

Universidad de Costa Rica



Sistema de Estudios de Posgrado

Relación de los polimorfismos *VEGFA* –2578C/A y *COX-2* –1195 G/A y el grado de atrofia gástrica en una población de adultos costarricenses

Trabajo final de investigación aplicada sometido a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología para optar al grado de Especialista en Inmunología Clínica.

Marvin Roberto Durán Delgado. Carne B02153

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica, 2021

Dedicatoria

Dedico este trabajo a Dios, a mi papá, a mi novia y a todos los ciudadanos y las ciudadanas de este país que financian con su trabajo diario nuestro trabajo y estas propuestas de investigación, que siempre sepan que su bienestar y el de sus seres queridos es el único fin legítimo de todo nuestro trabajo.

Agradecimientos a mis profesores y profesoras por sus esfuerzos en la planificación y ejecución del programa de la especialidad de inmunología clínica de la UCR. Al personal que labora en el INISA por su colaboración en este proyecto, mención especial al grupo de investigación de epidemiología del cáncer por abrir las puertas de la academia a quienes laboramos en un área diferente, gracias por permitirme tener esta maravillosa experiencia.

A mi familia, amigos y personas cercanas que han apoyado mi carrera y me han incentivado a salir adelante, quienes han apoyado mi trabajo y me han abierto puertas importantes para trabajar, gracias por las oportunidades y por brindarme las herramientas para realizar un mejor trabajo en beneficio de quienes requieren nuestros servicios.



SISTEMA DE ESTUDIOS EN POSGRADO
PROGRAMA DE POSGRADO EN ESPECIALIDADES EN MICROBIOLOGÍA

ACTA-55-2021

Acta presentación de Requisito Final de Graduación Trabajo de Investigación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el viernes 25 de junio de 2021 con el objeto de recibir el informe oral del estudiante **Marvin Roberto Durán Delgado** carné # **B02153**, quien se acoge al Reglamento General del Sistema de Estudios de Posgrado para presentar el Trabajo Final de Graduación, para optar por el grado académico de **Especialista en Inmunología Clínica**. Están presentes los siguientes miembros del Tribunal Examinador: Clas Une, PhD., quien preside y tutor, Wendy Malespín Bendaña, MSc. y Silvia Molina Castro, PhD., lectoras.

ARTICULO 1

Quien preside solicita al postulante realizar la presentación oral de su Trabajo de Investigación titulado: **“Relación de los polimorfismos VEGFA -2578C/A y COX-2 -1195 G /A y el grado de atrofia gástrica en una población de adultos costarricenses”**.

ARTICULO 2

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan al postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 3

El Tribunal Examinador declara el Trabajo Final de Graduación: Aprobado Reprobado

ARTICULO 4

Se da lectura al acta que firman los miembros del Tribunal Examinador y el Postulante, a las 16:08 horas.

Nombre	Firma	No. Cédula
<u>Clas Une, PhD.</u> Quien preside	_____	<u>175200001011</u>
<u>Wendy Malespín Bendaña, MSc.</u>	_____	<u>1-1065-0102</u>
<u>Silvia Molina Castro, PhD.</u>	_____	<u>1-1250-0466</u>
<u>Marvin Roberto Durán Delgado</u> Estudiante	_____	<u>1-1417-0676</u>

Observaciones: Se otorga mención de honor

Nota: Solamente firmarán el acta los responsables de la actividad descrita

Si el trabajo es merecedor de mención de honor anotar en observaciones

Contenido

1. Antecedentes.....	1
La atrofia gástrica como lesión precancerosa	1
La etiología multifactorial del CG	1
La infección por <i>H. pylori</i>	2
Factores virulencia <i>H. pylori</i>	4
La respuesta inmune contra <i>H. pylori</i>	5
Polimorfismos genéticos en genes vinculados a la respuesta inmune contra <i>H. pylori</i> ..	5
Expresión de la enzima COX-2 en individuos infectados por <i>H. pylori</i>	7
Alteraciones funcionales de la fisiología de la mucosa gástrica como predictores de lesiones precancerosas.....	9
Pepsinógenos como indicadores de cambios morfológicos y funcionales de la mucosa gástrica	10
3. Problema.....	13
4. Justificación.....	13
5. Objetivos.....	14
Objetivo general	14
Objetivos específicos.....	14
6. Metodología.....	15
Diseño de la investigación.....	15
Población de la investigación.....	15
Muestra.....	15
Criterios de inclusión	15
Criterios de exclusión.....	16
Grupos de comparación.....	16
Variables estudiadas.....	16
Consideraciones éticas	16
Estrategia metodológica	17
Niveles de pepsinógeno.....	17

Determinación de anticuerpos Anti <i>H. pylori</i>	17
Determinación de <i>H. pylori</i> CagA + o CagA-.....	17
Determinación de los genotipos	17
Análisis estadístico.....	18
7. Resultados.....	19
Características generales de la población y distribución de frecuencias.....	19
Frecuencias alélicas y frecuencias genotípicas	21
Análisis predictivo del efecto del polimorfismo <i>COX-2</i> -1195 G/A en combinación con otras variables empleando modelos de regresión logística binaria	22
Análisis predictivo del efecto del polimorfismo <i>VEGFA</i> -2578 C/A en combinación con otras variables empleando modelos de regresión logística binaria	23
8. Discusión	25
En la distribución de las características generales de los participantes no se encontró una distribución asimétrica en los dos grupos de comparación	25
La frecuencia genotípica con la que se presentan los polimorfismos <i>COX-2</i> -1195 G/A y <i>VEGFA</i> -2578 C/A en nuestra población de estudio es similar a la encontrada en otras poblaciones de referencia	26
El polimorfismo <i>COX-2</i> -1195 G/A no mostro ningún tipo de relación con el grado de atrofia gástrica.....	27
El genotipo AA del polimorfismo <i>VEGFA</i> -2578 C/A se asoció con una mayor predisposición a desarrollar atrofia gástrica de alto grado.....	28
Ninguno de los modelos de regresión logística binaria explorados en este estudio para los polimorfismos <i>COX-2</i> -1195 G/A y <i>VEGFA</i> -2578 C/A mostro una capacidad predictiva estadísticamente significativa.....	30
Limitaciones del estudio.....	30
9. Conclusiones y recomendaciones.....	31
10. Anexos.....	32
Anexo1. Cuadro de operacionalización de variables	32
Anexo 2. Indicadores de los modelos de regresión logística para el polimorfismo <i>COX2</i> -1195 G/A en combinación con otros factores.....	35

Anexo 3. Indicadores de los modelos de regresión logística para el polimorfismo <i>VEGFA</i> -2578 C/A en combinación con otros factores	36
11. Bibliografía.....	37

Resumen

Antecedentes: En nuestro país existe una alta incidencia de cáncer gástrico (CG) que se acompaña de una importante mortalidad, se sabe que infección por *Helicobacter pylori* es un factor importante, condición que se puede encontrar en una gran cantidad de sujetos que desarrollan el CG, sin embargo, solo una pequeña porción de los sujetos infectados por *H. pylori* desarrollarán CG, por lo tanto, debe haber otras variables que permitan explicar de manera más completa la etiología. Se han estudiado múltiples factores ambientales como la dieta y el fumado, así como factores propios del huésped, en este sentido, los polimorfismos asociados a genes que participan en la respuesta inflamatoria han tenido un papel protagónico para intentar conocer su rol en las etapas tempranas y tardías de la carcinogénesis gástrica. En este trabajo se exploró el posible efecto de los polimorfismos *VEGFA* -2578 C/A y *COX-2* -1195 G/A en la aparición de la atrofia gástrica, que se considera una lesión precancerosa.

Metodología: Se contó con una población derivada de un proyecto denominado CRELES, sobre la cual se tenían documentados antecedentes de importancia como la edad, el sexo, anticuerpos Anti-*H.pylori* y anticuerpos Anti-CagA, así como los niveles de pepsinógeno (PG). Tomando como base el nivel de PGI y la relación PGI/PGII se segregó la subpoblación en dos grupos, atrofia de alto grado y atrofia de bajo grado y se procedió a realizar el análisis de los polimorfismos supracitados. Se realizó un análisis estadístico descriptivo de la población para elaborar un modelo de regresión logística binaria que relacione los polimorfismos y los otros factores con el riesgo individual de un sujeto de padecer atrofia de la mucosa gástrica que es una lesión precursora del CG.

Resultados: La distribución de frecuencias de los genotipos de los polimorfismos estudiados es muy similar a lo reportado para otras poblaciones con incidencia, prevalencia y mortalidad de CG diferente. En general los factores no mostraron una distribución diferente entre los dos grupos de análisis, con excepción del genotipo AA del polimorfismo *VEGFA* -2578 C/A que mostró una tendencia a distribuirse en mayor magnitud en el grupo de los sujetos con atrofia de alto grado, posteriormente fue el único factor que se asoció a un riesgo elevado de desarrollar atrofia gástrica de alto grado en los modelos de regresión explorados, aunque por sí solo no fue suficiente para validar el modelo

Conclusiones: Este trabajo representa la primera descripción formal de la frecuencia con la que se presentan los genotipos *VEGFA* -2578 C/A y *COX2* -1195 G/A en sujetos costarricenses. En comparación con otras poblaciones utilizadas como referencia las frecuencias genotípicas de ambos polimorfismos fueron similares. Se logró evidenciar una distribución diferente de los sujetos que portan el genotipo AA del polimorfismo *VEGFA* -2578 C/A, esta asociación debe ser corroborada aumentando la cantidad de casos y controles analizados. No se logró establecer un modelo estadísticamente significativo que relacionar el desarrollo de las lesiones atróficas precancerosas con ninguno de los dos polimorfismos en combinación con otros factores.

Lista de cuadros

Cuadro 1. Fenotipos de gastritis reflejados en niveles de biomarcadores con su riesgo asociado (Modificado de Yakut et al.2013)	9
Cuadro 2. Estimación del grado de atrofia de la mucosa gástrica basada en niveles de pepsinógenos	16
Cuadro 3: Características de la población estudiada y análisis bivariado de su distribución en los grupos de interés	20
Cuadro 4. Frecuencias genotípicas y alélicas de los genes <i>COX2</i> y <i>VEGFA</i> en la población de estudio	21
Cuadro 5. Razón de momios y su intervalo de confianza al 95% para el polimorfismo <i>COX2</i> -1195 G/A en combinación con otros factores de la población estudiada	22
Cuadro 6. Razón de momios y su intervalo de confianza al 95% de confianza para el polimorfismo <i>VEGFA</i> -2578C/A en combinación con otros factores de la población estudiada	24
Cuadro 7. Cuadro de operacionalización de variables	31
Cuadro 8. Indicadores de los modelos de regresión logística para el polimorfismo <i>COX2</i> -1195 G/A en combinación con otros factores	34
Cuadro 9. Indicadores de los modelos de regresión logística para el polimorfismo <i>VEGFA</i> -2578C/A en combinación con otros factores	35

Lista de figuras

Figura 1. Historia natural de la infección por <i>H. pylori</i> . Modificado de(Suerbaum & Michetti, 2002).....	3
Figura 2. Dinámica de la variación de los niveles de pepsinógenos según el tipo de patología gástrica.....	11

Lista de abreviaturas

CG: Cáncer gástrico

COX-2: Ciclooxygenasa-2

IL-1: interleucina-1

IL-10: interleucina-10

IL-6: interleucina-6

IL-8: interleucina-8

PGI: pepsinógeno I

PGII: pepsinógeno II

OR: razón de los momios

SNP: polimorfismo de un solo nucleótido

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

VEGFA: factor de crecimiento vascular endotelial



Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Marvin Roberto Durán Delgado, con cédula de identidad 114170676, en mi condición de autor del TFG titulado Relación de los polimorfismos VEGFA -2578 C/A y COX-2 -1195 G/A y el grado de atrofia gástrica en una población de adultos costarricenses

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO *

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

Nombre Completo: Marvin Roberto Durán Delgado

Número de Carné: B02153 Número de cédula: 114170676

Correo Electrónico: marvin.duran@ucr.ac.cr

Fecha: 06/07/2021 Número de teléfono: 88653628

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Clas Une

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

1. Antecedentes

La atrofia gástrica como lesión precancerosa

La inflamación crónica de la mucosa gástrica tiene como consecuencia cambios morfológicos y funcionales en su fisiología; uno de los cambios más representativos es la atrofia de la mucosa que se acompaña de una pérdida de células glandulares que son reemplazadas por otros tipos celulares y tejido fibroso (1). La atrofia gástrica se considera una lesión precancerosa, según lo descrito por Correa, es precedida cronológicamente de una gastritis crónica (2). La cascada de Correa es el modelo de carcinogénesis gástrica más aceptado actualmente, y describe que el cáncer gástrico (CG) se deriva de una secuencia de lesiones histológicas que inicia con gastritis crónica y evoluciona a atrofia de la mucosa, dando lugar a otras lesiones como la metaplasia, la displasia y finalmente a la neoplasia(3).

La etiología multifactorial del CG

El adenocarcinoma gástrico es el tipo histológico más común con el que se presentan todas las formas de CG; se reconocen dos fenotipos histológicos el tipo difuso y el tipo intestinal(4). Este trabajo se enfoca en el fenotipo intestinal.

Actualmente se acepta que el CG es resultado de un proceso continuo que evoluciona normalmente de forma asintomática y cuyo origen es multifactorial (5), se sabe que el principal factor de riesgo para detonar esta secuencia de lesiones es la infección por *H. pylori*; la bacteria funciona como un detonante de la inflamación de la mucosa gástrica y el antecedente de su infección se puede asociar con entre un 80%(6) y hasta 92%(7) de los casos de CG. Debido a una extensiva recopilación de evidencia la OMS clasificó a *H. pylori* como carcinógeno tipo I(8), sin embargo, se estima que solo de un 2% a 3% de los infectados totales desarrollan CG lo que sugiere que la infección por *H. pylori* es importante y probablemente el principal factor de riesgo, pero no es suficiente para explicar toda la etiología del CG(9).

Se conocen otros factores que influyen de manera importante como la edad, el sexo, los factores ambientales y los genéticos. De los factores ambientales se sabe que la dieta, el tabaquismo y el etilismo juegan un papel en el desarrollo de la enfermedad(10). En cuanto al

sexo se sabe que es hasta 2 veces más frecuente en hombres que en mujeres(11) y se asocia a individuos de mayor edad(12)(11).

Por otro lado, muchos genes pueden mostrar variantes que aumenten o disminuyan el riesgo de desarrollar las lesiones precancerosas. Se han estudiado varios genes que participan en procesos como daño oxidativo, adhesión celular, reparación del ADN, oncogenes y genes supresores de tumores, apoptosis, protección de las mucosas, enzimas metabólicas y transportadores así como respuesta inflamatoria(5), todos estos factores se combinan de maneras complejas. Muchos esfuerzos se han concentrado en entender como la interacción de *H. pylori* con el hospedero puede desencadenar respuestas inflamatorias que contribuyan a explicar la etiología del CG. El papel de la inflamación en el cáncer es paradójico, en ocasiones los mecanismos antitumorales del sistema inmune son incapaces de limitar el crecimiento de las células tumorales a pesar de mediar fuertes acciones pro inflamatorias por medio de sus componentes celulares y humorales, el daño colateral inducido por la misma inflamación puede propiciar daños al ADN y un aumento importante en la tasa de mutación generando inestabilidad genómica y favoreciendo el desarrollo del cáncer (13).

La infección por *H. pylori*

H.pylori es una bacteria Gram negativa que posee una serie de 3 a 5 flagelos y que coloniza de manera selectiva el epitelio del estómago humano. La bacteria tiende a persistir en este ambiente hostil, en gran parte debido a la expresión de una ureasa que genera un microambiente que favorece su supervivencia. La vía de adquisición más importante es la oral-oral y la primo infección suele darse en la infancia. La bacteria posee varios factores de virulencia que incrementan su capacidad de movilidad, adaptación al ambiente adverso y adherencia a la mucosa gástrica, aumentando su patogenicidad (14).

La infección por esta bacteria se asocia a 3 cuadros clínicos: linfoma del tejido linfático asociado a las mucosas, CG y ulcera péptica (10) (15). La expresión de una patología u otra guarda relación con una serie de factores que incluyen la cepa de la bacteria, factores propios del hospedero y factores ambientales. Se estima que hay un 50% de prevalencia de *H. pylori* en la población mundial(14).

Durante el curso clínico de la infección se pueden tener diversos escenarios (figura 2). En el primer caso la infección crónica por *H. pylori* genera una gastritis predominantemente antral,

algunos individuos cursarán asintomáticos y otros tendrán un riesgo asociado de desarrollar una úlcera duodenal. En el segundo caso, se desarrolla una pangastritis no atrófica, esta suele ser asintomática. El tercer caso es el objeto de este estudio, en este escenario la infección por *H. pylori* desencadena la cascada de Correa generando atrofia del cuerpo evolucionando a metaplasia intestinal, luego a displasia, finalizando en CG(16).

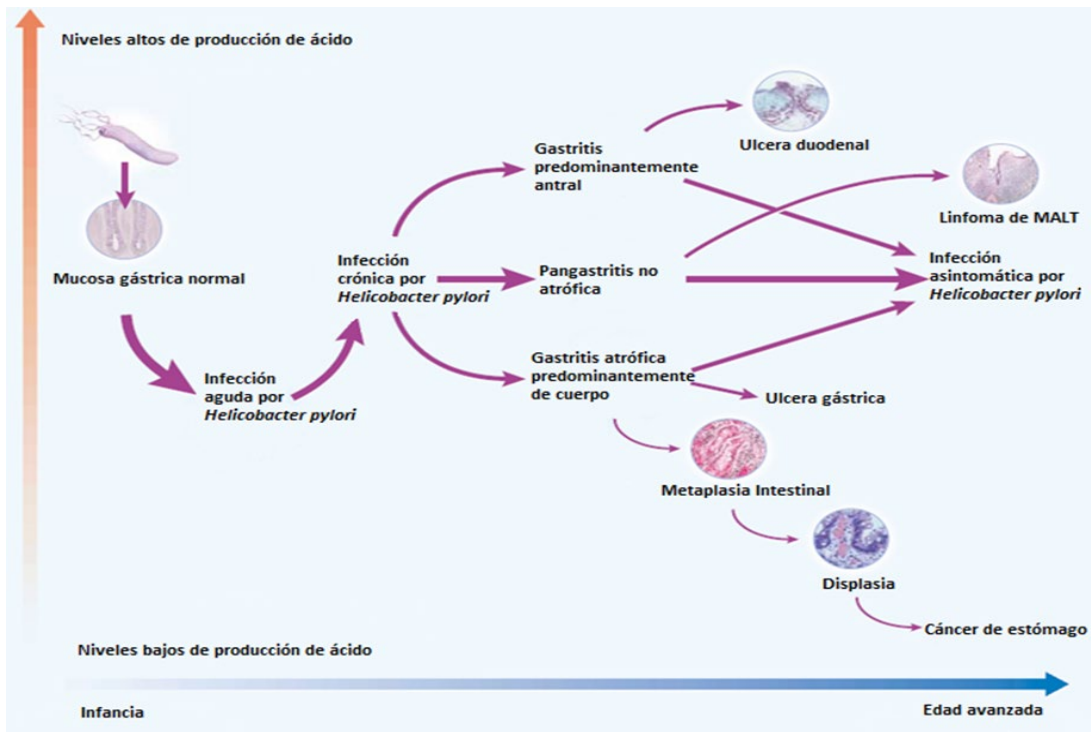


Figura 1. Historia natural de la infección por *H. pylori*. La infección por *H. pylori* suele persistir generando gastritis crónica, dependiendo de una serie de factores que incluyen la cepa bacteriana, la respuesta del hospedero y el ambiente la gastritis crónica generara alguno de los 3 patrones de gastritis: predominante del antro con riesgo de úlcera péptica, pangastritis no atrófica que suele ser asintomática, pero se podría asociar a un linfoma del MALT o gastritis predominante del cuerpo con riesgo elevado de CG. La figura también indica las variaciones funcionales en la secreción de ácido y la evolución dependiente de la edad. Modificado de (Suerbaum & Michetti, 2002). Modificación cortesía de la Dra. Vanessa Ramírez Mayorga

H. pylori es un factor importante en el desarrollo del CG y todas sus lesiones precursoras pero por si solo no es suficiente para explicar toda la etiología, debe estar acompañado de otros factores adicionales para desencadenar la patología, en este sentido se abordara el papel de los distintos factores de virulencia y cepas de *H. pylori*, así como el papel la respuesta del hospedero (17).

Factores virulencia *H. pylori*

La *H. pylori* exhibe una gran variedad de factores de virulencia, su caracterización es importante ya que algunas cepas se asocian a mayor riesgo de CG(6). Los principales factores de virulencia son la citotoxina asociada al gen A(CagA) y la toxina vacuolizante A s1m1 (VacA), estos factores suelen coexpresarse(18).

VacA es una proteína citotóxica con actividad vacuolizante que induce daño en células epiteliales, formación de canales de membrana, liberación de citocromo c desencadenando apoptosis y tiene capacidad de inducir una fuerte respuesta inflamatoria(19). Todas las cepas de *H. pylori* expresan VacA, pero algunas cepas expresan otras formas de esta proteína que vuelve a dichas cepas más virulentas. Se ha asociado la expresión de esta proteína con un riesgo aumentado de cáncer, también se asocia esta proteína con evasión de la respuesta inmune adaptativa inhibiendo la expansión de células T activadas por los antígenos bacterianos(6).

El gen *CagA* se ubica en una isla de patogenicidad denominada *cagPAI*. La proteína CagA es un fuerte determinante de la patogénesis de *H. pylori* que se asocia a un incremento importante de riesgo de CG. Los genes ubicados en esta isla de patogenicidad dan lugar a un sistema de secreción tipo IV que es una jeringa molecular que permite la inyección de la proteína CagA en el citoplasma de las células epiteliales induciendo rearrreglos en el citoesqueleto(20). La actividad de esta proteína se asocia con un incremento de la actividad inflamatoria a nivel local, este proceso se caracteriza por un aumento de daño al ADN secundario a niveles importantes de especies reactivas del oxígeno y una susceptibilidad aumentada al desarrollo de neoplasias(16).

Tradicionalmente se clasifica *H. pylori* según su expresión de CagA. Las cepas que la producen se conocen como *H. pylori* CagA+ y las que no la producen *H. pylori* CagA-(19). Actualmente se sabe que la expresión de CagA correlaciona con mayor riesgo de CG y úlcera péptica (21). Se han descrito varios mecanismos de fisiopatología mediada por esta proteína, que actualmente se considera una oncoproteína capaz de inducir cambios malignos in vitro(22). El riesgo de desarrollar patologías gástricas en individuos CagA+ es hasta 3 veces mayor respecto a individuos CagA-(23)(24). Entre el 80 y 60% de las cepas del oeste (Europa y África) expresan esta proteína y alrededor del 100% de las cepas que circulan en el este

Asiático la expresan y su *cagA* difiere en forma y función de manera que tiene efectos patológicos de mayor magnitud, estas cepas se consideran muy virulentas(10)(25).

El otro grupo importante de proteínas se denomina en su conjunto OMPs (por las siglas en inglés *Outer membrane proteins*) este grupo incluye importantes adhesinas, como OipA, cuya expresión es esencial para adherirse al epitelio gástrico. Otras proteínas de relevancia son BabA, SabA, DupA y FlaA, estas proteínas externas cumplen un papel importante en el proceso de adherencia. La expresión de estas proteínas se ha asociado selectivamente a riesgo aumentado de patologías gástricas como las úlceras pépticas o el CG, adicionalmente la expresión de FlaA media una activación menos eficiente del TLR-5 de modo que puede ser un factor importante en la modulación de la respuesta inmune(10)(21).

La respuesta inmune contra *H. pylori*

Los mecanismos de reconocimiento de patógenos clásicos de las bacterias extracelulares son los que se desencadenan en respuesta a la infección por *H. pylori*. Las células epiteliales, los macrófagos y las células dendríticas son los que efectúan dicho reconocimiento a través de sus receptores de reconocimiento de patrón, por ejemplo, los receptores tipo Toll son esenciales en dicho reconocimiento, iniciando la respuesta inmune en la mucosa gástrica(26)(27).

La consecuencia principal de este reconocimiento es la generación de un foco inflamatorio a nivel gástrico a través de la acción de los macrófagos que residentes que secretan interleucinas como IL-1, IL-6, TNF- α e IL-8 y productos como óxido nítrico(28) .

La respuesta inmune suele ser insuficiente para eliminar la infección, por lo suele generar un cuadro de infección e inflamación crónica, se sabe que algunos factores de virulencia pueden contribuir a evadir la respuesta inmune disminuyendo la efectividad de mecanismos basados en radicales libres de nitrógeno, del complemento y de la IgA secretora(29).

Polimorfismos genéticos en genes vinculados a la respuesta inmune contra *H. pylori*

Las mutaciones son cambios en la secuencia de nucleótidos. Las mutaciones pueden tener distintos tipos de efectos, en ocasiones hay alteraciones en la expresión de los genes que se derivan de pérdida o ganancia de función, mientras que en otros casos las mutaciones cursan con alteraciones en la regulación de la expresión génica, por otro lado, algunas mutaciones no tendrán ningún tipo de efecto(30).

Las mutaciones tienen la capacidad de generar nuevas variantes de un gen que se conocen como alelos, cuando estos alelos se presentan en una población con una frecuencia igual o mayor a 1% se conocen como polimorfismos (31), los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) son su forma de presentación más común. El primer aspecto relevante de los SNPs es su ubicación. Algunos SNP se concentran en la región que regula la expresión génica, propiamente en la región promotora o sitios cercanos, otros SNPs que se ubican en la región codificante o en los intrones(32). En segundo lugar, interesa el efecto de un SNP. En general los SNP que no cambian el aminoácido codificado por el gen se conocen como sinónimos mientras los que si introducen un cambio se conocen como no sinónimos. Estos cambios pueden tener efectos en la regulación de la expresión de los genes (aumento o disminución) o bien en su función misma (ganancia o pérdida).

Actualmente se acepta que los SNPs son responsables de la mayoría de la diversidad genética en la población, de modo que es posible que la susceptibilidad individual de los sujetos a ciertas enfermedades se asocie con estas variaciones(33).

En la última década los polimorfismos de algunos genes que modulan la inflamación han ganado mucha relevancia como un potencial factor asociado al aumento del riesgo de padecer cáncer(34). Algunos polimorfismos promueven una inflamación patológica de gran magnitud, aumenta la posibilidad de que se desarrollen lesiones precancerosas, el polimorfismo *IL-1 beta* 3954 C/T (35), *TNFA-308A* (36) y el *IL8-251T/A*(36). Otros polimorfismos podrían afectar contrapesos importantes del proceso inflamatorio, el sistema inmunológico tiene mecanismos críticos para modular la respuesta inmunológica disminuyendo el daño colateral, por ejemplo la IL-10 es esencial en mediar efectos antiinflamatorios, algunas mutaciones disminuyen la funcionalidad de esta citocina o sus receptores, por ejemplo los polimorfismos *IL-10-1082A*, *IL-10-819T* y *IL-10-592C/A*(37) se han asociado con riesgo aumentado de padecer CG. Otros mecanismos también pueden tener relevancia, por ejemplo en la familia de proteínas de choque térmico HSP-70 es crítica en la modulación del estrés celular, principalmente el polimorfismo *HSP-70+1267* (38)

Las lesiones tisulares mediadas por la inflamación crónica detonada por *H. pylori* son claves para la inestabilidad genómica y otra serie de factores desencadenantes de cáncer(39)(40).

Expresión de la enzima COX-2 en individuos infectados por *H. pylori*

El gen *COX-2* consta de 10 exones y se localiza en el cromosoma 1q31.1(41). Su producto es la enzima COX-2 y su expresión es inducible. Muchos de los SNP asociados a este gen se concentran en el promotor o en los sitios de unión del microARN(42)

La ciclooxigenasa (COX) participa activamente en la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos utilizando el ácido araquidónico como sustrato. Tiene dos isoformas, la enzima constitutiva es la COX-1 mientras la COX-2 es una enzima que se induce en condiciones patológicas como inflamación y cáncer (43).

La COX1 genera prostaglandinas, como la PGE1 que participa en el mantenimiento de la homeostasis en el estómago regulando el flujo sanguíneo, el recambio de los epitelios, la síntesis del mucus e inhibiendo la secreción excesiva de ácido gástrico.

Un estudio reciente demostró que la expresión de COX 1 no se alteraba significativamente cuando se comparaban individuos con diversos tipos de lesiones precancerosas de dos grupos, a saber, infectados con *H. pylori* e individuos no infectados. Por otro lado algunos estudios mostraron que la expresión del gen COX-2 estaba considerablemente aumentada en células epiteliales con lesiones precancerosas como la atrofia, metaplasia o displasia, además su expresión aumenta con la severidad del daño(44).

Se han propuesto varios mecanismos que incluyen un incremento en la síntesis de prostaglandinas y la inflamación asociada, inhibición de la apoptosis, promoción de la angiogénesis, modulación de la inflamación y potenciación de la capacidad invasiva del tumor(44). Adicionalmente se ha visto que COX-2 promueve la supervivencia y autorrenovación de las células madre pluripotenciales (45), la potenciación de estas propiedades es una característica habilitadora del cáncer(13).

En estudio clínico se observó que el aumento en la expresión de *COX-2* en el contexto de infección por *H. pylori* aumenta el riesgo de CG, con una razón de los momios (OR) de 9,31(46).

Según lo expuesto anteriormente, el aumento en la expresión de COX-2 parece ser un factor que potencia el desarrollo del CG, por lo tanto, explorar la dinámica de su producción tiene potencial para estimar el riesgo de un determinado sujeto contraer CG, hasta la fecha hay

reportes de varios polimorfismos de este gen que tienen un efecto en su expresión, como por ejemplo, *COX-2* (-765 G/C, -1195 G/A, -587 G/A), en la exploración de estos polimorfismos se han encontrado asociaciones importantes entre su presencia y el riesgo de desarrollar CG(47).

El polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) *COX-2* -1195 G/A se ubica en la región promotora del gen. Los individuos que portan el alelo A se caracterizan por un aumento de la expresión del gen mediante un mecanismo que consiste en la creación un sitio de unión para el factor de transcripción c-MYB, de manera que portar el alelo A media un aumento en la actividad transcripcional del gen (41). Para efectos de este trabajo el genotipo GG se considera el de referencia y el AA el de interés.

Expresión de *VEGFA* en individuos infectados por *H. pylori*

VEGFA es un gen localizado en el cromosoma 6 compuesto por 8 exones, el producto de este gen es el factor de crecimiento vascular endotelial-A (VEGF-A), se conocen otras isoformas de esta proteína generadas por splicing alternativo (48). Este factor participa en procesos de angiogénesis, vasodilatación, permeabilidad vascular y migración celular y es producido por macrófagos, fibroblastos, queratinocitos, células de músculo liso, células T y células tumorales (49). Tiene un papel esencial en la neovascularización, promoviendo la angiogénesis (13).

Al comparar las cepas *H. pylori* CagA⁺ con *H. pylori* CagA⁻ se encontró que las cepas más virulentas inducen mayores niveles de VEGF-A (50). También se ha encontrado niveles elevados de VEGF-A en pacientes con atrofia gástrica y metaplasia gástrica, estos hallazgos sugieren la posibilidad de que la contribución de los niveles elevados de VEGF-A al desarrollo de la neoplasia inicia desde eventos tempranos en la carcinogénesis gástrica (51). Siregar y colaboradores(2017), lograron asociar niveles séricos elevados de VEGF-A con lesiones atróficas con mayor grado de severidad (52).

En el contexto del CG asociado a infección por *H. pylori* se ha propuesto que la angiogénesis promovida por VEGF-A en las células de la mucosa gástrica es importante para el desarrollo, crecimiento y metástasis del tumor, los mecanismos que inducen la expresión de este gen incluyen los genes proinflamatorios *NFκβ* y *COX-2*, lo que sugiere que la inflamación

promovida por la infección de *H. pylori* juega un papel importante en la activación de este gen protumoral (50).

El polimorfismo en *VEGFA* -2578C/A es un SNP donde se sustituye una citosina por una adenina, este polimorfismo se ubica en el área del promotor del gen, generando cambios en su nivel de expresión (49). Este efecto se visualizó en un estudio realizado empleando células mononucleares derivadas de sangre periférica de sujetos voluntarios, en este estudio se observó que los de VEGF-A derivados de los sobrenadantes del cultivo celular en los individuos CC es mayor en referencia al genotipo CA que fue de producción intermedia y el genotipo AA que resulto el de menor producción (53). Para efectos de este trabajo el genotipo CC se considera el de referencia y el genotipo AA el de interés.

Alteraciones funcionales de la fisiología de la mucosa gástrica como predictores de lesiones precancerosas

Funcionalmente la mucosa gástrica inflamada puede tener variaciones en la secreción de sus distintos productos, por ejemplo, la secreción de ácido. Si la inflamación es predominante del cuerpo del estómago se suele presentar hipoclorhidria mientras que si es predominante del antro se suele presentar hiperclorhidria, en modelos experimentales se ha demostrado que la inflamación mediante IL-1 y TNF- α tiene un papel importante en la disminución de secreción de ácido (54). Las alteraciones funcionales de la mucosa gástrica pueden ser estimadas en un laboratorio mediante los productos de secreción de las células gástricas, siendo la gastrina y los PGs unos de los marcadores de elección, esta caracterización permite clasificar a los pacientes en tres fenotipos: la gastritis fenotipo úlcera duodenal, la asintomática y la gastritis fenotipo CG (55). Cada fenotipo de gastritis se puede caracterizar según alteraciones morfológicas y funcionales (Cuadro 1)

Cuadro 1. Fenotipos de gastritis reflejados en niveles de biomarcadores con su riesgo asociado (Modificado de Yakut et al.2013)

Fenotipo de gastritis	Úlcera duodenal	Crónica no atrófica	Cáncer gástrico
Secreción de HCl	Elevado	Normal	Baja
Niveles de pepsinógeno I y relación PGI/PGII	Normal a alto	Normal a alto	Bajo
Patrón de gastritis	Antro	Pangastritis	Cuerpo
Riesgo asociado	Úlcera duodenal	Linfoma del MALT	Cáncer gástrico

La población meta de este trabajo son los sujetos que presentan una gastritis con fenotipo CG, esta condición será definida por las alteraciones funcionales de la mucosa gástrica que serán estimadas mediante los niveles de PGs, como se explicara en la siguiente sección. Es importante anotar que los mejores métodos diagnósticos de la patología gástrica se basan en procedimientos invasivos que permiten identificar las lesiones y cambios morfológicos en biopsias del tejido gástrico y con imágenes médicas. En la actualidad, para simplificar este proceso se ha tratado de identificar biomarcadores y marcadores genéticos que puedan evidenciar o predecir el desarrollo de la patología gástrica, de manera preferencial en etapas tempranas (56).

Pepsinógenos como indicadores de cambios morfológicos y funcionales de la mucosa gástrica

Los PGs I y II son producidos por las células principales de las glándulas gástricas y otros tipos celulares, son zimógenos precursores de la pepsina, una enzima que participa en la digestión proteica, ambos PGs se pueden diferenciar inmunológicamente (57).

Los PGs I y II son marcadores que se han empleado habitualmente para determinar el estado funcional y la morfológico de la mucosa gástrica, son un marcador útil de la atrofia gástrica y proveen datos de importancia para estimar el riesgo de cáncer gástrico(2)(58)

El PGI es producido por las células principales ubicadas en el cuerpo, los niveles de PGI disminuyen proporcionalmente con la progresión de la atrofia del cuerpo del estómago (2). Por otro lado el PGII es producido en otras zonas de la mucosa e incluso en el duodeno, conforme aumenta la inflamación de la mucosa se observa un aumento de ambos PG, particularmente el PG II suele aumentar más(59) (60). Conforme la mucosa gástrica se atrofia

la producción de PGI disminuye notablemente, mientras la de PGII se mantiene, siendo así la medición de los PGs un excelente indicador de la atrofia de la mucosa gástrica. El cuadro 1 resume las alteraciones más representativas de la mucosa gástrica y los valores de PGs que las suelen acompañar.

Los datos de PGs pueden combinarse como sucede en el método ABC, para proveer una estimación de los cambios atróficos de la mucosa gástrica y su respectivo riesgo de CG, este tipo de estimación tiene limitaciones respecto a los métodos de referencia, quizá la más importante es que otras condiciones diferentes a CG que alteren la morfología y funcionalidad de la mucosa gástrica van a modificar los valores de los pepsinógenos (61). Para definir los niveles de PGs se puede emplear como referencia un estudio de cohorte que determino que en sujetos infectados por *H. pylori* los cortes de PGI por debajo de 70 ng/mL y la relación PGI/PGII menor o igual a 3 tienen buena sensibilidad para la detección de atrofia gástrica (55)(62).

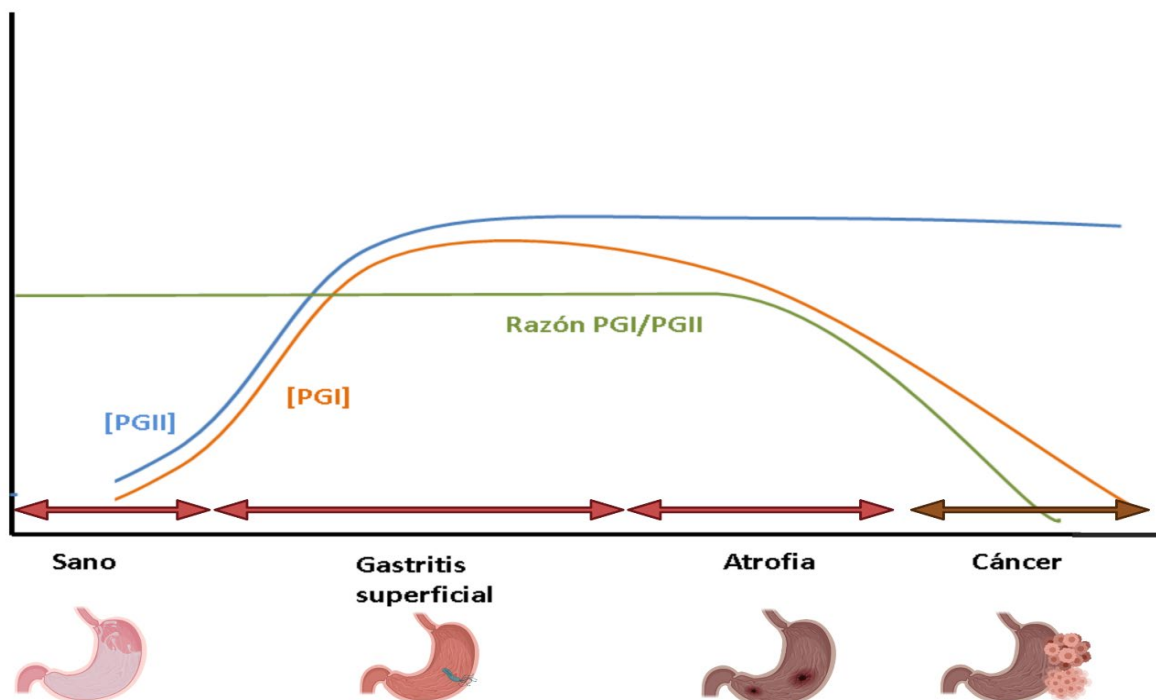


Figura 2. Dinámica de la variación de los niveles de pepsinógenos según el tipo de patología gástrica. La inflamación característica del cuadro de gastritis se asocia con un aumento tanto de PG1 como de PG2, cuando las lesiones gástricas progresan hacia la atrofia del cuerpo la producción de PG1 se ve afectada mientras PG2 tiende a permanecer constante, esto a su vez afecta el cociente de PG1/PG2, los niveles de PG1 y la razón de PGS continúan disminuyendo progresivamente conforme las lesiones se mueven hacia el desarrollo de CG según lo descrito en la cascada de Correa (Autoría de la figura. Dra. Wendy Malespín Bendaña, Cortesía Dr. Clas Une. Modificación de elaboración propia)

El análisis de los polimorfismos en genes vinculados a la inflamación tiene potencial para predecir el riesgo de desarrollo de CG

Casi todos los fenotipos de gastritis, así como las lesiones precursoras de CG son asintomáticas o leves, de modo que realizar un diagnóstico temprano y oportuno es complicado, adicionalmente los procedimientos actuales se limitan a la realización de endoscopias y biopsias que son métodos invasivos y muy especializados lo que a su vez implica un incremento del tiempo de espera para la obtención de los resultados, estos factores llevan a un incremento considerable de la mortalidad y la morbilidad(56). En una revisión sistémica sobre el papel de los polimorfismos en el desarrollo del CG y sus lesiones precursoras en América Latina los autores concluyen que el estudio de polimorfismos en genes vinculados a la inflamación puede proveer explicaciones de las diferencias en la susceptibilidad al CG observadas entre individuos (5), siguiendo esta línea es posible pensar que el análisis de los polimorfismos planteados en este trabajo puede generar mayor información sobre el riesgo de un individuo infectado con *H. pylori* a desarrollar CG mejorando las oportunidades de diagnóstico precoz(63).

3. Problema

¿Qué tipo de relación puede establecerse entre los polimorfismos *VEGFA* -2578C/A y *COX-2* -1195G/A y los niveles de pepsinógeno en una población de adultos costarricenses?

4. Justificación

El CG es uno de los cánceres de mayor incidencia en nuestro país, siendo el cuarto cáncer más común en mujeres y el tercero en hombres, el CG ocupa el primer lugar de mortalidad en todas las formas de cáncer con 12.7% (64) (65). El adenocarcinoma gástrico representa el 95% de todas las formas de cáncer gástrico. El factor de riesgo más importante es la infección por *H. pylori*. Hay otros factores que en general se clasifican como genéticos y ambientales, cuya contribución también es importante (66). En nuestro país la mortalidad del cáncer solo es superada por las enfermedades cardiovasculares, siendo este un problema de salud pública que, en 2020 afecto a más de 13000 pacientes nuevos, de los cuales, 952 fueron pacientes de CG (67).

La atrofia del estómago es la lesión precursora del modelo de carcinogénesis gástrica, se sabe que esta condición es consecuencia de una reacción inflamatoria persistente, que produce un adelgazamiento y pérdida de las glándulas de la mucosa gástrica (68). La respuesta inflamatoria derivada de la interacción entre la bacteria *H. pylori* y el hospedero se ha considerado como una característica facilitadora del cáncer (15). Algunos polimorfismos en genes que participan en la inflamación pueden facilitar este proceso (5) (63). En nuestro país se cuenta con estudios que evidencian el papel de algunos polimorfismos como HSP-70(38),IL-1B e IL-1RN(35) en el CG. Actualmente se cuenta con la oportunidad de ampliar la información sobre el desarrollo del CG estudiando los polimorfismos *VEGFA* -2578C/A y *COX-2* -1195 G/A. Conocer la frecuencia con la que se presentan estos polimorfismos en pacientes con atrofia gástrica puede mejorar el entendimiento de esta patología en nuestro país y estudios más profundos permitirían generar una opción de marcador de riesgo para favorecer la detección temprana de esta patología.

Para la elaboración de este proyecto se cuenta con un banco de datos y muestras derivadas del proyecto CRELES. Se ha determinado los niveles de PGI y PGII), se ha determinado el antecedente de la infección por *H. pylori* y *H. pylori* CagA+, toda esta información representa una gran oportunidad para el desarrollo de una investigación de esta naturaleza.

5. Objetivos

Objetivo general

Determinar la relación entre la presencia de los polimorfismos *VEGFA* -2578C /A y *COX-2* -1195 G/A y la severidad de la atrofia gástrica en un grupo de adultos costarricenses del proyecto CRELES

Objetivos específicos

1. Caracterizar la muestra estudiada mediante la descripción de parámetros demográficos y clínicos
2. Determinar la frecuencia de los genotipos del gen *VEGFA* -2578C/A en la muestra de estudio
3. Determinar la frecuencia de los genotipos del gen *COX-2* -1195 G/A en la muestra de estudio
4. Analizar la posible asociación entre los genotipos y los niveles de pepsinógeno para proponer el posible papel de estos polimorfismos en la atrofia gástrica

6. Metodología

Diseño de la investigación

Este estudio se clasifico como un estudio transversal y correlacional

Población de la investigación

La población estudiada correspondió a una submuestra derivada de un estudio tipo longitudinal denominado “Costa Rica: estudio longitudinal de envejecimiento saludable (CRELES)” donde se contó con la participación de 2589 adultos mayores de 60 años(69).

Muestra

Se tomó una submuestra derivada del total de los sujetos que participaron en el estudio CRELES (n=518). Por razones económicas se realizó una primera fase conformando dos grupos con 180 individuos en total. 60 individuos con PGs bajos que representó la condición de interés (atrofia de alto grado) y 120 individuos con pepsinógenos altos que funcionaron como grupo control. La finalidad de esta primera fase fue realizar un tamizaje aleatorio en búsqueda de posibles asociaciones, de modo que si los datos llegaban a sugerir una posible significancia a nivel estadístico la investigación se ampliaría hasta cubrir todo el marco muestral disponible.

Esta submuestra fue realizada a conveniencia, para ello se seleccionaron muestras de sujetos que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión

Fueron elegibles los sujetos del marco muestral que cumplieron con:

- I. Contaron con datos serológicos positivos o negativos por anticuerpos Anti-*H.pylori*
- II. Contaron con datos serológicos para la determinación de anticuerpos anti-factor de virulencia CagA mediante datos serológicos.
- III. Contaron con una determinación cuantitativa de pepsinógenos I y II
- IV. Existió disponibilidad de muestra de ADN en el banco de muestras biológicas del Instituto de investigaciones en salud

Criterios de exclusión

Fueron excluidos:

- I. Los sujetos cuyos valores de pepsinógeno I sean mayores a 70 pero menores a 130
- II. Los sujetos cuyos valores de la relación pepsinógeno I/ pepsinógeno II fueron mayores a 3 pero menores a 10.

Grupos de comparación

Los sujetos se agruparon en dos categorías (atrofia de alto grado y atrofia de bajo de grado), para ello se emplearon los niveles de pepsinógeno como estimador del grado de atrofia gástrica como un marcador de riesgo de desarrollar cáncer gástrico, la agrupación se realizara según lo indicado en el cuadro 2 (55)(62).

Cuadro 2. Estimación del grado de atrofia de la mucosa gástrica basada en niveles de pepsinógenos

	Atrofia severa o de alto grado	Atrofia de bajo grado
Pepsinógeno 1 (µg/L)	Menor de 70	Mayor de 130
Razón PG1/PG2	Menor de 3	Mayor de 10

Variables estudiadas

Para todos los individuos se cuenta con el dato de sexo y edad, datos derivados del estudio CRELES. En estudios previos realizados por el programa de epidemiología del cáncer del INISA se determinó la concentración de los PGs séricos, la presencia de anticuerpos contra *H. pylori* y contra el factor de virulencia CagA. En el presente estudio se determinó el genotipo de los polimorfismos *VEGFA* -2578C/A(rs699947) y *COX-2* -1195 G/A (rs689466).

Consideraciones éticas

Para este proyecto se cuenta con un consentimiento informado que fue firmado por todos los participantes, todo el proyecto cuenta con el aval del consejo ético científico de la UCR. Este proyecto pertenece al programa de epidemiología del cáncer del INISA y está inscrito en la vicerrectoría de investigación con el número de proyecto C0308.

Estrategia metodológica

Niveles de pepsinógeno

Las concentraciones ($\mu\text{g/L}$) de PGI y PGII se obtuvieron mediante la metodología de ELISA empleando un kit de la marca Biohit y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Determinación de anticuerpos Anti *H. pylori*

Los datos de la serología para la detección de anticuerpos Anti *H. pylori* se obtuvieron empleando una metodología de ELISA desarrollada en el laboratorio y basada en modificaciones de un ELISA previamente descrito(70)

Determinación de *H. pylori* CagA + o CagA-

Los datos de la serología para la detección del factor de virulencia CagA se obtuvieron utilizando una metodología de ELISA (24)

Determinación de los genotipos

Los ensayos para la determinación de los genotipos se llevaron a cabo en los laboratorios del INISA, UCR. Se utilizaron muestras de ADN previamente extraídas a partir de sangre total en tubos de muestras con EDTA como anticoagulante. Para la extracción se utilizó la metodología de proteinasa K y fenol/cloroformo. Las muestras se conservaron a -70°C .

La determinación de los genotipos para los polimorfismos *VEGFA* -2578C/A y *COX-2* -1195G/A se realizó mediante la técnica de PCR en tiempo real por medio de sondas Taqman para SNPs, empleando el método de discriminación alélica descrito por Furuya y colaboradores(71).

Para la determinación de *VEGFA* -2578C/A se empleó la sonda código C_8311602_10 5'GCCAGCTGTAGGCCAGACCCTGGCA[A/C]GATCTGGGTGGATAATCAGACTG AC3'. Para la determinación de *COX-2* -1195G/A se empleó la sonda código C_2517145_20 5'TTAGATGGAAGGGAGATTTTGACAG[C/T]TGGAATTCATCTTTGCTTTTGT 3'.

En ambos casos se empleó un volumen de reacción de $10\mu\text{L}$ conteniendo 10ng de ADN genómico; $5,5\mu\text{L}$ de mezcla de reacción "master mix" Taq Man Universal (Applied biosystems, Foster City, CA, USA), $0,55\mu\text{L}$ de la sonda respectiva y $3,95\mu\text{L}$ de agua. Las reacciones se realizaron en placas ópticas de 96 pozos en el equipo Step one plus (Applied

biosystems, Foster City, CA, USA). El programa de amplificación consistió en 1 ciclo de desnaturalización por 10 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 segundos, hibridación a 60°C por 1 minuto y extensión a 60°C por 3 minutos.

Análisis estadístico

Los datos sobre los genotipos generados en este proyecto se tabularon en una hoja de Excel. Se utilizó el software SPSS de IBM se determinaron las estadísticas descriptivas sobre la población para las variables: sexo, edad, niveles de PGI, relación PGI/PGII, porcentaje de individuos con serología positiva por el factor de virulencia CagA e infección por *H. pylori*, las frecuencias genotípicas y alélicas para cada uno de los polimorfismos estudiados. Se comprobó el cumplimiento del equilibrio de Hardy-Weinberg.

Todas estas variables se segregaron en los dos grupos de comparación y los resultados obtenidos se resumieron en tablas de contingencia. La distribución de frecuencias de las diferentes variables en cada grupo de comparación fue analizada empleando la prueba exacta prueba de Fisher.

Para determinar la capacidad de cada uno de los polimorfismos de predecir el grado de atrofia gástrica de cada sujeto generaron varios modelos de regresión logística binaria considerando las siguientes variables: sexo, edad, anticuerpos Anti *H. pylori*, anticuerpos Anti CagA.

Los modelos fueron generados utilizando el método de introducir variables y fueron evaluados mediante la prueba de Hosmer-Lemeshow (H y L) para determinar su bondad de ajuste, así mismo la pertinencia de cada modelo predictivo fue evaluada mediante el criterio de información bayesiano (BIC) y el criterio de información de Akaike (AIC), en base a la combinación de estos criterios se seleccionó el mejor modelo. Para cada uno de los modelos elegidos reportó el OR y el intervalo de confianza al 95%, así como el respectivo valor de p. Se considero significativos todos los valores de p menores a 0.10 para las regresiones logísticas mientras que para el resto de análisis se usó un valor de p de 0.05.

7. Resultados

Características generales de la población y distribución de frecuencias

Se procesaron 201 muestras de los participantes, con 3 muestras invalidas para cada polimorfismo porque no hubo amplificación mediante la técnica de PCR

El promedio de edad de la muestra estudiada fue de 75 años. Se analizo una cantidad similar de hombres y mujeres y su distribución en los dos grupos de comparación fue aleatoria. 65% de los sujetos fueron seropositivos por *H. pylori*, el porcentaje se mantuvo similar en los dos grupos de análisis. El 38% de los sujetos resultó positivo por CagA, la distribución en ambos grupos se mantuvo muy similar.

Para el caso del polimorfismo VEGFA -2578 C/A se encontró que el genotipo de referencia CC y la forma heterocigota AC no tienen una distribución significativamente diferente entre ambos grupos, a diferencia del genotipo AA, cuya distribución resulto ser significativamente diferente ($p=0.011$) y parece ser mayor en el grupo de atrofia de alto grado.

En el caso del polimorfismo *COX-2* -1195 G/A; el genotipo GG se presentó en 11 sujetos de 198 casos analizados, resultando ser una frecuencia muy baja no apta para realizar comparaciones, razón por la cual se decidió hacer el análisis empleando el término “portador de G” que agrupa los genotipos GG y GA, esto con la finalidad de visualizar mejor el posible efecto del alelo G. En cada uno de los grupos, “portador de G” y genotipo AA, los sujetos se distribuyeron de forma similar, sin diferencias estadísticamente significativas. El cuadro 3 resume todas las distribuciones de frecuencias por grupo de análisis para las variables de interés.

Cuadro 3: Características de la población estudiada y análisis bivariado de su distribución en los grupos de interés

Característica	Atrofia gástrica		Total	Valor de p*
	Alto grado	Bajo grado		
Edad				
60-69 años, n (%)	15 (26.8%)	41 (73.2%)	56	0.139
70-79 años, n (%)	28 (44.4%)	35 (55.6%)	63	0.081
80 años o más, n (%)	28 (34.1%)	54 (65.9%)	82	0.881
Total	71	130	201	
Sexo				
Masculino, n (%)	39(36.1%)	69(63.9%)	108	
Femenino, n (%)	32(34.4%)	61(65.6%)	93	0.883
Total	71	130	201	
Anticuerpos anti- <i>H. pylori</i>				
Positivo, n (%)	40(31.0%)	89 (69.0%)	129	
Negativo, n (%)	31(43.1%)	41(56.9%)	72	0.093
Total	71	130	201	
Anticuerpos Anti- CagA				
Positivo, n (%)	31(40.3%)	46(59.7%)	77	
Negativo, n (%)	40(32.3%)	84(67.7%)	124	0.289
Total	71	130	201	
Genotipo <i>VEGFA</i> -2578C/A				
AA, n (%)	17(56.7%)	13(43.3%)	30	*0.011
AC, n (%)	30(30.9%)	67(69.1%)	97	0.300
CC, n (%)	22(30.6%)	50(69.4%)	72	0.439
Total	69	130	198	
Genotipo <i>COX2</i> -1195 G/A				
Portador de G, n (%)	30(38.0%)	49(62.0%)	79	
AA, n (%)	40(33.6%)	79(66.4%)	119	0.547
Total	70	128	198	

*Prueba exacta de Fisher

Frecuencias alélicas y frecuencias genotípicas

Las frecuencias genotípicas y alélicas para ambos polimorfismos se resumen en el cuadro 4, se realizó la comprobación del Equilibrio de Hardy Weinberg (HW) concluyendo que no hay desviaciones significativas del mismo para ninguno de los dos casos.

Cuadro 4. Frecuencias genotípicas y alélicas de los genes *COX2* y *VEGFA* en la población de estudio

Genotipo	Atrofia gástrica		
	Alto grado	Bajo grado	Total
<i>COX2</i> –1195 G/A			
GG, n(frecuencia)	3 (0.04)	8 (0.06)	11 (0.06)
GT, n(frecuencia)	27 (0.39)	41 (0.32)	68 (0.34)
AA, n(frecuencia)	40 (0.57)	79 (0.62)	119 (0.60)
Total	70	128	198
Frecuencia alélica de G	0.24	0.22	0.23
Frecuencia alélica de A	0.76	0.78	0.77
Equilibrio de HW (p)	0.22	0.50	0.68
<i>VEGFA</i> –2578C/A			
AA, n(frecuencia)	17 (0.25)	13 (0.10)	30 (0.15)
AC, n(frecuencia)	30 (0.43)	67 (0.52)	97 (0.49)
CC, n(frecuencia)	22 (0.32)	50 (0.38)	72 (0.36)
Total	69	130	199
Frecuencia alélica de A	0.46	0.36	0.40
Frecuencia alélica de C	0.54	0.64	0.60
Equilibrio de HW (p)	0.29	0.19	0.80

Análisis predictivo del efecto del polimorfismo *COX-2* -1195 G/A en combinación con otras variables empleando modelos de regresión logística binaria

Se analizaron 4 posibles modelos de regresión logística para el análisis del polimorfismo *COX2* -1195 G/A. Ninguno de los modelos logro una bondad de ajuste significativa reflejada en el valor p empleando el criterio de Hosmer y Lemeshow (H y L) (Ver anexo 3), adicionalmente el antecedente de *H. pylori* y el factor de virulencia CagA mostraron colinealidad, por lo cual la elección del modelo final incluye al factor de virulencia CagA en el análisis por su relevancia en la patología gástrica que acompaña al proceso estudiado, excluyendo el antecedente de infección por *H. pylori*. Para este modelo en particular se definió como condiciones de referencia al grupo etario menor, el sexo femenino, el antecedente negativo de exposición a CagA y el genotipo portador de G. Los resultados se muestran en el cuadro 5, donde se evidencia que ninguna variable mostro una capacidad predictiva significativa.

Cuadro 5. Razón de momios y su intervalo de confianza al 95% para el polimorfismo *COX2* -1195G/A en combinación con otros factores de la población estudiada (Modelo 1)

	Atrofia gástrica			
	Alto grado	Valor p	Bajo grado	Valor p
Edad				
60-69 años	1		1	
70-79 años	2.126(0.971-4.657)	0.059	0.470(0.215-1.030)	0.059
80 años o más	1.331(0.618-2.865)	0.465	0.751(0.349-1.617)	0.465
Sexo				
Femenino	1		1	
Masculino	1.046(0.572-1.913)	0.883	0.956(0.523-1.748)	0.883
Anticuerpos Anti- CagA				
Negativo	1		1	
Positivo	1.441(0.785-2.644)	0.238	0.694(0.378-1.274)	0.238
Genotipo <i>COX2</i> -1195 G/A				
Portador de G	1		1	
AA	0.808 (0.443-1.476)	0.489	1.237 (0.677-2.259)	0.489

Análisis predictivo del efecto del polimorfismo *VEGFA* -2578 C/A en combinación con otras variables empleando modelos de regresión logística binaria

Se analizaron un total de 4 posibles modelos de regresión logística para el polimorfismo *VEGFA* -2578 C/A en combinación con los otros factores, los resultados de dichos análisis se resumen en el anexo 2. Ninguno de los modelos logro una bondad de ajuste significativa reflejada en el valor p empleando el criterio de H y L, adicionalmente el antecedente de *H. pylori* y el factor de virulencia CagA mostraron colinealidad, por lo cual la elección del modelo de se decidió incluir al factor de virulencia CagA en el análisis por su relevancia en la patología gástrica que acompaña al proceso estudiado excluyendo el antecedente de infección por *H. pylori*. Para este modelo en particular se definieron como condición de referencia las siguientes variables: el grupo etario menor, el sexo femenino, el antecedente negativo de exposición a CagA y el genotipo CC. Los resultados se muestran en el cuadro 4, donde se evidencia que la presencia del alelo AA mostro una capacidad predictiva significativa, sugiriendo un mayor riesgo de padecer atrofia gástrica de alto grado para los sujetos que acarrean dicho polimorfismo en su forma homocigota. El resto de variables no mostro una capacidad predictiva significativa con OR muy variables oscilando alrededor de 1, lo que representa la condición de referencia.

Cuadro 6. Razón de momios al 95% de confianza para el polimorfismo Genotipo *VEGFA* -2578C /A en combinación con otros factores de la población estudiada

	Atrofia gástrica			
	Alto grado	Valor p	Bajo grado	Valor p
Edad				
60-69 años	1		1	
70-79 años	2.368(1.059-5.293)	0.036	0.422(0.189-0.944)	0.036
80 años o más	1.468(0.669-3.222)	0.338	0.681(0.310-1.495)	0.338
Sexo				
Femenino	1		1	
Masculino	1.038(0.560-1.923)	0.906	0.964(0.520-1.786)	0.906
Anticuerpos Anti-CagA				
Negativo	1		1	
Positivo	1.261(0.673-2.364)	0.470	0.793(0.423-1.487)	0.470
Genotipo <i>VEGFA</i> -2578C/A				
CC	1		1	
AC	1.017(0.520-1.990)	0.961	0.983(0.503-1.924)	0.961
AA	2.821(1.141-6.970)	0.025	0.355(0.143-0.876)	0.025

8. Discusión

En la distribución de las características generales de los participantes no se encontró una distribución asimétrica en los dos grupos de comparación

Los resultados de la prueba exacta de Fisher indican que las variables edad, sexo, antecedente de exposición a *H. pylori* y *H. pylori* CagA se distribuyeron de forma aleatoria en los dos grupos de comparación (ver cuadro 3). Un factor clave en estos estudios es la edad, ya que se sabe que el CG es un proceso progresivo y que la carcinogénesis gástrica evoluciona lentamente a través del tiempo. La edad avanzada se asocia con mayor probabilidad de desarrollo de las lesiones precursoras y un aumento del riesgo de desarrollar CG. En un estudio se observó que los participantes de más de 60 años, en el contexto de infección por *H. pylori* y con alteración funcional de la mucosa gástrica evidenciada por disminución de PGI y el cociente PGI/PGII acumulaban un riesgo de 10.5 de desarrollar CG(11). Otro estudio apunta a que la incidencia de CG aumenta de manera importante a partir de los 55 años alcanzando su pico máximo en entre los 75 y 84 años(12). Considerando que todo el grupo de estudio de este trabajo pertenece a un grupo que está en riesgo aumentando de CG por el tema de la edad, es difícil poder observar alguna tendencia o asimetría entre los grupos etarios definidos para este trabajo.

La infección por *H. pylori* se asocia con una predisposición a desarrollar lesiones precursoras de CG (72) y el CG mismo(17), esto se puede ver potenciado en el caso de que la cepa de *H.pylori* sea CagA+, estas cepas se asocian a una posibilidad mayor de desencadenar lesiones precancerosas en la mucosa gástrica. Ninguno de estos dos efectos se logró evidenciar de manera clara en este estudio.

La frecuencia genotípica con la que se presentan los polimorfismos *COX-2* -1195 G/A y *VEGFA* -2578 C/A en nuestra población de estudio es similar a la encontrada en otras poblaciones de referencia

En el presente trabajo se realizó la descripción de la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos *COX2* -1195 G/A y *VEGFA* -2578 C/A en una población costarricense de adultos mayores de 60 años, a nuestro conocimiento es la primera descripción de esta naturaleza en nuestro país y en Centroamérica.

Para el polimorfismo *COX-2* -1195 G/A (cuadro 4), se obtuvo frecuencias de 6% para el genotipo GG, 34% para GA y 60% para el genotipo AA, las frecuencias permanecieron similares en los dos grupos de estudio. La presentación de estos genotipos es muy similar a la encontrada en un estudio efectuado en una población brasileña(63) y a otro realizado en una población surcoreana (73). En general esta tendencia se mantiene en distintos estudios efectuados en varios países alrededor del mundo, en un metaanálisis reciente se puede confirmar que el genotipo GG está, en general, menos representado que los otros genotipos (74).

Según lo expuesto en el cuadro 4, para *VEGFA* -2578 C/A las frecuencias genotípicas obtenidas fueron: 15% AA, 49% AC y 36% CC. Estos datos coinciden con los generados en una población brasileña(63), adicionalmente un estudio efectuado en una población surcoreana arroja una distribución de frecuencias genotípicas muy similar a la encontrada en nuestro país (75). Al observar la distribución en los dos grupos de análisis se evidencia que el genotipo AA mostró una distribución significativamente diferente entre los dos grupos, alcanzando un 25% en el caso de los participantes que se clasificaron en el grupo de atrofia de alto grado en referencia a 10% en el grupo con atrofia de bajo grado, la prueba de Fisher registrada en el cuadro 3 confirma esta observación.

El estudio en la población brasileña se eligió por ser una población latinoamericana donde el CG no está entre los principales tipos de cáncer y el estudio en la población surcoreana donde el CG tiene una incidencia y prevalencia más elevadas que en Costa Rica, pero con una menor mortalidad. En general, Brasil posee una incidencia de CG de 3.4% (4.3% en varones), Corea 12.5% (8.8% en varones) y Costa Rica 7.2% (8.4 en varones). Por su lado la prevalencia por 100 000 habitantes es de 165 en Corea, 27 en Costa Rica y 13 en Brasil. La mortalidad atribuible a CG es mayor en nuestro país con un 12.9%, Corea 8.5% y Brasil 6.1% (76) (77)

(67). Estos datos sugieren que existe una dinámica diferente en los procesos de carcinogénesis gástrica y en el desenlace de la enfermedad cuando se comparan las tres poblaciones, por eso es de vital importancia explorar factores que expliquen estas diferencias, en este caso estos SNPs se presentan en una frecuencia muy similar en las 3 poblaciones, estos datos preliminarmente sugieren que es difícil que sean, por si mismos, un factor que aumente el riesgo de progresión desde las lesiones precursoras hasta el CG, sin embargo, la validación de estas observaciones requiere más estudios.

El polimorfismo COX-2 -1195 G/A no mostro ningún tipo de relación con el grado de atrofia gástrica

Pese a que el genotipo AA del SNP COX-2 -1195 G/A media un fuerte incremento de la expresión de la proteína COX-2 e incluso se le ha asociado a un aumento del riesgo de desarrollo de algunos tipos de cáncer como el esofágico(41), el resultado global sobre esta serie de pacientes parece ser estadísticamente nulo, es decir el aumento de la condición proinflamatoria debido a la mayor cantidad de COX-2 es despreciable y no parece contribuir de ninguna forma al avance de las lesiones precancerosas de la mucosa gástrica.

Estos resultados no muestran ningún tipo de asociación entre el genotipo AA y el desarrollo de lesiones precancerosas contrastando con lo expuesto por otros autores. Por ejemplo, en un estudio con 179 muestras de tejido gástrico derivadas de sujetos con antecedente de infección por *H. pylori* expresión de COX-2 se encontró fuertemente inducida en escenarios de lesiones precancerosas como atrofia, metaplasia y displasia(44). En otro estudio, en etapas más tardías de la carcinogénesis gástrica, se observó que el genotipo AA se asocia con una mayor susceptibilidad a desarrollar CG del tipo difuso (73), otros estudios establecieron relaciones a nivel de alelos, donde el alelo G parece relacionarse con el CG de tipo intestinal (71), en general la expresión aumentada de COX-2 se ha relacionado con mayor propensión al CG o a cualquier de las lesiones o características habilitadoras del cáncer, en algunos estudios se le ha vinculado a linfagiogénesis e invasión linfática, características habilitadoras del CG(78). Hay un consenso importante en la literatura en referencia a la participación de COX-2 en los procesos de carcinogénesis gástrica, por lo tanto, estos datos no deberían ser la base para descartar más exploraciones en esta línea, puede ser que el efecto se haga evidente si se amplía el número de observaciones en este estudio o se realizan otros estudios seleccionando

la población de estudio con un método estadístico más robusto, también puede ser importante explorar otros SNPs descritos para este gen como rs5275(*COX-2*).

El genotipo AA del polimorfismo VEGFA -2578 C/A se asoció con una mayor predisposición a desarrollar atrofia gástrica de alto grado

En este estudio hay diferencia en las frecuencias con la que los sujetos con el genotipo AA se distribuyen en el grupo de atrofia de alto grado y atrofia de bajo grado (ver cuadro 3 y cuadro 4), los datos apuntan a que los portadores del genotipo AA desarrollan atrofia gástrica con mayor frecuencia que los sujetos que portan los otros genotipos.

Este hallazgo es contrario a lo esperado, ya que los antecedentes sugerían que el genotipo AA al cursar con una menor producción de VEGF-A se relacionaría principalmente con el grupo de atrofia gástrica de bajo grado, ya que los datos consultados apuntan a que el papel de esta proteína promueve la inflamación crónica, la atrofia gástrica y las lesiones subsecuentes hasta favorecer el CG.

Por ejemplo, los niveles séricos de VEGF-A fueron más elevados en pacientes seropositivos por *H. pylori* respecto a los seronegativos, en este mismo estudio se nota el efecto potenciador de las cepas de *H. pylori* CagA+, ya que los sujetos seropositivos por CagA tuvieron niveles aún más elevados de VEGF-A que los seronegativos(50). En otro estudio se encontraron asociaciones significativas entre los niveles séricos de VEGF-A y el desarrollo de atrofia gástrica e incluso metaplasia intestinal, con OR de 4.33 y 4.678 respectivamente (52).

En una investigación que incluyó 172 pacientes con antecedente de infección por *H. pylori* y con diversos tipos lesiones precursoras de CG incluyendo atrofia, metaplasia y displasia diagnosticadas por endoscopia y biopsia se encontró, mediante inmunohistoquímica, que la expresión de *VEGFA* aumento progresivamente conforme las lesiones progresaban según lo descrito en el modelo de carcinogénesis de Correa, esto sugiere que los niveles más elevados de esta proteína pueden encontrar a las etapas más tardías del proceso, sugiriendo una participación importante en esta parte del proceso. Esta observación de la participación crucial del VEGF-A en etapas tardías de la carcinogénesis gástrica es apoyada por un estudio en el que se encontró que los sujetos portadores del genotipo AA se asociaron con protección frente al desarrollo del CG(63), esto se puede atribuye a una menor expresión de la proteína

VEGF-A en momentos donde para el crecimiento tumoral es crítico contar con una adecuada irrigación que le permita satisfacer sus elevadas demandas energéticas.

No se encontraron datos publicados que sustenten los hallazgos de este trabajo sobre el potencial papel del genotipo AA, los resultados parecen apuntar en dirección opuesta a lo expuesto por otros autores. Dicho esto, es importante hacer algunas consideraciones en cuanto al diseño del trabajo y a la plausibilidad biológica de este hallazgo.

En cuanto al diseño del trabajo, se sabe la atrofia gástrica es la una de las lesiones precursoras de la cascada de Correa, pero no se desarrolla exclusivamente en los sujetos con lesiones precancerosas o CG sino que también otras condiciones de origen inflamatorio como la gastritis atrófica autoinmune (79). En esta línea, emplear los niveles de PGs como criterio para segregar los participantes en los dos grupos de comparación podría inducir un sesgo que en un número de observaciones pequeño tenga un efecto importante, por lo tanto, es necesario ampliar el número de observaciones para minimizar el posible efecto de este sesgo.

A nivel de plausibilidad biológica en otros modelos se ha visto que VEGF-A participa en el aumento de la permeabilidad vascular y en la reparación tisular, dos eventos claves para una buena respuesta inmunológica. Se propone que es posible VEGF-A tenga un rol importante en las etapas tempranas de la respuesta inflamatoria contra *H. pylori* en la mucosa gástrica, de modo que los portadores del genotipo AA adquieran algún grado de incompetencia para el control y la erradicación de la bacteria e incluso para la reparación tisular, todos eventos propios de una buena respuesta inmunológica.

En este escenario, la persistencia de *H. pylori*, por una inadecuada resolución del cuadro infeccioso podría desencadenar todos los efectos propios del CG y sus lesiones precursoras, lo que sucede en adelante escapa del alcance de este trabajo. Aumentar el número de observaciones y confirmar esta tendencia puede ser el punto de partida para generar nuevas preguntas de investigación, la mayoría de los trabajos se concentran en el rol que tiene VEGF-A en la angiogénesis y su participación en los eventos tardíos de la carcinogénesis gástrica, de modo que actualmente hay un vacío de conocimiento sobre el papel de VEGF-A en el control y resolución de la infección por *H. pylori* en etapas tempranas.

Ninguno de los modelos de regresión logística binaria explorados en este estudio para los polimorfismos COX-2 -1195 G/A y VEGFA -2578 C/A mostro una capacidad predictiva estadísticamente significativa

A pesar de realizar varios intentos de combinar todos los factores en modelos de regresión logística binaria no se logró obtener un modelo que reflejara una buena capacidad predictiva, esto queda evidenciado en los valores de p obtenidos mediante la prueba de H y L, que todos resultados ser estadísticamente no significativos (ver anexos 1 y 2). La poca capacidad predictiva del desarrollo de atrofia gástrica severa de los modelos de regresión logística binaria aquí explorados probablemente es reflejo de la distribución individual de las variables estudiadas (edad, sexo, antecedente de exposición a *H. pylori* CagA+), en las distintas categorías en las que se agruparon.

Limitaciones del estudio

La endoscopia y las observaciones histológicas son los métodos de referencia para evidenciar el estado de la mucosa gástrica, sin embargo, en este trabajo se han establecido los grupos de comparación (atrofia de bajo grado y atrofia de alto grado) en base a los niveles de PGs con el riesgo de que otras condiciones diferentes a las lesiones precancerosas o el CG mismo pueden alterar la funcionalidad de la mucosa gástrica y por lo tanto la información derivada de su interpretación carece de especificidad suficiente para establecer un diagnóstico en comparación con las técnicas histológicas(80), siendo esta la desventaja principal de emplear esta estrategia en nuestro estudio. Se reconoce entonces que este método de segregación acarrea un sesgo potencial, cuyo riesgo se asume debido a la conveniencia y facilidad de su implementación.

9. Conclusiones y recomendaciones

Este trabajo incluye la primera descripción de las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos *COX2* -1195 G/A y *VEGFA* -2578 C/A en Costa Rica, se ha encontrado que la distribución de los alelos que componen estos SNP es muy similar a la que presentan otras poblaciones. Estos estudios se constituyen en parte de una lista de polimorfismos vinculados a la inflamación que han sido explorados en nuestro país, incluyendo polimorfismos en receptores tipo Toll, proteínas de choque térmico y citocinas como IL-1, IL-10, TNF- α entre otros y resalta la necesidad que existe de conocer y comprender los factores ligados al hospedero que inciden para que inflamación crónica derivada de la infección por *H. pylori* tenga distintos los desenlaces conocidos, incluyendo CG. Esta información pretende orientar acciones efectivas para la prevención, diagnóstico y el manejo de esta patología

Se estudiaron dos SNPs, *COX2* -1195 G/A el genotipo AA está asociado con un aumento en la expresión del gen cursando con niveles más elevados de la proteína COX-2 mientras que en el caso *VEGFA* -2578 C/A el genotipo AA se asocia una disminución de la producción de la proteína VEGF-A, este genotipo es el que muestra una relación estadísticamente significativa con la atrofia gástrica de alto grado en nuestro estudio, dicha relación debe ser corroborada ampliando la cantidad de participantes. Actualmente se conoce mucho del rol de VEGF-A en etapas tardías de los procesos tumorales, pero en etapas tempranas los datos son pocos y hacen falta más estudios, esto abre la puerta para explorar el rol de VEGF-A en las etapas tempranas de la carcinogénesis gástrica.

Se recomienda ampliar el estudio de este polimorfismo hasta completar las 540 muestras disponibles en el marco muestral total, con la finalidad de verificar los hallazgos obtenidos. Además, es importante continuar explorando otros posibles factores asociados al comportamiento del CG en nuestro país, de modo que se pueda continuar la ruta de desarrollar estrategias predictivas que faciliten la detección temprana de los casos de CG y permitan ofrecer mejores alternativas y calidad de vida a quienes padecen esta enfermedad o están en riesgo de padecerla.

10. Anexos

Anexo1. Cuadro de operacionalización de variables

Cuadro 7. Cuadro de operacionalización de variables

Objetivos específicos	Variable	Definición Conceptual	Dimensiones (variables contenidas en la definición conceptual)	Definición operacional	Indicadores	Nivel de medición 33
Caracterizar la población estudiada mediante la descripción de demográficos y parámetros bioquímicos como determinación de anticuerpos Anti <i>H. pylori</i> y determinación serológica de <i>H. pylori</i> CagA+, cuantificación de niveles de pepsinógeno, relación de pepsinógeno (PG1/PG2)	Características demográficas y antecedentes clínicos de la población de estudio	Conjunto de características biológicas presentes en el grupo de estudio, así como sus antecedentes clínicos de relevancia	<ol style="list-style-type: none"> 1. Edad 2. Sexo 3. Antecedente de infección por <i>H. pylori</i> 4. Antecedente de infección por <i>H. pylori</i> CagA+ o CagA- 5. Niveles de pepsinógeno 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tiempo transcurrido en años desde el nacimiento 2. Sexo biológico 3. Caracterización de un factor de virulencia que se asocia a riesgo de CA gástrico 4. Estimación del grado de atrofia gástrica según intervalos predefinidos 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 60-69 años, 70-79 años, ≥80 años 2. Masculino/ femenino 3. CagA+, CagA- 4. Concentración (µg/L) de pepsinógeno I y II y razón PGI/PGII 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Continua (según registro) 2. Nominal 3. Nominal 4. Continua
Determinar la frecuencia de los genotipos del gen COX-2 (-1195 G>A) en un grupo de sujetos con pepsinógenos altos y un grupo de sujetos con pepsinógenos bajos	Frecuencia de las variantes alélicas del gen COX-2	Porcentaje de las unidades de observación que se agrupan en las categorías de estudio	<ol style="list-style-type: none"> 1. Homocigoto (GG) 2. Heterocigoto (GA) 3. Homocigoto (AA) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Los dos alelos presentan el mismo nucleótido (GG) 2. Presencia de ambos nucleótidos (GA) 3. Los dos alelos presentan el mismo nucleótido (AA) 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Patrón homocigoto (GG) 2. Patrón heterocigoto (GA) 3. Patrón homocigoto (AA) 	<p>Discreta: frecuencia</p> <p>Discreta: frecuencia</p> <p>Discreta: frecuencia</p>

<p>Determinar la frecuencia relativa de los genotipos del gen <i>VEGFA</i> (-2578C>A) en un grupo de sujetos con pepsinógenos altos y un grupo de sujetos con pepsinógenos bajos</p>	<p>Frecuencia de las variantes alélicas del gen <i>VEGFA</i></p>	<p>Porcentaje de las unidades de observación que se agrupan en las categorías de estudio</p>	<p>1. Homocigoto (CC) 2. Heterocigoto (CA) 3. Homocigoto (AA)</p>	<p>1. Los dos alelos presentan el mismo nucleótido (CC) 2. Presencia de ambos nucleótidos (CA) 3. Los dos alelos presentan el mismo nucleótido (AA)</p>	<p>1. Patrón homocigoto (AA) 2. Patrón heterocigoto (AG) 3. Patrón homocigoto (GG)</p>	<p>Discreta: frecuencia Discreta: frecuencia Discreta: frecuencia</p>
<p>Analizar la posible asociación entre el genotipo que porta cada individuo y los niveles de pepsinógeno como indicador de la severidad de la atrofia gástrica para proponer el posible papel de estos polimorfismos en esta patología</p>	<p>Asociación entre los polimorfismos en estudio y la severidad de la atrofia gástrica</p>	<p>Estadístico que cuantifica el grado de asociación entre la presencia de un genotipo y el riesgo de padecer atrofia gástrica</p>	<p>Razón de los momios (OR, de sus siglas en inglés) 221</p>	<p>Indicador estadístico que cuantifica el grado de asociación entre dos variables</p>	<p>Razón de los momios</p>	<p>Continua: razón de los momios e intervalo de confianza.</p>

Anexo 2. Indicadores de los modelos de regresión logística para el polimorfismo *COX2* - 1195 G/A en combinación con otros factores

Cuadro 8. Indicadores de los modelos de regresión logística para el polimorfismo *COX2* 8473 G/A en combinación con otros factores

Modelo	VARIABLES	Hosmer y Lemeshow	AIC	BIC
1	Edad, Sexo, Anticuerpos anti- <i>H. pylori</i> , Anticuerpos Anti-CagA, Genotipo <i>COX-2</i> - 1195 G/A	0.836	122.608	145.626
2	Edad, Sexo, Anticuerpos anti- <i>H. pylori</i> , Genotipo <i>COX-2</i> -1195 G/A	0.774	85.123	104.853
3	Edad, Sexo, Anticuerpos Anti-CagA, Genotipo <i>COX-2</i> -1195 G/A	0.832	89.065	108.794
4	Edad, Sexo, Genotipo <i>COX-2</i> -1195 G/A	0.871	53.646	70.087

Anexo 3. Indicadores de los modelos de regresión logística para el polimorfismo *VEGFA* -2578 C/A en combinación con otros factores

Cuadro 9. Indicadores de los modelos de regresión logística para el polimorfismo *VEGFA* -2587 C/A en combinación con otros factores

Modelo	VARIABLES	Hosmer y Lemeshow	AIC	BIC
1	Edad, Sexo, Anticuerpos anti- <i>H. pylori</i> , Anticuerpos Anti-CagA, Genotipo <i>VEGFA</i> -2578 C/A	0.836	122.608	145.626
2	Edad, Sexo, Anticuerpos anti- <i>H. pylori</i> , Genotipo <i>VEGFA</i> -2578 C/A	0.774	85.123	104.853
3	Edad, Sexo, Anticuerpos Anti-CagA, Genotipo <i>VEGFA</i> -2578 C/A	0.832	89.065	108.794
4	Edad, Sexo, Genotipo <i>VEGFA</i> -2578 C/A	0.871	53.646	70.087

11. Bibliografia

1. Spence AD, Cardwell CR, McMenamin ÚC, Hicks BM, Johnston BT, Murray LJ, et al. Adenocarcinoma risk in gastric atrophy and intestinal metaplasia: A systematic review. *BMC Gastroenterol.* 2017;17(1):1–9.
2. Dinis-Ribeiro M, Areia M, De Vries AC, Marcos-Pinto R, Monteiro-Soares M, O'Connor A, et al. Management of precancerous conditions and lesions in the stomach (MAPS): Guideline from the European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE), European Helicobacter Study Group (EHS), European Society of Pathology (ESP), and the Sociedade Portuguesa de Endoscopia Digestiva. *Virchows Arch.* 2012;460(1):19–46.
3. Correa P. Perspectives in Cancer Research A Human Model of Gastric Carcinogenesis. *Cancer Res J.* 1988;(13):3554–60.
4. Ajani JA, Lee J, Sano T, Janjigian YY, Fan D, Song S. Gastric adenocarcinoma. *Nat Rev Dis Prim.* 2017;3.
5. Chiurillo MA. Role of gene polymorphisms in gastric cancer and its precursor lesions: Current knowledge and perspectives in Latin American countries. *World J Gastroenterol.* 2014;20(16):4503–15.
6. Polk DB, Peek RM. Helicobacter pylori: Gastric cancer and beyond. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2010;10(6):403–14.
7. González CA, Megraud F, Buissonniere A, Lujan Barroso L, Agudo A, Duell EJ, et al. Helicobacter pylori infection assessed by ELISA and by immunoblot and noncardia gastric cancer risk in a prospective study: The Eurgast-EPIC project. *Ann Oncol.* 2012;23(5):1320–4.
8. Parsonnet J, Gary D FM. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med.* 1991;325(16).
9. Crowe SE. Helicobacter pylori Infection. *N Engl J Med.* 2019;380(12):1158–65.
10. Wroblewski LE, Peek RM, Wilson KT. Helicobacter pylori and gastric cancer: Factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(4):713–39.
11. Eybpoosh S, Talebkhan Y, Saberi S, Esmaili M, Oghalaie A, Ebrahimzadeh F, et al. Age-Specific Gastric Cancer Risk Indicated by the Combination of Helicobacter pylori Sero-Status

and Serum Pepsinogen Levels. *Iran Biomed J.* 2015;19(3):133–42.

12. Christie J, Shepherd NA, Codling BW, Valori RM. Gastric cancer below the age of 55: Implications for screening patients with uncomplicated dyspepsia. *Gut.* 1997;41(4):513–7.
13. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.
14. Breno B. Pathogenesis and clinical management of *Helicobacter pylori* gastric infection. *World J Gastroenterol.* 2019;9327(37).
15. Yamaoka Y, Graham DY. *Helicobacter pylori* virulence and cancer pathogenesis. *Futur Oncol.* 2014;10(8):1487–500.
16. Chmiela M, Kupcinskas J. Review: Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2019;24(S1):1–5.
17. Eslick GD. *Helicobacter pylori* infection causes gastric cancer? A review of the epidemiological, meta-analytic, and experimental evidence. *World J Gastroenterol.* 2006;12(18):2991–9.
18. Suriani R, Colozza Mb M, Cardesi E, Mazzucco D, Marino M, Grosso S, et al. CagA and VacA *Helicobacter pylori* antibodies in gastric cancer. Vol. 22, *Can J Gastroenterol.* 2008.
19. Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010;7(11):629–41.
20. Backert S, Blaser MJ. The role of CagA in the gastric biology of *helicobacter pylori*. Vol. 76, *Cancer Research.* American Association for Cancer Research Inc.; 2016. p. 4028–31.
21. Javed S, Skoog EC, Solnick J V. Impact of *helicobacter pylori* virulence factors on the host immune response and gastric pathology. Vol. 421, *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 2019. 21–52 p.
22. Chen SY, Zhang RG, Duan GC. Pathogenic mechanisms of the oncoprotein CagA in *H. pylori*-induced gastric cancer (Review). *Oncol Rep.* 2016;36(6):3087–94.
23. Gwack J, Shin A, Kim CS, Ko KP, Kim Y, Jun JK, et al. CagA-producing *Helicobacter pylori* and increased risk of gastric cancer: A nested case-control study in Korea. *Br J Cancer.*

2006;95(5):639–41.

24. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, et al. Infection with *Helicobacter pylori* Strains Possessing *cagA* Is Associated with an Increased Risk of Developing Adenocarcinoma of the Stomach. *Cancer Res.* 1995;55(10):2111–5.
25. Tserentogtokh T, Gantuya B, Subsomwong P, Oyuntsetseg K, Bolor D, Erdene-Ochir Y, et al. Western-type *Helicobacter pylori* CagA are the most frequent type in Mongolian patients. *Cancers (Basel).* 2019;11(5):2–11.
26. Maeda S, Akanuma M, Mitsuno Y, Hirata Y, Ogura K, Yoshida H, et al. Distinct Mechanism of *Helicobacter pylori*-mediated NF- κ B Activation between Gastric Cancer Cells and Monocytic Cells. *J Biol Chem.* 2001;276(48):44856–64.
27. Smith MF, Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF- κ B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biol Chem.* 2003 Aug 29;278(35):32552–60.
28. Gobert AP, Mersey BD, Cheng Y, Blumberg DR, Newton JC, Wilson KT. Cutting Edge: Urease Release by *Helicobacter pylori* Stimulates Macrophage Inducible Nitric Oxide Synthase . *J Immunol.* 2002;168(12):6002–6.
29. Hessey SJ, Spencer J, Wyatt JI, Sobala G, Rathbone BJ, Axon ATR, et al. Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. *Gut.* 1990;31(2):134–8.
30. Condit CM, Achter PJ, Lauer I, Sefcovic E. The changing meanings of “mutation:” A contextualized study of public discourse. *Hum Mutat.* 2002 Jan 1;19(1):69–75.
31. Brookes AJ. The essence of SNPs. Vol. 234, *Gene.* Gene; 1999. p. 177–86.
32. Shastri BS. SNP alleles in human disease and evolution. *J Hum Genet.* 2002;47(11):561–6.
33. Chanock S. Candidate genes and single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the study of human disease. *Dis Markers.* 2001;17(2):89–98.
34. Lanás A. *Gastroenterología y Hepatología.* 2014;37(7).
35. Alpízar-Alpízar W, Pérez-Pérez GI, Une C, Cuenca P, Sierra R. Association of interleukin-1B and interleukin-1RN polymorphisms with gastric cancer in a high-risk population of Costa

- Rica. *Clin Exp Med*. 2005;5(4):169–76.
36. De Oliveira JG, Rossi AFT, Nizato DM, Miyasaki K, Silva AE. Profiles of gene polymorphisms in cytokines and toll-like receptors with higher risk for gastric cancer. *Dig Dis Sci*. 2013;58(4):978–88.
 37. Con SA, Con-Wong R, Con-Chin GR, Con-Chin VG, Takeuchi H, Valerín AL, et al. Serum pepsinogen levels, *Helicobacter pylori* CagA status, and cytokine gene polymorphisms associated with gastric premalignant lesions in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16(12):2631–6.
 38. Ferrer-Ferrer M, Malespín-Bendaña W, Ramírez V, González MI, Carvajal A, Une C. Polymorphisms in genes coding for HSP-70 are associated with gastric cancer and duodenal ulcer in a population at high risk of gastric cancer in Costa Rica. *Arch Med Res*. 2013;44(6):467–74.
 39. Moss SF, Blaser MJ. Mechanisms of disease: Inflammation and the origins of cancer. Vol. 2, *Nature Clinical Practice Oncology*. *Nat Clin Pract Oncol*; 2005. p. 90–7.
 40. Alpizar Warner, Une Clas SR. Revisión La inflamación y su papel en el desarrollo del cáncer gástrico. *Acta Med Costarric*. 2009;51(2):76–82.
 41. Zhang X, Miao X, Tan W, Ning B, Liu Z, Hong Y, et al. Identification of Functional Genetic Variants in Cyclooxygenase-2 and Their Association With Risk of Esophageal Cancer. *Gastroenterology*. 2005;129(2):565–76.
 42. Leng WD, Wen XJ, Kwong JSW, Huang W, Chen JG, Zeng XT. COX-2 rs689466, rs5275, and rs20417 polymorphisms and risk of head and neck squamous cell carcinoma: A meta-analysis of adjusted and unadjusted data. *BMC Cancer*. 2016;16(1).
 43. Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase 2: A molecular target for cancer prevention and treatment. Vol. 24, *Trends in Pharmacological Sciences*. *Trends Pharmacol Sci*; 2003. p. 96–102.
 44. Tiwari SK, Shaik AS, Shaik AP, Alyousef AA, Bardia A, Habeeb MA, et al. Gene expression patterns of COX-1, COX-2 and iNOS in *H. Pylori* infected histopathological conditions. *Microb*

- Pathog. 2019;135:103634.
45. Echizen K, Hirose O, Maeda Y, Oshima M. Inflammation in gastric cancer: Interplay of the COX-2/prostaglandin E2 and Toll-like receptor/MyD88 pathways. *Cancer Sci.* 2016;107(4):391–7.
 46. Zhang Y, Fen Pan K, Zhang L, Ling Ma J, Zhou T, You Li J, et al. Helicobacter pylori cyclooxygenase-2 and evolution of gastric lesions: results from an intervention trial in China. *Carcinog Adv Access.* 2016;1–3.
 47. Fu J, Li Z, Li N. The association between COX-2 gene rs5275 polymorphism and Nasopharyngeal carcinoma risk. *Pathol Res Pract.* 2018;214(10):1579–82.
 48. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico MG. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation.* 1996;93(8):1493–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8608615/>
 49. Brogan IJ, Khan N, Isaac K, Hutchinson JA, Pravica V, Hutchinson I V. Novel polymorphisms in the promoter and 5' UTR regions of the human vascular endothelial growth factor gene. *Hum Immunol.* 1999;60(12):1245–9.
 50. Siregar G, Sari D, Sungkar T. Serum VEGF levels in Helicobacter pylori infection and correlation with Helicobacter pylori cagA and vacA genes. *Open Access Maced J Med Sci.* 2017;5(2):137–41.
 51. Feng CW, Wang LD, Jiao LH, Liu B, Zheng S, Xie XJ. Expression of p53, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in gastric precancerous and cancerous lesions: Correlation with clinical features. *BMC Cancer.* 2002;2:1–7.
 52. Siregar GA, Halim S, Sitepu VR. Serum TNF- α , IL-8, VEGF levels in Helicobacter pylori infection and their association with degree of gastritis. *Acta Med Indones.* 2015;47(2):120–6.
 53. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson I V., et al. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(1):260–4.
 54. Beales ILP, Calam J. Interleukin 1 β and tumour necrosis factor α inhibit acid secretion in

- cultured rabbit parietal cells by multiple pathways. *Gut*. 1998;42(2):227–34.
55. Yakut M, Örmeci N, Erdal H, Keskin O, Karayel Z, Tutkak H, et al. The association between precancerous gastric lesions and serum pepsinogens, serum gastrin, vascular endothelial growth factor, serum interleukin-1 Beta, serum toll-like receptor-4 levels and *Helicobacter pylori* Cag A status. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2013;37(3):302–11.
 56. Agkoc M, Dursun H, Albayrak F, Yilmaz O, Kiziltunc A, Yilmaz A, et al. Usefulness of Serum Pepsinogen Levels as a Screening Test For Atrophic Gastritis and Gastric Cancer. *Eurasian J Med*. 2010;42(1):15–8.
 57. Kishikawa H, Kimura K, Takarabe S, Kaida S, Nishida J. *Helicobacter pylori* antibody titer and gastric cancer screening. *Dis Markers*. 2015;2015(October).
 58. Cho JH, Jeon SR, Kim HG, Jin SY, Park S. The serum pepsinogen levels for risk assessment of gastric neoplasms. *Med (United States)*. 2017;96(29).
 59. Boron, Walter F Boulpaep EL. *Medical physiology: a cellular and molecular approach*. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2012. 1352 p.
 60. Yamaguchi Y, Nagata Y, Hiratsuka R, Kawase Y, Tominaga T, Takeuchi S, et al. Gastric Cancer Screening by Combined Assay for Serum Anti-*Helicobacter pylori* IgG Antibody and Serum Pepsinogen Levels-The ABC Method. *Digestion*. 2016;93(1):13–8.
 61. Massarrat S, Haj-Sheykholeslami A, Mohamadkhani A, Zendehtel N, Aliasgari A, Rakhshani N, et al. Pepsinogen II can be a potential surrogate marker of morphological changes in corpus before and after *H. pylori* eradication. *Biomed Res Int*. 2014;2014.
 62. Watabe H, Mitsushima T, Yamaji Y, Okamoto M, Wada R, Kokubo T, et al. Predicting the development of gastric cancer from combining *Helicobacter pylori* antibodies and serum pepsinogen status: A prospective endoscopic cohort study. *Gut*. 2005;54(6):764–8.
 63. Furuya TK, Jacob CE, Tomitão MTP, Camacho LCC, Ramos MFKP, Eluf-Neto J, et al. Association between polymorphisms in inflammatory response-related genes and the susceptibility, progression and prognosis of the diffuse histological subtype of gastric cancer. *Genes (Basel)*. 2018;9(12):1–22.

64. Vargas S. Etiología Y Epidemiología. Rev Médica Costa Rica y Centroamérica. 2016;73(618):33–6.
65. Dávila Meneses A, Quintanilla Retana F, Castillo Araya K, Sánchez Ortiz L, Barquero Uriarte T, Romero Zúñiga JJ. Caracterización clínica y epidemiológica de la población tamizada en el centro de detección temprana de cáncer gástrico, costa rica: período 1996-2015. Rev Costarric Salud Pública. 2018;27(2):68–81.
66. Ramesh T, Senthilkumar C. Cellular and molecular aspects of polyphenol actions on gastric cancer. Nat Prod Their Act Compd Dis Prev. 2012;(June):223–43.
67. World health organization. Costa Rica. Incidence, mortality and prevalence of cancer. Source: Cancer today. 2020. Accesado el 2 de junio del 2021. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/188-costa-rica-fact-sheets.pdf>
68. Warner Alpízar-Alpízar. Revisión La inflamación y su papel en el desarrollo del cáncer gástrico. Acta Med Costarric. 2009;51(2):76–82.
69. Méndez-Chacón E, Santamaría-Ulloa C, Rosero-Bixby L. Factors associated with hypertension prevalence, unawareness and treatment among Costa Rican elderly. BMC Public Health. 2008;8:1–11.
70. Méndez-Chacón E, Ramírez V, Malespín-Bendaña W, Pérez-Pérez G, Une C. Validation of a serological test for helicobacter pylori infection in Costa Rica. Rev Biol Trop. 2020;68(2):551–62.
71. Furuya TK, Jacob CE, Tomitão MTP, Camacho LCC, Ramos MFKP, Eluf-Neto J, et al. Association between polymorphisms in inflammatory response-related genes and the susceptibility, progression and prognosis of the diffuse histological subtype of gastric cancer. Genes (Basel). 2018;9(12):1–24.
72. Ebule AI, Longdoh AN, Paloheimo IL. Helicobacter pylori infection and atrophic gastritis. Afr Health Sci. 2013;13(1):112–7.
73. Shin WG, Kim HJ, Cho SJ, Kim HS, Kim KH, Jang MK, et al. The COX-2-1195AA genotype is associated with diffuse-type gastric cancer in Korea. Gut Liver. 2012;6(3):321–7.
74. Zhang XW, Li J, Jiang YX, Chen YX. Association between COX-2 -1195G>A polymorphism and

- gastrointestinal cancer risk: A meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2017;23(12):2234–45.
75. Kim YJ, Chung WC, Jun KH, Chin HM. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor (VEGF) associated with gastric cancer recurrence after curative resection with adjuvant chemotherapy. *BMC Cancer*. 2019;19(1):1–9.
 76. World health organization. Republic of Korea. Incidence, mortality and prevalence of gastric cancer. Source: Cancer today. 2020. Accesado el 2 de junio del 2021 . Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/410-korea-republic-of-factsheets.pdf>
 77. World health organization. Brasil. Incidence, mortality and prevalence of gastric cancer. Source: Cancer today. 2020. Accesado el 2 de junio del 2021. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/76-brazil-fact-sheets.pdf>
 78. Da MX, Wu XT, Wang J, Guo TK, Zhao ZG, Luo T, et al. Expression of Cyclooxygenase-2 and Vascular Endothelial Growth Factor-C Correlates with Lymphangiogenesis and Lymphatic Invasion in Human Gastric Cancer. *Arch Med Res*. 2008 Jan 1;39(1):92–9.
 79. Lahner E, Zagari RM, Zullo A, Sabatino A Di, Meggio A, Cesaro P, et al. Chronic atrophic gastritis: Natural history, diagnosis and therapeutic management. A position paper by the Italian Society of Hospital Gastroenterologists and Digestive Endoscopists [AIGO], the Italian Society of Digestive Endoscopy [SIED], the Italian Society of Gastroenterology [SIGE], and the Italian Society of Internal Medicine [SIMI]. *Dig Liver Dis*. 2019;51:1621–32.
 80. Cho JH, Jeon SR, Kim HG, Jin SY, Park S. The serum pepsinogen levels for risk assessment of gastric neoplasms. *Med*. 2017;96(29).