



Trabajo Fin de Grado

INFLUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS DE CICLOOXIGENASA-2 EN EL DESARROLLO DEL ADENOCARCINOMA GÁSTRICO EN ARAGÓN.

INFLUENCE OF CICLOOXYGENASE-2 POLYMORPHISMS IN THE DEVELOPMENT OF GASTRIC ADENOCARCINOMA IN ARAGON.

Autor/es

Ana Barea Arguiñena

Director/es

María Asunción García González
Elena Piazuelo Ortega

Facultad / Escuela
Curso 2016-17

INDICE

INDICE.....	1
RESUMEN:	2
ABSTRACT:	3
INTRODUCCIÓN	4
Infección por <i>Helicobacter pylori</i> y cáncer gástrico	6
Inflamación crónica y cáncer gástrico: papel de la Ciclooxygenasa 2.....	8
Susceptibilidad genética y cáncer gástrico.....	10
HIPÓTESIS	12
OBJETIVOS	12
MÉTODOS	13
PACIENTES.....	13
GENOTIPADO DE CICLOOXIGENASA 2	14
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	16
RESULTADOS	17
Características clínicas y demográficas de la población	17
Genotipado de los polimorfismos de <i>PTGS2</i>	19
DISCUSIÓN.....	25
CONCLUSIONES.....	28
BIBLIOGRAFIA	29
ABREVIATURAS	34
ANEXOS	35

RESUMEN:

Introducción: La Ciclooxygenasa 2 (Cox-2) es una enzima que interviene en la conversión del ácido araquidónico a prostaglandinas las cuales son importantes mediadores de la respuesta inmune a nivel gastrointestinal. La expresión de Cox-2 es inducida por agentes mitógenos y proinflamatorios y participa de forma directa en el proceso de carcinogénesis gástrica. Recientemente, se ha descrito la asociación de ciertos polimorfismos del gen PTGS2 (o COX-2) con un mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico (CG). Puesto que la producción de Cox-2 está regulada genéticamente, el objetivo de nuestro estudio fue analizar el papel de ciertos polimorfismos localizados en el gen *PTGS2* en el desarrollo del CG en Aragón. Métodos: ADN genómico procedente de 240 pacientes con CG primario diagnosticados en 4 hospitales aragoneses y 240 individuos sanos emparejados por sexo y edad (± 5 años) fue tipado mediante técnicas de PCR, RFLP y TaqMan para el estudio de 5 SNPs localizados en el gen *PTGS2* (-1195 G>A rs689466, -765 G>C rs20417, 3050 G>C rs5277, +8473 T>C rs5275 y +9850 A>G rs4648298). El estatus de infección por *H. pylori* y de anticuerpos frente a las citotoxinas CagA/VacA se realizó mediante Western blot. Resultados: El análisis de regresión logística identificó la infección por cepas CagA+ de *H. pylori* (OR: 2.79; 95% IC: 1.87-4.17, $p < 0.0001$) y la historia familiar de CG (OR: 5.56; 95% IC: 2.29-13.4, $p < 0.0001$) como factores independientes asociados a un mayor riesgo de desarrollar CG en Aragón. En relación con el estudio genético, el SNP +8473 T>C rs5275 se asoció con un mayor riesgo de CG (OR: 2.36; 95% IC: 1.19-4.68, modelo recesivo), principalmente de predominio distal (OR: 2.33; 95% IC: 1.13-4.80) y tipo histológico intestinal (OR: 2.76; 95% IC: 1.26-6.03). El análisis estratificado en función del estatus de infección por *H. pylori*, mostró que la asociación entre el SNP rs5275 y CG era estadísticamente significativa sólo en el subgrupo de individuos infectados por *H. pylori* (OR: 2.40; 95% IC: 1.04-5.54; $p = 0.03$). Conclusión: Nuestros resultados sugieren que el polimorfismo +8473 T>C rs5275 del gen *PTGS2* está implicado en la susceptibilidad al desarrollo del CG en la población aragonesa.

Palabras clave: cáncer gástrico, ciclooxygenasa 2, susceptibilidad genética, *Helicobacter pylori*.

ABSTRACT:

Background & aim: Cyclooxygenase 2 (COX-2) is a key enzyme in mediating the conversion of arachidonic acid into prostaglandins which are important regulators of the immune inflammatory response in the gastrointestinal mucosa. COX-2 expression is induced by proinflammatory and mitogenic stimuli and involved in several mechanisms of gastric cancer (GC) development. Recently, some polymorphisms located in the *PTGS* (or *COX-2*) gene have been related to increased risk of developing GC. Since COX-2 expression is genetically regulated, the aim of our study was to assess the relevance of several functional *PTGS2* gene polymorphisms on GC susceptibility in a population from Aragon. Methods: Genomic DNA from 240 Caucasian patients with primary GC diagnosed in 4 hospitals in Aragon, and 240 sex- and aged- (± 5 years) matched cancer-free healthy controls was typed for 5 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *PTGS2* gene (-1195 G>A rs689466, -765 G>C rs20417, 3050 G>C rs5277, +8473 T>C rs5275 y +9850 A>G rs4648298) by PCR, RFLP and TaqMan assays. *H. pylori* infection and CagA/VacA antibody status were determined by Western blot in patients and controls. Results: Logistic regression analysis identified *H. pylori* infection with CagA strains (OR: 2.79; 95% CI: 1.87-4.17, $p < 0.0001$) and positive family history of GC (OR: 5.56; 95% CI: 2.29-13.4, $p < 0.0001$) as independent risk factors for GC in our population. Concerning gene polymorphisms, the SNP +8473 T>C rs5275 was significantly associated with an increased risk of GC (OR: 2.36; 95% CI: 1.19-4.68, recessive model), mainly located in the non-cardia stomach (OR: 2.33; 95% CI: 1.13-4.80) and of the intestinal histological subtype (OR: 2.76; 95% CI: 1.26-6.03). Stratified analysis according to the status of *H. pylori* infection revealed a significant association between the rs5275 gene polymorphism and GC risk only in the subgroup of subjects infected by *H. pylori* (OR: 2.40; 95% CI: 1.04-5.54; $p = 0.03$). Conclusion: Our data show that the *PTGS2* +8473 T>C rs5275 gene polymorphism is involved in defining the genetic basis of the susceptibility to CG in a population from Aragon.

Keywords: gastric cancer, cyclooxygenase 2, genetic susceptibility, *Helicobacter pylori*.

INTRODUCCIÓN

El CG representa un grave problema sanitario, especialmente en algunas naciones como Japón, China y diversos países de América Latina¹. Este tipo de cáncer constituye, tras el cáncer de pulmón, la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo². Aunque su incidencia en países industrializados ha disminuido notablemente, en España supone 18 casos/100.000 en varones y 8,4 casos/100.000 habitantes al año en mujeres³⁻⁴. La mayoría (90-95%) de los tumores diagnosticados corresponden a adenocarcinomas, distinguiéndose según su estirpe histológica (clasificación de Lauren) adenocarcinomas de tipo intestinal y difuso⁵, mientras que los linfomas gástricos constituyen una variedad mucho menos frecuente⁶.

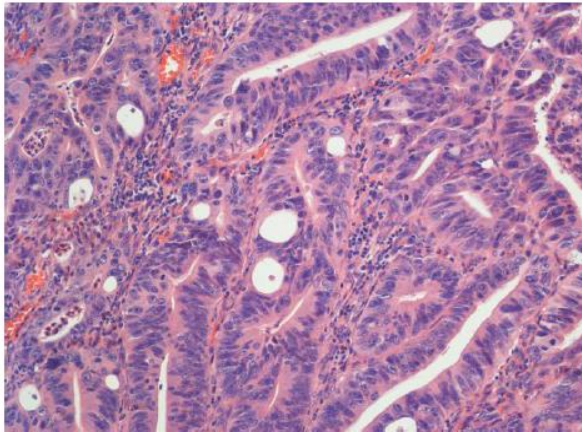


Figura1. Carcinoma gástrico de tipo intestinal.
Tomado de Correa et al., 2012⁷.

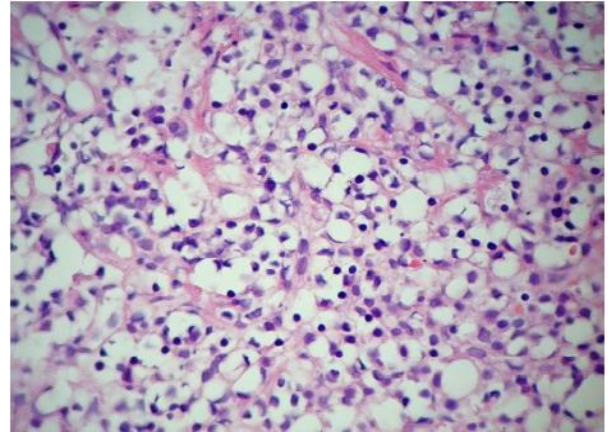


Figura2. Carcinoma gástrico de tipo difuso.
Tomado de Correa et al., 2012⁷.

La distinción del grupo histológico (intestinal o difuso) es muy importante ya que su etiología, desarrollo y expresión fenotípica son muy diferentes. Con una frecuencia del 33%, el de tipo intestinal está formado por células tumorales dispuestas en estructuras tubulares irregulares que infiltran el estroma y son similares a las del intestino (figura 1). Este tipo histológico se asocia a gastritis crónica atrófica severa, metaplasia intestinal y displasia en la mucosa contigua. Predomina en varones con una edad media de 60 años, es de localización antral y presenta un grado de diferenciación moderado o bueno. En su génesis se consideran relevantes los factores ambientales. El tipo difuso, sin embargo, con una frecuencia del 53%, es un tumor no diferenciado que presenta pérdida de la arquitectura glandular. En este subtipo, las células tumorales son generalmente redondas y pequeñas sin cohesión entre ellas y contienen abundantes mucinas citoplasmáticas que desplazan el núcleo hacia la periferia (figura 2). Otras características son que no se asocia a lesiones precancerosas gástricas (LPGs), es más frecuente en mujeres con edades inferiores a los 50 años, se localiza normalmente en el fondo gástrico, y presenta un peor pronóstico por estar poco diferenciado y formado por células de predominio infiltrante⁴⁻⁸.

Aunque se desconoce la etiología exacta del CG, numerosos estudios demuestran la implicación de varios agentes, considerándose que es el resultado de la interacción de muchos factores como los dietéticos, ambientales y genéticos, siendo algunos de los ambientales, como el consumo de tabaco y alcohol o la ingestión de carnes ahumadas, relevantes en el desarrollo del mismo⁹ (figura 3). Aunque esta etiología puede variar en dependencia de la ubicación de la tumoración, su origen multifactorial y el desarrollo del mismo dependerá de la interacción de los genes del organismo con el medio ambiente.

Las principales características del cáncer (hallmarks) como el mantenimiento de la proliferación celular, la inhibición de la apoptosis y la angiogénesis también se encuentran presentes en la carcinogénesis gástrica, y pueden ser consecuencia de dos hechos fundamentales: la adquisición de mutaciones endógenas (en oncogenes y/o supresores tumorales) o debidas a carcinógenos exógenos y la inflamación crónica que se asocia a la infección por HP. Además de los procesos comunes en la carcinogénesis, estudios de expresión génica, de RNAseq y polimorfismos han identificado vías de señalización y mecanismos moleculares específicos del CG que condicionan la progresión desde la metaplasia intestinal al CG¹¹. Son pues estas LPGs de suma importancia en el desarrollo del mismo (figura 4).

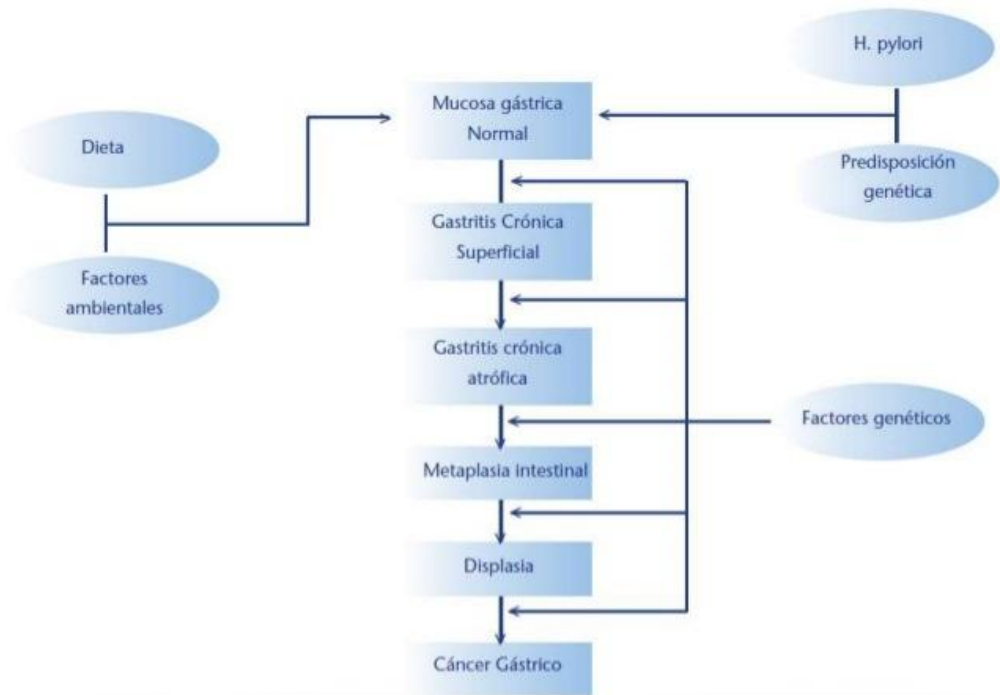


Figura 3. Proceso de carcinogénesis gástrica con componente multifactorial. Tomado de Fárreas-Rozman et al., 2000¹⁰.

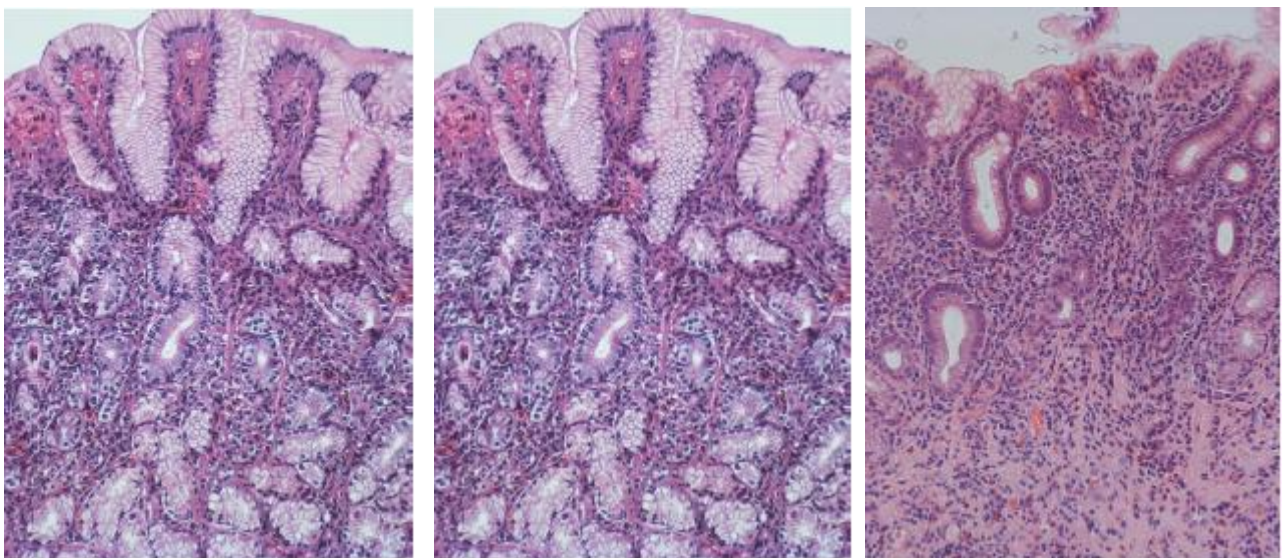


Figura 4. a) Mucosa normal teñida con hematoxilina-eosina. b) Gastritis crónica no atrófica. c) Gastritis crónica atrófica. Tomadas de Correa et al., 2012⁷.

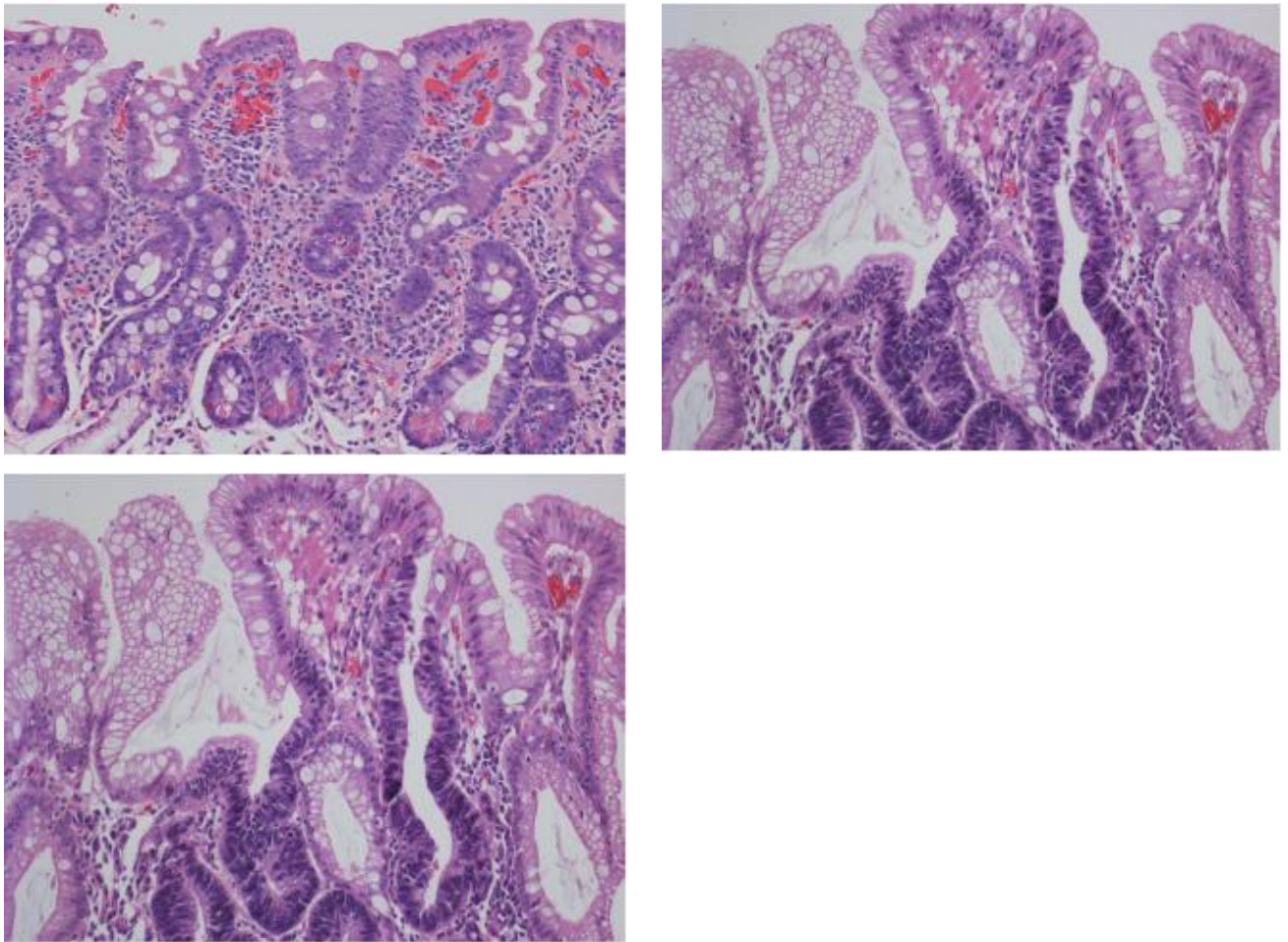


Figura 4. d) Metaplasia intestinal completa. e) Metaplasia intestinal incompleta. f) Displasia gástrica. Tomadas de Correa et al., 2012⁷.

Infección por *Helicobacter pylori* y cáncer gástrico

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria microaerofílica y gram-negativa que infecta a más de la mitad de la población mundial, que en un principio se relacionó con determinadas afectaciones gastrointestinales benignas, como la gastritis crónica y la úlcera péptica. Más recientemente se demostró una estrecha asociación entre este microorganismo y el cáncer gástrico, tanto adenocarcinoma como linfoma, catalogándose en 1994 como carcinógeno tipo I (con potencial neoplásico probado) por la Organización Mundial de la Salud.¹²

La colonización del epitelio gástrico por *H. pylori* provoca una reacción inflamatoria crónica en la mucosa gástrica siendo su evolución muy variable⁴ (figura 5). La mayoría de los individuos infectados suelen ser asintomáticos y sólo un 15% de éstos manifestarán algún tipo de sintomatología pudiendo evolucionar a LPGs como gastritis atrófica. Una minoría (0.1-4%) desarrollará lesiones de peor pronóstico como adenocarcinoma gástrico o linfoma del tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (MALT)¹³.

Los individuos que presentan inflamación de la mucosa gástrica mayoritariamente en la zona antral suelen presentar una secreción ácida gástrica más bien elevada, lo que promueve que tiendan a desarrollar lesiones como úlceras duodenales; por el contrario, los individuos en los que la gastritis afecta principalmente al cuerpo gástrico presentan esos niveles de secreción disminuidos y además como se mantienen así en el tiempo lleva a una

atrofia gástrica progresiva lo que hace que aumenten el riesgo de desarrollar cáncer gástrico⁵.

Diferentes estudios sugieren que en esta evolución influyen considerablemente tanto factores vinculados a la bacteria (virulencia), del individuo (predisposición genética y reacción inflamatoria) como el medio ambiente (dieta y estilo de vida)¹⁴.

Actualmente se ha confirmado la relación entre *H. pylori* y cáncer gástrico¹. Diversos estudios prospectivos en los que se recogieron muestras de sujetos sanos que más tarde desarrollaron el cáncer gástrico observaron unas prevalencias de infección en los pacientes con adenocarcinoma gástrico de entre el 69 y el 94%. Sin embargo, esto no significa que todos los individuos infectados por *H. pylori* vayan a desarrollar CG, ya que sólo el 1% de los infectados acabará desarrollando la enfermedad¹⁵.

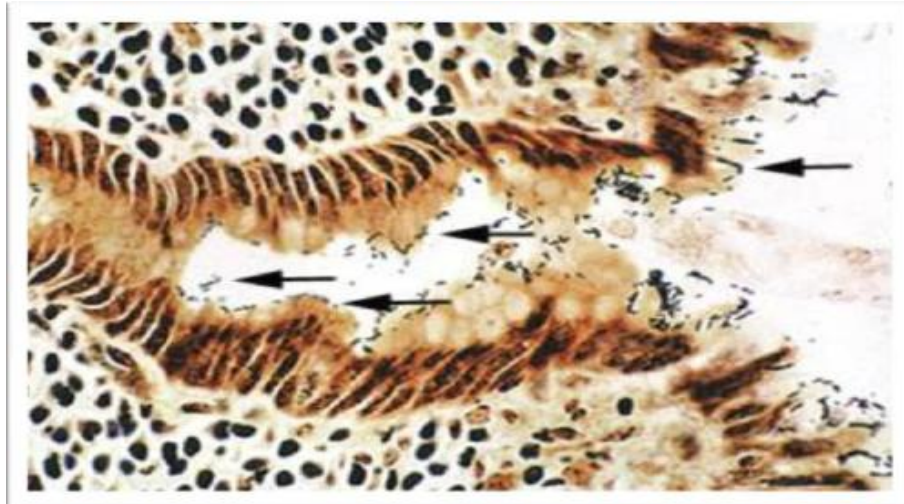


Figura 5. Mucosa gástrica colonizada por HP (señalada con flechas). Tomado de Correa et al., 2012⁷.

La infección en el epitelio gástrico causada por este microorganismo produce consecuencias negativas para el huésped a través de múltiples y complejos mecanismos, siendo las cepas VacA y CagA responsables de una menor o mayor virulencia de éste.

VacA es una proteína citotóxica, codificada por el gen *vacA*, que induce la formación de vacuolas en epitelio gástrico dañando dichas células epiteliales, ya que a través de canales aniónicos provocan la acidificación del citosol de éstas. Además producen liberación de citocromo C que causa apoptosis epitelial e inhibe la activación y crecimiento de linfocitos T (figura 6). Todas las cepas de *H. pylori* producen dicha proteína, pero su expresión puede variar según los polimorfismos existentes en el microorganismo y donde se sitúen en la secuencia del gen¹⁷.

Las cepas CagA positivas producen una proteína codificada por el gen *cagA*, localizado en una región del genoma bacteriano conocida como la isla de patogenicidad Cag (en inglés, *cag*-PAI, *cag* pathogenicity island). Estas cepas portadoras de PAI poseen un sistema de secreción tipo IV que permite "inyectar" la proteína CagA en el citoplasma de las células epiteliales del estómago donde es fosforilada provocando cambios en el citoesqueleto celular debido a la disolución del complejo E-cadherina con β -catenina, induciendo la expresión de citoquinas proinflamatorias, aumentando la proliferación celular y activación de oncogenes entre otros. Aunque los genes *vacA* y *cagA* no guardan relación entre sí, a menudo son coexpresados¹⁷⁻¹⁸.

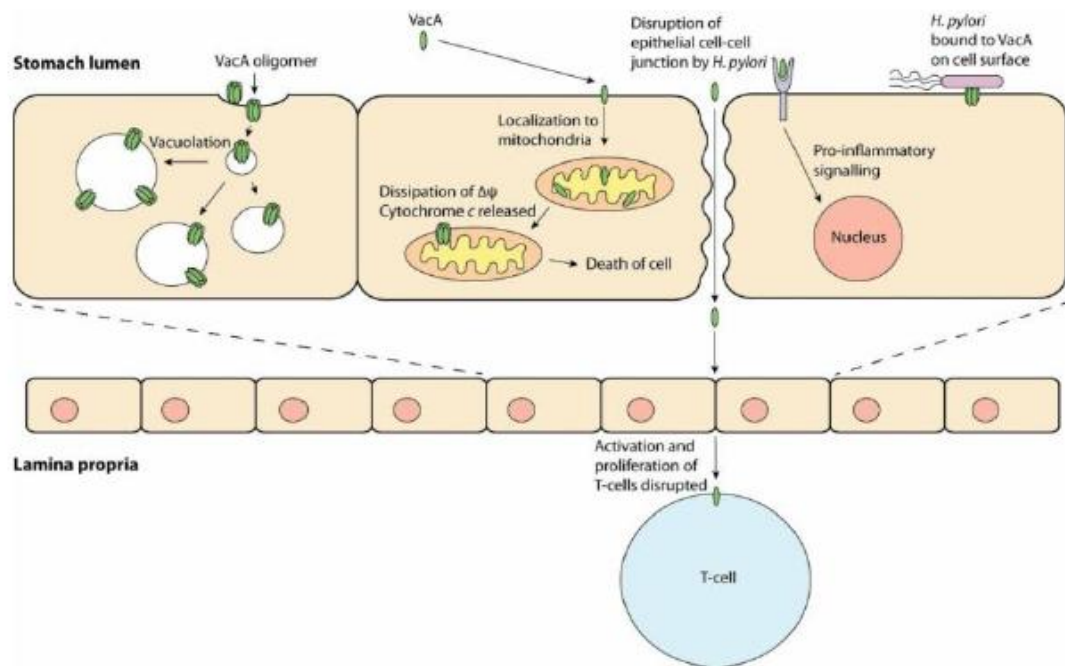


Figura 6. Mecanismo de acción VacA en epitelio gástrico. Tomado de Palframan et al., 2012¹⁶.

Inflamación crónica y cáncer gástrico: papel de la Ciclooxygenasa 2

Además de los factores de virulencia de *H. pylori* y los componentes ambientales, el largo proceso de respuesta inflamatoria causado por la infección bacteriana es uno de los factores desencadenantes del proceso neoplásico. En relación con el complejo entramado de mediadores biológicos implicados en esta reacción inflamatoria, existen numerosas evidencias de que la isoenzima 2 de la ciclooxygenasa juega un papel crucial tanto en el desarrollo como en la progresión del cáncer gástrico¹⁹.

La enzima ciclooxygenasa (COX), también denominada prostaglandina (PG) G/H sintasa, cataliza la primera reacción en la conversión del ácido araquidónico (AA) en los diferentes prostanoides, es decir la producción de PGH₂ a partir del AA, el cual es liberado de los fosfolípidos de membrana por acción de fosfolipasas, principalmente la fosfolipasa A₂ tras la activación celular. La PGH₂ es después convertida en diferentes prostanoides por la actividad de diversas sintasas terminales. Los prostanoides son una familia de lípidos bioactivos que comprenden PGE₂, PGF_{2α}, PGD₂, prostaciclina (PGI₂), y Tromboxano A₂ (TXA₂). Se han identificado dos isoenzimas denominadas COX-1 y COX-2. A pesar de que ambas producen los mismos prostanoides, sus niveles a nivel celular están influenciados por el nivel de expresión de sus diferentes genes. Los genes que codifican COX-1 y COX-2 tienen una regulación diferente. Así, COX-2 es un gen de respuesta inmediata, de forma que la isoenzima está ausente en la mayoría de las células pero su síntesis es inducida por citoquinas, factores de crecimiento, radicales libres, oncogenes y diferentes mitógenos presentes en situaciones de inflamación o durante la progresión tumoral, mientras que COX-1 es una isoenzima constitutiva responsable de mantener los niveles basales de prostanoides que son esenciales para la homeostasis de los tejidos²⁰. Así, se conoce que los diferentes prostanoides derivados de la enzima constitutiva COX-1 juegan un papel clave en muchos procesos fisiológicos como la citoprotección gastrointestinal en virtud de sus efectos sobre el moco, el bicarbonato, el flujo sanguíneo mucoso y la protección celular epitelial y

endotelial, la hemodinámica renal, o la hemostasis, mientras que se considera a la COX-2 responsable de procesos fisiopatológicos como la inflamación, las úlceras gastrointestinales, la angiogénesis, la aterosclerosis o el cáncer²¹.

La relación entre COX-2 y cáncer gastrointestinal se ha descrito tanto en las neoplasias gástricas, colónicas como esofágicas, donde se ha constatado también una sobreexpresión de esta isoenzima tanto en el cáncer ya establecido como en lesiones preneoplásicas como el adenoma de colon y el esófago de Barret²²⁻²⁵. En el cáncer gástrico, también se han publicado numerosos estudios en los que se describe un aumento en la expresión de COX-2 en la mucosa gástrica de pacientes con lesiones preneoplásicas y pacientes con cáncer de estómago, especialmente en aquellos infectados por *H. pylori*¹⁹⁻²⁰.

Un hallazgo muy interesante de estos estudios es el aumento de COX-2 observado también en la mucosa gástrica de familiares de primer grado de pacientes con cáncer gástrico. Otro importante hallazgo es que se ha constatado la expresión de COX-2 tanto a nivel de ARNm como de proteína en lesiones con displasia no invasiva, lo que implica que COX-2 juegue un papel ya en los primeros estadios de la carcinogénesis gástrica⁶.

En relación a la asociación entre infección por *H. pylori* y sobreexpresión de COX-2 en la mucosa gástrica, diversos estudios han demostrado que *H. pylori* es capaz de inducir la expresión de COX-2. Así, se ha detectado un aumento de expresión de COX-2 en gastritis positivas para *H. pylori* en comparación con aquellas gastritis en las que no existía infección por *H. pylori*²⁶⁻³⁰.

Un estudio experimental en ratones mostró que 24 semanas después de ser infectados con *H. pylori*, la expresión de COX-2 y los niveles de PGE₂ aumentaron de forma significativa²⁷. Similares resultados se obtuvieron en un estudio *in vitro* en el que el cultivo de la línea celular de cáncer gástrico MKN 28 con *H. pylori*, se asoció con un aumento tanto de ARNm de COX-2 como de niveles de PGE₂²⁸. El mecanismo por el que *H. pylori* produce la sobreexpresión de COX-2 no está totalmente claro, pero se ha descrito tanto un efecto directo de *H. pylori*, que activaría algunas vías de señalización como AP-1 o p38/ATF-2, como un efecto indirecto mediado por las citoquinas liberadas durante la respuesta inflamatoria asociada a la infección por *H. pylori* o por el aumento de secreción de gastrina, que no sólo induce la expresión de COX-2 sino que incrementa la vida media del ARNm de COX-2¹⁸.

Respecto a los mecanismos por los que COX-2 favorece la carcinogénesis gástrica, actualmente se han identificado varios mecanismos fundamentales mediante los que COX-2 contribuye a la tumorigénesis y la adquisición del fenotipo tumoral: 1) inhibición de la apoptosis asociada con incremento de PGE₂ y consiguiente modulación de factores pro/anti apoptóticos como bcl-2, MAKS/ras y caspasa-3, 2) incremento de la angiogénesis tumoral, 3) incremento de la proliferación y capacidad invasiva celular, y 4) modulación de la inflamación e immuno-supresión. En el cáncer gástrico, se ha demostrado que todos estos mecanismos están implicados. Así, se ha comprobado *in vitro*, en células tumorales gástricas, que la sobreexpresión de COX-2 estimula la proliferación celular mientras que la inhibición de COX-2, mediante silenciamiento génico o utilizando inhibidores selectivos de COX-2 como el NS-398, produce una inhibición de la proliferación celular, la angiogénesis y una inducción de la apoptosis²⁹. Por otra parte, se ha demostrado la existencia de una correlación positiva entre la expresión de COX-2 y el factor VEGF-C (factor linfangiogénico) en pacientes con cáncer gástrico³⁰. Además, se ha demostrado que la PGE₂ induce la expresión de CD44, un receptor de membrana que expresan las células madre tumorales que juegan un papel clave en la formación de metástasis³¹.

Susceptibilidad genética y cáncer gástrico

La susceptibilidad genética del huésped tiene un papel importante en la carcinogénesis gástrica como lo evidencia el hecho de que la heredabilidad del CG se ha calculado en un 28% y que la historia familiar es un factor de riesgo independiente de la infección por *H. pylori*. Aunque el efecto de dicha infección es el principal factor de riesgo de CG, los factores heredados que confieren susceptibilidad genética a la infección y a la severidad de la reacción inflamatoria y otros mecanismos de tumorigénesis son también una parte de este complejo proceso.

El análisis de polimorfismos genéticos y el estudio de su asociación con enfermedades han sido de gran valor para identificar genes asociados a enfermedades complejas como el cáncer. Un polimorfismo genético es una variación alélica en la secuencia de ADN presente en más del 1-5% de los individuos de una población. La combinación de variantes polimórficas de un importante número de genes con el estilo de vida y la exposición a factores ambientales puede llevar a determinadas enfermedades complejas como pueden ser cánceres no esporádicos, HTA o DM2³².

El 90% de la diversidad fenotípica humana proviene de las variaciones heredadas en una sola base o single nucleotide polymorphism (SNP), que es la mínima alteración que puede sufrir el ADN de un individuo y se trata del intercambio entre los pares de bases adenina, citosina, timina y guanina. Se considera el polimorfismo más común y si no supera ese 1% de la población se denomina mutación, y no polimorfismo³³.

En el CG la susceptibilidad individual está asociada a los polimorfismos presentes en la mayor parte de la población y a la propiedad que poseen de poder modificar el efecto de la exposición ambiental pudiendo esta interacción gen-ambiente dar explicación a la variación en la incidencia de cáncer gástrico en el mundo¹⁶. Esta susceptibilidad genética representada por los polimorfismos genéticos podría desempeñar un papel clave en la amplia variedad de procesos implicados en la carcinogénesis gástrica como son: a) factores de protección de la mucosa gástrica (mucinas); b) la respuesta inflamatoria; c) variabilidad intrínseca en las proteínas involucradas en los mecanismos de reparación de ADN; d) variabilidad en la respuesta a la desintoxicación de compuestos carcinógenos llevada a cabo por las enzimas metabólicas; e) protección contra el daño oxidativo de ADN; f) oncogenes y genes supresores tumorales¹³. Muchos de los estudios realizados sobre este tema se han centrado en los polimorfismos localizados en genes implicados en la respuesta inmune por la importante labor que desempeña ésta en la inflamación e integridad de la mucosa gástrica. En general los estudios de asociación, y en especial los de genes candidatos, presentan la limitante de una falta de replicabilidad de los resultados cuando se intentan replicar en otras poblaciones. Las causas atribuibles son: diferencias entre las muestras en cuanto a su origen étnico y consecuente estructura poblacional, mezcla genética con otras poblaciones o aislamiento genético de las mismas, diferentes patrones de desequilibrio de ligamento de los genes estudiados, pequeño tamaño muestral, diferencias en el diagnóstico de la enfermedad y en los efectos ambientales a los que están expuestas dichas poblaciones.

Sin embargo, los estudios sobre susceptibilidad genética en cáncer gástrico todavía son escasos y se han centrado principalmente en polimorfismos localizados en genes que codifican la síntesis de mediadores biológicos implicados en el control de la respuesta inmune. En este sentido, la interleuquina-1 β (IL-1 β), su antagonista natural IL-1ra, el factor de necrosis tumoral TNF- α y TNF- α (o LT- β) son citocinas proinflamatorias con acción inmunorreguladora, cuyos niveles se encuentran elevados en la mucosa gástrica de pacientes con cáncer gástrico. En el año 2000, se publicó en Nature un estudio que describía por primera vez la asociación de genotipos específicos de polimorfismos de la IL-1 con un

incremento en el riesgo de desarrollar cáncer gástrico³⁴.

Posteriormente, El-Omar describía un perfil genético proinflamatorio compuesto por las variantes alélicas *IL1B*-511T, *IL-1RN**2/*2, *TNFA*-308A e *IL10* haplotipo ATA/ATA como factor de riesgo asociado con el desarrollo de cáncer gástrico de localización distal, independientemente del tipo histológico³⁵. Estos resultados fueron parcialmente confirmados por estudios posteriores realizados en Portugal³⁶ y en Japón³⁷. Sin embargo, contrastan notablemente con los obtenidos recientemente por Zambon³⁸ en un estudio realizado en Italia, en el que los autores no encuentran ninguna asociación entre los polimorfismos de *IL1* y *TNF* analizados previamente por El-Omar. Igualmente, en un estudio caso-control realizado en Corea, Jang et al.³⁹ describen la asociación del alelo A del polimorfismo localizado en la posición -238 del *TNFA* con un menor riesgo de desarrollar cáncer gástrico pero no observan ninguna asociación con el polimorfismo localizado en la posición -308 del mismo gen. Estas discrepancias en los resultados obtenidos podrían deberse a las diferencias genéticas existentes entre las poblaciones analizadas y, como ya sugiriera Zambon, pone de manifiesto la necesidad de realizar estudios poblaciones en diferentes áreas geográficas para realmente determinar la influencia de dichos polimorfismos en la susceptibilidad del cáncer gástrico.

A pesar del importante papel que COX-2 parece jugar en el desarrollo del CG, se sabe muy poco en relación a la contribución que determinadas variaciones en la secuencia del gen *COX-2* puedan tener en el desarrollo del cáncer gástrico. En este sentido, se han identificado varios polimorfismos localizados en el promotor del gen *COX-2* cuyas variantes alélicas se han asociado con variaciones en la capacidad de unión de esta proteína con diversos factores de transcripción como el NF-κB. Además, la presencia del alelo +9850G del gen *COX-2* se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar otros tipos de neoplasias como el cáncer de colon⁴⁰.

HIPÓTESIS

La intensidad y naturaleza de la respuesta inflamatoria propia de cada individuo está genéticamente predeterminada y por tanto desempeña un papel clave en la génesis del CG al modular el efecto de otros factores como la infección por *Helicobacter pylori* sobre el individuo. Determinados polimorfismos genéticos de mediadores biológicos implicados en la respuesta inflamatoria como la ciclooxigenasa-2 podrían permitir la identificación de pacientes susceptibles de desarrollar cáncer de estómago.

OBJETIVOS

El objetivo principal del estudio es analizar la influencia y potencial interacción entre los factores genéticos dependientes del huésped, definidos por los polimorfismos de *COX2* o *PTGS2*, y la infección por *Helicobacter pylori* en el desarrollo del CG en la población aragonesa.

Este objetivo general se concreta en los siguientes objetivos:

1. Determinar la prevalencia y el riesgo de CG asociado a la infección por *H. pylori* y de las cepas CagA/VacA en una muestra poblacional aragonesa.
2. Determinar el genotipo, la frecuencia alélica y el riesgo de CG asociado a diferentes polimorfismos de *COX-2*.
3. Determinar el riesgo de CG asociado a la infección por *H. pylori* y a los polimorfismos genéticos de *COX-2* estudiados en función de la localización del tumor (cáncer gástrico distal / cáncer proximal o de la unión esofagogástrica) y del tipo histológico tumoral (intestinal, difuso o indeterminado).
4. Analizar la potencial interacción entre infección por *H. pylori* y los polimorfismos de *COX-2* estimando el riesgo de CG ante la coexistencia de los mismos.

MÉTODOS

PACIENTES

Para llevar a cabo este estudio se han utilizado 480 muestras de ADN genómico procedentes de una colección particular de 1.400 ADNs resultantes de la ejecución de varios proyectos FIS sobre epidemiología genética del CG en España (PI 05/0405, PS09/00213, PI15/00331) realizados por nuestro grupo (Grupo consolidado de Investigación en Patología Digestiva de la DGA, Ref B-01). Las muestras se obtuvieron de 240 pacientes diagnosticados de adenocarcinoma gástrico primario en 4 hospitales de la Comunidad Autónoma de Aragón (Hospital Universitario Miguel Servet, Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, San Jorge de Huesca y Obispo Polanco de Teruel) durante el periodo comprendido entre mayo del 2004 y noviembre del 2010. Como controles se utilizaron muestras de ADN procedentes de 240 sujetos sin patología gastrointestinal (donantes de sangre e individuos que acuden a consultas externas para revisión), emparejados por sexo y edad (± 5 años) pertenecientes a la citada colección de ADNs. En dicho estudio se excluyeron pacientes diagnosticados previamente de CG que presentaron recidiva de su neoplasia, pacientes de raza no caucásica, tipo histológico tumoral distinto de adenocarcinoma (linfoma de MALT, estroma, etc) o pacientes que manifestaron su negativa a participar en el estudio.

La recogida de la información se realizó previamente de forma estandarizada utilizando una hoja de recogida de datos diseñada específicamente para el estudio. A cada paciente/control se le hizo un cuestionario que incluía datos demográficos, hábitos tóxicos (alcohol y tabaco) y existencia de antecedentes familiares de CG. También se recogió información referente al estadio tumoral TNM en el momento del diagnóstico, el tratamiento recibido (cirugía, quimioterapia y radioterapia), la localización del tumor (distal / proximal o de la unión gastroesofágica) y el tipo histológico tumoral (intestinal, difuso o indeterminado según la Clasificación de Lauren). Los datos se almacenaron en una base única para su posterior análisis y procesamiento.

A todos los pacientes y controles se les realizó una extracción de 12 ml. de sangre que se distribuyeron de la siguiente forma: 6 ml. en tubos venojet con silicona (para diagnóstico serológico de infección por *H. pylori*) y 6 ml. en tubos con EDTA como anticoagulante (para extracción de ADN). A cada paciente se le asignó, según su centro de procedencia, un código formado por el número del hospital (2 dígitos) seguido de otros 3 dígitos que identificaban al paciente (Ej. 01-001). Las muestras se enviaron al Laboratorio de Patología Digestiva en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA) en Zaragoza dónde se procesaron, alicuotaron y almacenaron hasta su análisis.

Todos los individuos incluidos en el estudio fueron informados del carácter del mismo por el médico responsable y dieron su consentimiento por escrito (referencias Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón CEICA PI 05/20, PI 09/30 y PI 15/0150).

La extracción de ADN genómico se realizó de forma automatizada (AutoGenFlex 3000) en la Unidad de Genómica del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS)/Universidad de Zaragoza, cuyas instalaciones se encuentran ubicadas en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA). Una vez extraídos, los ADN se alicuotaron y almacenaron a -20°C en el Laboratorio que el grupo de Patología Digestiva tiene en el CIBA.

El análisis serológico de infección por *H. pylori* y de las cepas CagA y VacA se llevó a cabo en el servicio de Microbiología del Hospital Clínico Universitario de Zaragoza mediante inmunoblotting, utilizando el kit Bioblot Helicobacter, Biokit SA, Barcelona, España (Figura 7). Este método ha sido validado por nuestro grupo en estudios previos⁴¹

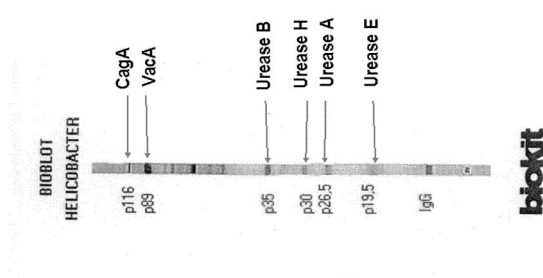


Figura 7. Test biokit para el análisis serológico de infección por *H. pylori* y de las cepas CagA y VacA. Este test determina la presencia/ausencia de bandas proteicas de 116 kD (CagA), 89 kD (VacA), 35 kD (Ureasa B), 30 kD (Ureasa H), 26.5 kD (Ureasa A) y 19.5 kD (Ureasa E). Se considera indicador de infección la presencia de una banda de 116 (CagA), 89 (VacA) ó 35 kD (ureasa B) o la presencia de dos bandas de 30 (ureasa H), 26,5 (Ureasa A) ó 19,5 kD (Ureasa E).

GENOTIPADO DE CICLOOXIGENASA 2

Los polimorfismos del gen *PTGS2* analizados en nuestro estudio (-1195 G>A rs689466, -765 G>C rs20417, 3050 G>C rs5277, +8473 T>C rs5275 y +9850 A>G rs4648298) fueron seleccionados en base a su repercusión funcional y a estudios previos de asociación con otros cánceres descritos en la Literatura. Las características de dichos SNPs se resumen a continuación en la tabla 1.

Tabla 1: Características de los SNPs de *PTGS2* analizados en el estudio.

SNP ^a	Gen	Cromosoma	Posición ^b	Tipo SNP	Alelos ^c	MAF	HWE ^d	Detección
rs689466	<i>PTGS2</i>	1	186681619	Promotor	A/G	0.190	0.834	TaqMan assay
rs20417	<i>PTGS2</i>	1	186681189	Promotor	G/C	0.231	0.857	RFLP (Fau I)
rs5277	<i>PTGS2</i>	1	186679065	Promotor	G/C	0.198	0.541	TaqMan assay
rs5275	<i>PTGS2</i>	1	186673926	3'-UTR	T/C	0.304	0.378	TaqMan assay
rs4648298	<i>PTGS2</i>	1	186672550	3'-UTR	A/G	0.029	0.483	RFLP (Alu I)

MAF: alelo de menor frecuencia. RFLP: Restriction fragment length polymorphism.

^aSNP identificación según la base de datos NCBI.

^bPosición en el cromosoma de acuerdo con the Genome Reference Consortium Human Build 38.p2 (GRCh38.p2).

^cAlelos Mayor/menor

^dLos valores de P en la población control se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

El genotipado de los 5 SNPs se realizó mediante ensayos de discriminación alélica 5'-nucleasa (sondas TaqMan R-MGB) y métodos basados en PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

Las sondas de hidrólisis TaqMan[®] son oligonucleótidos (18-22 pb) marcados con un fluorocromo donador (reporter) en el extremo 5' y con una molécula inhibidora (quencher) en el extremo 3'. La proximidad del quencher a la molécula donadora en una sonda intacta provoca la inhibición de la señal fluorescente. Para el genotipado de SNPs se utilizan dos sondas TaqMan específicas, una para cada alelo marcadas con fluorocromos distintos, generalmente VIC y FAM. Durante la amplificación del ADN diana, si la sonda hibrida completamente con su cadena complementaria en el ADN molde, ésta será hidrolizada por la actividad 5' exonucleasa de la polimerasa. La degradación de la sonda separa el fluorocromo, rompiendo la proximidad entre éste y el quencher, permitiendo así la emisión de fluorescencia. La fluorescencia detectada es directamente proporcional a la cantidad de

fluorocromo liberado y, por lo tanto, a la cantidad de ADN de interés presente en el producto de PCR.

El análisis de los SNPs -1195 G>A (rs689466), +3050 G>C (rs5277) y +8473 T>C (rs5275) se realizó con sondas Taqman mediante el uso de ensayos específicos para cada SNP proporcionados por Applied Biosystems (TaqMan® Pre-Designed Assays-on-demand kits; Assay ID: C__2517145_20 para rs689466, Assay ID: C__7550198_10 para rs5277 y Assay ID: C__7550203_10 para rs5275). Las amplificaciones se llevaron a cabo de acuerdo con el procedimiento estándar indicado por el fabricante. El análisis final de PCR y lectura de fluorescencia se realizó en un equipo ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Madrid, España) (Figura 8).

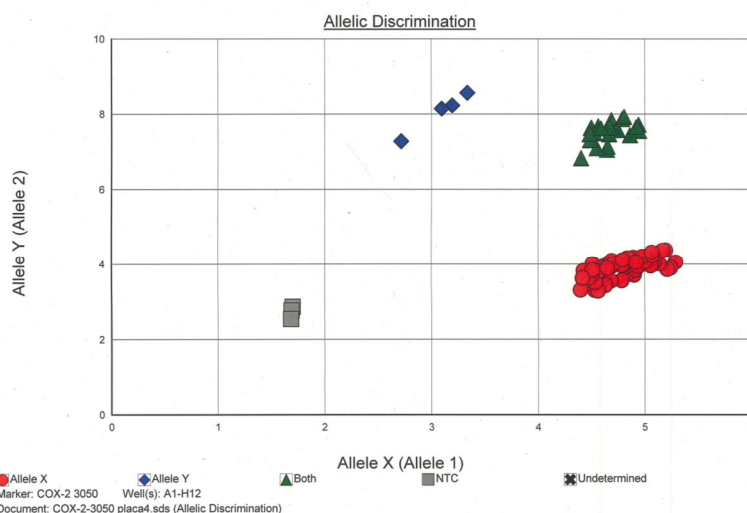


Figura 8. Genotipado mediante sondas TaqMan®. Diagrama de puntos de un experimento de genotipado de COX-2 +3050 (rs5277). En rojo, fluorescencia obtenida por el fluorocromo VIC, que en este caso marca la sonda diseñada para el alelo X (G). En azul, fluorescencia obtenida con FAM que marca el alelo Y (C) y en verde, ambas fluorescencias que representarían a los heterocigotos GC.

El genotipado de los SNPs -765 G>C (rs20417) y +9850 A>G (rs4648298) se determinó mediante técnicas de RFLP utilizando las enzimas de restricción *Fau I* (New England Biolabs, Izasa, Barcelona) y *Alu I* (Invitrogen, Prat de Llobregat, Barcelona), respectivamente. Los cebadores utilizados para amplificar las regiones que contienen ambos loci fueron: -765 5'-CCGCTTCCTTTGTCCATCAG-3'/-765 5'-GGCTGTATATCTGCTCTATATGC-3'⁴² y +9850 5'-CGTCCCATTCTAATTAATGCCCTT-3'/+9850 5'-ATTAAAACCCACAGTGCTTGACACA-3'⁴³, respectivamente. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial de 2 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos (para el SNP -765 rs20417) ó 30 ciclos (para el +9850 rs4648298) de 94°C a 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, y 72°C durante 30 segundos, y una elongación final a 72°C durante 5 minutos.

Para el análisis del SNP -765 G>C (rs20417) se incubaron 10 µL de los productos de PCR con 2 U (unidades) de *Fau I* durante 5 horas a 55° C. Los productos de PCR resultantes de la digestión se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% dando lugar a dos fragmentos de 122 y 187 pb (alelo C) o bien a un fragmento intacto de 309 pb (alelo G) (Figura 9A). Para el análisis del polimorfismo +9850 A>G (rs4648298) se incubaron 10 µL de los productos de PCR con 2 U de *Alu I* durante 5 horas a 37 °C. Los fragmentos resultantes de la digestión se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% dando lugar a dos fragmentos de 349 y 196 pb (alelo G) o a un fragmento no digerido de 545 pb (alelo A) (Figura 9B).

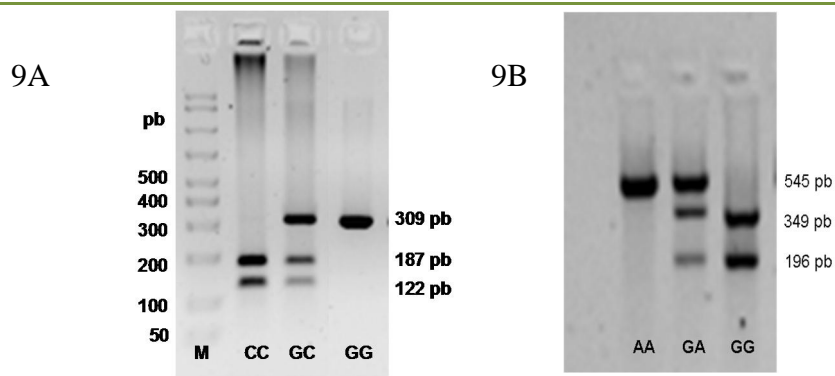


Figura 9. Análisis de polimorfismos mediante enzimas de restricción (RFLP). 9A. Gel de agarosa en el que se muestran los fragmentos resultantes tras digestión enzimática con *Fau* I (-765 G>, (rs20417). El alelo G se corresponde con el fragmento original de 309 pb y el alelo C con 2 fragmentos de 187 y 122. En el pocillo 1 se muestra el marcador de 1 kb. 9B. Digestión enzimática con *Alu* I (+9850 A>G, rs4648298). El alelo G se corresponde con dos fragmentos de 349 y 196 pb mientras que el alelo A se corresponde con un fragmento no digerido de 545 pb.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se efectuó mediante el paquete estadístico SPSS 22.0 (SPSS Ibérica, Madrid, Spain) y el paquete SNPAssoc del programa R 3.0.2. En el análisis descriptivo inicial se calcularon las frecuencias relativas y absolutas para las variables cualitativas y la media y la desviación estándar (DE) para las variables cuantitativas. En el caso de estas últimas, se evaluó la normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. La relación entre variables cualitativas se contrastó mediante tablas de contingencia usando el test de chi-cuadrado (χ^2). Las variables cuantitativas (medias) se compararon mediante el test t de Student o U de Mann-Whitney, utilizando uno u otro según criterios de normalidad. Se consideró estadísticamente significativa un valor de $p < 0.05$.

En relación al estudio genético, se evaluó en primer lugar el equilibrio de Hardy-Weinberg para cada SNP en la población control. Para ello, se compararon las frecuencias genotípicas observadas con las frecuencias esperadas mediante el test de Chi-Cuadrado (χ^2) con un grado de libertad (df). Una vez comprobado el equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0.05$) para cada SNP se realizó un análisis bivalente para comparar las frecuencias genotípicas de cada polimorfismo en pacientes y controles. El grado de asociación de los diferentes SNPs con la variable respuesta se estimó mediante los valores de Odds Ratio (OR) e intervalo de confianza (IC) al 95% en los diferentes modelos de herencia evaluados (dominante, recesivo, co-dominante y log-aditivo). La influencia de los factores genéticos en el desarrollo de CG se evaluó mediante análisis de regresión logística ajustado por sexo, edad, status de infección por *H. pylori*, hábito tabáquico e historia familiar de CG. El estudio del efecto de las interacciones gen-gen y gen-factores ambientales en el riesgo de CG se llevó a cabo mediante construcción de un modelo de regresión logística con la inclusión del término "interacción" como variable en el modelo de regresión. En todos los análisis realizados se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$. Sin embargo, y para abordar el aspecto de la corrección por análisis múltiple, se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.01$ resultante de dividir el valor de 0.05 por el número de polimorfismos analizados (5).

Por último, teniendo en cuenta una potencia de 0.90 y un valor alfa de 0.05 nuestro estudio es capaz de detectar valores significativos en $OR > 1.74$ o < 0.48 . El cálculo del tamaño muestral se realizó mediante el programa Epidat 3.1.

RESULTADOS

Características clínicas y demográficas de la población

Las características clínico-demográficas de los controles y los pacientes con CG se muestran en la Tabla 2. De los 240 pacientes con CG, en 44 (18,33%) el tumor se localizó en la zona proximal o cardinal del estómago y en 196 (81,66%) el tumor se localizó en la zona distal. De acuerdo con la clasificación de Lauren⁵, en 114 pacientes (58,16%) el tumor fue de tipo intestinal, en 65 (33,16%) de tipo difuso y en 17 (8,67%) de tipo mixto o indeterminado.

En el análisis univariante de las diferentes variables evaluadas en nuestro estudio, observamos que la infección por cepas CagA de *H. pylori* fue significativamente más frecuente en los pacientes con CG que en los controles (68,34% vs. 44,16%; OR: 2,71, 95% IC: 1,83-4,01, $p < 0,0001$) (Tabla 2). Por el contrario, no existieron diferencias significativas en la prevalencia de cepas VacA+ entre pacientes y controles (44,2% vs 39,6%). En el análisis estratificado por la localización del tumor (cardial/distal) observamos que la infección por cepas CagA de *H. pylori* se asoció de forma específica con un mayor riesgo de CG distal (OR: 3,09, 95% IC: 2,09-4,73, $p < 0,0001$) pero no con el CG de localización cardinal (OR: 1,56, 95% IC: 0,77-3,17, $p = 0,21$) (Tabla suplementaria 1). Igualmente, el análisis según el tipo histológico tumoral (intestinal/difuso) reveló la asociación de la infección por cepas CagA de *H. pylori* con un mayor riesgo de CG tanto de tipo intestinal (OR: 2,67, 95% IC: 1,62-4,39, $p < 0,0001$) como de tipo difuso (OR: 3,97, 95% IC: 1,97-7,98, $p < 0,0001$) (Tabla suplementaria 2).

Además de la infección por cepas CagA de *H. pylori*, la existencia de antecedentes familiares de CG se asoció con un mayor riesgo de CG (OR: 5,52, 95% IC: 2,39-12,73, $p < 0,0001$) (Tabla 2). En el análisis estratificado por localización tumoral, la historia familiar de CG se asoció tanto con el CG distal (OR: 5,87, 95% IC: 2,28-12,62, $p < 0,0001$) como cardinal (OR: 6,21, 95% IC: 2,05-18,81, $p = 0,002$) mientras que el consumo de tabaco lo hizo con un mayor riesgo de CG cardinal (OR: 4,03, 95% IC: 1,48-10,95, $p = 0,007$) (Tabla suplementaria 1).

Tabla 2: Características clínico-demográficas de pacientes con CG y controles.

	Controles n = 240	Pacientes CG n = 240	ORs (95% IC)	P Value
Edad \pm SD (rango)	71.88 \pm 12.23 (29-96)	72 \pm 12.14 (29-92)		
Sexo	161 V (67.1%) 79 M (32.9%)	161 V (67.1%) 79 M (32.9%)	1 (0.70-1.52)	0.84
Hábito tabáquico				
Nunca	133 (55.42%)	129 (53.75%)	Referencia	
Ex-fumador	33 (13.75%)	44 (18.33%)	1.37 (0.82-2.29)	0.24
Fumador actual	68 (28.33%)	64 (26.67%)	0.97 (0.64-1.47)	0.91
Desconocido	6 (2.5%)	3 (1.25%)	NA	NA
<i>H. pylori</i> +	154 (64.16%)	141 (70.85%)	1.36 (0.91-2.03)	0.15
CagA+	106 (44.16%)	136 (68.34%)	2.71 (1.83-4.01)	<0.0001
VacA+	95 (39.58%)	88 (44.22%)	1.2 (0.82-1.76)	0.38
Historia familiar de CG				
No	211 (87.9%)	191 (79.58%)	Referencia	
Si	7 (2.91%)	35 (14.58%)	5.52 (2.39-12.73)	<0.0001
Desconocida	22 (9.16%)	14 (5.83%)	NA	NA
Localización tumoral				
Cardial		44 (18.33%)		
Distal		196 (81.66%)		
^a Tipo histológico tumoral				
Intestinal		114 (58.16%)		
Difuso		65 (33.16%)		
Mixto o indeterminado		17 (8.67%)		
^b TNM estadio				
Estadio I		29 (12.08%)		
Estadio II		26 (10.83%)		
Estadio III		48 (20%)		
Estadio IV		108 (45%)		
Sin determinar		29 (12.08%)		
Tratamiento quirúrgico		176 (73.33%)		
Quimioterapia		176 (73.33%)		
Radioterapia		41 (17.08%)		

GC, cáncer gástrico; n, número de individuos; OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza; SD, derivación estándar; V, hombres; M, mujeres.

^aInformación correspondiente a 196 pacientes.

^bEstadio clínico del tumor según criterios de la Unión Internacional contra el Cáncer (UICC).

Genotipado de los polimorfismos de *PTGS2*

Análisis individual

En la tabla 3 se muestra la distribución de los genotipos y las frecuencias alélicas de los SNPs analizados (-1195 rs689466, -765 rs20417, +3050 rs5277, +8473 rs5275, +9850 rs4648298) en controles y pacientes con CG clasificados según la localización y el tipo histológico tumoral. Ninguno de los 5 SNPs se desvió significativamente del equilibrio de Hardy-Weinberg en el grupo control. Cuatro SNPs (rs689466, rs20417, rs5277 y rs4648298) no influyeron en la susceptibilidad al desarrollo de CG (Tabla 4). Sin embargo, el polimorfismo rs5275 se asoció de forma significativa con un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (modelo recesivo; OR: 1.92, IC 95%: 1.02-3.64) (Tabla Suplementaria 3). Dicha asociación mantuvo valores significativos también en el análisis multivariante tras corregir por sexo, edad, infección por *H. pylori*, consumo de tabaco e historia familiar de CG (modelo recesivo; OR: 2.14, IC 95%: 1.10-4.16), (Tabla 4), (Figura 1 del Anexo). Cuando los sujetos fueron clasificados en función del status de infección por *H. pylori*, observamos que la asociación entre rs5275 y CG mantuvo valores estadísticamente significativos sólo en el subgrupo de individuos infectados por *H. pylori* (Tabla 4). El análisis de interacciones reveló una interacción estadísticamente significativa entre la infección por *H. pylori* y rs5275 en el desarrollo de CG (p -interacción = 0.018, modelo recesivo), (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de interacción entre el SNP rs5275 de *COX2* e infección por *Helicobacter pylori* en el riesgo de cáncer gástrico

Polimorfismo	Estatus de infección por <i>Helicobacter pylori</i>					
	<i>Helicobacter pylori</i> – n= 144			<i>Helicobacter pylori</i> + n= 295		
<i>COX2</i> rs5275	Control	Caso	OR (95% CI)	Control	Caso	OR (95% CI)
Modelo recesivo						
TT+CT	79	50	Referencia	145	123	1.34 (0.87-2.05)
CC	7	8	1.81 (0.61-5.29)	9	18	3.16 (1.32-7.58)
P for interaction = 0.018						

n= número de individuos. OR: Odds ratio. 95% CI: Intervalo de confianza 95%

En el análisis de asociación estratificado por localización (cardial/distal, Tabla 6) y tipo histológico tumoral (intestinal/difuso, Tabla 7) observamos que el SNP rs5275 se asoció con un mayor riesgo de CG de predominio distal (modelo recesivo, OR: 2.06; 95% IC: 1.03 – 4.11, $p < 0.03$) y tipo histológico intestinal (modelo recesivo, OR: 2.38; 95% IC: 1.10 – 5.18, $p < 0.02$).

Análisis multivariante

El análisis de regresión logística identificó la infección por cepas CagA+ de *H. pylori* (OR: 2.79; 95% IC: 1.87-4.17, $p < 0.0001$) y la historia familiar de CG (OR: 5.56; 95% IC: 2.29-13.4, $p < 0.0001$) como factores independientes asociados a un mayor riesgo de desarrollar CG. En relación con el estudio genético, el SNP rs5275T>C se asoció con un mayor riesgo de CG (OR: 2.36; 95% IC: 1.19-4.68, modelo recesivo), principalmente de predominio distal (OR: 2.33; 95% IC: 1.13-4.80) y tipo histológico intestinal (OR: 2.76; 95% IC: 1.26-6.03) (Tabla 8).

Tabla 3. Genotipos de los SNPs de *PTGS2* analizados en pacientes y controles

	rs689466				rs20417				rs5277				rs5275				rs4648298			
	Genotipos				Genotipos				Genotipos				Genotipos				Genotipos			
	AA	AG	GG	MAF	GG	GC	CC	MAF	GG	GC	CC	MAF	TT	CT	CC	MAF	AA	AG	GG	MAF
Controles (n = 240)	158	73	9	19	141	87	12	23.1	156	73	11	19.8	110	114	16	30.4	226	14	-	2.9
Pacientes CG (n = 240)	149	85	6	20.4	154	73	13	20.6	160	74	6	17.9	112	99	29	32.7	224	16	-	3.3
CG Cardial (n = 44)	25	17	2	23.8	28	14	2	20.4	30	14	-	15.9	21	18	5	31.8	42	2	-	2.2
CG Distal (n = 196)	124	68	4	2.2	126	59	11	5.7	130	60	6	18.3	91	81	24	32.9	182	14	-	3.5
CG Intestinal (n = 114)	67	46	1	21	69	40	5	21.9	75	36	3	18.4	53	46	15	33.3	105	9	-	3.9
CG Difuso (n = 65)	43	19	3	19.2	44	16	5	20	46	18	1	15.3	29	28	8	40.3	62	3	-	2.3

MAF: Frecuencia del alelo menor. n: número de individuos.

Tabla 4: Asociación de SNPs de *PTGS2* y riesgo de cancer gástrico. Análisis estratificado según el status de infección por *H. pylori*.

db SNP ID	A/a	<i>H. pylori</i>	Genotipo Control			Genotipo CG			Modelo Dominante		Modelo Recesivo		Modelo Log-Aditivo	
			AA	Aa	aa	AA	Aa	aa	OR (95% IC) ^a	P valor	OR (95% IC) ^a	P valor	OR (95% IC) ^a	P valor
rs689466	A/G	Total n	158	73	9	149	85	6	1.12 (0.76-1.64)	0.5773	0.61 (0.20-1.86)	0.3847	1.04 (0.74-1.46)	0.8265
		<i>H. pylori</i> +	101	49	4	83	56	2	1.34 (0.83-2.16)	0.2263	0.52 (0.09-2.92)	0.4465	1.22 (0.79-1.89)	0.3644
		<i>H. pylori</i> -	57	24	5	41	16	1	0.82 (0.38-1.74)	0.6014	0.31 (0.03-2.78)	0.2452	0.76 (0.40-1.45)	0.4006
rs20417	G/C	Total n	141	82	12	154	73	13	0.79 (0.54-1.15)	0.2154	1.17 (0.50-2.70)	0.7207	0.87 (0.3-1.19)	0.3743
		<i>H. pylori</i> +	86	61	7	90	44	7	0.72 (0.45-1.15)	0.1624	1.06 (0.36-3.13)	0.9136	0.80 (0.54-1.18)	0.2572
		<i>H. pylori</i> -	55	26	5	36	18	4	1.10 (0.54-2.21)	0.7992	1.38 (0.34-5.55)	0.6512	1.12 (0.64-1.95)	0.7019
rs5277	G/C	Total n	156	73	11	160	74	6	0.95 (0.64-1.41)	0.8065	0.58 (0.21-1.65)	0.3010	0.91(0.65-1.27)	0.5792
		<i>H. pylori</i> +	102	45	7	96	41	4	0.91 (0.56-1.49)	0.7165	0.61 (0.17-2.14)	0.4321	0.89 (0.58-1.34)	0.5654
		<i>H. pylori</i> -	54	28	4	37	19	2	0.97 (0.48-1.96)	0.9242	0.85 (0.14-4.96)	0.8527	0.96 (0.53-1.74)	0.8852
rs5275	T/C	Total n	110	114	16	112	99	29	0.96 (0.66-1.40)	0.8480	2.14 (1.10-4.16)	0.0213	1.14 (0.85-1.52)	0.3767
		<i>H. pylori</i> +	67	78	9	57	66	18	1.14 (0.72-1.82)	0.5784	2.40 (1.04-5.54)	0.0353	1.29 (0.90-1.86)	0.1663
		<i>H. pylori</i> -	43	36	7	30	20	8	0.95 (0.48-1.87)	0.8875	2.08 (0.68-6.30)	0.1961	1.13 (0.68-1.88)	0.6288
rs4648298	A/G	Total n	226	14	-	224	16	-	1.15 (0.55-2.42)	0.851	NA*	NA	1.14 (0.55-2.38)	0.853
		<i>H. pylori</i> +	144	10	-	131	10	-	1.10 (0.44-2.72)	1.000	NA	NA	1.09 (0.45-2.07)	1.000
		<i>H. pylori</i> -	82	4	-	53	5	-	1.93 (0.49-7.53)	0.485	NA	NA	1.89 (0.48-7.20)	0.492

CG, cancer gástrico; n, número de individuos.

A/a, Alelos mayor/menor ; OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza.

^aP-valor, ORs, y 95% ICs Se calcularon mediante análisis de regresión logística ajustado por sexo, edad, tabaquismo y antecedentes familiares de CG

Valor de $P < 0.05$ se destaca en negrita

*NA; No aplicable.

Tabla 6: Asociación de SNPs de *PTGS2* con subtipos anatómicos de cáncer gástrico.

CG Cardial		Genotipo Control				Genotipo CG			Modelo Dominante		Modelo Recesivo		Modelo Log-Aditivo	
Gen	db SNP ID	A/a	AA	Aa	aa	AA	Aa	aa	OR (95% IC) ^a	P valor	OR (95% IC) ^a	P valor	OR (95% IC) ^a	P valor
<i>PTGS2</i>	rs689466	A/G	158	73	9	25	17	2	1.33 (0.66-2.69)	0.4246	0.85 (0.14-5.30)	0.8626	1.21 (0.67-2.20)	0.5341
<i>PTGS2</i>	rs20417	G/C	141	87	12	28	14	2	0.73 (0.36-1.50)	0.3893	1.18 (0.23-5.99)	0.8401	0.81 (0.44-1.51)	0.5081
<i>PTGS2</i>	rs5277	G/C	156	73	11	30	14	–	1.11 (0.53-2.33)	0.7754	0.22 (0.03-3.88)	0.2241	0.92 (0.49-1.75)	0.8029
<i>PTGS2</i>	rs5275	T/C	110	114	16	21	18	5	0.94 (0.47-1.88)	0.8615	2.05 (0.63-6.73)	0.2516	1.11 (0.64-1.93)	0.7187
<i>PTGS2</i>	rs4648298	A/G	226	14	–	42	2	–	0.76 (0.17-3.51)	0.7812	NA*	NA	0.98 (0.2-4.82)	1.000
CG Distal		Genotipo Control				Genotipo CG			Modelo Dominante		Modelo Recesivo		Modelo Log-Aditivo	
Gen	db SNP ID	A/a	AA	Aa	aa	AA	Aa	aa	OR (95% IC) ^a	P valor	OR (95% IC) ^a	P valor	OR (95% IC) ^a	P valor
<i>PTGS2</i>	rs689466	A/G	158	73	9	124	68	4	1.08 (0.72-1.63)	0.7125	0.56 (0.16-1.97)	0.3525	1.01 (0.70-1.45)	0.9644
<i>PTGS2</i>	rs20417	G/C	141	87	12	126	59	11	0.78 (0.52-1.17)	0.2252	1.14 (0.47-2.76)	0.7702	0.86 (0.62-1.20)	0.3742
<i>PTGS2</i>	rs5277	G/C	156	73	11	130	60	6	0.94 (0.62-1.42)	0.7558	0.76 (0.27-2.15)	0.6018	0.92 (0.65-1.31)	0.6578
<i>PTGS2</i>	rs5275	T/C	110	114	16	91	81	24	0.95 (0.64-1.41)	0.8041	2.06 (1.03-4.11)	0.03907	1.12 (0.83-1.53)	0.46012
<i>PTGS2</i>	rs4648298	A/G	226	14	–	182	14	–	1.24 (0.58-2.67)	0.6952	NA	NA	1.18 (0.53-2.6)	0.7001

A/a, alelos mayor/menor; OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza.

^aORs y 95% ICs Se calcularon mediante análisis de regresión logística ajustado por sexo, edad, infección por *H. pylori*, tabaquismo y antecedentes familiares de CG.

Valor de $P < 0.05$ se destaca en negrita.

*NA; No aplicable.

Tabla 7: Asociación de SNPs de *PTGS2* con subtipos histológicos de cáncer gástrico.

CG Intestinal		Genotipo Control			Genotipo CG			Modelo Dominante		Modelo Recesivo		Modelo Log-Aditivo		
Gen	db SNP ID	A/a	AA	Aa	aa	AA	Aa	aa	OR (95% CI) ^a	Pvalor	OR (95% CI) ^a	Pvalor	OR (95% CI) ^a	Pvalor
<i>PTGS2</i>	rs689466	A/G	158	73	9	67	46	1	1.27 (0.79-2.05)	0.3215	0.27 (0.03-2.27)	0.1624	1.12 (0.73-1.72)	0.6044
<i>PTGS2</i>	rs20417	G/C	141	87	12	69	40	5	0.91 (0.57-1.46)	0.6981	0.90 (0.30-2.75)	0.8561	0.92 (0.62-1.38)	0.6952
<i>PTGS2</i>	rs5277	G/C	156	73	11	75	36	3	0.91 (0.56-1.48)	0.7053	0.60 (0.16-2.25)	0.4278	0.88 (0.58-1.34)	0.5569
<i>PTGS2</i>	rs5275	T/C	110	114	16	53	46	15	0.97 (0.61-1.55)	0.8994	2.38 (1.10-5.18)	0.0298	1.18 (0.82-1.69)	0.3729
<i>PTGS2</i>	rs4648298	A/G	226	14	–	105	9	–	1.38 (0.58-3.30)	0.4922	NA	NA	1.34 (0.55-3.27)	0.4992
CG Difuso		Genotipo Control			Genotipo CG			Modelo Dominante		Modelo Recesivo		Modelo Log-Aditivo		
Gen	db SNP ID	A/a	AA	Aa	aa	AA	Aa	aa	OR (95% CI) ^a	Pvalor	OR (95% CI) ^a	Pvalor	OR (95% CI) ^a	Pvalor
<i>PTGS2</i>	rs689466	A/G	158	73	9	43	19	3	0.97 (0.52-1.82)	0.9169	1.40 (0.30-6.60)	0.6775	1.01 (0.59-1.74)	0.9603
<i>PTGS2</i>	rs20417	G/C	141	87	12	44	16	5	0.61 (0.32-1.14)	0.1136	1.58 (0.46-5.47)	0.4762	0.76 (0.45-1.28)	0.3018
<i>PTGS2</i>	rs5277	G/C	156	73	11	46	18	1	0.81 (0.42-1.54)	0.5098	0.44 (0.05-3.66)	0.3998	0.79 (0.45-1.39)	0.4043
<i>PTGS2</i>	rs5275	T/C	110	114	16	29	28	8	0.96 (0.52-1.76)	0.8940	1.73 (0.62-4.78)	0.3038	1.09 (0.68-1.76)	0.7204
<i>PTGS2</i>	rs4648298	A/G	226	14	–	62	3	–	0.78 (0.21-2.80)	0.705	NA	NA	0.70 (0.18-2.77)	0.7620

A/a, alelos mayor/menor; OR, odds ratio; CI, intervalo de confianza.

^aORs y 95% CIs Se calcularon mediante análisis de regresión logística ajustado por sexo, edad, infección por *H. pylori*, tabaquismo y antecedentes familiares de CG.

Valor de $P < 0.05$ se destaca en negrita.

*NA; No aplicable.

Tabla 8. Análisis de regresión logística.

Factor	Cáncer gástrico Población total		CG Cardial		CG Distal		CG Intestinal		CG Difuso	
	OR (95% CI)	<i>P</i> Valor	OR (95% IC)	<i>p</i> Valor	OR (95% IC)	<i>p</i> Valor	OR (95% IC)	<i>p</i> Valor	OR (95% IC)	<i>p</i> Valor
Sexo	1.08 (0.68-1.71)	0.723	3.88 (0.81-18.6)	0.090	0.94 (0.58-1.52)	0.807	1.03 (0.58-1.84)	0.896	0.63 (0.31-1.27)	0.20
Edad	1.01 (0.99-1.02)	0.465	0.97 (0.94-1)	0.078	1.01 (0.99-1.03)	0.084	1.02 (0.99-1.04)	0.079	0.99 (0.97-1.02)	0.738
Infección por <i>H. Pylori</i> CagA+	2.79 (1.87-4.17)	<0.0001	1.68 (0.78-3.60)	0.178	3.16 (2.04-4.88)	<0.0001	2.88 (1.69-4.92)	<0.0001	3.80 (1.85-7.80)	<0.0001
Tabaco	1.76 (0.95-3.28)	0.072	3.30 (1.21-8.95)	0.019	1.64 (0.85-3.17)	0.140	0.91 (0.39-2.12)	0.841	2.18 (0.89-5.30)	0.085
Antecedentes familiares de CG	5.56 (2.29-13.4)	<0.0001	3.61 (0.97-13.3)	0.06	6.51 (2.56-16.5)	<0.0001	9.05 (3.41-24)	<0.0001	4.03 (0.92-17.6)	0.064
rs5275 (modelo recesivo)	2.36 (1.19-4.68)	0.013	2.07 (0.63-6.82)	0.23	2.33 (1.13-4.80)	0.021	2.76 (1.26-6.03)	0.011	1.69 (0.53-5.42)	0.373

CG= Cáncer Gástrico. OR= Odds ratio. IC = Intervalo de confianza.
 Valor de $P < 0.05$ se destaca en negrita

DISCUSIÓN

Cox-2 es una isoenzima inducible que interviene en el metabolismo y conversión del ácido araquidónico a prostaglandinas las cuales son importantes mediadores de la respuesta inmune a nivel gastrointestinal⁹. Su implicación en el proceso de carcinogénesis gástrica viene dada por su capacidad para estimular la proliferación celular y la angiogénesis, inhibir la apoptosis y aumentar la formación de especies reactivas de oxígeno⁴⁴. El gen *PTGS2* o *COX2*, que codifica la síntesis de Cox-2, se encuentra en el cromosoma 1q25.2-3 y está formado por 10 exones⁴⁵. Recientemente, se han descrito variaciones en los niveles de expresión de Cox-2 relacionados con polimorfismos localizados en zonas del gen que regulan su transcripción⁴⁶. En los últimos años numerosos estudios han evaluado la posible asociación entre polimorfismos genéticos de *COX2* y diferentes tipos de cáncer. Sin embargo, los estudios referentes al cáncer de estómago aportan resultados poco concluyentes.

En nuestro estudio hemos analizado la influencia de 5 polimorfismos de *COX2* (-1195 G>A rs689466, -765 G>C rs20417, 3050 G>C rs5277, +8473 T>C rs5275 y +9850 A>G rs4648298) en el desarrollo del CG en Aragón así como las posibles interacciones con otros factores como la infección por *H. pylori*. De los 5 polimorfismos analizados, observamos que el SNP +8473 T>C rs5275 se asoció de forma significativa con un mayor riesgo de desarrollar CG, principalmente de localización distal y tipo intestinal, en individuos infectados por *H. pylori*. El locus rs5275 T>C se localiza en el exon 10 del gen *COX2*, en la región UTR 3'. Estudios funcionales atribuyen a dicho SNP un papel importante en el control de la transcripción y de la estabilidad del ARNm⁴⁷. En un estudio publicado por Pu *et al.*⁴⁷ se describe la asociación del alelo C del SNP rs5275 con una reducción del riesgo de desarrollar lesiones premalignas orales (OPL). Un efecto protector similar en el riesgo de cáncer de pulmón se describe en 2 estudios realizados en China y Corea⁴⁸⁻⁴⁹. Sin embargo, el alelo C de rs5275 se ha asociado con un riesgo incrementado de cáncer de pulmón en 2 estudios europeos realizados en población caucásica^{48y50} lo cual resulta compatible con el aumento del riesgo de CG en individuos portadores del genotipo rs5275 CC observado en nuestro estudio. Igualmente, un reciente estudio realizado por Lu *et al.*⁵¹ corrobora nuestros resultados describiendo un aumento del riesgo de CG en individuos portadores del alelo rs5275 C. Las discrepancias en los resultados obtenidos en los diferentes estudios podrían atribuirse a las diferencias en frecuencias alélicas existentes entre las poblaciones analizadas, tamaños muestrales insuficientes o a diferencias en la metodología aplicada en los estudios.

Otro hallazgo interesante de nuestro estudio es el hecho de que la asociación previamente descrita del SNP rs5275 y CG sólo se observó en pacientes infectados por *H. pylori*. Como ya hemos comentado previamente en la introducción, existen estudios que describen una asociación directa entre la infección por *H. pylori* y la expresión de COX-2⁵²⁻⁵³ y se ha sugerido que la sobreexpresión de COX-2 puede contribuir a la transformación neoplásica asociada a *H. pylori*^{27y54}. A nivel experimental, se ha demostrado en ratones que la infección por *H. pylori* se asocia con un aumento de expresión de COX-2 y de producción de PGE2 que se observa ya a las 24 horas después de la inoculación²⁸. Tras este tiempo se observó que el nivel de ARNm de COX-2 aumentó hasta cinco veces y los niveles de PGE2 se triplicaron, lo que indica que la síntesis de COX-2 y PGE2 son factores relacionados con la infección por *H. pylori* que por otra parte se sabe que influyen en el desarrollo de cáncer gástrico^{29y52}, lo cual ha sido confirmado por otros estudios⁵⁵⁻⁶⁰. Además, se ha comprobado en pacientes con gastritis que la infección por *H. pylori* puede producir una respuesta de

inflamación local, cambio fenotípico de las células epiteliales, inducción de la proliferación celular e inhibición de la apoptosis, lo que contribuye a un mayor riesgo de cáncer⁶¹. En el mismo estudio, se detectó un aumento de COX-2 en pacientes con gastritis que eran *H. pylori* positivos en comparación con gastritis sin infección por *H.pylori*²⁷. La COX-2 se encuentra sobreexpresada en el 50-80% de pacientes con cáncer gástrico.

El mecanismo por el cual la infección por *H. pylori* causa la sobreexpresión de COX-2 no está del todo claro. En un estudio in vitro se observó como la infección por *H. Pylori* indujo la expresión de COX-2 y óxido nítrico (ON) mediante la activación de AP-1 en células epiteliales gástricas (AGS)^{52y62}, siendo la transducción de señal inducida por *H. pylori* un mecanismo crucial implicado en la expresión de COX-2⁶³. A su vez se vio como la infección por *H. pylori* estimuló la secreción de gastrina que promueve la expresión de la COX-2 aumentando la vida media de su ARNm⁶⁴ y cómo la inhibición del péptido liberador de gastrina disminuyó la expresión de COX-2, lo que indica que la gastrina podría estar implicada en la expresión de COX-2 inducida por *H. pylori*. Independientemente del mecanismo implicado, lo que queda fuera de toda duda es la relación entre infección por *H. pylori*, sobreexpresión de COX-2 y CG, por lo que no resulta extraño el hecho de que la asociación encontrada se observe en los pacientes infectados por *H. pylori*.

En relación a la funcionalidad del polimorfismo rs5275 de COX-2 se conoce poco. El análisis "in silico"⁶⁵ de la estructura del ARNm que contendría esta variante indicó que este cambio de nucleótido produce una interrupción de 25 pb que conduce a la formación de un bucle adicional, lo que podría afectar la estabilidad del ARNm y por tanto el nivel de expresión de COX-2. Se sabe que el aumento de la expresión de COX-2 puede deberse a la regulación de los eventos transcripcionales como post-transcripcionales. Una mayor actividad de COX-2 se ha asociado con mayor riesgo de cáncer y mal pronóstico del mismo, y la inhibición de la COX-2 reduce la incidencia de una variedad de cánceres⁶⁶. Así, a la vista de nuestros resultados, podríamos hipotetizar que la expresión de la variante alélica C, que se asoció en nuestro estudio con un mayor riesgo de CG, podría ser superior a la expresión del alelo salvaje. Sin embargo, esta hipótesis debe confirmarse en estudios in vitro, en los que se demuestre la repercusión del polimorfismo en los niveles de expresión del ARNm de COX-2. Por otra parte, otra posibilidad que no podemos descartar es que este polimorfismo no sea funcional, sino que se encuentre en desequilibrio de ligamiento con otro polimorfismo que sea el realmente responsable de la asociación.

En vista de los resultados obtenidos en nuestro estudio parece lógico pensar que aunque no hemos observado una relación entre los SNPs de *COX2* y predisposición a la infección por *H. pylori*, un sujeto infectado por dicha bacteria desarrolla una gastritis crónica que conllevará un aumento en la expresión de COX-2 en la mucosa gástrica con sus posibles repercusiones negativas; si esto ocurre, además, en un sujeto genéticamente susceptible, determinado por la presencia de la variante rs5275 C, el ambiente de inflamación crónica podría favorecer el desarrollo de CG.

En relación al resto de polimorfismos analizados en nuestro estudio, no encontramos ninguna asociación estadísticamente significativa entre los SNPs -1195 G>A rs689466, -765 G>C rs20417, 3050 G>C rs5277 y +9850 A>G rs4648298 y variaciones en el riesgo de desarrollar CG. En concordancia con nuestros resultados, no hemos encontrado en la Literatura estudios que describan la asociación de dichos SNPs con riesgo de CG en población caucásica.

Dong *et al.*⁶⁷ en un meta-análisis en el que se incluyeron 47 estudios caso-control, describe un aumento significativo del riesgo de cáncer, y en particular de cánceres del

sistema digestivo (colorrectal, gástrico, esofágico, vías biliares, vesícula biliar y pancreático), en sujetos portadores del alelo A del SNP -1195 G>A rs689466. Sin embargo, el análisis estratificado por tipo de etnia reveló que dicha asociación mantenía valores significativos sólo en poblaciones asiáticas y no en caucásicos. En este sentido, Lu *et al.*⁹ describe la asociación del polimorfismo rs689466 con un mayor riesgo de CG en un reciente estudio realizado en población china. El SNP rs689466 se localiza en el promotor del gen *COX-2*, en una zona reguladora en la que se han descrito varios dominios de unión a elementos reguladores de la transcripción del gen. Zhang *et al.*⁶⁸ observó que la presencia del alelo A en el locus rs689466 creaba un punto de unión para el factor de transcripción c-MYB que se traducía en un aumento de la actividad transcripcional del gen. De esta manera, los individuos homocigotos rs689466 AA presentaban niveles más elevados de RNAm en tejido esofágico en comparación con los sujetos portadores del alelo rs689466 G. Dicho aumento en los niveles de expresión de *COX-2* podría justificar la asociación entre el SNP rs689466 y el mayor riesgo de cáncer de esófago observado en el estudio. Liu *et al.*⁶⁹ observa igualmente, un aumento en la expresión de *COX-2* en mucosa gástrica de individuos infectados por *H. pylori* portadores del alelo rs689466 A y una asociación significativa entre dicho SNP y mayor riesgo de CG. Se necesitan estudios bien diseñados en diferentes áreas geográficas y con tamaños muestrales suficientes para poder determinar de forma más concluyente la contribución del SNP -1195 G>A rs689466 en el riesgo de CG.

Al igual que ocurre con rs689466, muchos estudios han evaluado el efecto del SNP -765 G>C rs20417 en la susceptibilidad al CG, principalmente en población asiática. Varios meta-análisis concluyen la asociación del alelo rs20417 C con un riesgo incrementado de CG⁷⁰⁻⁷⁴. Sin embargo, en el análisis estratificado por tipo de etnia, la asociación entre dicho SNP y riesgo de CG sólo se observa en poblaciones asiáticas y no en caucásicos, hallazgo que concuerda con los resultados obtenidos en nuestro estudio. El SNP rs20417 se localizó en el promotor del gen *COX-2*. Estudios *in vitro* han demostrado que la presencia del alelo rs20417 C produce la abolición del punto de unión de Sp1, un activador transcripcional de la expresión de *COX-2*, que se traduce en una reducción del 30% en la actividad transcripcional del gen⁴⁷. Zhang *et al.*⁷⁵ observan que la presencia de la variante rs20417 C también crea un punto de unión para la nucleofosmina (NPM), la cual se comporta como un inhibidor de la transcripción. Sin embargo, las notables diferencias étnicas en la distribución de frecuencias y genotipos del SNP rs20417 parecen influir en la actividad transcripcional del mismo⁷⁵.

Respecto al SNP +3050 G>C rs5277, varios estudios realizados en Austria, Noruega y China^{50y76-77} describen la asociación de rs5277 con un mayor riesgo de cáncer de mama, pulmón y vías biliares, respectivamente. Sin embargo, otros estudios no encuentran ninguna asociación o describen incluso un efecto protector de dicho SNP en cáncer de colon⁷⁸ y pulmón⁷⁹. En relación al CG, la información relativa al efecto del SNP rs5277 en el riesgo de CG es muy escasa. En uno de los pocos estudios descritos en la Literatura, Hussain *et al.*⁸⁰ no encuentra ninguna asociación entre dicho SNP y CG en un estudio realizado en China, al igual que ocurre en nuestra población.

Por último, no hemos encontrado en la Literatura ningún estudio que evalúe la contribución del SNP +9850 A>G rs4648298 en la susceptibilidad al CG. Si se ha descrito la asociación de dicho SNP con un mayor riesgo de cáncer colorrectal⁸¹, riesgo reducido de desarrollar dicha neoplasia⁸² en incluso ningún efecto sobre el cáncer de colon⁵². Estos resultados poco concluyentes ponen de manifiesto la necesidad de diseñar estudios que aborden el papel del polimorfismo rs4648298 en el riesgo del cáncer en general y del CG en particular.

En resumen, nuestro estudio realizado en población aragonesa describe la asociación del SNP rs5275 +8473 T>C del gen *PTGS2* y riesgo incrementado de desarrollar CG, principalmente de localización distal y tipo intestinal, en individuos infectados por *H. pylori*. Nuestros resultados ponen de manifiesto la necesidad de realizar estudios poblacionales bien caracterizados, en diferentes áreas geográficas y con un amplio número de pacientes para poder determinar de forma concluyente la contribución de los polimorfismos de *PTGS2* en el desarrollo del CG. El mejor conocimiento de los factores implicados en la etiología del CG nos ayudará a identificar qué subpoblaciones de individuos tienen más posibilidades de desarrollar cáncer de estómago y precisan, por lo tanto, un seguimiento más detallado o una actuación terapéutica precoz.

CONCLUSIONES

1. Los resultados de nuestro estudio muestran que la infección por cepas cagA de *H. pylori* y la existencia de antecedentes familiares de CG son factores de riesgo asociados al desarrollo de CG en la población aragonesa.
2. El polimorfismo rs5275 del gen *PTGS2* se asocia con un mayor riesgo de desarrollar CG, principalmente de localización distal y tipo intestinal en individuos infectados por *H. pylori*.
3. Los polimorfismos -1195 G>A rs689466, -765 G>C rs20417, 3050 G>C rs5277 y +9850 A>G rs4648298 no se asocian con riesgo de CG en nuestra población.
4. Nuestros resultados deben ser verificados en estudios con mayor tamaño muestral y en diferentes poblaciones.

BIBLIOGRAFIA

1. Shao Y, Sun K, Xu W, Li X-L, Shen H, Sun W-H. Helicobacter pylori infection, gastrin and cyclooxygenase-2 in gastric carcinogenesis. World Journal of Gastroenterology:WJG.2014;20(36):12860-12873. doi:10.3748/wjg.v20.i36.12860.
2. Resende C, Thiel A, Machado JC, Ristimäki A. Gastric cancer: basic aspects. Helicobacter. 2011;16 Suppl 1:38–44.
3. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. Eur J Cancer. 2010;46:765–81.
4. Wang Z, Chen J, Liu J. COX-2 Inhibitors and Gastric Cancer. Gastroenterology Research and Practice. 2014;2014:132320.
5. Badía M, García-González MA. Polimorfismos en genes de baja penetrancia implicados en respuesta inmune e infección por Helicobacter pylori. Influencia en el desarrollo del cáncer gástrico. Med Clin (Barc) 2011;137:555-60
6. Gisbert JP, Pajares JM. Ciclooxygenasa-2 (COX-2), Helicobacter pylori y cáncer gástrico. Med Clin (Barc) 2003; 120: 189-93.
7. Correa P, Piazuelo MB. The gastric precancerous cascade. J. Dig. Dis. 2012;13:2-9
8. Espejo H, Navarrete J. Clasificación de los adenocarcinomas de estómago. Rev Gastroenterol. Perú. 2003;23:199-212.
9. Zhang XM, Zhong R, Liu L, Wang Y, Yuan JX, Wang P, et al. Smoking and COX-2 functional polymorphisms interact to increase the risk of gastric cardia adenocarcinoma in Chinese population. PLoS One. 2011;6:e21894.
10. Sáinz Samitier R, Mearín Manrique F, Piqué Badia, Saperas Franch E, Lanás-Arbeola A, Borda-Celaya F, et al: Enfermedades del estómago y el duodeno; Medicina interna de Farreras-Rozman. 14ava edición Tomoi. Editorial Harcourt; Pág.:172,2000.
11. Smith MG, Hold GL, Tahara E, El-Omar E. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. World J Gastroenterol 2006; 12:2979-2990.
12. Fuentes-Pananá E, Carmolingo-Ponce M, Maldonado-Bernal C. Infección, inflamación y cáncer gástrico. Salud pública Méx. 2009;51(5):427-33.
13. Wang Z, Chen JQ, Liu JL. COX-2 inhibitors and gastric cancer. Gastroenterol. Res. Pract. 2014;2014:132320.PubMed.
14. Gonzalez CA, Sala N, Capella G. Genetic susceptibility and gastric cancer risk. Int J Cancer. 2002; 100:249-60.
15. Gisbert JP. Enfermedades relacionadas con la infección por *Helicobacter pylori*. Gastroenterol Hepatol 2013;36 Supl 2:39-50.
16. Palframan SL, Kwok T, Gabriel K. Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. Front Cell Infect Microbiol. 2012;2:92. doi: 10.3389/fcimb.2012.00092.
17. Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P, Seruca R, Sousa S, Carvalho R, et al. Helicobacter pylori and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. JNatl Cancer Inst. 2002;94:1680-7.
18. Naumann M. Pathogenicity island-dependent effects of Helicobacter pylori on intracellular signal transduction in epithelial cells. Int J Med Microbiol 2005; 295:335-341.
19. Zhang XW, Li J, Jiang YX, Chen YX. Role of cyclooxygenase-2 in gastric cancer

- development and progression World J Gastroenterol. 2017;23: 2234-2245.
20. Bruno A, Dovizio M, Patrignani P. Molecular and experimental basis for COX inhibition in cancer. In: NSAIDs and Aspirin. Springer International Publishing Switzerland. 2016; ISBN 978-3-319-33887-3.
 21. Smyth EM, Grosser T, Wang M, Yu Y, Fitzgerald GA. Prostanoids in health and disease. J Lipid Res. 2009; 50: S423-8.
 22. Wambura C, Aoyama N, Shirasaka D, Sakai T, Ikemura T, Sakashita M, et al. Effect of *Helicobacter pylori*-induce cyclooxygenase-2 on gastric epithelial cell kinetics: implication for gastric carcinogenesis. Helicobacter 2002;7:129-38.
 23. Pereira C, Medeiros RM, Dinis Ribeiro MJ. Cyclooxygenase polymorphisms in gastric and colorectal carcinogenesis: are conclusive results available?. European Journal of Gastroenterology & Hepatology. 2009;21:76-91.
 24. Liang Y, Liu JL, Wu Y, Zhang ZY, Wu R. Cyclooxygenase-2 polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer: a meta-analysis. Tohoku J Exp Med. 2011;223:137-144.
 25. Machado JC, Figueiredo C, Canedo P, Pharoah P, Carvalho R, Nabais S, et al. A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. Gastroenterology. 2003;125:364-71.
 26. Loogna P, Franzen L, Sipponen P, Domellof L. Cyclooxygenase-2 and Bcl-2 expression in the stomach mucosa of Wistar rats exposed to *Helicobacter pylori*, N'-methyl-N'-nitro-N nitrosoguanidine and bile. Virchows Arch 2002;441:77-84.
 27. Fu S, Ramanujam KS, Wong A, Fantry GT, Drachenberg CB, James SP, et al. Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* gastritis. Gastroenterology. 1999;116:1319-29.
 28. Xiao F, Furuta T, Takashima M, Shirai N, Hanai H. Involvement of cyclooxygenase-2 in hyperplastic gastritis induced by *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 mice. Aliment Pharmacol Ther 2001; 15: 875-886.
 29. Romano M, Ricci V, Memoli A, Tuccillo C, Di Popolo A, Sommi P, et al. *Helicobacter pylori* up-regulates cyclooxygenase-2 mRNA expression and prostaglandin E2 synthesis in MKN 28 gastric mucosal cells in vitro. J Biol Chem 1998; 273: 28560-28563.
 30. Fu YG, Sung JJ, Wu KC, Wu HP, Yu J, Chan M, et al. Inhibition of gastric cancer-associated angiogenesis by antisense COX-2 transfectants. Cancer Lett. 2005; 224:243-52.
 31. Gou HF, Chen XC, Zhu J, Jiang M, Yang Y, Cao D, et al. Expressions of COX-2 and VEGF-C in gastric cancer: correlations with lymphangiogenesis and prognostic implications. J Exp Clin Cancer Res. 2011; 30: 14.
 32. Ishimoto T, Oshima H, Oshima M, Kai K, Torii R, Masuko T, et al. CD44+ slow-cycling tumor cell expansion is triggered by cooperative actions of Wnt and prostaglandin E2 in gastric tumorigenesis. Cancer Sci. 2010; 101: 673-678.
 33. Lu Y, Lu F, Zeng S, Sun S, Lu L, Liu L. Genetics and gastric cancer susceptibility. Int J Clin Exp Med. 2015; 8(6): 8377-8383.
 34. Hofker MH, Fu J, Wijmenga C. The genome revolution and its role in understanding complex diseases. Biochim Biophys Acta 2014;1842:1889-95.
 35. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. Nature. 2000;404:398-402.

36. Gonzalez CA, Sala N, Capella G. Genetic susceptibility and gastric cancer risk. *Int J Cancer*. 2002;100:249–60.
37. Yamaoka Y, Kodama T, Kita M, Imanishi J, Kashima K, Graham DY. Relation between cytokines and *Helicobacter pylori* in gastric cancer. *Helicobacter*. 2001;6:116–24.
38. Beales IL, Calam J. Interleukin 1 beta and tumour necrosis factor alpha inhibit acid secretion in cultured rabbit parietal cells by multiple pathways. *Gut*. 1998;42:227–34.
39. El Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*. 2000;404:398–402.
40. Zambon CF, Basso D, Navaglia F, Falda A, Belluco C, Fogar P, et al. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology*. 2004;126:382–4.
41. Santolaria S, Lanas A, Benito R, Perez-Aisa MF, Montoro M, Sainz R, et al. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:1511; Lanas A. et al. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:779.
42. Cipollone F, Toniato E, Martinotti S, Fazio M, Iezzi A, Cuccurullo C, et al. A polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene as an inherited protective factor against myocardial infarction and stroke. *Jama* 2004;291:2221-8.
43. Cox DG, Pontes C, Guino E, Navarro M, Osorio A, Canzian F, et al. Polymorphisms in prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 (PTGS2/COX2) and risk of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004;91:339-43.
44. Lazar D, Taban S, Ardeleanu C, Simionescu C, Sporea I, Cornianu M, et al. Immunohistochemical expression of the cyclooxygenase-2 (COX-2) in gastric cancer. The correlations with the tumor angiogenesis and patients' survival. *Rom J Morphol Embryol*. 2008;49 (3):371–379
45. Cheng J, Fan X-M. Role of cyclooxygenase-2 in gastric cancer development and progression. *World J Gastroenterol*. 2013;19(42):7361–7368.
46. Papafili A, Hill MR, Brull DJ, McAnulty RJ, Marshall RP, et al. Common promoter variant in *cyclooxygenase-2* represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(10):1631–6.
47. Pu X, Lippman SM, Yang H, Lee JJ, Wu X. Cyclooxygenase-2 gene polymorphisms reduce the risk of oral premalignant lesions. *Cancer*. 2009;115(7):1498–1506.
48. Hu Z, Miao X, Ma H, Wang X, Tan W, Wei Q, et al. A common polymorphism in the 3'UTR of cyclooxygenase 2/prostaglandin synthase 2 gene and risk of lung cancer in a Chinese population. *Lung Cancer*. 2005; 48(1):11–7.
49. Park JM, Choi JE, Chae MH, Lee WK, Cha SI, Son JW, et al. Relationship between cyclooxygenase 8473T>C polymorphism and the risk of lung cancer: a case-control study. *BMC Cancer*. 2006; 6:70.
50. Langsenlehner U, Yazdani-Biuki B, Eder T, Renner W, Wascher TC, Paulweber B, et al. The cyclooxygenase-2 (PTGS2) 8473T>C polymorphism is associated with breast cancer risk. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(4):1392–4.
51. Lu X, Chen F, Liu X, Yuan D, Zi Y, He X, et al. Detection and Clinical Significance of COX-2 Gene SNPs in Gastric Cancer. *Cell Biochem Biophys*. 2015;72:657–660.
52. Zhang LJ, Wang SY, Huo XH, Zhu ZL, Chu JK, Ma JC, et al. Anti-*Helicobacter pylori* therapy followed by celecoxib on progression of gastric precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 2731-2738.
53. Targosz A, Brzozowski T, Pierzchalski P, Szczyrk U, Ptak-Belowska A, Konturek SJ, et al. *Helicobacter pylori* promotes apoptosis, activates cyclooxygenase (COX)-2 and

- inhibits heat shock protein HSP70 in gastric cancer epithelial cells. *Inflamm Res* 2012; 61: 955-966.
54. Plummer SM, Hall M, Faux SP. Oxidation and genotoxicity of fecapentaene-12 are potentiated by prostaglandin H synthase. *Carcinogenesis* 1995; 16:1023–8.
 55. Sung JJ, Leung WK, Go MY, To KF, Cheng AS, Ng EK, et al. Cyclooxygenase-2 expression in *Helicobacter pylori*-associated premalignant and malignant gastric lesions. *Am J Pathol.* 2000;157:729–735.
 56. Sheu BS, Yang HB, Sheu SM, Huang AH, Wu JJ. Higher gastric cyclooxygenase-2 expression and precancerous change in *Helicobacter pylori*-infected relatives of gastric cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2003;9:5245–5251.
 57. Saukkonen K, Rintahaka J, Sivula A, Buskens CJ, Van Rees BP, Rio MC, et al. Cyclooxygenase-2 and gastric carcinogenesis. *APMIS.* 2003;111:915–925.
 58. Saukkonen K, Nieminen O, van Rees B, Vilkki S, Härkönen M, Juhola M, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in dysplasia of the stomach and in intestinal-type gastric adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2001;7:1923–1931.
 59. Rocco A, Caruso R, Toracchio S, Rigoli L, Verginelli F, Catalano T, et al. Gastric adenomas: relationship between clinicopathological findings, *Helicobacter pylori* infection, APC mutations and COX-2 expression. *Ann Oncol.* 2006;17 Suppl 7:vii103–vii108.
 60. Van Rees BP, Saukkonen K, Ristimäki A, Polkowski W, Tytgat GN, Drillenburger P, et al. Cyclooxygenase-2 expression during carcinogenesis in the human stomach. *J Pathol.* 2002;196:171–179.
 61. Asaka M. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Intern Med* 2002; 41: 1-6.
 62. Cho SO, Lim JW, Kim KH, Kim H. Involvement of Ras and AP-1 in *Helicobacter pylori*-induced expression of COX-2 and iNOS in gastric epithelial AGS cells. *Dig Dis Sci.*2010; 55: 988-996.
 63. Li Q, Liu N, Shen B, Zhou L, Wang Y, Wang Y, et al. *Helicobacter pylori* enhances cyclooxygenase 2 expression via p38MAPK/ATF-2 signaling pathway in MKN45 cells. *Cancer Lett* 2009; 278: 97-103.
 64. Subramaniam D, Ramalingam S, May R, Dieckgraefe BK, Berg DE, Pothoulakis C, et al. Gastrin-mediated interleukin-8 and cyclooxygenase-2 gene expression: differential transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Gastroenterology* 2008; 134: 1070-1082.
 65. Hofacker IL. Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3429-31.
 66. Cok SJ, Morrison AR. The 3'-untranslated region of murine cyclooxygenase-2 contains multiple regulatory elements that alter message stability and translational efficiency. *J Biol Chem* 2001;276:23179-85.
 67. Dong J, Dai J, Zhang M, Hu Z, Shen H. Potentially functional COX-2 -1195G>A polymorphism increases the risk of digestive system cancers: a meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010;25:1042–1050.
 68. 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; 129:565–76.
 69. Liu F, Pan K, Zhang X, Zhang Y, Zhang L, Ma J, et al. Genetic variants in cyclooxygenase-2: Expression and risk of gastric cancer and its precursors in a Chinese population. *Gastroenterology.* 2006;130:1975-84.

70. Zhao F, Zhu H, Huang M, Yi C, Huang Y. The 765G>C polymorphism in the cyclooxygenase-2 gene and gastric cancer risk: an update by meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15:2863–2868.
71. Jiang GJ, Wang HM, Zhou Y, Tan YF, Ding WL, Gao J, et al. The correlation study between the nucleotide polymorphisms of cyclooxygenase-2 gene and the susceptibility to gastric cancer. *Acta Univ Med Nanjing.* 2007; 27, 890-4.
72. Liu JL, Liang Y, Wang ZN, Zhou X, Xing LL. Cyclooxygenase-2 polymorphisms and susceptibility to gastric carcinoma: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2010;16:5510–7.
73. Wang XF, Huang MZ, Zhang XW, Hua RX, Guo WJ. COX-2-765G>C polymorphism increases the risk of cancer: a meta-analysis. *PLoS One.* 2013;8, 73213.
74. Xu YS, Zhao B, Long CY, Li H, Lu X, Liu G, et al. Cyclooxygenase-2 promoter 765C increase of digestive tract cancer risk in the Chinese population: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15:4563–6.
75. Zhang XM, Zhong R, Liu L, Wang Y, Yuan JX, Wang P, et al. Interaction of *Cyclooxygenase-2* promoter polymorphisms with *Helicobacter pylori* infection and risk of gastric cancer. *Mol carcinog.*2011;50(11):876-83 .
76. Campa D, Zienolddiny S, Maggini V, Skaug V, Haugen A, Canzian F. Association of a common polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene with risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 25: 229-235, 2004.
77. Sakoda LC, Gao YT, Chen BE, Chen J, Rosenberg PS, Rashid A et al. Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) gene polymorphisms and risk of biliary tract cancer and gallstones: a population-based study in Shanghai, China. *Carcinogenesis.* 2006;27: 1251-1256.
78. Khorshidi F, Haghighi MM, Mojarad EN, Azimzadeh P, Damavand B, Vahedi M et al. The Prostaglandin Synthase 2/cyclooxygenase 2 (PTGS2/COX2) rs5277 Polymorphism Does not Influence Risk of Colorectal Cancer in an Iranian Population. *Asian Pac J Cancer Prev.*2014;15(8),3507-3511.
79. Hu Z, Miao X, Ma H, Wang X, Tan W, Wei Q, et al. A common polymorphism in the 3'UTR of cyclooxygenase 2/prostaglandin synthase 2 gene and risk of lung cancer in a Chinese population. *Lung Cancer.*2005;48: 11-17.
80. Hussain SK, Mu LN, Cai L, Chang SC, Park SL, Oh SS, et al. Genetic variation in immune regulation and DNA repair pathways and stomach cancer in China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18:2304–9.
81. Cox DG, Pontes C, Guino E, Navarro M, Osorio A, Canzian F, et al. Polymorphisms in prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 (PTGS2/COX2) and risk of colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2004;91:339–343.
82. Siezen CL, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Kram NR, Van-Doeselaar M, Van-Kranen HJ. Polymorphisms in the genes involved in the arachidonic acid-pathway, fish consumption and the risk of colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2006;119:297–303.

ABREVIATURAS

AA: Ácido araquidónico.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

AINES: Antiinflamatorios no esteroideos.

AGS: Células epiteliales gástricas.

Cag-PAI: Isla de patogenicidad Cag

CIBA: Centro de Investigación Biomédica de Aragón.

CG: Cáncer Gástrico.

DE: Desviación estándar.

Df: grado de libertad

DM2: Diabetes mellitus 2.

H. pylori: Helicobacter pylori.

HTA: Hipertensión arterial.

IL-1 α : Interleuquina-1 α .

IACS: Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud

LPG's: Lesiones precancerosas gástricas.

MALT: Tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica.

OPL: Lesiones premalignas orales.

OR: Odds Ratio.

PG: Prostaglandina.

SNP: single nucleotide polymorphism

TXA₂: Tromboxano A₂.

VEGF-C: factor linfangiogénico.

ANEXOS

Tabla Suplementaria 1: Características clínico-demográficas de los pacientes clasificados según la localización tumoral.

	Controles n = 240	CG Cardial n = 44	ORs (95% IC)	P Valor	CG Distal n = 196	ORs (95% IC)	P Valor
Edad \bar{x} SD (rango)	71,88 \pm 12,23 (29-96)	67,11 \pm 12,96 (30-91)	0.97 (0.94-0.99)	0.021	73,10 \pm 11,70 (29-96)	1 (0.99-1.03)	0.29
Sexo	161 V (67,08%) 79 M (32,92%)	41 V (93,18%) 3 M (6,82%)	6.70 (2.01-22.33)	0.002	120 V (61,22%) 76 M (38,78%)	0.77 (0.52-1.25)	0.23
Tabaquismo							
Nunca	133/234 (56,84%)	9/42 (21,43%)	Reference		120/195 (61,54%)	Reference	
Ex-fumador	68/234 (29,06%)	24/42 (57,14%)	5.22 (2.29-11.84)	<0.0001	40/195 (20,51%)	0.66 (0.42-1.06)	0.10
Fumador actual	33/234 (14,10%)	9/42 (21,43%)	4.03 (1.48-10.95)	0.007	35/195 (17,95%)	1.13 (0.67-1.92)	0.68
<i>H. pylori</i> +	154 (64,16%)	23/36 (63,89%)	0.98 (0.47-2.05)	0.99	118/163 (72,39%)	1.46 (0.95-2.26)	0.10
CagA+	106 (44,16%)	20/36 (55,56%)	1.56 (0.77-3.17)	0.21	116/163 (71,16%)	3.09 (2.09-4.73)	<0.0001
VacA+	95 (39,58%)	12/36 (33,33%)	0.76 (0.36-1.59)	0.58	76/163 (46,62%)	1.32 (0.88-1.98)	0.18
Historia familiar de CG	7/218 (3,21%)	7/41 (17,07 %)	6.21 (2.05-18.81)	0.002	28/185 (15,13%)	5.87 (2.28-12.62)	<0.0001

GC, cancer gástrico; n, número de individuos; OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza; SD, derivación estándar; M, Hombres; F, Mujeres.
OR and 95% IC valores ajustados por sexo y edad. Valor $P < 0.05$ destacado en negrita.

Tabla Suplementaria 2: Características clínico-demográficas de los pacientes clasificados según el tipo histológico tumoral.

	Controles n = 240	CG Intestinal n = 114	ORs (95% IC)	P Valor	CG Difuso n = 65	ORs (95% IC)	P Valor
Edad \bar{x} SD (rango)	71,88 \bar{x} 12,23 (29-96)	74,11 \pm 10,05 (35-92)	1.02 (0.99-1.04)	0.09	70,26 \pm 14.27 (29-96)	0.99 (0.97-1.01)	0.36
Sexo	161 V (67,08%) 79 M (32,92%)	73 V (64%) 41 M (36%)	0.87 (0.54-1.39)	0.63	35 V (53,84%) 30 M (46,16 %)	0.57 (0.33-0.99)	0.06
Tabaquismo							
Nunca	133 (55,42%)	72/113 (63,72%)	Reference		40 (61,54%)	Reference	
Ex-fumador	68 (28,33%)	28/113 (24,78%)	0.76 (0.45-1.28)	0.35	17 (26,15%)	0.83 (0.43-1.57)	0.63
Fumador actual	33 (13,75%)	13/113 (11,5%)	0.73 (0.36-1.47)	0.73	8 (12,31%)	0.80 (0.34-1.88)	0.68
<i>H. pylori</i> +	154 (64,16%)	69/97 (71,13%)	1.37 (0.82-2.29)	0.25	40/50 (80%)	2.23 (1.06-4.69)	0.03
CagA+	106 (44,16%)	66/97 (68,04%)	2.67 (1.62-4.39)	<0.0001	38/50 (76%)	3.97 (1.97-7.98)	<0.0001
VacA+	95 (39,58%)	46/97 (47,42%)	1.36 (0.84-2.19)	0.22	24/50 (48%)	1.39 (0.75-2.58)	0.34
Historia familiar de CG	33/539 (6,1%)	19/105 (18.09%)	6.65 (2.7-16.41)	<0.0001	8/65 (12,31%)	4.23 (1.47-12.16)	0.008

GC, cáncer gástrico; n, número de individuos; OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza; SD, derivación estándar; M, Hombres; F, Mujeres. OR y 95% IC valores ajustados por sexo y edad. Valor $P < 0.05$ destacado en negrita.

Tabla Suplementaria 3: SNPs en el gen *PTGS2* asociados con riesgo de cáncer gástrico.

Global	Análisis univariante				Análisis multivariante*			
	Codominante	Dominante	Recesivo	Log-aditivo	Codominante	Dominante	Recesivo	Log-aditivo
db SNP ID	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value
rs689466	0.71 (0.25-2.03) 0.4106	1.18 (0.81-1.71) 0.3921	0.66 (0.23-1.88) 0.4298	1.09 (0.78-1.51) 0.6175	0.65 (0.21-1.98) 0.5056	1.12 (0.76-1.64) 0.5773	0.61 (0.20-1.86) 0.3847	1.04 (0.74-1.46) 0.8265
rs20417	0.99 (0.44-2.25) 0.3986	0.80 (0.55-1.15) 0.2226	1.09 (0.49-2.44) 0.8372	0.87 (0.64-1.17) 0.3545	1.05 (0.45-2.47) 0.3497	0.79 (0.54-1.15) 0.2154	1.17 (0.50-2.70) 0.7207	0.87 (0.63-1.19) 0.3743
rs5277	0.53 (0.19-1.47) 0.4607	0.93 (0.64-1.35) 0.7003	0.53 (0.19-1.47) 0.2136	0.88 (0.64-1.22) 0.4574	0.59 (0.21-1.66) 0.5854	0.95 (0.64-1.41) 0.8065	0.58(0.21-1.65) 0.3010	0.91 (0.65-1.27) 0.5792
rs5275	1.78 (0.92-3.46) 0.086	0.97 (0.68-1.38) 0.8547	1.92 (1.02-3.64) 0.0404	1.12 (0.85-1.47) 0.4385	1.96 (0.98-3.91) 0.0472	0.96 (0.66-1.40) 0.8480	2.14 (1.10-4.16) 0.0213	1.14 (0.85-1.52) 0.3767
rs4648298	1.15 (0.55-2.42) 0.706	1.15 (0.55-2.42) 0.706	NA [*]	1.15 (0.55-2.58) 0.853	1.12 (0.57-2.61) 0.6178	1.12 (0.57-2.61) 0.6178	NA	1.12 (0.57-2.76) 0.7168
CG Cardial	Análisis univariante				Análisis multivariante*			
	Codominante	Dominante	Recesivo	Log-aditivo	Codominante	Dominante	Recesivo	Log-aditivo
db SNP ID	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value
rs689466	1.40 (0.29-6.88) 0.5238	1.46 (0.76-2.81) 0.2560	1.22 (0.26-5.86) 0.8056	1.34 (0.78-2.31) 0.2967	0.96 (0.15-6.09) 0.6735	1.33 (0.66-2.69) 0.4246	0.85 (0.14-5.30) 0.8626	1.21 (0.67-2.20) 0.5341
rs20417	0.84 (0.18-3.96) 0.8294	0.81 (0.42-1.58) 0.5418	0.90 (0.20-4.19) 0.8971	0.85 (0.49-1.50) 0.5763	1.04 (0.20-5.38) 0.6236	0.73 (0.36-1.50) 0.3893	1.18 (0.23-5.99) 0.8401	0.81 (0.44-1.51) 0.5081
rs5277	0.99 (0.50-1.99) 0.9701	0.87 (0.44-1.72) 0.6816	0.22 (0.01-3.87) 0.2241	0.77 (0.42-1.42) 0.4701	0.85 (0.56-1.35) 0.1298	1.11 (0.53-2.33) 0.7754	0.57 (0.07-4.86) 0.610	0.92 (0.49-1.75) 0.8029
rs5275	1.64 (0.54-4.95) 0.5041	0.93 (0.49-1.76) 0.8169	1.79 (0.62-5.18) 0.3006	1.07 (0.64-1.80) 0.7835	1.87 (0.54-6.45) 0.4551	0.94 (0.47-1.88) 0.8615	2.05 (0.63-6.73) 0.2516	1.11 (0.64-1.93) 0.7187
rs4648298	0.77 (0.17-3.51) 0.7264	0.77 (0.17-3.51) 0.7264	NA	0.77 (0.17-3.47) 1.000	0.98 (0.2-4.82) 0.977	0.98 (0.2-4.82) 0.977	NA	0.99 (0.2-4.86) 0.99
CG Distal	Análisis univariante				Análisis multivariante*			
	Codominante	Dominante	Recesivo	Log-aditivo	Codominante	Dominante	Recesivo	Log-aditivo
db SNP ID	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value
rs689466	0.57 (0.17-1.88) 0.4041	1.12 (0.75-1.66) 0.5770	0.53 (0.16-1.76) 0.2885	1.03 (0.73-1.46) 0.8698	0.58 (0.16-2.07) 0.5431	1.08 (0.72-1.63) 0.7125	0.56 (0.16-1.97) 0.3525	1.01 (0.70-1.45) 0.9644
rs20417	1.03 (0.44-2.41) 0.3981	0.79 (0.54-1.17) 0.2374	1.13 (0.49-2.62) 0.7764	0.87 (0.63-1.20) 0.3878	1.03 (0.42-2.52) 0.3800	0.78 (0.52-1.17) 0.2252	1.14 (0.47-2.76) 0.7702	0.86 (0.62-1.20) 0.3742
rs5277	0.65 (0.24-1.82) 0.7103	0.94 (0.63-1.40) 0.7717	0.66 (0.24-1.81) 0.4096	0.91 (0.65-1.28) 0.5972	0.75 (0.26-2.14) 0.8600	0.94 (0.62-1.42) 0.7558	0.76 (0.27-2.15) 0.6018	0.92 (0.65-1.31) 0.6578
rs5275	1.81 (0.91-3.62) 0.1016	0.98 (0.67-1.43) 0.9012	1.95 (1.01-3.79) 0.0452	1.13 (0.84-1.51) 0.4226	1.87 (0.91-3.85) 0.0806	0.95 (0.64-1.41) 0.8041	2.06 (1.03-4.11) 0.0390	1.12 (0.83-1.53) 0.4601
rs4648298	1.24 (0.58-2.67) 0.5799	1.24 (0.58-2.67) 0.5799	NA	1.23 (0.58-2.62) 0.70	1.18 (0.53-2.60) 0.6876	1.18 (0.53-2.60) 0.6876	NA	1.18 (0.53-2.61) 0.723

OR, odds ratio; 95% IC, 95% intervalo de confianza.

ORs y 95% IC en el análisis multivariante se ajustaron por edad, sexo, infección por *H. pylori*, fumadores y antecedentes familiares de CG.

Valor de $P < 0.05$ se destaca en negrita.

*NA; No aplicable.

Tabla Suplementaria 4: SNPs en el gen *PTGS2* asociados con riesgo de cáncer gástrico.

CG Intestinal	Análisis univariante				Análisis multivariante*			
	Codominante	Dominante	Recesivo	Log-aditivo	Codominante	Dominante	Recesivo	Log-aditivo
db SNP ID	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value
rs689466	0.26 (0.03-2.11) 0.0615	1.35 (0.85-2.14) 0.1989	0.23 (0.03-1.81) 0.0927	1.15 (0.77-1.73) 0.4995	0.30 (0.04-2.56) 0.1645	1.27 (0.79-2.05) 0.3215	0.27 (0.03-2.27) 0.1624	1.12 (0.73-1.72) 0.6044
rs20417	0.85 (0.29-2.51) 0.9362	0.93 (0.59-1.46) 0.7504	0.87 (0.30-2.54) 0.7992	0.93 (0.64-1.37) 0.7195	0.87 (0.28-2.70) 0.9246	0.91 (0.57-1.46) 0.6981	0.90 (0.30-2.75) 0.8561	0.92 (0.62-1.38) 0.6952
rs5277	0.57 (0.15-2.09) 0.6564	0.97 (0.60-1.54) 0.8840	0.56 (0.15-2.06) 0.3619	0.92 (0.61-1.37) 0.6672	0.59 (0.16-2.24) 0.7202	0.91 (0.56-1.48) 0.7053	0.60 (0.16-2.25) 0.4278	0.88 (0.58-1.34) 0.5569
rs5275	1.95 (0.89-4.23) 0.1115	0.97 (0.62-1.52) 0.90763	2.12 (1.01-4.46) 0.0498	1.15 (0.81-1.63) 0.4237	2.16 (0.96-4.86) 0.0686	0.97 (0.61-1.55) 0.8994	2.38 (1.10-5.18) 0.0298	1.18 (0.82-1.69) 0.3729
rs4648298	1.38 (0.58-3.30) 0.469	1.38 (0.58-3.30) 0.469	NA	1.38 (0.58-3.21) 0.4992	1.34 (0.55-3.27) 0.524	1.34 (0.55-3.27) 0.524	NA	1.34 (0.55-3.29) 0.5488
CG Difuso	Análisis univariante				Análisis multivariante*			
	Codominante	Dominante	Recesivo	Log-aditivo	Codominante	Dominante	Recesivo	Log-aditivo
db SNP ID	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value	OR (95% IC) <i>P</i> value
rs689466	1.22 (0.32-4.72) 0.9425	0.99 (0.55-1.76) 0.9614	1.24 (0.33-4.73) 0.7547	1.02 (0.63-1.66) 0.9446	1.37 (0.29-6.54) 0.842	0.97 (0.52-1.82) 0.9169	1.40 (0.30-6.60) 0.6775	1.01 (0.59-1.74) 0.9603
rs20417	1.34 (0.45-4) 0.1755	0.68 (0.38-1.21) 0.18636	1.58 (0.54-4.67) 0.4187	0.84 (0.52-1.34) 0.4508	1.28 (0.36-4.50) 0.1294	0.61 (0.32-1.14) 0.1136	1.58 (0.46-5.47) 0.4762	0.76 (0.45-1.28) 0.3018
rs5277	0.31 (0.04-2.45) 0.3940	0.77 (0.42-1.39) 0.3787	0.33 (0.04-2.56) 0.2162	0.74 (0.44-1.25) 0.2509	0.42 (0.05-3.53) 0.6303	0.81 (0.42-1.54) 0.5098	0.44 (0.05-3.66) 0.3998	0.79 (0.45-1.39) 0.4043
rs5275	1.90 (0.74-4.87) 0.3522	1.05 (0.61-1.82) 0.8611	1.96 (0.80-4.82) 0.1542	1.19 (0.77-1.83) 0.4356	1.60 (0.55-4.68) 0.5389	0.96 (0.52-1.76) 0.8940	1.73 (0.62-4.78) 0.3038	1.09 (0.68-1.76) 0.7204
rs4648298	0.78 (0.22-2.80) 0.6981	0.78 (0.22-2.80) 0.6981	NA	0.79 (0.22-2.78) 0.7352	0.70 (0.18-2.77) 0.6044	0.70 (0.18-2.77) 0.6044	NA	0.70 (0.17-2.77) 0.614

OR, odds ratio; 95% IC, 95% intervalo de confianza.

ORs y 95% CI en el análisis multivariante se ajustaron por edad, sexo, infección por *H. pylori*, fumadores y antecedentes familiares de CG.

Valor de $P < 0.05$ se destaca en negrita.

*NA; No aplicable.

FIGURA 1

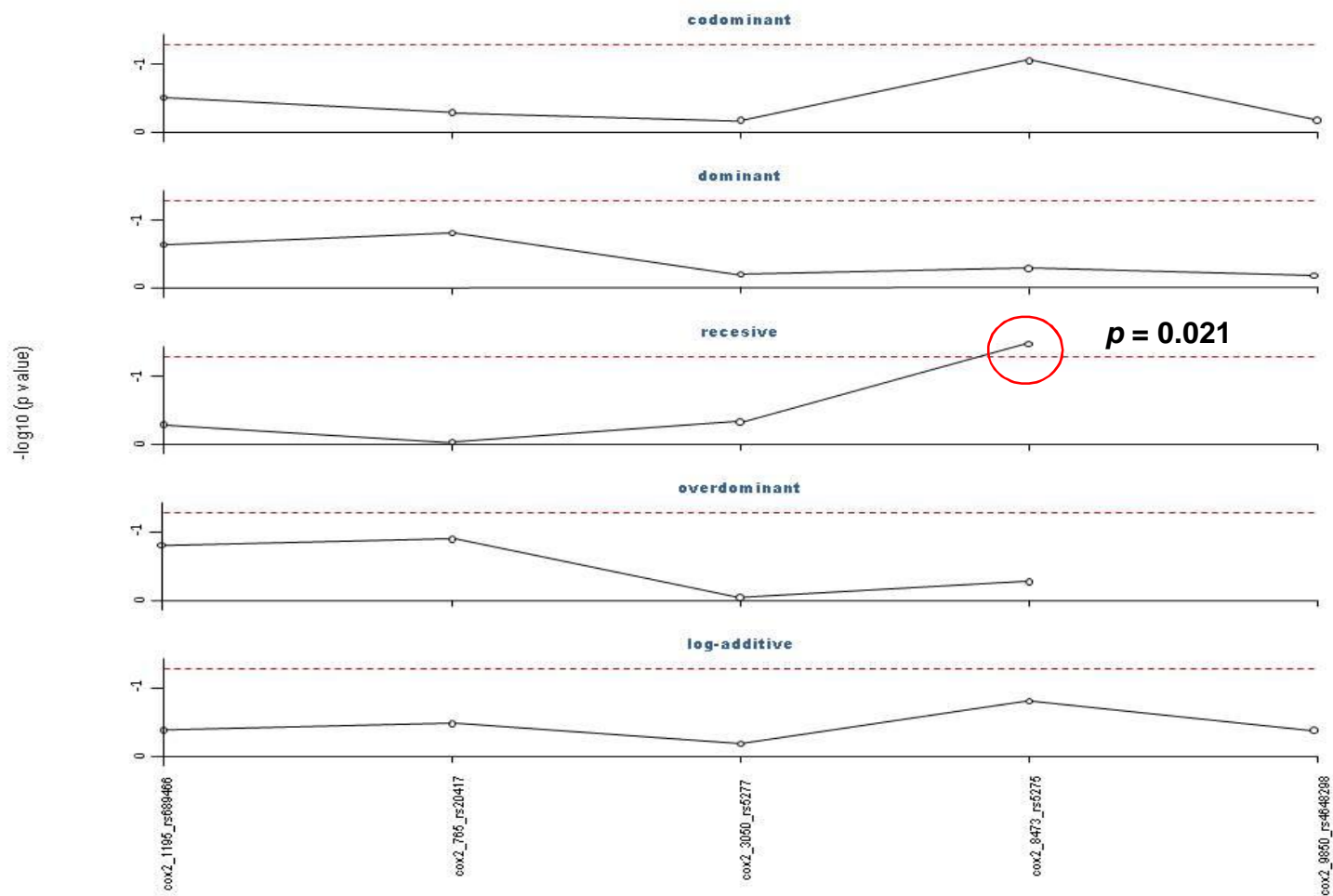


Figura 1. Análisis de la asociación entre los SNPs de *COX-2* analizados y el riesgo de CG. Representación gráfica de los niveles p de significación en el análisis multivariante según los diferentes modelos de herencia. La variante *COX2 rs5275* mantuvo valores estadísticamente significativos en el modelo recesivo.