevalencia de lesiones precursoras de malignidad de CG (Correa, 2011). Se halló una diferencia significativa moderada entre GCNA, las lesiones precursoras de CG y el género. La seguridad social presentó una diferencia significativa frente a las enfermedades analizadas ( $p \leq 0,05$ ).

Tabla 9

Características sociodemográficas según lesiones precursoras de cáncer gástrico

Enfermedad	GCNA (n=63)	GCA (n=18)	<i>P</i>
Variable	n (77,78%)	n (22,22%)	
<b>Género</b>			
Femenino	42 (85,7%)	7 (14,3%)	0,054
Masculino	21 (65,6%)	11 (34,4%)	
<b>Edad (años)</b>			
41-50	29 (46,032%)	5 (27,78%)	0,601
51-60	18 (28,57%)	10 (55,56%)	
61-70	15 (23,81%)	16 (88,89%)	
≥ 71	1 (1,59%)	2 (11,11%)	
<b>Nivel de educación</b>			
Ninguno	10 (66,7%)	5 (33,3%)	0,605
Primaria	18 (75,0%)	6 (25,0%)	
Secundaria	19 (79,2%)	5 (20,8%)	
Técnico	7 (77,8%)	2 (22,2%)	
Tecnología	1 (100%)	0 (0,0%)	
Universidad	8 (100%)	0 (0,0)	
<b>Seguridad social</b>			
No asegurado	6 (50,0%)	6 (50,0%)	0,03
Subsidiado	36 (87,5%)	6 (14,3%)	
Contributivo	21 (77,8%)	6 (22,2%)	

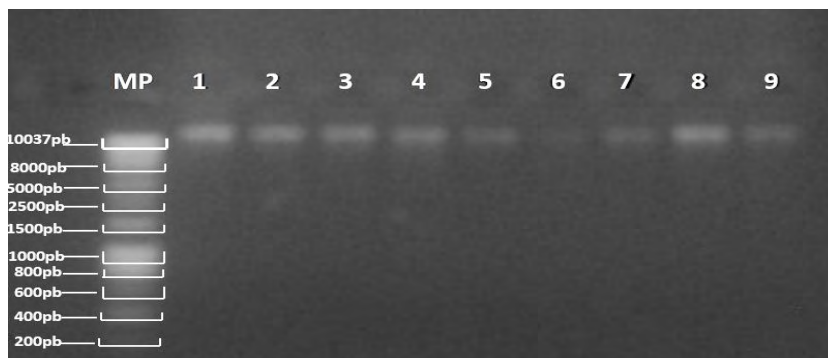
GNA: gastritis no atrófica; GCA: gastritis crónica atrófica; MI: metaplasia intestinal; p: chi cuadrado de diferencia. Fuente: esta investigación



## 6.2 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE HUMANA

La estandarización del protocolo de extracción usando el kit (UltraClean™ Blood DNA Isolation), permitió la obtención de ADN de calidad al no observar en la electroforesis degradación de las muestras (Figura 9). No obstante, se evidenciaron barridos y bandas tenues en algunas muestras de ADN asociada probablemente con la formación de coágulos de sangre, que impidieron el paso de la muestra a través de la columna de extracción y un correcto lavado y purificación de la misma.

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ADN total de sangre de pacientes de Tumaco. MP: marcador de tamaño molecular (HyperLadder de pb 1000pb), carril 1 al 9: muestras de ADN de sangre humana. Condiciones de corrida: 100 V, 40 min en buffer TAE 1X, usando cámara de electroforesis horizontal HU-10 *Topac*™. Fuente: Esta investigación.

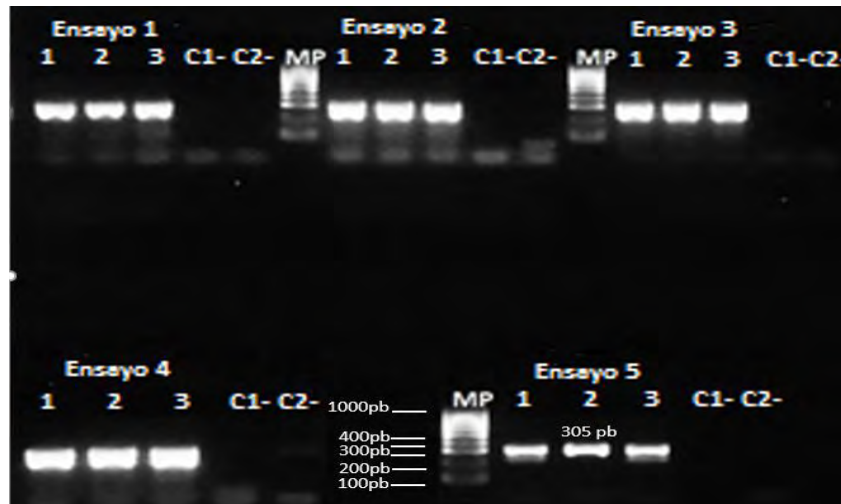


## 6.3 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS GENES *IL-1β* Y *TNF-α*

### 6.3.1 Amplificación del gen *IL-1β*

Con los ensayos 1, 2, 3 y 4 no se logró una correcta amplificación del gen *IL-1β*, puesto que se visualizaron bandas indefinidas e inespecíficas fuera del tamaño esperado de 305 pb (Figura 10).

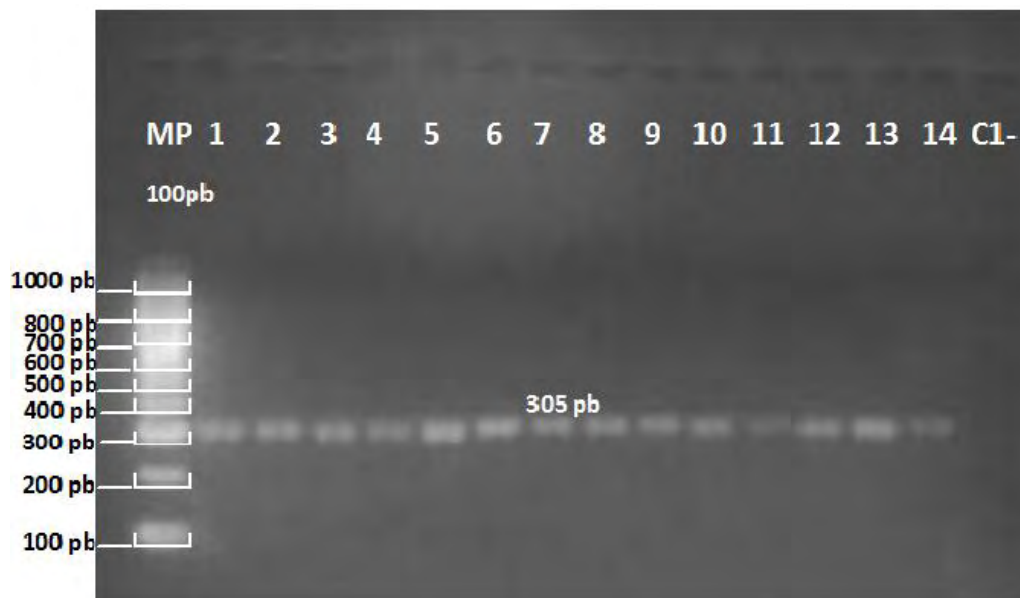
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del gen *IL-1 $\beta$* . MP: marcador de tamaño molecular de 100 pb (Bioline). Carriles 1, 2, 3 del ensayo 5 se observan bandas definidas y al nivel del fragmento de 305 pb del MP. Carriles 4 y 5: blancos, componentes de PCR sin ADN y agua respectivamente. Condiciones de corrida: 80 V, 70 min en buffer TAE 1X, usando cámara de electroforesis horizontal *Enduro*. Fuente: Esta investigación.



Los resultados de bandas no definidas se atribuyen a las concentraciones no estandarizadas de los componentes de PCR en los 4 tratamientos, o por el contrario al exceso de los componentes que generó amplificaciones inespecíficas (Hernández & Mejía, 2013).

En el ensayo 5 se lograron los mejores resultados de amplificación, la mayoría de las muestras después de la reacción de PCR resultaron en la amplificación satisfactoria de fragmentos de tamaño esperado de aproximadamente 305 pb (Figura 10 y 11), posteriormente digeridos con la enzima de restricción *Ava*I.

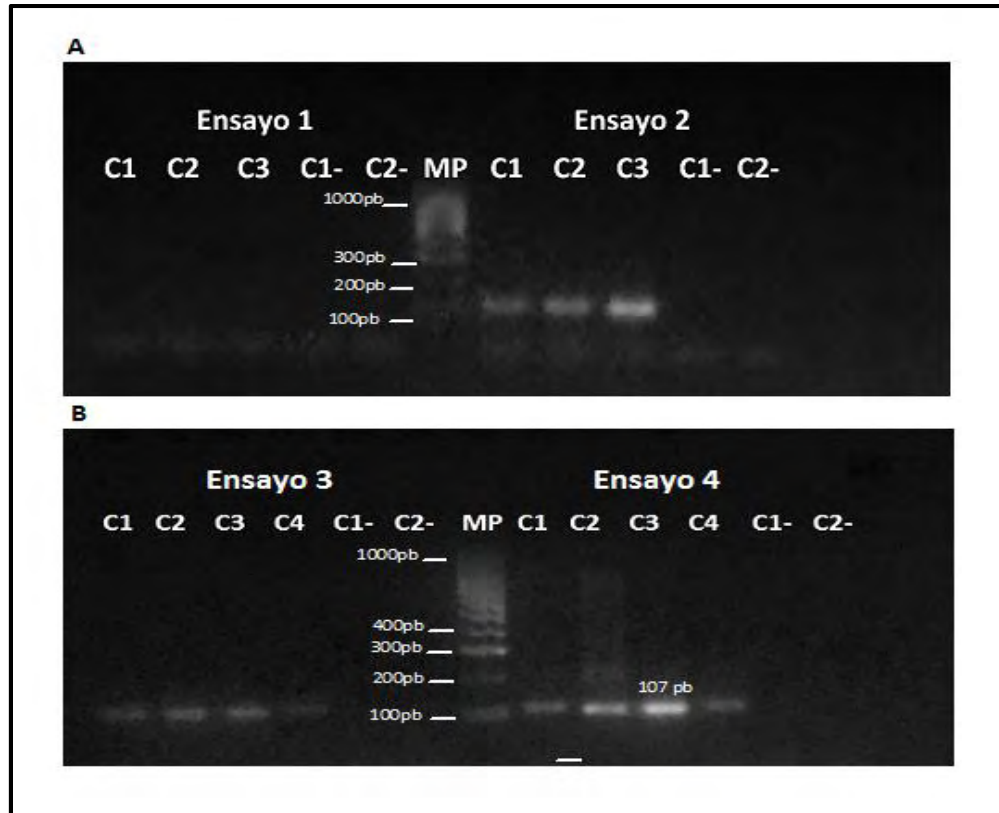
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del gen *IL-1 $\beta$* . MP: marcador de tamaño molecular de 100 pb (Bioline). Carril 1 al 14: se observan bandas correspondientes a los amplicones de 305 pb del gen *IL-1 $\beta$* . Carril C1-: blanco: componentes de PCR sin ADN. Condiciones de corrida: 80 V, 70 min en buffer TAE 1X. Fuente: Esta investigación.



### 6.3.2 Amplificación del gen *TNF- $\alpha$*

La visualización de los amplicones en el gel de agarosa del ensayo 1 no permitieron detectar bandas compatibles con el gen *TNF- $\alpha$*  (Figura 12), probablemente por la alta concentración de algunos componentes de la PCR, que disminuyeron la eficiencia de la amplificación (Tabla 5) (Serrato et al., 2014). Los ensayos 2, 3 y 4 permitieron estandarizar el método de amplificación por PCR del gen *TNF- $\alpha$* , sin embargo, la alta definición de las bandas de 107 pb observadas en el ensayo 4 definieron las condiciones del protocolo de la PCR del gen, Figura 12.

Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del gen *TNF- $\alpha$* . MP: marcador de tamaño molecular de 100 pb (Bioline). Carril 1 al 4 del ensayo 4: se observan bandas correspondientes a los amplicones de 107 pb del gen *TNF- $\alpha$* . Carril C1- y C2-: blancos: componentes de PCR sin ADN. Condiciones de corrida: 80 V, 70 min en buffer TAE 1X. A: Ensayos 1 y 2. B: Ensayos 3 y 4. Fuente: Esta investigación.



Como se describió en la sección de métodos, las condiciones óptimas para la amplificación del gen *TNF- $\alpha$*  están descritas en la Tabla 2, la mayoría de las muestras después de la reacción de PCR resultaron en la amplificación satisfactoria de fragmentos de tamaño de aproximadamente 107 pb (Figura 13), luego digeridos con la enzima *NcoI*.

Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del gen *TNF- $\alpha$* . MP: marcador de tamaño molecular de 100 pb (Bioline). Carril 1 al 13: se observan bandas correspondientes a los amplicones de 107 pb del gen *TNF- $\alpha$* . Carriles C1- y C2-: blancos: componentes de PCR sin ADN. Condiciones de corrida: 80 V, 70 min. Fuente: Esta investigación.

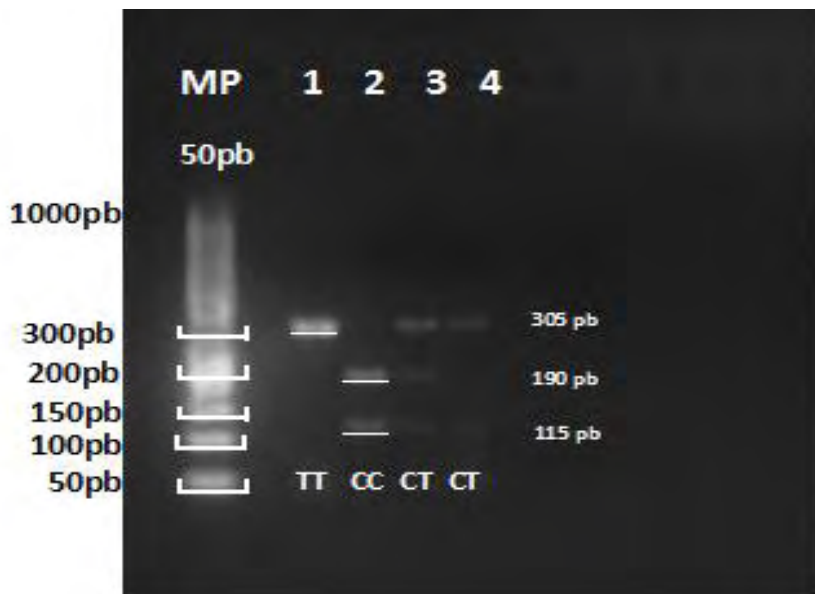


## 6.4 DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

### 6.4.1 Detección del polimorfismo -511 C/T del gen *IL-1 $\beta$* por PCR-RFLP

El corte del gen *IL-1 $\beta$*  con la enzima de restricción *AvaI* generó bandas características para cada genotipo, visualizadas en geles de agarosa al 3% (Figura 14). Para el genotipo normal homocigoto del alelo C (CC) se obtuvieron fragmentos de 190 y 115 pb, que se formaron por el reconocimiento del sitio de restricción en ambas cadenas. El genotipo heterocigoto CT generó fragmentos de 305, 190 y 115 pb que correspondieron a la longitud del amplificado y a los productos digeridos con la enzima de restricción. El genotipo homocigoto para el alelo raro T (TT) generó un fragmento de 305 pb ya que no se produjeron cortes por la ausencia de sitios reconocibles para la enzima *AvaI* (Figura 14) (Chun Li, et al., 2005; Acosta, et al., 2012).

Figura 14. Patrón electroforético de productos de digestión por PCR-RFLP del gen *IL-1 $\beta$*  con la enzima de restricción *AvaI* en gel de agarosa al 3 %. MP: Marcador de tamaño molecular de 50 pb. Carril 1: se observa banda de 305 pb que identifican el genotipo homocigoto TT. Carril 2: se observan bandas de 190 y 115 pb que identifican el genotipo homocigoto CC y carril 3 y 4: se observan bandas de 305, 190 y 115 pb que identifican el genotipo heterocigoto CT. Condiciones de corrida: 80 V por 90 min y una precorrida de 40 V por 10 min. Fuente: Esta investigación

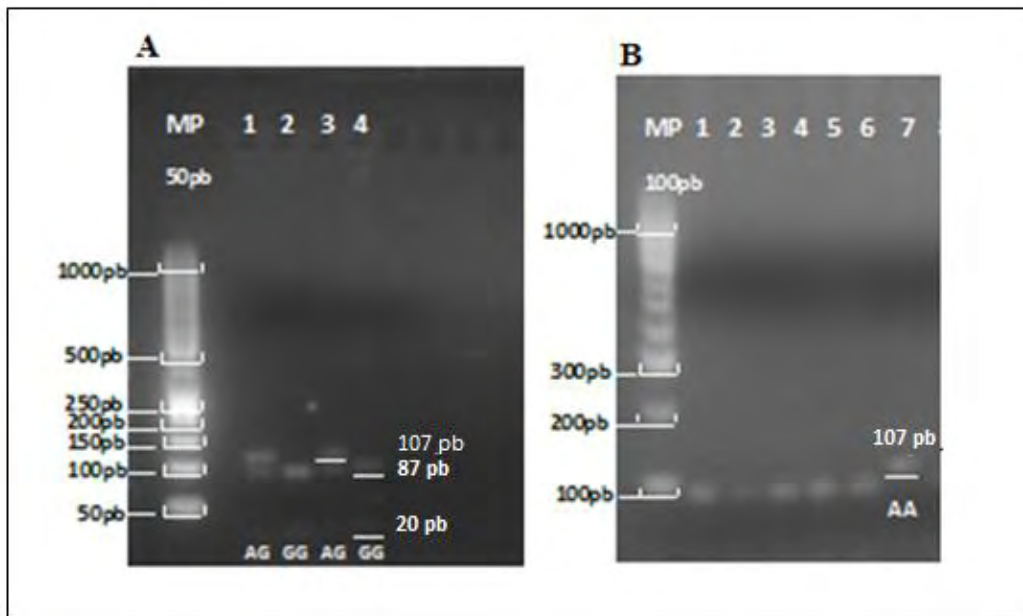


#### 6.4.2 Detección del polimorfismo -308 G/A del gen *TNF- $\alpha$* por PCR-RFLP

El corte del gen *TNF- $\alpha$*  con la enzima de restricción *NcoI* generó bandas características para cada genotipo. Para el genotipo normal homocigoto del alelo G (GG) se obtuvieron fragmentos de 20 y 87 pb, que se formaron porque la enzima reconoce el sitio de restricción en ambas cadenas del ADN amplificado, por tanto, el corte es en la misma posición. El genotipo heterocigoto AG generó fragmentos de 107, 87 y 20 pb, el fragmento no digerido correspondió a la cadena intacta del amplificado y los dos fragmentos generados fueron el resultado del reconocimiento del sitio de restricción en una sola cadena del amplicón. El genotipo homocigoto AA generó un fragmento de 107 pb, el fragmento se formó por la ausencia de sitios reconocibles para la enzima en ambas cadenas del producto amplificado, por lo cual no se produjeron cortes

(Figura 15) (Arango, et al., 2010). El fragmento de 20 pb se visualizó como una banda tenue y poco visible, resultados similares se reportan en los estudios realizados por Chun Li, et al. 2005, Torres, Acosta, Sicard, & Groot de Restrepo, 2004; Acosta, et al. 2010. (Figura 15).

Figura 15. Patrón electroforético de productos de digestión por PCR-RFLP del gen *TNF- $\alpha$*  con la enzima de restricción *NcoI* en gel de agarosa al 4 %. MP: Marcador de tamaño molecular de 50 pb. **A.** Carril 1 y 3: se observan bandas de 107, 87 y 20 pb que identifican el genotipo heterocigoto AG. Carril 2 y 4: se observan bandas de 20 y 87 pb que identifican al genotipo homocigoto GG. **B.** carril 1, 2, 3, 4, 5 y 6: se observan bandas de 20 y 87 pb genotipo homocigoto GG y en el carril 7 genotipo homocigoto AA. Condiciones de corrida: 80 V por 90 min y una precorrida de 40 V por 10 min. Fuente: Esta investigación.



## 6.5 FRECUENCIAS ALÉLICAS DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES *IL-1 $\beta$ -511* Y *TNF- $\alpha$ -308* EN PACIENTES DE TUMACO.

### 6.5.1 Frecuencias de alelos y de polimorfismos de los genes *IL-1 $\beta$ -511* y *TNF- $\alpha$ -308*

De los 81 individuos participantes se lograron analizar 78 y 79 perfiles polimórficos de *IL-1 $\beta$ -511* y *TNF- $\alpha$ -308*, respectivamente. Los datos recopilados tras la digestión enzimática y la

distribución de los genotipos y alelos observados en la población de estudio se presentan en la Tabla 10.

Se observó que para el polimorfismo *IL-1β-511*(C/T) el mayor porcentaje de individuos poseen el alelo raro T (64,47%) y el genotipo heterocigoto CT (60,26%). En cuanto al polimorfismo *TNF-α-308* (G/A) se determinó un alto porcentaje del alelo raro G (86,08%) y el genotipo homocigoto normal GG.

Tabla 10

Frecuencias de genotipos y alelos de los polimorfismos *IL-1β -511* y *TNF-α-308*

Polimorfismo	Genotipo			Alelo	
	CC	CT	TT	C	T
<i>IL1β -511</i>	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
	4 (5,13%)	47 (60,26%)	27 (34,61%)	54 (35,53%)	98 (64,47%)
<i>TNF-α-308</i>	GG	AG	AA	G	A
	61 (77,21)	15 (18,99%)	3 (3,85%)	136 (86,08%)	22 (13,92%)

Fuente: Esta investigación

### 6.5.1.1 Polimorfismo de la región *IL-1β -511* (C/T)

Se determinó que la frecuencia del alelo C fue levemente mayor en el grupo con lesiones precursoras de CG (0,4118) en relación al grupo de individuos con GCNA, por el contrario, la frecuencia del alelo T fue mayor en pacientes con GCNA. En cuanto a la frecuencia de heterocigotos, en el grupo de GCNA fue de 0,6441 y en el grupo con GCA fue de 0,4706. Del grupo de pacientes afectados, 3 individuos fueron homocigotos normales (CC), 6 fueron homocigotos raros (TT) y 8 individuos fueron heterocigotos (CT). Por otro lado, en el grupo de GCNA se encontró que un individuo fue homocigoto normal (CC), seis fueron homocigotos raros (TT) y ocho fueron heterocigotos (CT) (Tabla 11).



### 7.5.1.2 Polimorfismo de nucleótido único *TNF- $\alpha$ -308* (G/A)

La distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas se describen en la Tabla 11. En el grupo de casos con lesiones precursoras de malignidad solo se presentaron individuos con el genotipo normal GG (18 pacientes), por lo tanto, la frecuencia del alelo G fue 1. En el grupo con diagnóstico de enfermedad benigna se encontró que 43 individuos fueron homocigotos normales (GG), cuatro eran homocigotos raros (AA) y 14 fueron heterocigotos (GA). La frecuencia de los alelos G y A para este grupo fueron de 0,8197 y 0,1803, respectivamente (Tabla 11)

### 6.5.2 EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG

Se determinó en la población estudio que el grupo con lesiones precursoras de malignidad para el polimorfismo *IL-1 $\beta$ -511* se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg (EH-W), sin embargo, existieron diferencias significativas en el grupo de pacientes que presentaron enfermedad benigna ( $p=0,001$ ), grupo que no se ajusta al modelo del EH-W (Tabla 11). Las frecuencias alélicas y genotípicas de los pacientes con GCNA para el polimorfismo *TNF- $\alpha$ -308* se encontraron en EH-W. No se determinó el cálculo del modelo para el grupo de pacientes con GCA, debido a que la distribución del polimorfismo *TNF- $\alpha$ -308* se caracterizó por la ausencia del genotipo GA y AA, lo que supone que el alelo G se encuentra fijado en el grupo, sin embargo, se debe tener en cuenta que el tamaño de la muestra fue pequeño (18 individuos con genotipo GG).

Tabla 11

Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos *IL-1B-511* y *TNF- $\alpha$ -308* en gastritis no atrófica y lesiones precursoras de CG

Grupo	SNP's	Alelo	Obs	Fa	FHe	Genotipo s	Fg	Obs	Esp	P
GCNA Enfermedad benigna	IL-1 $\beta$ -511	C	40	0,34	0,64	CC	0,11	1	6,78	0,001
		T	78	0,66		CT	0,45	39	26,44	
						TT	0,44	21	25,78	
	TNF- $\alpha$ -308	G	100	0,82	0,23	GG	0,67	43	40,98	0,086
		A	22	0,18		GA	0,29	14	18,03	
						AA	0,032	4	1,98	
GCA Lesiones precursoras de CG	IL-1 $\beta$ -511	C	14	0,41	0,47	CC	0,17	3	2,88	1
		T	20	0,59		CT	0,48	8	8,23	
						TT	0,34	6	5,88	
	TNF- $\alpha$ -308	G	36	1	-	GG	-	18	-	-
		A	0	0		GA	-	0	-	
						AA	-	0	-	

CG: Cáncer gástrico; GCNA: gastritis crónica no atrófica; GCA: gastritis crónica atrófica incluye pacientes con y sin MI: metaplasia intestinal. SNP's: Polimorfismo de nucleótido único. Fa: Frecuencia alélica, FHe: Frecuencia de heterocigotos, Fg: frecuencia genotípica, Obs: Frecuencias observadas, Esp: Frecuencias esperadas. Fuente: Esta investigación.

## 6.6 PERFILES POLIMÓRFICOS DE *IL-1β-511* *TNF-α-308* Y LAS LESIONES PRECUROSAS DE CÁNCER GÁSTRICO EN TUMACO

### 6.6.1 Polimorfismos de *IL-1β-511* y *TNF-α-308* según tipo de gastritis

El análisis bivariado se realizó con el fin de establecer el valor de chi cuadrado ( $\chi^2$ ) y tener una idea general a cerca de la asociación de las enfermedades gástricas con los genotipos de cada uno de los polimorfismos. Para el polimorfismo *IL-1β-511* y *TNF-α-308* el valor de  $\chi^2$  fue 0,098 y 0,144 respectivamente (Tabla 12). Valores que indicaron que no hay diferencias entre ambos grupos.

Tabla 12

Polimorfismos de *IL-1β-511* y *TNF-α-308* según genotipos y tipo de lesión gástrica

Polimorfismo	Genotipos	Enfermedad benigna	Lesiones precursoras de CG		p
		GCNA	GCA con MI	GCA sin MI	
<i>IL-1β-511</i>	CC	1	2	1	0,098
	CT	39	6	2	
	TT	21	4	2	
<i>TNF-α-308</i>	GG	43	13	5	0,144
	GA	15	0	0	
	AA	3	0	0	

CG: Cáncer gástrico; GCNA: gastritis crónica no atrófica; GCA: gastritis crónica atrófica; MI: metaplasia intestinal; p: Chi cuadrado de diferencia. Fuente: Esta investigación.

Según los resultados de no significancia entre las lesiones y los genotipos de cada polimorfismo se optó por realizar otro análisis bivariado de la población de estudio, con el fin medir la relación entre las variables: genotipos, pacientes diagnosticados con enfermedad benigna (GCNA) e individuos con lesiones precursoras de CG; grupo que se conformó por pacientes con GCA sin MI y GCA con MI, debido a que el tamaño de la muestra en este grupo fue bajo en el análisis anterior.

El segundo análisis bivariado mostró que el polimorfismo *IL-1β-511* presentó un valor  $\chi^2$  de 0,033 y el *TNF-α-308* un valor  $\chi^2$  de 0,028, resultados que indicaron posibles diferencias entre los genotipos de los polimorfismos y los grupos con las enfermedades gástricas evaluadas (Tabla 13).

Tabla 13.

Polimorfismos de *IL-1β-511* y *TNF-α-308* según genotipos y tipos de gastritis

Polimorfismos	Genotipos	GCNA	GCA	<i>p</i>
IL-1B-511	CC	1	3	0,033
	CT	39	8	
	TT	21	6	
TNF-a-308	GG	43	18	0,028
	GA	15	0	
	AA	3	0	

CG: Cáncer gástrico; GCNA: gastritis crónica no atrófica; GCA: gastritis crónica atrófica; MI: metaplasia intestinal; p: Chi cuadrado de diferencia. Fuente: Esta investigación.

### 6.6.2 Genotipos de *IL-1β-511* y *TNF-α-308* según riesgo de gastritis no atrófica o lesión precursora de cáncer gástrico

El modelo de regresión logística binomial se aplicó para conocer la posible asociación entre un genotipo o alelo específico de cada uno de los polimorfismos y el riesgo de presentar lesiones precursoras de CG en presencia de *H. pylori*, expresada como odds ratio (OR) con un intervalo de confianza del 95% (IC 95%). La regresión logística binomial se ajustó por todos los polimorfismos y las variables sociodemográficas (género y seguridad social), que fueron significativas en relación a las enfermedades gástricas (Tabla 9). Para la estimación de los OR se tomaron como referentes la población con diagnóstico de GCNA y los genotipos silvestres de cada polimorfismo (OR=1).

Los OR para los genotipos CT y TT fueron de 0,068 y 0,095 respectivamente, resultados que indican que no se encontró un riesgo relativo significativo de los genotipos polimórficos evaluados y las lesiones precursoras de malignidad de CG. De igual forma, el alelo T (CT+TT) presentó un aumento de riesgo sin ser significativo (OR = 0,7) (Tabla 14). Los OR para el polimorfismo *TNF- $\alpha$ -308* no se lograron determinar por la ausencia de los genotipos heterocigoto AG y homocigoto con el alelo raro A (AA) en la población de estudio.

Tabla 14

Genotipos de *IL-1 $\beta$ -511* y *TNF- $\alpha$ -308* según riesgo a gastritis atrófica y no atrófica en pacientes de Tumaco

Genotipos	GCNA		GCA	
	n (%)	n (%)	OR	IC 95%
<i>IL1-<math>\beta</math>-511</i>				
CC	1 (1,64%)	3 (17,64%)	1	1
CT	39 (63,93%)	8 (47,06%)	0,068	0,0063-0,744
TT	21 (34,43%)	6 (35,29%)	0,095	0,0083-1,091
CT+TT	60 (98,36%)	14 (82,35%)	0,7	0,0071-69,18
<i>TNF-<math>\alpha</math>-308</i>				
GG	43 (70,49%)	18 (100%)	1	1
GA	15 (24,59 %)	0	0	0
AA	3 (4,92%)	0	0	0
GA+AA	18 (23,08%)	0	0	0

CG: Cáncer gástrico; GCNA: gastritis crónica no atrófica; GCA: gastritis crónica atrófica; OR: *odds ratio*; p: Chi cuadrado de diferencia. OR\*: ajustado a género y seguridad social. Fuente: Esta investigación.

En general los genotipos de los polimorfismos no presentaron un riesgo relativo significativo que los vincule directamente con lesiones precursoras de malignidad de CG en individuos infectados por *H. pylori* del municipio de Tumaco- Nariño.

Debido a que los valores obtenidos para los dos polimorfismos mostraron la tendencia de las pruebas estadísticas anteriores, al no obtenerse  $OR > 1$  para sus genotipos, se ajustaron los análisis a una nueva prueba de regresión logística, la cual permitió evaluar la interacción entre la enfermedad y otros factores que fueron significativos como el género y la seguridad social. Para la estimación de los OR se tomaron como referentes la población con diagnóstico de GCNA y el género femenino y la seguridad social contributiva ( $OR = 1$ ).

Los análisis indicaron que los hombres presentaron 4 veces más riesgo de presentar lesiones precursoras de malignidad que las mujeres ( $p = 0,05$ ), en cuanto a la seguridad social se presentó en el grupo de pacientes no asegurados un riesgo 6 veces mayor de padecer lesiones precursoras de CG frente al régimen vinculado, con una diferencia relativamente moderada ( $p = 0,06$ ) (Tabla 15)

Tabla 15.

Riesgo de lesión precursora de cáncer gástrico según género y seguridad social

Variables Sociodemográficas	Lesiones Presurosas de Malignidad (GCA)		<i>p</i>	
	OR	IC 95%		
Género	Femenino	1	1	0,05
	Masculino	4,274	0,991-18,435	
Seguridad Social	Contributivo	1	1	0,06
	Subsidiado	0,4316	0,913-49,452	
	No asegurado	6,718	0,092-2,017	

Fuente: Esta investigación

## 7. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio que evaluó la asociación de los polimorfismos *IL-1 $\beta$ -511* y *TNF- $\alpha$ -308* con lesiones precursoras de malignidad en el municipio de Tumaco-Nariño (Colombia). Para el desarrollo de esta investigación se incluyó como principal factor de inclusión pacientes con infección por *H. pylori*, múltiples estudios reportan que la infección por esta bacteria desencadena en el hospedero una respuesta inflamatoria intensa de tipo (Th1), que estimula la producción de citoquinas proinflamatorias (Yea, et al., 2001; Arango, et al., 2010; Martínez & García, 2011; Martínez, et al., 2014). Autores describen que variantes alélicas o polimorfismos producen una sobreexpresión en los genes que codifican estas citoquinas, que conllevan a la inflamación crónica de la mucosa gástrica e incrementan el riesgo de lesiones precursoras de malignidad y CG (Rad, Dossumbekova, Neu, & Prinz, 2003; Torres, et al., 2004; Santos, et al., 2012; Martínez, et al., 2014).

Dentro de los polimorfismos más estudiados se encuentran la *IL-1 $\beta$ -511* y *TNF- $\alpha$ -308*, variantes polimórficas analizadas en esta investigación por ser el foco de más de 200 estudios y representar un importante papel en la investigación de la carcinogénesis gástrica (Wex, Bornschein, & Malfertheiner, 2009; Santos, et al., 2012).

La asociación entre el polimorfismo -511 de la *IL-1 $\beta$*  y lesiones precursoras de malignidad y CG se encuentra ampliamente documentado, por ser una molécula proinflamatoria expresada después de la infección por *H. pylori* (Rad, et al., 2003; Schneider, et al., 2009). La citoquina es importante en la amplificación de la respuesta inmune ante la infección del microorganismo y es un potente inhibidor de la secreción de ácido gástrico (Rad, et al., 2003; Schneider, et al., 2009). El polimorfismo bialélico -511 se relaciona con un incremento en la producción de la interleuquina frente a patógenos, lo que genera un medio inflamatorio que puede desencadenar la transformación maligna del tejido a través de cambios moleculares y morfológicos (Cumbal, 2010).

Dado el papel fundamental y la importancia que tienen otros genes que codifican proteínas involucradas en la respuesta inflamatoria por la infección de *H. pylori*, el *TNF- $\alpha$*  está ampliamente estudiado como un potente inmunomediador asociado a la patogénesis del CG (Schneider, et al., 2009; Acosta, et al., 2010). Autores describen que una de las variantes alélicas más investigadas

es la transición de G por A encontrada en la posición -308 del promotor *TNF- $\alpha$* , este polimorfismo genera una sobreexpresión del gen lo que causa un mayor daño en el tejido gástrico (Torres, et al., 2004).

La detección de los polimorfismos en este estudio se realizó por medio de la técnica de PCR-RFLP (polimorfismo de longitud de fragmento de restricción), método extensamente empleado para el estudio de polimorfismos de un solo nucleótido, la digestión con enzimas de restricción de fragmentos de ADN conocidos, permite identificar alelos normales o mutados en un gen y por ende de genotipos, lo que resulta adecuado para determinar grupos particulares de personas con riesgo de contraer o padecer cierta enfermedad (Solarte, et al, 2012; Berg, 2012). Además, varios artículos reportan la aplicación de la técnica de PCR-RFLP para el reconocimiento de genotipos específicos y su posible asociación con lesiones preneoplásicas o CG (García, et al., 2007; Morán, et al., 2009; Acosta, et al., 2010; Kimanga, 2012; Türe, et al., 2015)

La estandarización de la PCR fue óptima para la mayoría de muestras sometidas a amplificación, sin embargo, solo se lograron analizar 78 y 79 perfiles de los genotipos para la *IL-1 $\beta$ -511* y *TNF- $\alpha$ -308*, presumiblemente por la baja concentración y calidad de ADN de algunas muestras, problemas generados por el taponamiento por coágulos de las columnas de Kit de extracción. Barrantes, (2002), sugiere que la coagulación puede deberse a que no hay una mezcla homogénea del anticoagulante del tubo colector con la muestra de sangre, que la cantidad de sangre sea superior a la del anticoagulante o por cambios abruptos en la temperatura de almacenamiento de las mismas.

## **7.1 FRECUENCIAS ALÉLICAS Y GENOTÍPICAS DE LOS POLIMORFISMOS DE LOS GENES *IL-1 $\beta$ -511* Y *TNF- $\alpha$ -308* EN PACIENTES DE TUMACO.**

### **7.1.1 Polimorfismo de la región *IL-1 $\beta$ -511* (C/T)**

Las frecuencias alélicas y genotípicas de la población de Tumaco para el polimorfismo *IL-1 $\beta$ -511* son similares a otros países de Latinoamérica. La prevalencia de la frecuencia del alelo T (64,47%) en la población de Tumaco se comporta de manera similar en países como Venezuela, Ecuador y Perú con un porcentaje de frecuencia del alelo T de 52%, 62,9% y 79% respectivamente



(Morán, et al., 2009; Cumbal 2010; Acosta, et al., 2012). Cabe destacar que un estudio realizado por Zabaleta, et al. (2008), en una población afroamericana mostró la misma tendencia de prevalencia del alelo T (53,4%), resultado relevante si se tiene en cuenta que el origen étnico de la población de Tumaco es africano (Guauque-Olarte, Fuentes-Pardo, Cárdenas-Henao, & Barreto, 2010). Por otra parte, la frecuencia de este alelo difirió de otras poblaciones de Europa y Asia, que indicaron que el alelo normal C es el más frecuente (Acosta, et al., 2012).

La frecuencia del alelo T en la enfermedad benigna y las lesiones precursoras de malignidad siguió la misma tendencia 66,1% y 58,82%, respectivamente (Morán, et al., 2009). Se mostró mayor frecuencia de genotipos heterocigotos CT, seguido por los homocigotos TT, resultados similares a los reportados por Arango, et al. (2010), en enfermedades benignas y preneoplásicas.

### **7.1.2 Polimorfismo de nucleótido único *TNF- $\alpha$ -308* (G/A)**

Las frecuencias alélicas y genotípicas de la población de Tumaco y de los subgrupos (enfermedad benigna y lesiones precursoras de malignidad) para el polimorfismo *TNF- $\alpha$ -308* siguen la tendencia mundial de baja frecuencia del alelo mutante A y un aumento significativo del alelo normal G, con mayor proporción del alelo A solo en poblaciones caucásicas (Gorouhi, Islami, Bahrami, & Kamangar, 2008; Acosta, et al., 2010). La baja frecuencia de este alelo probablemente se deba al importante acervo genético aborigen de la población afrodescendiente del municipio de Tumaco y una menor contribución caucásica (Acosta, et al., 2010).

## **7.2 EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG**

### **7.2.1 Polimorfismo -511 C/T del gen *IL-1 $\beta$***

Se presentó EH-W en el grupo con lesiones precursoras de CG para el polimorfismo *IL-1 $\beta$ -511*, ya que no se evidenciaron diferencias significativas ( $p=1$ ) y la frecuencia de los heterocigotos no excedió el 0,5 (Tabla 11), indicando que no hay desviación en el equilibrio de las frecuencias génicas y genotípicas en el grupo, lo que significa que no están bajo la influencia de

factores que las modifiquen. De acuerdo a Soriguer & Morcillo, (2007), si existe EH-W en la población estudiada (casos) se podría suponer que no existe correlación entre genotipo y enfermedad.

La desviación en el EH-W observado para *IL-1 $\beta$ -511* en la muestra de la población con enfermedad benigna (GCNA), se puede explicar porque la frecuencia de los heterocigotos fue de 0,6441 (Tabla 11). Además, la baja frecuencia del alelo C (0,339), refleja que los homocigotos para este alelo son raros y que la mayoría de las copias se encuentran presentes en los heterocigotos CT, lo que supone una alta variación genética. (Tabla 11).

En el grupo se observó una baja frecuencia de homocigotos normales con el alelo C (CC) (Tabla 11) lo que podría explicarse principalmente por fuerzas como la mutación, que están influenciando en dichas frecuencias y aun no alcanzan el equilibrio (Gutiérrez, 2010). Resultados contrastantes fueron encontrados en el estudio de Arango, et al. (2010), que reporta que poblaciones con enfermedades benignas para la *IL-1 $\beta$ -511* se encuentran en E-HW. Soriguer & Morcillo. (2007), plantean que las diferencias encontradas en algunas investigaciones sobre el EH-W cuando se estudia el riesgo de padecer una enfermedad en función de determinado genotipo de una secuencia de ADN, se debe al inadecuado tamaño de la muestra o errores en la genotipificación del polimorfismo, que producen sesgos al interpretar los resultados por ser más fácil de detectar un genotipo que otro (Inieta, Guinóa, & Moreno, 2005).

### **7.2.2 Polimorfismo -308 G/A del gen *TNF- $\alpha$***

El E-HW para este polimorfismo se presentó en la población de pacientes con enfermedad benigna. En esta población se alcanzó el EH-W a pesar de que la frecuencia del alelo G fue alta (0,8197), lo que determinó que la mayoría de individuos fueran homocigotos normales AA (43) (Tabla 11). Además, se indicó que fuerzas como la mutación posiblemente no están actuando en el grupo estudiado.

Para el grupo con enfermedades gástricas la presencia de un solo genotipo (GG) no permite el cálculo del modelo de EH-W, por no cumplir la premisa de tener al menos 2 genotipos de los 3 posibles (Acosta, et al., 2010). Es importante señalar que la frecuencia del alelo G fue de 1; cuando

un alelo alcanza una frecuencia de este valor se dice que alcanzó la fijación, lo que resultó en la pérdida del alelo mutante, este proceso puede explicarse por efecto de la deriva génica, que produce la reducción de la variación genética dentro de la población (Pierce, 2009). Este resultado es similar a otros estudios que reportan que la distribución del polimorfismo *TNF- $\alpha$ -308* se caracteriza por la ausencia del alelo A (Baena, et al., 2002) (Baena, *et al.*, 2002; Torres, et al., 2004).

En general, la distribución diferencial de las frecuencias alélicas y genotípicas en los polimorfismos estudiados pueden inducir variaciones en la respuesta inmune, la incidencia y mortalidad de CG (Zabaleta, et al., 2008). Así podría suponerse que en relación a los resultados encontrados las frecuencias alélicas y genotípicas en los polimorfismos estudiados pueden estar influyendo en la respuesta inmune del hospedero pese a que todos los pacientes muestreados presentaron infección por *H. pylori* en el municipio de Tumaco.

### **7.3 GENOTIPOS DE *IL-1 $\beta$ -511* Y *TNF- $\alpha$ -308* SEGÚN RIESGO DE GASTRITIS NO ATRÓFICA O LESIÓN PRECURSORA DE CÁNCER GÁSTRICO**

#### **7.3.1 Riesgo relativo (OR) de *IL-1 $\beta$ -511* frente a lesiones precursoras de CG**

Los OR obtenidos en este estudio para los genotipos CT (OR=0,068) y TT (OR=0,095) de *IL-1 $\beta$ -511* indicaron que no existe riesgo de asociación entre estas variantes y las lesiones precursoras de malignidad de CG; a pesar de que se observó un incremento de riesgo del alelo T (OR =0,7). Los resultados encontrados en esta investigación coinciden con diferentes investigaciones. Arango, et al. (2011), reporta que en una población colombiana con infección por *H. pylori* no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los genotipos del polimorfismo *IL-1 $\beta$ -511* y lesiones premalignas y malignas de CG. Cumbal (2010), reporta que individuos con el genotipo homocigoto *IL-1 $\beta$ -511*TT, no presentan un riesgo relativo (OR= 0,95) de padecer CG. En otras poblaciones de Latinoamérica como Honduras, Costa Rica y Venezuela se reportó que no existe asociación del polimorfismo -511 con lesiones precursoras de malignidad y CG (Morgan, et al., 2009; Melo-Barbosa, et al., 2009; Morán, et al., 2009).

A nivel mundial, metanálisis realizados por García-González, et al. (2005) & Camargo, et al. (2006), sugieren que en poblaciones asiáticas el genotipo TT no está asociado a un incremento en el riesgo de CG, en comparación a poblaciones caucásicas.

Pese al contraste de los resultados encontrados en este estudio, varios autores reportan que la *IL-1 $\beta$ -511* es determinante en el desarrollo de enfermedades gástricas relacionadas con la infección por *H. pylori*, ya que el polimorfismo incrementa el aumento de la citoquina IL-1 $\beta$  que inhibe la producción de ácido en el estómago (Rad, et al., 2003; Schneider, et al., 2008; Arango, et al., 2010). En Colombia, investigaciones relacionan el polimorfismo -511 con el desarrollo de enfermedades premalignas y malignas de CG. (Martínez, et al., 2011), indicaron que ser portador del genotipo *IL-1 $\beta$ -511*TT (OR=4,69; IC 95% 1,22-18,09) y tener infección por *H. pylori CagA+*, se asocia a un riesgo 4 veces mayor de presentar la enfermedad. Además, se encontró que una población (alta incidencia de CG) con el genotipo TT presentaba un mayor riesgo de CG (OR = 11.31; 95%CI 1.20-106.54) (Martínez, et al., 2011). Martínez *et al.* (2014), reportaron que individuos portadores del genotipo TT para el polimorfismo *IL-1 $\beta$ -511* provenientes de poblaciones de alto y bajo riesgo a CG en Colombia, presentaron una asociación positiva al CG (OR= 4,05).

Estudios realizados en otras poblaciones del mundo indican que el alelo T, presenta un incremento en el riesgo de desarrollar lesiones precursoras de malignidad y CG, en individuos infectados por el patógeno (Rad, et al., 2003; Morán, et al., 2009; Melo, et al., 2009). No obstante, el estudio realizado por Santos, et al. (2012), reporta que el genotipo CC y CT están relacionados con enfermedades gástricas y CG.

Contrario a los resultados de este estudio, Zeng, et al. (2015), afirma que el efecto de la *IL-1 $\beta$ -511* es más evidente en poblaciones de bajo riesgo de CG que en poblaciones de alto riesgo de CG. Autores proponen que los contrastantes de la asociación del polimorfismo *IL-1 $\beta$ -511* y el CG en poblaciones del mundo, son el resultado de diferencias en la composición genética de los grupos étnicos que causan efectos sobre su frecuencia (Morán, et al., 2009; Martínez, et al., 2011; Santos, et al., 2012).

### 7.3.2 Riesgo relativo (OR) de *TNF- $\alpha$ -308* frente a lesiones precursoras de CG

No fue posible determinar asociación entre el polimorfismo *TNF- $\alpha$ -308* y las lesiones precursoras de CG, debido a la ausencia de los genotipos heterocigoto CT y homocigoto TT portadores del alelo raro T. Resultados equivalentes fueron reportados en una población del suroccidente de Colombia, que indicaron que no se encontró una asociación del polimorfismo y el riesgo de CG (Torres, et al., 2004). Otros estudios, no reportan la asociación entre este marcador y el riesgo de CG, y sugieren que el polimorfismo *TNF- $\alpha$ -308* no es relevante para el riesgo de CG en poblaciones hispanas (Garza-González, et al., 2005).

En países como Brasil, Santos, et al. (2012), reportan que los genotipos del polimorfismo *TNF- $\alpha$ -308* no se asocian con enfermedades precursoras de malignidad de CG ( $p < 0,05$ ). Al igual que en poblaciones de África, donde los genotipos del polimorfismo -308 no se encuentran asociados a pacientes con GCA y CG (Essadik, et al., 2015).

Por el contrario, autores como El Omar y colaboradores (2003), reportan que el alelo *TNF- $\alpha$ -308A* presenta un incremento de riesgo significativo de CG no cardial, se refleja que el incremento fue más significativo en el genotipo homocigoto (AA) que en los heterocigotos (GA); además, el estudio concluye que la citoquina *TNF- $\alpha$*  desempeña un papel importante en la inflamación gástrica y el desarrollo de CG. Resultados que concuerdan con los obtenidos por Chun Li, et al. (2005) en una población de China. De igual manera, Gorouhi, et al. (2008), realizaron un meta-análisis que indica que *TNF- $\alpha$ -308* presenta una asociación estadísticamente significativa con lesiones a CG en poblaciones asiáticas, pero en poblaciones occidentales las frecuencias de estos marcadores genéticos a menudo muestran grandes variaciones entre los diversos grupos étnicos y raciales en su distribución.

La variación genética en poblaciones latinoamericanas como Tumaco, podría explicarse por la confluencia de europeos, amerindios y sobre todo africanos en el proceso de colonización, lo que surgió en una gran heterogeneidad genética (Morán, et al., 2009). Es decir, las frecuencias alélicas de los polimorfismos en poblaciones mixtas de América varían en relación con la contribución genética parental (Morán, et al., 2009).

### **7.3.3 Riesgo relativo (OR) de otros factores frente a lesiones precursoras de CG**

Numerosos son los factores ambientales de riesgo que se asocian con el desarrollo del CG en determinadas regiones del mundo (Ramírez & Sánchez, 2008). En este estudio, factores de riesgo como el género ( $p=0,05$ ) y la seguridad social ( $p=0,06$ ) fueron significativos en relación a las lesiones precursoras de CG.

Los hombres presentaron un riesgo 4 veces mayor que las mujeres de presentar lesiones precursoras de malignidad. Este resultado refleja la tendencia mundial que indica que el riesgo desarrollar CG es más frecuente en hombres que en mujeres, siguiendo la proporción 2:1 (Arana & Corona, 2002; Soto, et al., 2003; Yépez, Bravo, Hidalgo, Jurado, & Bravo, 2012).

En cuanto a seguridad social, las personas no vinculadas al régimen de salud mostraron un riesgo 7 veces mayor de presentar lesiones precursoras de CG (Crew & Neugut, 2006). Se ha demostrado que el riesgo de desarrollar la enfermedad está estrechamente relacionado con las condiciones socioeconómicas (Serrano, et al., 2009). En el municipio de Tumaco el bajo nivel de ingresos, la alta tasa de desempleo y pobreza (Gallo, 2012), generan un problema de salud que no permite que los pobladores accedan a la atención médica básica y a tratamientos de erradicación de la infección por *H. pylori* (Figueroa, Cortés, Pazos, & Bravo, 2012).

### **7.3.4 Biomarcadores evolutivos y polimorfismos humanos**

En la población de Tumaco son múltiples las investigaciones que tratan de explicar la alta prevalencia de infección por *H. pylori* y el bajo riesgo al que están expuesto sus pobladores a desarrollar lesiones precursoras de malignidad y CG. Kodaman, et al. (2014), estudiaron si el origen étnico y la ancestría de *H. pylori* podría incidir en el curso de las enfermedades gástricas. Los autores encontraron que la muestra estudiada del municipio de Tumaco presentaba un origen étnico africano y las cepas patógenas que infectaban la población tenían una ancestría de igual origen, por lo tanto, concluyeron que el largo periodo de co-evolución del hospedero-bacteria pudo haber condicionado a los individuos a presentar menor riesgo de CG en esta región.

Por lo tanto, es importante destacar que no se evidenció una asociación entre los polimorfismos y las lesiones precursoras de malignidad a pesar de que todos los individuos seleccionados para la realización de este estudio presentaron infección por *H. pylori* (microorganismo que provoca una fuerte respuesta inmune), lo que sugiere que posiblemente en relación a lo planteado por Kodaman, et al. (2014), la ancestría de las cepas bacterianas y el origen étnico africano de la población Tumaco podrían incidir en la distribución de las frecuencias de los polimorfismo y en la susceptibilidad genética propia del hospedero generando una baja predisposición de los pobladores del municipio de Tumaco a desarrollar lesiones precursoras de malignidad y CG.

## CONCLUSIONES

Las frecuencias alélicas del polimorfismo del gen de la citoquina proinflamatorias *IL-1 $\beta$ -511* en pacientes con lesiones precursoras de CG provenientes del municipio de Tumaco (zona de bajo riesgo de CG) se encuentran en EH-W. En contraste, la población con GCNA presentó desviación del EH-W lo que sugiere que alguna fuerza como la mutación está actuando sobre las frecuencias, sin embargo, es posible que exista un error de tipo aleatorio relacionado con el bajo tamaño de la muestra que puede estar influyendo en los resultados.

No se determinó EH-W en la población con lesiones precursoras de malignidad para el polimorfismo *TNF- $\alpha$ -308*, debido a la alta frecuencia del alelo G, que probablemente se podría explicar por un proceso de fijación de este alelo en la muestra de la población de Tumaco.

Los polimorfismos de los genes de las citoquinas *IL-1 $\beta$ -511* (OR=0,7) y *TNF- $\alpha$ -308* (no determinado) no están asociados con las lesiones precursoras de CG observadas en la población de estudio. Pese a describirse el papel fundamental que desempeñan estos biomarcadores en la susceptibilidad genética propia del hospedero en otras regiones geográficas del mundo.

Los genes de estudio no son marcadores informativos para establecer la predisposición de los pobladores de Tumaco a padecer lesiones precursoras de malignidad de CG.

No se encontraron evidencias suficientes para afirmar que la infección por *H. pylori* no incide en la sobreexpresión de los genes estudiados ya que no se encontró asociación entre los polimorfismos y las lesiones precursoras de CG en la población de estudio.

Factores como las diferencias culturales (dieta y estilos de vida) ligadas al origen étnico, posiblemente pueden estar influyendo en las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de los genes de las citoquinas proinflamatorias *IL-1 $\beta$ -511* y *TNF- $\alpha$ -308*.

Se estableció que otros factores de riesgo pueden ser determinantes en la etiología del CG en la población de estudio. El no estar vinculado al régimen de salud y pertenecer al sexo masculino se relacionaron con un alto riesgo de presentar lesiones precursoras de malignidad.



## RECOMENDACIONES

Los resultados presentes deben evaluarse teniendo en cuenta el pequeño tamaño de la muestra. Un aumento en el tamaño de las muestras podría disminuir el error aleatorio y aportar un cambio significativo a las frecuencias de los alelos mutantes de los polimorfismos estudiados. En el proyecto de “BIMRCADORES DE SUCEPTIBILIDAD HUMANA A CANCER GASTRICO EN EL DEPARTAMENTO DE NARIÑO”, posiblemente se pueda observar esta significancia ya que el tamaño de la muestra será mucho mayor.

Ampliar el estudio a otros marcadores específicos de la población Latinoamericana que desempeñen un rol importante en la respuesta inmune, podría brindar mayor información respecto a la susceptibilidad genética del hospedero frente al desarrollo de lesiones precursoras del CG.

Debido al rol patogénico y cancerígeno de *Helicobacter pylori*, es importante conocer la asociación de la existencia o ausencia de virulencia con los polimorfismos estudiados, ya que el riesgo de padecer la patología podría aumentar en presencia de los polimorfismos conjugados con un genotipo virulento de la cepa infectante.

## **PRODUCTOS ASOCIADOS**

Una investigación asociada al Trabajo de Grado se presentó en:

El V Congreso de Microbiólogos Europeos, en el evento que se denomina: Congreso ámbito internacional. Este evento fue realizado entre el 21 y 25 de Julio de 2012 en Leipzig-

El producto fue de tipo poster, y se presentó con el nombre:

“PHYLOGEOGRAPHIC ANCESTORS OF *Helicobacter pylori* IN TWO POPULATIONS IN CONTRAST TO GASTRIC CANCER RISK IN SOUTHWESTERN COLOMBIA”

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A., Lichtman, A., y Pillai., S. (2012). Inmunología celular y molecular. Madrid. España: Editorial McGraw Hill. Disponible en: [https://books.google.com.co/books?id=iQCupVehIXQC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q=inflamaci%C3%B3n&f=false](https://books.google.com.co/books?id=iQCupVehIXQC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q=inflamaci%C3%B3n&f=false) [13 diciembre 2015].
- Acosta, O., Solano, L., Huerta, D., Oré, D., Sandoval, J., Figueroa., J, *et al.* (2012). Variabilidad genética de la respuesta inflamatoria. I. Polimorfismo -511 C/T en el gen IL1 $\beta$  en diferentes subpoblaciones peruanas. *An Fac med.* 73 (3), 221-5.
- Acosta, O., Solano, L., Oré, D., Salazar, A., Sandoval, J., y Fujita, O. (2010). Polimorfismo -308 G/A en la región promotora del gen factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) en diferentes subpoblaciones peruanas. *Revista Horizonte Médico*, 10(1), 47-54.
- Aguillón, J. C., Cruzat, A., Cuenca, J., y Cuchacovich, M. (2002). El polimorfismo genético del factor de necrosis tumoral alfa como factor de riesgo en patología. *Rev. méd. Chile*, 130(9), 1043-1050.
- Alcaldía de Tumaco-Gallo V. (2012). Análisis de la situación de salud del municipio de Tumaco (Perfil Epidemiológico). Disponible en: <http://www.tumaco-narino.gov.co/apc-aa-files/30376361326136653033333064623836/perfil-epidemiologico-ao-2011-ultima-version.pdf>. [22 febrero 2016]
- Amieva, M., Emad, M., y El-Omar, E. (2008). Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*, 134(1), 306-323.
- Arana, J., y Corona, A. Cirugía general Endoscópica- Hospital Regional. (2002). Monografía: cáncer gástrico. Disponible en: <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no47-5/RFM47506.pdf>. [22 febrero 2016]
- Arango, M., Jaramillo, C., Montealegre, M., y Bohórquez-Delgado, M. (2010). Genotipificación de los polimorfismos -511, -31 y +3954 del gen de la interleucina-

- 1  $\beta$  humana en una población colombiana con cuadro de dispepsia. *Biomédica*, 30, 199-206
- Baena, A., Leung, J., Sullivan, A., Landires, J., Vasquez-Luna, N., Quiñones-Berrocal J, *et al.* (2002). TNF- promoter single nucleotide polymorphisms are markers of human ancestry. *Genes Immunity*, 3, 482-487.
- Barrantes, A. (2002). Recomendaciones para la toma de la muestra y control de calidad en el laboratorio de coagulación. *Rev Cost Cienc Méd.* 1 (2), 179-184
- Beales, I. L., y Calam, J. (1998). Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha inhibit acid secretion in cultured rabbit parietal cells by multiple pathways. *Gut*, 42(2), 227-234.
- Bedoya, U. A., Sansón, F., Yépez, Y., Santacruz, C., Cifuentes, Y., Calvache, D., y Bedoya, G. A. (2012). Prevalencia y severidad de las lesiones precursoras de malignidad en un área de alto riesgo de cáncer gástrico. *Rev Col Gastroenterol*, 27(4), 275-281.
- Berg, H. (2012). Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments (PCR-RFLP) and gel electrophoresis - valuable tool for genotyping and genetic fingerprinting. *InTech*, 51, 978-953.
- Bidwell, M. J., Keen, L., Gallagher, G., Kimberly, R., Huizinga, T., McDennott M., ... D'Alfonso, S. (1999). Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immun.* Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Grant\\_Gallagher/publication/12134387\\_Cytokine\\_gene\\_polymorphism\\_in\\_human\\_disease\\_online\\_databases/links/02bfe511d677c092f0000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Grant_Gallagher/publication/12134387_Cytokine_gene_polymorphism_in_human_disease_online_databases/links/02bfe511d677c092f0000000.pdf). [4 octubre 2015].
- Björklund, M. (2005). A method for adjusting allele frequencies in the case of microsatellite allele drop-out. *Molecular Ecology Notes*, 5, 676-679.
- Botstein, D., y Risch, N. (2003). Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet*, 33, 228-237.

- Bravo, L y Pazos, A. (2010). Susceptibilidad antimicrobial asociada a factores de virulencia de aislados de *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis crónica (tesis de pregrado). Universidad del Valle, Cali, Colombia.
- Bravo, L. E., Doorn, L. J., Realpe, J. L., y Correa, P. (2002). Virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori*: Do they explain the african enigma? *The American J of Gastroenterol*, 97(11), 2839-42.
- Checa, M. A. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*, 20(3), 213-221
- Correa, P. (2011). Cáncer gástrico: Una enfermedad infecciosa. *Rev. colomb. Cir*, 26(2), 111-117.
- Correa, P. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. (2003). *Cancer Epidemiol Biomarkers*, 12(3), 238-241.
- Correa, P., y Piazuolo, B. (2012). Evolutionary History of the *Helicobacter pylori* Genome: Implications for Gastric Carcinogenesis. *Rev: Gut Liver*, 6(1), 21-28.
- Crew, K., y Neugut, D. (2006). Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 12(3), 354-362.
- Criado, L. (2010). Asociación de polimorfismos de genes de inmunidad innata y enfermedad de Chagas en Santander (tesis de maestría). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.
- Cumbal, N. (2010). Estudio de los polimorfismos en las regiones -31(T>C), -511(C>T) y +3954(C>T) del gen *Il-1β* de interleuquina-1β mediante PCR-RFLP en población ecuatoriana con cáncer gástrico y presencia de *Helicobacter pylori*, (tesis de pregrado). Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.
- Dinarello, C. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. Disponible en: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/87/6/2095.full.pdf>. [5 octubre 2015].

- El-Omar, E. M., Carrington, M., Chow, W. H., McColl, K. E., Bream, J. H., Young, H. A., Rabkin, C. S. (2000) Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Letters to Nature*, 404(6776), 398-402.
- El-Omar, E., Rabkin, C. S., Gammon, M. D., Vaughan, T. L., Risch, H. A., Schoenberg, J. B., y Chow, W. H. (2003). Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology*, 124(5), 1193-1201.
- Essadik, A., Jouhadi, H., Rhouda, T., Nadifiyine, S., Kettani, A., y Maachi1, F. (2015). Polymorphisms of Tumor Necrosis Factor Alpha in Moroccan Patients with Gastric Pathology: New Single-Nucleotide Polymorphisms in *TNF- $\alpha$ -193 (G/A)*. *Mediators of Inflammation*. Article ID 143941, 5 pages
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, *et al*. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide. IARC CancerBase 2014;11: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 15/Jan/2014
- Figueroa, M., Cortés, A., Pazos, Á., Bravo, L. E. (2012). Susceptibilidad in vitro de *Helicobacter pylori* a amoxicilina y claritromicina obtenido a partir de biopsias gástricas de pacientes de zona de bajo riesgo para cáncer gástrico. *Biomédica*. 32(2).
- Figueroa, M., Cortes, A., Pazos, A., y Bravo, L. (2012). Sensibilidad in vitro a amoxicilina y claritromicina de *Helicobacter pylori* obtenido de biopsias gástricas de pacientes en zona de bajo riesgo para cáncer gástrico. *Biomédica*. 32, 32-42.
- Furuta, T., Shirai, N., Xiao, F., El-Omar, E., Rabkin, C. S., Sugimura, H., y Ohashi, K. (2004). Polymorphism of interleukin-1beta affects the eradication rates of *Helicobacter pylori* by triple therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2, 22-30.
- García-González, M. A., Savelkoul, P. H., Benito, R., Santolaria, S., Crusius, J. B., Peña, A. S., y Lanás, A. (2005). No allelic variant associations of the *IL-1* and *TNF- $\alpha$*  gene polymorphisms in the susceptibility to duodenal ulcer disease. *Int J Immunogenet*, 32(5), 299-306.

- García-González, M. D., Lanás, M. D., Quintero, E., Nicolás, D., Parra-Blanco, A. M. D., y Strunk, M., (2007). Gastric cancer susceptibility is not linked to pro-and anti-inflammatory cytokine gene polymorphisms in whites: A Nationwide Multicenter Study in Spain. *The American Journal of Gastroenterology*, 102, 1878-1892.
- Garza-González, E., Bosques-Padilla, F., El-Omar, E., Hold, G., 3, Tijerina-Menchaca, R., Maldonado-Garza, H., y Pérez-Pérez, G. Role of the polymorphic *IL-1B*, *IL-1RN* and *TNF- $\alpha$*  genes in distal gastric cancer in Mexico. *Int. J. Cancer*. 114, 237–241.
- Gomes, I., Collins, A., Lonjou, C., Thomas, NS., Wilkinson, J., Watson, M., y Morton, N. (1999). Hardy-Weinberg quality control. *Ann Hum Genet*, 63(6), 535-538.
- Gorouhi, F., Islami, F., Bahrami, H., y Kamangar, F. (2008). Tumour-necrosis factor- A polymorphisms and gastric cancer risk: a meta-analysis. *Br J cancer*, 98(8), 1443-1451
- Guauque-Olarte, S., Fuentes-Pardo, A., Cárdenas-Henao, H., Barreto., G. (2010). Diversidad y estructura genética de tres poblaciones afrodescendientes del suroccidente colombiano a partir de 8 STR'S. *Acta biol. Colomb.* 15 (2), 47 – 60.
- Guo, S., y Thompson, E. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48, 361-372.
- Gutiérrez, M. (2010). Genotipificación de los polimorfismos +3954 (C/T) y -511 (C/T) del gen *IL-1 $\beta$* , y -308 (G/A) del gen *TNF- $\alpha$*  en pacientes mexicanos con y sin gastritis crónica. (Tesis Maestría). Instituto Politécnico nacional-Escuela superior de medicina. Sección de estudio de posgrado e investigación. Ciudad de México D.F. México.
- Soria, A. (2009). Estudios de polimorfismos genéticos TNF-alfa (238 y 308), IL-10 (1082) MTHFR (677) y del DAS-28 como predictores de la respuesta al tratamiento con INFLIXIMAB, en la artritis reumática (Tesis doctoral). Universidad de Valencia, Valencia, España.
- Hernández, R., y Mejía, L. (2013). Análisis de la divergencia genética de ganado bovino lechero del trópico alto de Nariño mediante marcadores moleculares heterólogos de

tipo microsatélite (tesis de pregrado). Universidad de Nariño, San Juan de Pasto, Colombia.

- Hwang, I. R., Kodama, T., Kikuchi, S., Sakai, K., Peterson, L. E., Graham, D. Y., y Yamaoka, Y. (2002). Effect of interleukin 1 polymorphisms on gastric mucosal interleukin 1beta production in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*, 123(6), 1793-1803.
- Iniesta, R., Guinóa, E., y Moreno, V. (2005). Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit.* 19 (4), 333-41.
- Kamangar, F., Abnet, C. C., Hutchinson, A. A., Newschaffer, C. J., Helzlsouer, K., Shugart, Y. Y., y Taylor, P. (2006). Polymorphisms in inflammation-related genes and risk of gastric cancer (Finland). *Cancer Causes Control*, 17, 117-25.
- Kato, I., Canzian, F., Franceschi, S., Plummer, M., Van Doorn, L. J., Lu, Y., y Muñoz, N. (2006). Genetic polymorphisms in anti-inflammatory cytokine signaling and the prevalence of gastric precancerous lesions in Venezuela. *Cancer Causes y Control*, 17(9), 1183-1191.
- Kodaman, N., Pazos, A., Schneider, B., Piazuolo, B., Merad, R., Sobota, R., Correa, P. (2014). Human and *Helicobacter pylori* coevolution shapes the risk of gastric disease. *PNAS*, 111(4), 1445-1460.
- Kuchroo, V., Sarvetnick, N., Hafler, D., y Nicholson, L. (2001). Cytokines and autoimmune diseases. Totowa-New Jersey. Estados Unidos; Editorial Humana Press.
- Li, C., Xia, B., Yang, Y., Li, J., y Xia, H.H. (2005). TNF gene polymorphisms and *Helicobacter Pylori* infection in gastric carcinogenesis in Chinese population. *Am J Gastroenterol*, 100(2), 290-294.
- Machado, J. C., Figueiredo, C., Canedo, P., Pharoah, P., Carvalho, R., y Sobrinho-Simões, M. (2003). A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology*, 125(2), 364-371.



- Machado, J. C., Pharoah, P., Sousa, S., Carvalho, R., Oliveira, C., Figueiredo, C., y Sobrinho-Simões, M. (2001). Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma. *Gastroenterology*, 121, 823-829.
- Malfertheiner, P., Megraud, F., Morain, CO., Bazzoli, F., El-Omar, E., y Graham, D. (2007). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*, 56, 772-781.
- Marcano, M., Infante, F., Rangel, C., Rojas, MA., y Vivas, O. (2006). Modelo teórico de respuesta inmunológica en la mucosa gástrica en la infección por *Helicobacter pylori*. *VITAE Academia Biomédica Digital*, 26, 987-1317.
- Marín, F. (2013). Análisis de la variabilidad genética de los genes MUC y TFF de protección de la mucosa gástrica en relación al cáncer gástrico y las lesiones precursoras (tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.
- Marrugat, J., Vila, J., Pavesi, M., y Sanz, F. (1998). Estimación del tamaño de la muestra en la investigación clínica y epidemiológica. Disponible en: [https://www.uclm.es/organos/vic\\_investigacion/c\\_etica/pdf/Anexo8CEEA.pdf](https://www.uclm.es/organos/vic_investigacion/c_etica/pdf/Anexo8CEEA.pdf). [29 enero 2016].
- Martínez, B., y García-González, M. (2011). Polimorfismos en genes de baja penetrancia implicados en respuesta inmune e infección por *Helicobacter pylori*. Influencia en el desarrollo del cáncer gástrico. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-medicina-clinica-2-linkresolver-polimorfismos-genes-baja-penetrancia-implicados-90035538>. [20 septiembre 2015].
- Martínez, T., Hernández, A., Bravo, M., Trujillo, E., Pérez-García, J., Robayo, J., y Camorlinga, M. (2014). Lesiones preneoplásicas gástricas en pacientes colombianos: Asociación de polimorfismos genéticos interleucinas 1 $\beta$ -511, 1RN, 10-819, 10-1082, factor de necrosis tumoral- $\alpha$ -308 y anticuerpos Inmunoglobulina G hacia caga de *Helicobacter pylori*. *Rev Colomb Cancerol*, 18(1), 8-17.

- Mbulaiteye, S., Hisada, M., y El-Omar, E. (2009). *Helicobacter Pylori* associated global gastric cancer burden. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2654592/>. [4 octubre 2015].
- Melo-Barbosa, HP., Martins, LC., Dos Santos, SE., Demachki, S., Assumpção, MB., Aragão, CD., de Oliveira Corvelo, TC. (2009). Interleukin-1 and TNF-alpha polymorphisms and *Helicobacter pylori* in a Brazilian Amazon population. *World J Gastroenterol.* 15 (12), 1465-71.
- Mora, S., y Corado, J. (2003). *Inmunología actual*. Venezuela: Editorial Alfa Impresores.
- Morán, Y., Cañas, M., Grimán, P., Camargo, M., Rivero, M., y Chiurillo, M. (2009). Distribución de polimorfismos genéticos de interleuquina-1 en individuos de la región centroccidental de Venezuela. *Acta biol. Colomb*, 14(1), 185-194.
- Morgan, D., Domínguez, R., Temitope, K., París, H., Martin, C., F., Galanko, J. *et al.* (2009). Gastric cancer and the high combination prevalence of host cytokine genotypes and *Helicobacter pylori* in Honduras. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 4(9), 1103-11.
- Nyerere, A. (2012). Il-1b-511 allele t and il-1rn-l/l play a Pathological role in helicobacter pylori (*H. Pylori*) disease outcome in the African population. *Ethiop J Health Sci.* 22 (3).
- Peleteiro, B., Lunet, N., Barros, R., La Vecchia, C., y Barros, H. (2010). Factors contributing to the underestimation of *Helicobacter pylori*-associated gastric cancer risk in a high-prevalence population. *Cancer Causes y Control*, 21(8), 1257-1264.
- Pierce, A. (2009). *Genética: Un enfoque conceptual* (pp. 692-695). Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana. Disponible en: [https://books.google.com.co/books?id=ALR9bgLtFhYC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q=deriva&f=false](https://books.google.com.co/books?id=ALR9bgLtFhYC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q=deriva&f=false). [20 febrero 2016].

- Rad, R., Dossumbekova, A., Neu, B., y Prinz, C. (2003). Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonization during *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, 53(8), 1082-1089.
- Ramírez, A., y Sánchez, R. (2008). *Helicobacter pylori* y cáncer gástrico. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rgp/v28n3/a08v28n3.pdf>. [2 octubre 2015].
- Raymond, M., y Rousset, F. (1995). Genepop (version 3.1c): A population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86, 248-249.
- Razelle, K., y Moshe, T. (2006). *Citokynes: Interleukines and their receptors*. Massachusetts. Estados Unidos: Editorial Kluwer Academic Publishers.
- Rodríguez, A., y Vanegas, J. (2009). *Helicobacter pylori*: agresor común de la mucosa gástrica. Disponible en: [http://cmim.org/boletin/pdf2009/MedIntContenido04\\_08.pdf](http://cmim.org/boletin/pdf2009/MedIntContenido04_08.pdf). [3 octubre 2015].
- Rojas, W., Aristizabal, B., Cano, L., Gómez, L., y Lopera, D. *Inmunología de Rojas*. (2007). Medellín. Colombia. Editorial Corporación para Investigaciones Biológicas 14a ed.
- Sánchez, N. A., Giono, S., y Maldonado, C. (2010). Receptores tipo Toll, patogénesis y respuesta inmune a *Helicobacter pylori*. *Salud Pública de México*, 52, 447-454.
- Santos, J. C., Ladeira, M. S., Pedrazzoli, J., y Ribeiro, M. L. (2012). Relationship of *IL-1 $\beta$*  and *TNF- $\alpha$*  polymorphisms with *Helicobacter pylori* in gastric diseases in a Brazilian population. *Braz J Med Biol Res*, 45(9), 811-817.
- Schneider, S., Weydig, C., y Wessler, Silja. (2009). Targeting focal adhesions: *Helicobacter pylori*-host communication in cell migration. *Cell Communication and Signaling*. 6 (2).
- Serrano, A., Hernández, M., De la Garza, J., y Herrera, L. (2009). *Helicobacter pylori* y cáncer gástrico. Disponible en: <http://www.incan.org.mx/revistaincan/elementos/documentosPortada/1272302472.pdf>. [2 octubre 2015].

- Serrato, A., Flores, Ll., Aportela, J., y Sierra E. (2014). PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. En Cornejo, A., Serrato, A., Rendón, B., y Rocha, M. (Ed.), *Herramientas moleculares en ecología: Aspectos teóricos y prácticos*. (pp. 53-74). México: Editorial Secretaria de medio ambiente y recursos naturales. Disponible en:[http://www.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4\\_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/\\$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf](http://www.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf). [1 febrero 2016].
- Somma, M., y Querci, M. (2007). Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. En Querci, M., Jermini, M., y Eede, V. (Ed.), *Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos*. (pp. 34-74). Luxemburgo: Editorial Oficina de publicaciones oficiales de las comunidades europeas. Disponible en: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/User%20Manual%20ES%20full.pdf>. [1 febrero 2016].
- Soria, A. (2009). Estudios de polimorfismos genéticos TNF-alfa (238 y 308), IL-10 (1082) MTHFR (677) y del DAS-28 como predictores de la respuesta al tratamiento con INFLIXIMAB, en la artritis reumática (Tesis doctoral). Universidad de Valencia, Valencia, España.
- Soriguer, F., y Morcillo, Sonsoles. (2007). ¿Qué hacer cuando en los estudios de epidemiología biomolecular la distribución genotípica no se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg? *Endocrinol Nutr.* 54 (3), 169-73.
- Soto, G., Bautista, C., Roth, D., Gilman, R., Velapatiño, B., Ogura, M. *et al.* *Helicobacter pylori* Reinfection Is Common in Peruvian Adults after Antibiotic Eradication Therapy. *JID.* 188, 1263-1275.
- Sugimoto, M., Furuta, T., Shirai, N., Nakamura, A., Xiao, C., Kajimura M., y Hishida, A. (2007). Different effects of polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta on development of peptic ulcer and gastric cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22(1), 51-59.

- Sugimoto, M., Yamaoka, Y., y Furuta, T. (2010). Influence of interleukin polymorphisms on development of gastric cancer and peptic ulcer. *World J Gastroenterol*, 16(10), 1188-1200.
- Torres, M. (2012). La evolución humana Estudiada a través de la biodiversidad de los microorganismos. *Rev: Hipótesis, Apuntes científicos uniandinos*, 12, 62-66.
- Torres, M.M., Acosta, C.P., Sicard, D.M., y Groot de Restrepo, H. (2004). Susceptibilidad genética y riesgo de cáncer gástrico en una población del Cauca. *Biomédica*. 24, 153-162.
- Vélez, S., Camargo, J., y Correa., P. (2004). Bases moleculares de la familia de la interleuquina-1. *Revista Colombiana de Reumatología*, 11(1), 11-39.
- Wang, P., Hua-Xiang, H., Zhang, J. Y., Dai, L. P., Xu, X. Q., y Wang, K. J. (2007). Association of interleukin-1 gene polymorphisms with gastric cancer: A meta-analysis. *International Journal of cancer*, 120(3), 552-562.
- Wex, T., Bornschein, J., y Malfertheiner, P. (2009). Host polymorphisms of immune regulatory genes as risk factors for gastric cancer. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 55(4), 395-408
- Yépez, M., Bravo, I., Hidalgo, A., Jurado, D., Bravo, L. (2012). Incidencia y Mortalidad por Cáncer, Municipio de Pasto 2003-2007. Editorial universitaria. Universidad de Nariño. 43, 4.
- Zambon, C. F., Basso, D., Navaglia, F., Falda, A., Belluco, C., Fogar, P., y Plebani, M. (2004). Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology*, 126, 382-384.
- Zeng, Z-R., Hu, P-J., Hu, S., Pang, R-P., Chen, M-H., Ng, M., y Sung, J Y. (2015). Association of interleukin 1B gene polymorphism and gastric cancers in high and low prevalence regions in China. *Gut*. 52, 1684-1689.

Zhang, L., WU, G., Herrle, F., Niedergethmann, M., y Keese, M. (2012). Single nucleotide polymorphisms of genes for EGF, TGF- $\beta$  and *TNF- $\alpha$*  in patients with pancreatic carcinoma cancer. *Genomics y Proteomics*, 9, 287-296.

## ANEXOS

### Anexo 1. Aval del comité de ética del proyecto “BIOMARCADORES DE SUCEPTIBILIDAD HUMANA A CÁNCER GÁSTRICO EN EL DEPARTAMENTO DE NARIÑO”



Universidad de Nariño  
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIONES, POSTGRADOS  
Y RELACIONES INTERNACIONALES

Acta de Aprobación No. 04

#### EL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE NARIÑO.

Creado por el Sistema de Investigaciones mediante Resolución Rectoral N° 1608 de Abril 20 del 2010, el cual se rige por la Resolución N° 008430 del 4 de Octubre 1993 del Ministerio de Salud de Colombia, mediante la cual se establece las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud.

Que en relación al proyecto de investigación: “BIOMARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD HUMANA A CÁNCER GÁSTRICO EN EL DEPARTAMENTO DE NARIÑO”, certifica que:

1. Los integrantes del proyecto de investigación en mención adjuntaron los siguientes documentos:
  - Proyecto de investigación.
  - Consentimiento Informado.
  - Carta de aval del representante legal de la institución donde se realizarán la investigación.
2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité
3. Según las categorías establecidas en el artículo 11 de la resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, el presente estudio tiene el siguiente riesgo  
 Sin riesgo.       Riesgo mínimo       Riesgo mayor del mínimo
4. El Comité informará de manera inmediata a las directivas institucionales toda novedad que reciba acerca de:
  - a. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisada y aprobada por el Comité.
5. El presente proyecto ha sido aprobado por el periodo correspondiente al cronograma propuesto por los investigadores (24 meses).
6. El investigador principal deberá informar al Comité de Ética en Investigaciones de la Universidad de Nariño a saber:
  - a. Cualquier cambio que se proponga introducir en este proyecto. Estos cambios no podrán iniciarse sin la revisión y aprobación del Comité, excepto cuando sean necesarios para eliminar peligros inminentes para los sujetos,
  - b. Cualquier problema imprevisto que involucre riesgo para los sujetos u otros.
  - c. Cualquier evento adverso serio en las primeras 24 horas de ocurrido.
  - d. Cualquier conocimiento nuevo respecto al estudio, que pueda afectar la tasa riesgo/beneficio para los sujetos participantes.
  - e. Cualquier decisión tomada por otros Comités de Ética.
  - f. La terminación prematura o suspensión del proyecto explicando la razón para esto.

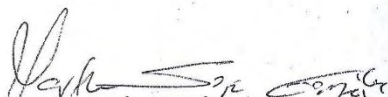


Universidad de Nariño  
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIONES, POSTGRADOS  
Y RELACIONES INTERNACIONALES

- g. El investigador principal de la Universidad de Nariño deberá presentar un informe semestral al Comité de Ética en Investigación.

Por medio de la presente, el Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Nariño, avala el proyecto arriba mencionado en el marco de los principios, políticas y procedimientos de la declaración de Helsinki, de la Asamblea Médica Mundial, de la ley 44 de 1993 de la República de Colombia y de la reglamentación vigente del Comité de Ética de la Universidad de Nariño.

Dado en Pasto a los seis (06) días del mes de Junio del dos mil catorce (2014)



MARTHA SOFÍA GONZÁLEZ INSUASTI

Presidente



## Anexo 2. Forma de consentimiento informado.

Página 1

HOSPITAL SAN ANDRES DE TUMACO  
IPS GESTIONAR BIENESTAR TUQUERRES HOSPITAL  
UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
UNIVERSIDAD DE VALLE  
FORMA DE CONSENTIMIENTO  
BIOMARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD HUMANA A CÁNCER GÁSTRICO EN EL  
DEPARTAMENTO DE NARIÑO

Yo, \_\_\_\_\_ CC \_\_\_\_\_ he recibido la siguiente información:

Este es un estudio diseñado para investigar la susceptibilidad que los humanos tenemos para desarrollar cáncer gástrico en dos poblaciones adultas del departamento de Nariño, donde la incidencia de cáncer gástrico es variable, alta en la población de Tuquerres, hasta 150 casos por 100000 habitantes en Túquerres y menos del 6 casos por 100000 habitantes en Tumaco. Si participo en el estudio, es porque me han informado que con un análisis de sangre puedo conocer mi estado de salud relacionada con mis defensas y porque anteriormente participé en un estudio relacionado, por lo cual yo aportaré una muestra de sangre y tendré luego un resultado del examen que determinará si estoy a riesgo o no de padecer algún tipo de lesión o cáncer gástrico en un futuro. Las personas no participantes en este estudio son aquellos pacientes quienes voluntariamente no desean a participar, y aquellos pacientes quienes no llenan los requisitos detallados abajo.

Se incluirán mujeres y hombres adultos que estén a mayor riesgo de cáncer gástrico, esto es, mayores de 40 años provenientes de dos localidades del departamento de Nariño-Colombia: Tumaco, en la costa del Pacífico (77 pacientes) y Túquerres, en las montañas de los Andes (49 pacientes) que participaron en el proyecto previo "Susceptibilidad antimicrobial según factores de virulencia de aislados de *H. pylori* en pacientes con gastritis crónica", proyecto financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación COLCIENCIAS No 1106-40820549, Contrato RC. No.301-200, la Universidad del Valle y la Universidad de Nariño. Se excluirán pacientes con diagnóstico actual de cáncer o pacientes con desordenes de coagulación sanguínea o con administración de medicamentos para impedir la coagulación de la sangre (anticoagulantes); tampoco son elegibles las personas quienes fueron operadas del estómago (gastrectomía) y los pacientes que rehúsen firmar este consentimiento escrito.

Yo tendré que contestar unas pocas preguntas para confirmar mi participación. Luego permitiré una toma de muestra sanguínea que se depositará en cuatro tubos de 5 ml cada una, para su uso posterior exclusivo con propósitos únicamente de investigación. Si los resultados de los exámenes confirman que estoy a riesgo de desarrollar cáncer gástrico, la entidad de salud a la cual estoy afiliado asumirá la atención clínica oportuna. Todas las muestras serán analizadas por personal experto de la Universidad del Nariño en Pasto, la Universidad del Valle, la Universidad Cooperativa de Colombia y las otras entidades participantes que lo ameriten.

Este es un estudio de investigación que ayudará a los médicos a entender mejor los problemas causados en el estómago y puede mostrar en un futuro como prevenir o tratar enfermedades gástricas.

Las muestras recogidas, sin embargo, serán usadas para propósitos de esta investigación, o eventualmente de las investigaciones que se deriven con fines científicos. Los análisis de las muestras permitirán evaluar si el paciente amerita un tratamiento para prevenir el cáncer gástrico y si es adecuado eliminar la infección por *Helicobacter pylori*. Los resultados obtenidos serán puestos a disposición de mi médico tratante, quien definirá la conducta más adecuada.

Existe un riesgo menor que el mínimo de sangrado como resultado de tomar la muestra de sangre. No hay riesgo alguno diferente al descrito en la toma de la muestra sanguínea. En caso de ocurrir se hará un tratamiento específico de acuerdo a los procedimientos médico-quirúrgicos vigentes en el Hospital San José de Tuquerres o San Andrés de Tumaco, los costos de estos procedimientos serán asumidos con presupuesto de la investigación.

La participación en el estudio es voluntaria y la alternativa para los pacientes, consistiendo en escoger no participar. Usted puede rehusarse a participar o retirarse del estudio a cualquier momento sin poner en riesgo, de manera alguna, su tratamiento médico en la institución en el presente o en el futuro. Si nuevos descubrimientos ocurren durante el curso de la investigación que pueden alterar el deseo de los participantes a continuar, dicha información será provista al participante. Los resultados del estudio pueden ser pasados a la agencia que lo auspicia. Los resultados del estudio pueden ser publicados. La privacidad de los participantes será protegida y no será identificado en ninguna forma.

No hay ningún costo por la toma de muestras, ni por las pruebas moleculares que se requieren para emitir los resultados de susceptibilidad al cáncer gástrico objeto de este estudio. Como el análisis de la muestra de sangre puede sugerir la necesidad de consulta con mi médico tratante, el costo de las visitas médicas, procedimientos médicos y otros eventuales procedimientos derivados de los hallazgos correrán a cargo del participante o de la aseguradora a la que este afiliado. Los gastos adicionales para los estudios genéticos de mucosa gástrica, indicados en el protocolo de la investigación serán cubiertos por el presupuesto de la investigación.

El estudio ha sido discutido conmigo y todas mis preguntas han sido resueltas. Entiendo que si tengo preguntas adicionales en referencia a los derechos de los participantes, u otras preocupaciones, ellas deben dirigirse a los investigadores listados a continuación de esta forma de consentimiento o puedo contactar al Presidente del Comité de Ética de la Universidad de Nariño Dr. Jorge Nelson Lopez, Teléfono 3006081644 o al Investigador Principal Dr Alvaro Pazos Moncayo, teléfono 3168307965, o al Dr. Luis E. Bravo, de la Universidad del Valle, teléfono 3212100 Ext 4101 de Cali o al o al Dr. Mauricio Enríquez, Director IPS Gestionar Bienestar Túquerres Tel: 7280188 o al Dr. Francisco Luis Quiñones Chávez Tel: 7272456 o al número celular 3173662482 Director del Hospital San Andrés de Tumaco ESE.

Yo estoy de acuerdo con los términos detallados arriba y me ha sido entregada una copia de esta forma de consentimiento.

\_\_\_\_\_  
Firma del Participante

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Firma de Quien Obtiene el Consentimiento

\_\_\_\_\_  
Fecha

El participante me ha indicado que no puede leer. Yo certifico que le he leído esta forma de consentimiento al participante y que le he explicado que al firmar en el sitio arriba asignado, el participante ha indicado su acuerdo con participar en el estudio.

Firma del Lector \_\_\_\_\_

Firma del Coinvestigador \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

El participante ha indicado que no sabe escribir ni firmar, para lo cual autoriza el registro de la huella dactilar de su dedo índice derecho, además de su nombre completo y número de célula que transcribiré.



Nombre Participante \_\_\_\_\_ C.C. \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

Huella Dactilar del participante. \_\_\_\_\_  
Nombre de quien transcribe

**Anexo 3.** Protocolo de extracción de ADN a partir de muestras de sangre usando el kit Ultra Clean Blood spin (Mobio)

Se añadieron 200  $\mu$ L de sangre conservada en medio EDTA en un tubo de 2 mL y se adicionaron 10  $\mu$ L de proteinasa K. Posteriormente se agregaron 200  $\mu$ L de solución B1 y se homogenizó la solución en un equipo vórtex durante 15 seg.

Se Incubó la muestra a 65 °C por 10 min y se centrifugó brevemente para recoger el lisado. Luego se adicionaron 200  $\mu$ L de solución B2 y se agitó por inversión durante 15 seg. Posterior a la homogenización se centrifugó brevemente para tomar el sobrenadante.

El lisado se añadió aun spin filter de 2 mL y se centrifugó durante 1 min por 13.000 r.p.m. Luego se transfirió el SPIN FILTER a un tubo de 2 mL. Se agregó 50  $\mu$ L de solución B3 al spin filter y se centrifugó por 30 seg a 13.000 r.p.m. Se retiró el spin filter y se descartó el flujo.

Posteriormente se colocó el spin filter de nuevo en el mismo tubo de 2 mL, y se adicionó 500  $\mu$ L de solución B4 1 al SPIN FILTER. Se centrifugó por 30 seg a 13.000 r.p.m.

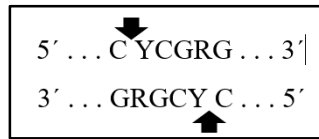
Se removió el SPIN FILTER y descartó el flujo; se colocó nuevamente el SPIN FILTER en el mismo tubo de 2 mL, se centrifugará durante 30 seg a 13.000 r.p.m. para secar la membrana del SPIN FILTER.

Con cuidado se removerá el SPIN FILTER y se trasferirá a un nuevo tubo de 2 MI, en el cual se adicionará de 100-200  $\mu$ L de solución B5 e incubar por 5 min a 65 °C. Finalmente se centrifugará por 1 min a 13.000 r.p.m, se retirará la unidad del SPIN FILTER cerca del tubo, y el DNA se conservará en el tubo para su posterior amplificación.

#### Anexo 4. Sitio de corte de la enzima de restricción *AvaI* para el polimorfismo *IL-1β-511*

El genotipo homocigoto CC se observó en el gel como 2 bandas de 190 y 115 pb, estos fragmentos se forman porque la enzima reconoce el sitio de restricción en ambas cadenas del ADN amplificado, por lo tanto, es cortado en la misma posición (Cumbal, 2010).

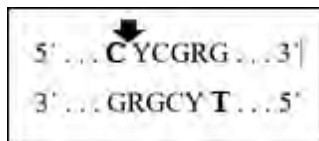
Sitio de corte de la enzima de restricción *AvaI* para la formación del genotipo CC del polimorfismo *IL-1β-511*.



Fuente: (Inserto de la casa fabricante de la enzima *AvaI*. *Thermo Scientific*)

El genotipo heterocigoto CT se observó en el gel como 3 bandas, que corresponden a la longitud del producto amplificado de 305 pb y a los productos de digestión de 190 y 114 pb. El fragmento no digerido corresponde a la cadena intacta del amplificado y los dos fragmentos generados son el resultado del reconocimiento del sitio de restricción en una sola cadena del producto amplificado (Cumbal, 2010).

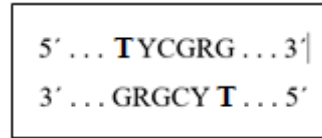
Sitio de corte de la enzima de restricción *AvaI* para la formación del genotipo CT del polimorfismo *IL-1β-511*.



Fuente: (Modificación inserto de la casa fabricante de la enzima *AvaI*. *Thermo Scientific*)

El genotipo homocigoto TT se observa en el gel de agarosa como una sola banda de 305 pb aproximadamente. Este fragmento se forma por la ausencia de sitios reconocibles para la enzima en ambas cadenas del producto amplificado, por lo cual no se producen cortes (Cumbal, 2010).

Sitio de corte de la enzima de restricción *AvaI* para la formación del genotipo TT del polimorfismo IL-1 $\beta$ -511



Fuente: (Modificación inserto de la casa fabricante de la enzima *AvaI*. *Thermo Scientific*)

**Anexo 5.** Sitio de corte de la enzima de restricción *NcoI* para el polimorfismo *TNF-α-308*

El genotipo homocigoto GG se observó en el gel como dos bandas de 87 y 20 pb, que se forman por el reconocimiento del sitio de restricción en ambas cadenas.

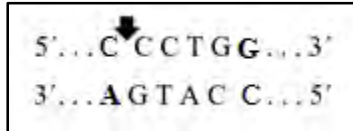
Sitio de corte de la enzima *NcoI* para la formación del genotipo GG del polimorfismo *TNF-α-308*.



Fuente: (Inserto de la casa fabricante de la enzima *NcoI*. *Thermo Scientific*)

El genotipo heterocigoto GA se observó en el como 3 bandas de 305, 190, y 115 pb. Las bandas corresponden a la longitud del amplificado y a los productos digeridos con la enzima de restricción.

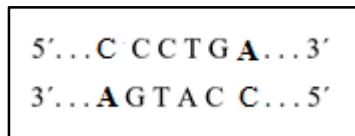
Sitio de corte de la enzima *NcoI* para la formación del genotipo GA del polimorfismo *TNF-α-308*.



Fuente: (Modificación inserto de la casa fabricante de la enzima *NcoI*. *Thermo Scientific*)

El genotipo homocigoto AA se observó en el gel como una banda de 107 pb aproximadamente. No se producen cortes por la ausencia de sitios reconocibles para la enzima.

Sitio de corte de la enzima *NcoI* para la formación del genotipo GG del polimorfismo *TNF-α-308*.



Fuente: (Modificación inserto de la casa fabricante de la enzima *AvaI*. *Thermo Scientific*)





