



Universidad
de Alcalá

Programa de Doctorado en Especialidades Médicas

**HISTORIA NATURAL DE LA GASTRITIS
CRÓNICA. FACTORES QUE MODULAN SU
EVOLUCIÓN. ESTUDIO DE UNA COHORTE DE
478 PACIENTES CON SEGUIMIENTO DE 12
AÑOS, EN LA PROVINCIA DE SORIA**

Tesis Doctoral presentada por

MARÍA LUISA PARDO LÓPEZ

Director:

DR. JOSE MIGUEL SANZ ANQUELA

Alcalá de Henares, 2016

A mis padres

Agradecimientos

A los pacientes y familiares que han participado en este estudio mi más profundo respeto. Como médico no olvido que ellos son la piedra angular de mi trabajo y que gracias a ellos ha sido posible elaborar este estudio.

Al Dr. José Miguel Sanz Anquela, director de esta tesis doctoral, por sus valiosos conocimientos, por su interés y estímulo continuos y sobre todo por su apoyo incondicional y su amistad. Sin él esta tesis no habría sido posible.

Al Dr. Juan Manuel Ruiz Liso, jefe de servicio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario de Soria, por proponerme como patólogo para formar parte de un gran equipo de investigación.

A Carlos González, Nuria Sala, Fátima Marín y todo el equipo de investigación del Instituto Catalán de Oncología, por la oportunidad que me han brindado y la confianza que han depositado en mí.

A Pilar, Amalia, Ángela, Lola, Rosana, Marisa y todos los integrantes del laboratorio de Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario de Soria, por su impecable trabajo de campo y por la meticulosidad, esmero y buen hacer, que siempre demuestran, en el procesamiento de las muestras evaluadas en este estudio.

Al Dr. José María Arrinda, patólogo del hospital de Bidasoa, por su valiosa y desinteresada colaboración.

A los patólogos Antonia Gutiérrez y Agustín Vaíllo, mis compañeros de trabajo y amigos, por su apoyo a lo largo de estos años.

A Manolo, por su comprensión, su paciencia y su ánimo durante todo este proceso. Gracias por estar ahí.

AA-PAS 2.5	Azul Alcian y Acido Periódico de Schiff a pH 2.5
ADN	Acido Desoxirribonucleico
AINES	Antiinflamatorios No Esteroideos
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
BabA	Blood antigen binding Adhesión
CagA	Cytotoxin associated gene A
CagPAI	Cag Pathogenicity Island
CDH1	Cadherina 1
CEA	Carcinoembryonic antigen
CEGEN	Centro Nacional de Genotipado España
Clp	Caseinolytic protease p
COX-2	Cicloóxigenasa 2
C-terminal	Carboxi-terminal
CYP	Cytochrome P
EndoIII	Endonucleasa III
ERCC2	Excision repair cross-complimentary group 2
GACD	Gastritis atrófica corporal difusa
GAM	Gastritis atrófica multifocal
GDA	Gastritis difusa antral
GST	Glutación S transferasa
HID-AA 2.5	High iron diamine-Alcian blue pH 2.5
Hp	Helicobacter pylori
HR	Hazard ratio
HtrA	High temperature requirement A
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC	Intervalos de confianza
ID	Intestino delgado
IL8	Interleuquina 8
IL10	Interleuquina 10
IL-1NA	Interleukin 1 Receptor Antagonist
IL1β	Interleuquina 1b
LD	linkage disequilibrium
Le^b	Lewis B
LOH	Loss of heterozygosity
LPCG	Lesiones precursoras de cáncer gástrico
LPS	Lipopolisacáridos
MAF	Minor allele frequency
MC	Metaplasia completa
MI	Metaplasia intestinal
MII	Metaplasia intestinal incompleta
Mis	Metaplasia intestinal sulfomucina
MSI	Microsatellite instability
MTHFR	Enzima metilentetrahidrofolato reductasa

MUC1	Mucin 1
MUC2	Mucin 2
MUC5AC	Mucin 5AC
MUC6	Mucin 6
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NapA	Neutrophil activating protein A
NAT	N-acetiltransferasa
NAT1	N-acetiltransferasa 1
NAT2	N-acetiltransferasa 2
NI	Neoplasia intraepitelial
NNi	Neoplasia no invasiva
OLGA	Operative link for gastritis assessment
OLGIM	Operative link on gastric intestinal metaplasia assessment
OMPs	Outer membrane proteins
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Odds ratio
PAI	Pathogenicity island
PCR	Polymerase chain reaction
Prxs	Peroxirredoxinas
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
SNP	Single nucleotide polymorphism
SOD	Superóxido dismutasa mitocondrial
SPEM	Spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia
TFF	Trefoil factor family
TFF 1	Trefoil factor family 1
TFF 2	Trefoil factor family 2
TFF 3	Trefoil factor family 3
TNF-α	Tumoral necrosis factor α
VacA	Vacuolating cytotoxin A
VNTR	Variable number of tandem repeats
XPD	Xeroderma Pigmentosum complementation group D
XRCC1	X-ray cross complementing group 1
XRCC3	X-ray cross complementing group 3

Presentación de la Tesis

“yo hago lo que usted no puede y usted hace lo que yo no puedo. Juntos podemos hacer grandes cosas”

Teresa de Calcuta

Presento esta Tesis como un compendio de tres publicaciones que se desprenden de los trabajos de investigación dirigidos por el Departamento de Epidemiología del Instituto Catalán de Oncología y avalados por RETICC (Red Temática de investigación cooperativa en cáncer) y el Ministerio de Sanidad. Los trabajos han sido financiados en gran medida por el Fondo de Investigación Sanitaria. En estas publicaciones se recogen los resultados relacionados con los distintos factores que modulan la evolución de las lesiones precursoras de cáncer gástrico (LPCG). El estudio se inició en el 2004 en la provincia de Soria, una de las provincias españolas de alto riesgo de carcinoma gástrico, con el fin de encontrar marcadores pronósticos que permitan seleccionar a los pacientes con más riesgo de cáncer gástrico para su seguimiento. En el primer artículo se identifican aquellos factores predictivos de cáncer gástrico entre los pacientes con lesiones precursoras relacionados con: los antecedentes familiares de carcinoma gástrico, la existencia de infección por *Helicobacter pylori* (Hp), el consumo AINES (anti-inflamatorios no esteroideos) y tabaco, así como el tipo de LPCG. En el segundo, y su ampliación posterior, se evalúa el efecto de los factores de virulencia del Hp, *cagA* y *vacA*, en la evolución de las lesiones precursoras siendo la primera vez que se analiza la relación del factor de virulencia *vacA* y su combinación con *cagA* con la progresión de estas lesiones. El tercer artículo, atendiendo a la susceptibilidad genética del individuo como factor de riesgo de cáncer, analiza por primera vez, la relación de los polimorfismos de los genes de mucinas con la evolución de las LPCG.

Me incorporé para contribuir como patólogo en esta línea de investigación en el 2005, recogiendo el legado de los trabajos que desde años atrás ya venía realizando el Dr. Sanz Anquela en el campo de gastritis crónica y las LPCG que de ella se derivan, patologías que en la actualidad, siguen siendo un problema de salud en nuestro medio.

Introducción	1
1. Perspectiva histórica de la gastritis crónica	2
2. Clasificación de la gastritis crónica	6
3. Lesiones precursoras del cáncer gástrico. Clasificación y estadificación	11
3.1. Atrofia gástrica	11
3.2. Metaplasia Intestinal	15
3.2.1. Metaplasia pseudopilórica	20
3.3. Displasia epitelial	21
4. Alteraciones moleculares en las lesiones precursoras del cáncer gástrico	28
5. Historia natural de las lesiones precursoras del cáncer gástrico	30
6. Factores relacionados con la evolución de las lesiones precursoras del cáncer gástrico	30
6.1. Factores relacionados con la virulencia del <i>Helicobacter pylori</i>	31
6.1.1. La Ureasa	33
6.1.2. Los flagelos	33
6.1.3. Lipopolisacáridos	33
6.1.4. Factores de adhesión	34
6.1.5. Sistemas antioxidantes	35
6.1.6. Citotoxina vacuolizante A	36
6.1.7. La isla de patogenicidad cag y citotoxina asociada al gen A	37
6.1.8. Péptidoglicano	38
6.2. Factores medioambientales y estilo de vida	38
6.3. Factores relacionados con la susceptibilidad genética del individuo	40
6.3.1. Mecanismos de protección de la mucosa gástrica frente al <i>Helicobacter pylori</i> y otros agentes carcinógenos	41
6.3.2. La respuesta inflamatoria frente a la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	42
6.3.3. Capacidad para paliar los efectos tóxicos de los carcinógenos y protección ante el estrés oxidativo	43
6.3.4. Los mecanismos de reparación del ADN	44
6.3.5. Procesos relacionados con la proliferación y adhesión celular	45
Justificación	46
Objetivos	50

Materiales y método	52
1. Población del estudio	53
2. Histopatología	56
2.1. Clasificación de los diagnósticos anatomopatológicos	56
2.2. Score histológico	57
3. Valoración de la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	58
4. Genotipado de las cepas de <i>Helicobacter pylori</i>	58
5. Genotipado de las mucinas en cada individuo	59
6. Análisis estadístico	60
Resultados	62
1. Presentación de los resultados	63
2. Resumen del artículo 1	64
<i>Int. J. Cancer.</i> 2010 Dec 1; 127(11): 2654-60.	
3. Resumen del artículo 2	73
<i>Am. J. Gastroenterol.</i> 2011 May; 106(5): 867-74.	
3.1. Ampliación del artículo 2	82
<i>Am. J. Gastroenterol.</i> 2012 Jan; 107(1): 145-6.	
4. Resumen artículo 3	85
<i>Carcinogénesis.</i> 2012 May; 33(5): 1072-80	
5. Resumen de los resultados más destacados	95
Discusión	96
1. Factores involucrados en la evolución de las lesiones precursoras del cáncer gástrico	97
1.1. Edad y sexo como factores implicados en la evolución de las lesiones precursoras de cáncer gástrico	97
1.2. El tabaco como factor de riesgo de evolución de las lesiones precursoras de cáncer gástrico	98
1.3. La infección por <i>Helicobacter pylori</i>	98
1.4. El consumo de anti-inflamatorios no esteroideos como protectores en la evolución a cáncer gástrico	98

1.5. Antecedentes familiares de cáncer gástrico como factor de riesgo de evolución de las lesiones precursoras de cáncer gástrico	99
1.6. La metaplasia intestinal incompleta como marcador riesgo de cáncer gástrico	99
1.7. Los factores de virulencia bacteriana vacA y cagA como factores pronósticos en pacientes con lesiones precursoras gástricas	102
1.8. Polimorfismos del gen MUC2 como factor asociado a la evolución de las lesiones precursoras de cáncer gástrico	104
2. Fortalezas y limitaciones del estudio	106
2.1. Fortalezas del estudio	106
2.2. Limitaciones del estudio	107
Conclusiones	109
Bibliografía	111

Introducción

1. Perspectiva Histórica de la Gastritis Crónica

Nuestros conocimientos sobre la gastritis crónica y las LPCG se remontan a dos siglos atrás. La primera mención de la gastritis en la literatura médica se debe a G.E. Stahl en 1728. Boerhaave en 1771 y Broussais en 1808, realizan las primeras descripciones de la gastritis crónica en “*Ventriculitis Inflammation*” y “*Histoire des phlémagies ou inflamations chroniques*” respectivamente¹. En 1830 Cruveilhier observa la relación de la gastritis crónica con la úlcera gástrica². A mediados del siglo XIX, en 1855, Handfield Jones describe la atrofia de la mucosa gástrica que más tarde Austin Flint en 1860 y Samuel Fenwick en 1870 relacionan con la anemia perniciosa¹. En 1883 Kupffer describe la presencia de glándulas de tipo intestinal en la mucosa gástrica³. Dielafoy a finales del siglo XIX, ya apuntaba a la gastritis crónica como posible precursor del carcinoma gástrico debido a los cambios regresivos que sufrían las glándulas gástricas por la irritación continuada.

En la primera mitad del siglo XX con el auge de la cirugía en pacientes con úlcera péptica y cáncer gástrico y la aparición de las primeras técnicas de endoscopia tanto de tubo rígido como semiflexible, se pudo disponer de piezas quirúrgicas gástricas y biopsias de mucosa, aunque a ciegas y por succión, de pacientes vivos. Este hecho mejoró el estudio morfológico de la gastritis⁴ y permitió la realización de trabajos que mostraron que la gastritis crónica siempre estaba presente en los pacientes con úlcera péptica⁵. También pusieron de manifiesto el vínculo existente entre la atrofia gástrica y la metaplasia intestinal con el cáncer gástrico⁶⁻¹⁰. Aunque estos estudios eran observacionales y se realizaron en grupos limitados y seleccionados de pacientes, sus conclusiones constituyeron la base de nuestro conocimiento actual sobre la relación de la gastritis crónica con las distintas enfermedades gástricas¹¹. También sirvieron para que Pekkan Laurén describiese los dos tipos principales de adenocarcinomas gástricos: el adenocarcinoma de tipo intestinal y el difuso¹².

A principios del siglo XX el estudio morfológico de la gastritis todavía estaba muy limitado por las dificultades técnicas. Las piezas gástricas obtenidas de autopsias presentaban en la mucosa cambios debidos a la agonía o la autólisis. Las piezas quirúrgicas solo permitían el estudio de la parte proximal del estómago y la técnica

provocaba distintos artefactos en la mucosa¹³. Los endoscopios no alcanzaban la región antral gástrica y en ocasiones provocaban hemorragias masivas⁴. Las biopsias por aspiración a ciegas no eran muy representativas y las muestras que se podían obtener de la mucosa gástrica eran escasas¹⁴.

La introducción del endoscopio flexible por Basil Hirschowitz a mediados del siglo XX revolucionó el mundo de la gastroenterología. Este nuevo tipo de endoscopio permitía visualizar y realizar biopsias múltiples en todas las regiones de la cavidad gástrica en el momento de la exploración. La calidad de las muestras mejoró. Su versatilidad favoreció la realización de estudios con poblaciones de mayor tamaño¹¹. Las ventajas aportadas por el nuevo endoscopio permitieron avanzar en el conocimiento de los factores fisiopatológicos de los diferentes tipos de gastritis¹⁴, de sus bases morfológicas^{15,16} de sus factores etiológicos y de sus características epidemiológicas¹⁷. También permitieron confirmar la asociación de la gastritis crónica con las dos principales enfermedades gástricas: la úlcera péptica¹³ y el cáncer gástrico^{18,19}.

La vinculación de la gastritis crónica con el carcinoma gástrico, sobre todo con el de localización distal, todavía se hace más estrecha cuando en 1975 Pelayo Correa, basado en estudios epidemiológicos y patológicos²⁰⁻²², propone su modelo de carcinogénesis gástrica. Correa consideró que el carcinoma gástrico es el resultado de “una larga evolución de lesiones precursoras en la mucosa gástrica (principalmente la gastritis crónica atrófica y la metaplasia intestinal)”. El proceso comienza con la inflamación que mantenida en el tiempo daría paso a la atrofia de la mucosa gástrica, el reemplazo de ésta por mucosa de tipo intestinal a lo que seguiría la displasia epitelial y finalmente el carcinoma²³. William Haensezl, apoyado por estudios de migraciones²², observó que el desarrollo de carcinoma gástrico en los adultos de las zonas de alto riesgo estaba determinado por la exposición a algún factor medioambiental durante las primeras décadas de la vida. Por tanto, el proceso de carcinogénesis comenzaría en la infancia y su evolución dependería de factores medioambientales además de los hábitos dietéticos y de cierta susceptibilidad genética^{24,25}.

La hipótesis carcinogénica de Correa denominada “Cascada de Correa” puso de manifiesto que la gastritis crónica es un proceso dinámico²⁶ (ya considerado por Knud Faber a principios de siglo XX²⁷ y otros gastroenterólogos escandinavos como Siurala y

Vuorinen en los años 60²⁸), y que su historia natural está modulada por distintos factores pudiendo dar lugar al desarrollo de úlcera péptica o de carcinoma gástrico. Este último precedido secuencialmente por atrofia gástrica, metaplasia intestinal y displasia. Las tres lesiones consideradas como precursoras de cáncer gástrico.

A pesar de todos los avances en el conocimiento de la gastritis crónica la mayoría de los gastroenterólogos la seguían considerando como consecuencia de alguna enfermedad gástrica y no como una entidad etiopatogénica. Los clínicos no tenían interés en esta entidad, para ellos el principal factor etiológico de las enfermedades gástricas era las alteraciones en la secreción ácida¹¹. Todo dio un vuelco cuando en 1982 Marshall and Warren²⁹ consiguieron aislar y cultivar desde biopsias gástricas de pacientes con úlcera péptica y gastritis, una bacteria en espiral que ya se había observado en la cavidad gástrica de los perros a finales del siglo XVIII por Bizzozero y con posterioridad en la cavidad gástrica humana por Freedberg en 1940³⁰, pero no se había podido aislar ni cultivar. Originalmente denominada *Campylobacter pylori*, en 1989 se creó un nuevo género para esta bacteria: *Helicobacter*³¹. Lo que consiguieron Marshall and Warren supuso un cambio en la concepción etiopatogénica de las enfermedades gástricas.

Diferentes estudios demostraron la relación causal entre el Hp y la gastritis³²⁻³⁸, la úlcera duodenal^{39,40} y la úlcera gástrica^{41,42}. En 1994 fue clasificado como factor carcinogénico humano por la *International Agency for Research on Cancer (IARC)*⁴³. Varios trabajos contribuyeron a reconocer al Hp como un carcinógeno humano. Dos trabajos publicados en 1991 en el “*Journal of the National Cancer Institute*” por el equipo de Parsonnet⁴⁴ y el equipo de Talley⁴⁵ establecieron una asociación directa entre el adenocarcinoma gástrico distal y la infección por Hp. Parsonnet evaluando la prevalencia de la bacteria en las piezas de gastrectomía por adenocarcinoma gástrico y Talley determinando los niveles de anticuerpos para Hp en los pacientes diagnosticados de cáncer gástrico. Estudios de cohorte histórica en Hawai⁴⁶, California⁴⁷ y el Reino Unido⁴⁸ establecieron la relación de temporalidad entre la infección por Hp y el desarrollo del carcinoma⁴⁹. También se observó que una de las diferencias entre las poblaciones de alto riesgo y bajo riesgo de cáncer gástrico era que en las primeras existía una alta prevalencia de infección por Hp en la infancia, por lo que se consideró

que aquel factor medioambiental postulado por William Haensezl en 1972²² era esta bacteria⁵⁰.

El hecho de que existiera un agente infeccioso causante de la gastritis crónica y sus secuelas abrió las puertas para el tratamiento y la prevención de las enfermedades gástricas. Aumentó el interés por la gastritis por parte de múltiples disciplinas que se tradujo en un sinnúmero de reuniones, conferencias, investigaciones y publicaciones que derivó en una gran diversidad de enfoques y de terminologías que no ayudaban en la práctica clínica y generaban malos entendidos entre los clínicos y los patólogos⁵¹.

Ante este panorama, entre 1988 y 1990 George Misiewicz y Guido Tytgat lideraron un grupo de trabajo constituido por gastroenterólogos y patólogos europeos. Lo integraron: Robert Strickland como principal representante de los clínicos y endoscopistas. Stewart Goodwin como microbiólogo. Como patólogos, Ashley Price y Pentti Sipponen representaban a un importante grupo de patólogos europeos como: Bogomoletz, Dixon, Haot, Heilmann, Solcia, y Stolte. El objetivo fue: promover un lenguaje común aplicable a los nuevos conocimientos de la historia natural de la gastritis crónica, proporcionar pautas sencillas para la valoración microscópica de las biopsias gástricas y proporcionar una clasificación aplicable tanto en la clínica como en la investigación. Sus conclusiones se presentaron en 1990 en el congreso mundial de gastroenterología en Sídney⁵¹. El resultado fue una guía práctica que incluía: la descripción de las principales LPCG, un método para la toma de biopsias en la cavidad gástrica, un sistema de graduación histológica para las lesiones (la inflamación, la atrofia y la metaplasia intestinal) y una clasificación consensuada de la gastritis. Se denominó Sistema de Sídney⁵².

Los patólogos americanos entre los que se encontraban Pelayo Correa, Jonson H. Yardley y Rubin criticaron con dureza el Sistema de Sídney^{53,54}. En su opinión cometieron errores de concepto y malentendidos a la hora de describir los distintos tipos de gastritis y la clasificación les pareció incompleta y no representativa. Así que por iniciativa americana se llevó a cabo una nueva reunión de consenso en Houston en 1994. El resultado fue el Sistema de Sídney Actualizado que se publicó en 1997⁵⁵. En él se llega a un acuerdo en cuanto a la nomenclatura de los distintos tipos de gastritis crónicas. Se recomienda una toma de biopsia de la *incisura angularis* además de las

cuatro recomendadas inicialmente del cuerpo y del antro y se añadieron escalas visuales para la graduación histológica de las distintas lesiones encontradas en la biopsia de la mucosa gástrica.

El interés en la clasificación de la gastritis crónica y en la valoración de las LPCG que de ella se derivan radica en la posibilidad de poder predecir en qué casos su evolución va a dar lugar a formas graves de enfermedad gástrica y en qué casos la aplicación de un tratamiento permitiría prevenirlas. Actualmente, con el desarrollo de la biología molecular y los estudios genéticos, ha mejorado el conocimiento de los mecanismos etiopatogénicos de la gastritis crónica y la carcinogénesis gástrica. En un futuro pueden aportar información sobre posibles factores pronósticos que ayuden a predecir la evolución de las LPCG y a elegir los tratamientos más adecuados para prevenir e incluso curar la úlcera péptica y el cáncer gástrico⁵¹.

2. Clasificación de la Gastritis Crónica

A lo largo de la historia, a medida que evolucionaban los conocimientos sobre de la gastritis crónica, se fueron elaborado numerosas clasificaciones basadas en distintos criterios que han llevado a denominar de varias maneras a una misma entidad biológica.

Rudolf Schindler combinando el endoscopio semiflexible y las biopsias quirúrgicas de la mucosa gástrica mediante laparotomía, elaboró la primera clasificación moderna de las gastritis crónicas en 1947. Dividió a las gastritis en agudas y crónicas. Las gastritis crónicas las subdividió en tres tipos: **gastritis crónica superficial**, **gastritis crónica atrófica** y **gastritis crónica hipertrófica**¹¹.

Whitehead *et al* en 1972¹⁶ elaboraron una clasificación morfológica de las gastritis de acuerdo con: (1) el tipo de mucosa afectada: cardial, corporal o fúndica, pilórica o antral y transicional o indeterminada; (2) el tipo y grado de inflamación: superficial o profunda; leve, moderada o severa; con o sin atrofia; (3) la actividad del proceso inflamatorio; y (4) la presencia y el tipo de metaplasia: pseudopilórica o intestinal. Distinguieron dos tipos de gastritis crónica la **gastritis superficial** y la

gastritis crónica atrófica. En esta clasificación es la primera vez que se introduce como parámetro la actividad del proceso inflamatorio, entendiendo como tal la presencia de neutrófilos en el epitelio foveolar y en las criptas¹¹ (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros morfológicos de la clasificación de la Gastritis crónica por Whitehead *et al.* 1972¹⁶

Tipo de mucosa	Tipo de gastritis	Intensidad	Actividad	Metaplasia
Cardial	Superficial Atrófica	Leve	No activa	Pseudopilórica
Fúndica o corporal		Moderada	Activa	Intestinal
Transicional o intermedia		Severa		
Antral o pilórica				

Strickland y Mackay en 1973¹⁵ siguiendo criterios fisiopatológicos y topográficos establecieron dos tipos de gastritis atrófica: El **tipo A** y el **tipo B**. El **tipo A** es una gastritis limitada al cuerpo gástrico, mediada por mecanismos autoinmunes (presencia de anticuerpos contra células parietales) y se relaciona con la anemia perniciosa. El **tipo B** se origina en el antro y con el tiempo se extiende a todas las regiones gástricas, está mediada por agentes medioambientales, se relaciona con la úlcera gástrica y es la más frecuente. En ambos tipos de gastritis, la atrofia y la metaplasia intestinal son frecuentes y las dos tienen posibilidades de evolucionar a cáncer gástrico. Esta clasificación ponía de manifiesto la importancia de la distribución de las lesiones a la hora de determinar la etiología y la patogenia de la gastritis.

En 1975 Glass y Pitchumoni²⁷, basados en la clasificación de Strickland¹⁵, proponen un tercer tipo de gastritis crónica el **tipo AB**. En este tipo se ven afectados tanto el antro como el cuerpo gástrico, independientemente de que existan o no anticuerpos anticélulas parietales. Predispone tanto a la úlcera gástrica como al carcinoma gástrico. El **tipo B**, lo reservan para la afectación antral y el **tipo A**, para la afectación corporal.

Correa en 1980¹⁷ basándose en criterios etiopatogénicos divide a las gastritis crónicas en: (1) **gastritis crónica autoinmune**, concordante con el tipo A Strickland¹⁵; (2) **gastritis crónica hipersecretora**, producida por stress, limitada al antro,

relacionada con la úlcera duodenal pero no con el carcinoma gástrico; y ni la atrofia, ni la metaplasia intestinal son frecuentes; y (3) **gastritis crónica medioambiental**, equivalente a la gastritis tipo B de Strickland¹⁵ y tipo AB de Glass²⁷.

Posteriormente, tras el descubriendo del Hp, Correa en 1988² modifica la clasificación previa y siguiendo un criterio clínico-patológico define cinco tipos gastritis crónica: (1) **gastritis crónica superficial** como estadio inicial de los otros tipos; (2) **gastritis difusa antral** debida al stress, a la hipersecreción o al Hp. Ambas gastritis no atróficas; (3) **gastritis postgastrectomía** o **gastritis por reflujo**; (4) **gastritis atrófica corporal difusa**, mediada por mecanismos autoinmunes concordante con la gastritis tipo A de Strickland¹⁵ y (5) **gastritis atrófica multifocal** debida a factores medioambientales, la dieta e incluso al Hp, concordante con el tipo B de Strickland¹⁵ (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de la gastritis crónica por Correa 1988

Correa 1988 ²	Etiología	Strickland ¹⁵	Glass ²⁷	Correa 1980 ¹⁷
Gastritis crónica superficial				
Gastritis difusa antral	Stress, hipersecreción o <i>Helicobacter pylori</i>		Tipo B	Hipersecretora
Gastritis postgastrectomía	reflujo			
Gastritis atrófica corporal difusa	Autoinmune	Tipo A	Tipo A	Autoinmune
Gastritis atrófica multifocal	Dieta, <i>Helicobacter pylori</i>	Tipo B	TipoAB	Medio ambiental

Paralelamente en Europa Wyatt y Dixon⁵⁶, Stolte y Heilman⁵⁷, basan sus clasificaciones en criterios etiológicos y topográficos y utilizan la nomenclatura alfabética para definir los distintos tipos de gastritis crónicas. Wyatt y Dixon distinguen tres tipos de gastritis: la gastritis **tipo A**, de naturaleza autoinmune; **la tipo B**, debida a la bacteria Hp entre otras causas, y la gastritis **tipo C** o gastritis química, producida por

reflujo. Los patólogos alemanes, Stolte y Heilman, definían la gastritis **tipo AB** como aquella debida a la combinación de mecanismos autoinmunes y bacterianos (A de autoinmune B de bacteriana).

En 1990 el Sistema de Sídney^{52,57} y su actualización posterior en 1994⁵⁵, siguiendo criterios topográficos, morfológicos y etiológicos, definió los distintos tipos de gastritis crónicas y empleó una terminología común aceptada en consenso con la intención de acabar con las discrepancias semánticas que existían a la hora de definir una misma entidad (Tabla 3). Estableció dos tipos principales de gastritis crónicas: (1) la **gastritis no atrófica**, producida por Hp, asociada con la úlcera péptica duodenal y no al carcinoma y (2) la **gastritis crónica atrófica**. Dentro de las gastritis atróficas distinguen dos tipos: la **gastritis atrófica multifocal**, de origen alimentario, que afecta al cuerpo y al antro gástrico, relacionada con la infección por Hp y la segunda, la **gastritis atrófica autoinmune**, que afecta a la región corporal gástrica de forma difusa desarrollándose una anemia perniciosa. La gastritis por reflujo la incluye en el apartado de **gastritis química**.

Tabla 3. Clasificación de la gastritis crónica por el Sistema de Sídney

Sídney ⁵⁵	Strickland 1973 ¹⁵	Glass ²⁷	Correa 1980 ¹⁷	Correa 1988 ²	Alfabetica ^{56,57}
Gastritis no atrófica		Tipo B	Hipersecretora	GDA	Tipo B
Gastritis atrófica autoinmune	Tipo A	Tipo A	Autoinmune	GACD	Tipo A
Gastritis atrófica multifocal	Tipo B	Tipo AB	Medioambiental	GAM	
Gastritis química				Post-gastrectomía	Tipo C

GDA: Gastritis Difusa Antral; GACD: Gastritis Atrófica Corporal Difusa; GAM. Gastritis Atrófica Multifocal

El Sistema Sídney además, ideó un método semi-cuantitativo de graduación de la inflamación, atrofia, metaplasia, displasia y Hp. De tal manera que valora con el 0 a la mucosa normal y la ausencia de Hp y con el 3 la intensidad severa, pasando por los

grados 1 (leve) y 2 (moderada) ayudándose de escalas visuales (Fig. 1). Para ello recomienda cinco biopsias de la cavidad gástrica: dos del cuerpo y dos del antro, correspondientes a la curvatura mayor y menor de cada región, y una de la *incisura angularis* (Fig. 2). En cada localización se identifica el tipo de lesión y el grado de intensidad y se comparan las distintas localizaciones para definir el tipo de gastritis crónica. Esta clasificación es aceptada internacionalmente y ha permitido un mejor entendimiento entre los clínicos y los patólogos.

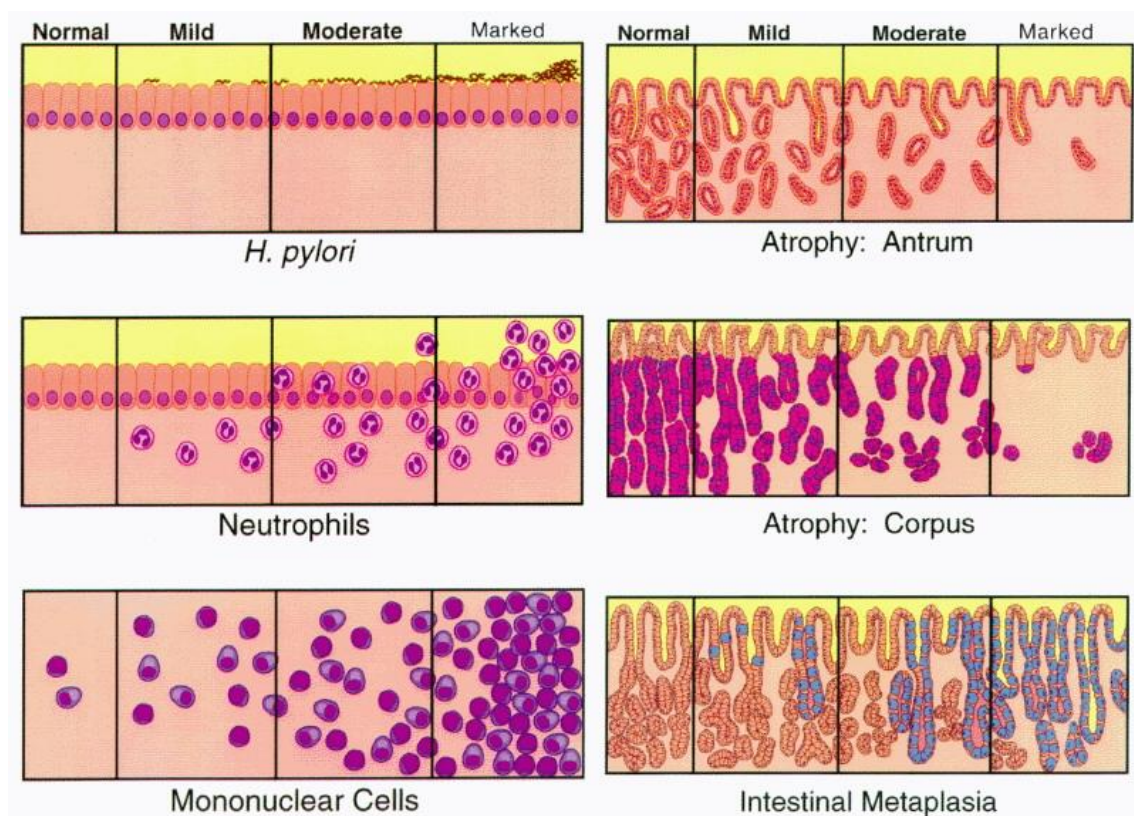


Fig. 1. Escalas visuales para la graduación de las lesiones gástricas y Hp según el Sistema de Sídney⁵⁵

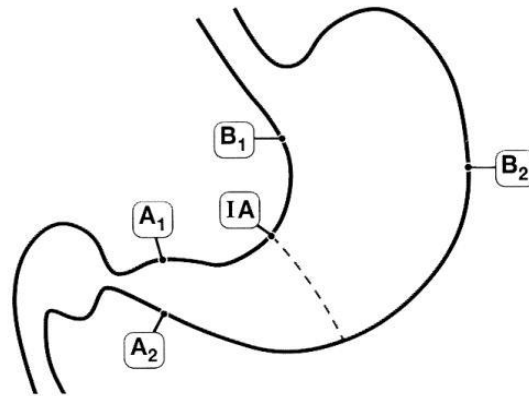


Fig. 2. Representación esquemática de la localización de las biopsias gástricas recomendadas por el Sistema de Sídney. Dos de antro: una de curvatura menor (A1) y otra de curvatura mayor (A2); una de *incisura angularis* (IA en sus siglas en inglés); dos de cuerpo: una de curvatura menor (B1) y otra de curvatura mayor (B2)⁵⁵.

3. Lesiones precursoras de cáncer gástrico. Clasificación y estadificación

Se define como lesiones precursoras aquellas alteraciones histológicas que favorecen el desarrollo de cáncer⁵⁸. Son lesiones que lo preceden aunque no necesariamente conducen a su desarrollo⁵⁹.

Actualmente tras la hipótesis de Correa sobre la carcinogénesis gástrica en 1975²³ y sus actualizaciones posteriores^{25,60} se considera que el desarrollo del carcinoma gástrico sobre todo de tipo intestinal es el resultado de un largo proceso que comienza con una gastritis crónica y continua con el desarrollo paulatino de las que hoy se consideran como LPCG: la atrofia gástrica, la metaplasia intestinal y la displasia.

3.1. Atrofia Gástrica

En la actualidad se define atrofia gástrica como la pérdida “apropiada de glándulas” de la mucosa gástrica⁶¹. Dentro de esta definición se incluyen dos variantes morfológicas: 1) aquella que cursa con la disminución del número de glándulas en la mucosa gástrica, denominada **atrofia no metaplásica** y 2) aquella que conlleva la

sustitución de las glándulas habituales en cada región gástrica por otro tipo glandular no propio de esa región (metaplasia pseudopilórica sobre mucosa corporal o fúndica) o de ese órgano (metaplasia intestinal), denominada **atrofia metaplásica**⁶¹. Se puede producir por dos mecanismos: a) por la destrucción de las células madre y/o de las glándulas; b) por destrucción selectiva de las células epiteliales especializadas con la conservación de las células madre⁶². Todo ello como resultado de un proceso inflamatorio prolongado.

En la **atrofia no metaplásica**, la pérdida del número de glándulas provoca una disminución del grosor de la mucosa, aumento del espacio interglándular, fibrosis de la lámina propia y colapso de las fibras reticulínicas interglandulares¹⁶ (Fig.3). Además, en el caso de la mucosa antral, se observa una menor ramificación glandular y en la mucosa corporal se produce un acortamiento de los túbulos glandulares. Este tipo de atrofia es la que más cuesta reconocer y en la que hay menos concordancia diagnóstica, sobre todo cuando es leve y afecta a la región antral⁶³ porque, habitualmente, en el antro el componente fibroso de la lámina propia es mayor y la disposición de las unidades glandulares es más irregular que en la mucosa corporal o fúndica. Además cuando el infiltrado inflamatorio crónico es muy intenso puede desplazar las glándulas aumentando el espacio interglándular dando la sensación de un aumento de la fibrosis o puede ocultar las glándulas impidiendo su adecuada valoración⁵⁵.

En la **atrofia metaplásica** el epitelio especializado de las glándulas mucosectoras, en el antro, o de glándulas oxínticas, en el cuerpo, es sustituido por epitelio no propio de esa localización o de ese órgano lo que conlleva una pérdida real de tejido glandular funcional y por lo tanto una verdadera atrofia⁵⁵ (Fig. 4). La metaplasia intestinal solo es marcador de atrofia cuando afecta a una unidad glandular completa no cuando afecta solo a la porción foveolar de la mucosa. En la región corporal y en la *incisura angularis* la sustitución de las glándulas oxínticas por glándulas mucosectoras similares a las de la región antro-pilórica, lo que se conoce como metaplasia pseudopilórica, también es un marcador de atrofia. En este caso cuando la atrofia es marcada el parecido con la mucosa antral normal es tal que para diagnosticar atrofia corporal es necesario la información del endoscopista sobre la localización de la muestra. Cuando la metaplasia pseudopilórica afecta a la *incisura angularis* es difícil distinguir una gastritis no atrófica antral de una gastritis atrófica

corporal con metaplasia pseudopilórica por eso en el caso de biopsias de la *incisura angularis* solo se puede hablar de atrofia metaplásica cuando exista metaplasia intestinal⁶¹.

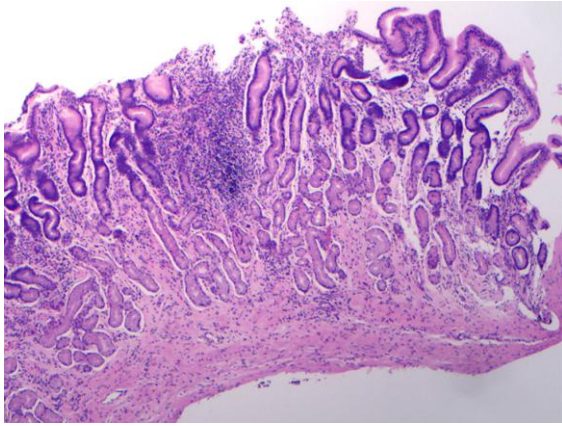


Fig. 3. Atrofia gástrica no metaplásica. H&E

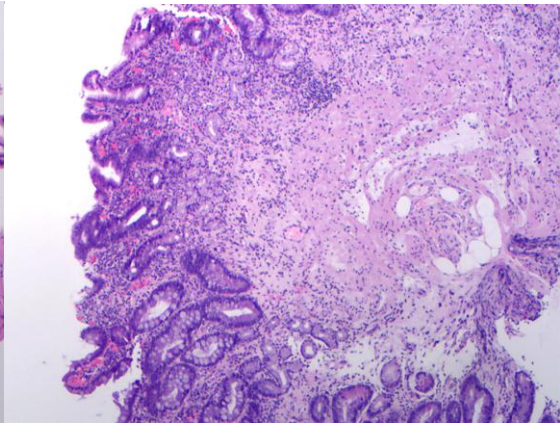


Fig. 4. Atrofia gástrica metaplásica. H&E

Teniendo en cuenta estas pautas, un grupo internacional de patólogos constituido por Máximo Rugge, Pelayo Correa, Michael F Dixon (Club de la Atrofia)⁶¹ propuso la clasificación de la atrofia gástrica actualmente más utilizada. Sus objetivos fueron mejorar el grado de acuerdo diagnóstico entre los patólogos, facilitar el reconocimiento de la lesión y valorar su gravedad. En la clasificación se distinguen cuatro categorías **atrofia ausente**, **indefinida para atrofia**, **atrofia no metaplásica** y **atrofia metaplásica**. En la categoría indefinida para atrofia se incluyen aquellos casos en los que la intensidad del componente inflamatorio provoca tal distorsión arquitectural que no permite una valoración adecuada de la lesión, siempre y cuando, no exista metaplasia intestinal. La gravedad de la atrofia se establece siguiendo las escalas visuales recomendadas por el Sistema de Sídney⁵⁵ (Fig. 1) considerándose tres grados: leve, moderada y severa.

Partiendo de las recomendaciones del Sistema de Sídney y siguiendo el enfoque del “Club de la Atrofia” un grupo internacional de gastroenterólogos y patólogos, OLGA (*operative link for gastritis assessment*)⁶³⁻⁶⁵, ha propuesto un sistema de graduación y estadificación histológica de la gastritis crónicas basado en la extensión y

gravedad de la atrofia, con la intención de aportar una información pronóstica que permita en la práctica clínica identificar a los pacientes con mayor riesgo de progresión.

El Sistema de estadificación OLGA, como se denomina, considera cinco tomas de biopsias: dos de antro, una de *incisura angularis*, y dos de cuerpo. Valora la atrofia (con o sin metaplasia) en cada región gástrica siguiendo las escalas visuales del sistema de Sídney (Fig.1) puntuándola del 0 al 3 como ausente, mínima, moderada y marcada respectivamente. La estadificación resulta de la combinación del grado de atrofia en el antro (donde se incluye la *incisura angularis*) y en el cuerpo, estableciéndose cuatro estadios (Fig. 5). Según dos estudios transversales^{66,67} y un estudio de cohorte⁶⁸ este sistema de estadificación resulta fácil de manejar y ayuda en la identificación de pacientes en riesgo de progresión (aquellos con estadio de OLGA III/VI) por lo que es útil clínicamente al aportar información pronóstica.

		CORPUS			
		No Atrophy (score 0)	Mild Atrophy (score 1)	Moderate Atrophy (score 2)	Severe Atrophy (score 3)
A N T R O	No Atrophy (score 0) (including <i>incisura angularis</i>)	STAGE 0	STAGE I	STAGE II	STAGE III
	Mild Atrophy (score 1) (including <i>incisura angularis</i>)	STAGE I	STAGE II	STAGE II	STAGE III
	Moderate Atrophy (score 2) (including <i>incisura angularis</i>)	STAGE II	STAGE II	STAGE III	STAGE IV
	Severe Atrophy (score 3) (including <i>incisura angularis</i>)	STAGE III	STAGE III	STAGE IV	STAGE IV

Fig. 5. Estadios de la atrofia según sistema OLGA⁶³⁻⁶⁵

Algunos autores⁶⁹ consideran un inconveniente que el sistema de estadificación de las gastritis crónicas por el método OLGA esté basado en la atrofia, lesión con muy bajo grado de acuerdo a la hora de su valoración⁷⁰⁻⁷². Aunque todavía no se aplica en la rutina diaria, se ha recomendado su utilización⁷³.

3.2. Metaplasia intestinal

La metaplasia intestinal es el siguiente paso después de la atrofia en la carcinogénesis gástrica²³. Se define como la sustitución del epitelio glandular y foveolar de la mucosa gástrica por epitelio intestinal⁵⁵.

En cuanto a su origen se postula que la metaplasia intestinal es el resultado de la mutación de una o varias células madre pluripotenciales localizadas en el cuello de la unidad glandular de la mucosa gástrica a partir de la cual se regeneraría el epitelio destruido por el proceso inflamatorio^{74,75}. Actualmente Houghton *et al.*⁷⁶ han planteado que esa célula madre pluripotencial se origina en la médula ósea y llega a la mucosa gástrica reclutada durante el proceso inflamatorio. Esto que, por ahora, se ha observado en modelos murinos experimentales se analiza e interpreta en el contexto de las enfermedades humanas y se discuten las implicaciones que pueda tener en futuros tratamientos⁷⁷. En cualquier caso, esta observación pone de manifiesto la importancia de la respuesta inflamatoria en la carcinogénesis gástrica.

La metaplasia intestinal varía en cuanto a su morfología, perfil enzimático y el tipo de secreción de mucinas. Estas variaciones han dado pie a la elaboración de varias clasificaciones siguiendo distintos criterios⁷⁸⁻⁸³ (Tabla 4). La clasificación más difundida en la práctica diaria es la que diferencia dos tipos de metaplasia intestinal: **metaplasia intestinal completa** y **metaplasia intestinal incompleta**. Esta terminología fue introducida por autores Japoneses en los años 70 del siglo pasado basándose en el perfil enzimático de las células metaplásicas. La metaplasia intestinal completa era aquella que expresaba la mayoría de las enzimas propias del epitelio mucoso del intestino delgado, mientras que en la metaplasia intestinal incompleta esas enzimas estaban ausentes o solo se expresaban en parte^{78,84}.

Otra de las clasificaciones más utilizadas, pero en investigación, es la que propusieron Filipe y Jass en 1986⁸³. Está basada en las características morfológicas y el tipo de secreción de mucinas identificadas mediante técnicas histoquímicas⁸⁶. La mucosa gástrica secreta habitualmente mucinas neutras mientras que la mucosa intestinal secreta mucinas ácidas de dos tipos: (1) sialomucinas, propias del intestino

delgado y grueso y (2) sulfomucinas, sólo en el intestino grueso. Las mucinas neutras se tiñen de rojo y las mucinas ácidas de tiñen de azul con el AA-PAS 2.5 (en inglés *alcian blue-periodic acid Schiff pH 2.5*). Con HID-AA 2.5 (en inglés *high iron diamine-alcian blue pH 2.5*) la mucina ácida sulfomucina se tiñe de marrón y las mucinas neutras y la mucina ácida sialomucina no se tiñen⁸⁷. Teniendo en cuenta esto Filipe y Jass distinguieron tres tipos de metaplasia intestinal: (1) el **tipo I**, aquella que secreta sialomucinas, propias de la mucosa del intestino delgado; (2) el **tipo II**, que secreta, a la vez, mucinas neutras y la mucina ácida sialomucina, propias de la mucosa gástrica y del intestino delgado respectivamente y (3) el **tipo III**, que expresa sulfomucina, mucina ácida propia de la mucosa del intestino grueso. El tipo I corresponde a la metaplasia intestinal completa y los tipos II y III a la metaplasia intestinal incompleta considerándose el tipo II como un paso intermedio entre el tipo I y el tipo III⁸³.

Tabla 4. Clasificaciones de la Metaplasia Intestinal⁸⁵

Kawachi 1974 ⁷⁸	Completa			Incompleta	
Teglbjaerg 1978 ⁷⁹	Tipo intestino delgado			Tipo colónico	
Jass 1979 ⁸⁶	Tipo I			Tipo IIA	Tipo IIB
Sipponen 1980 ⁸⁰	Tipo intestino delgado			MIs negativa	Mis positiva
Segura 1983 ⁸¹	MI ID-I	MI ID-II	MC colónica	MII sin sulfomucinas	MII con sulfomucinas
Filipe 1985 ⁸³	Tipo I			Tipo II	Tipo III
Baracchini 1990 ⁸²	MI de intestino delgado	MC colónica		MII de intestino delgado	MII colónica

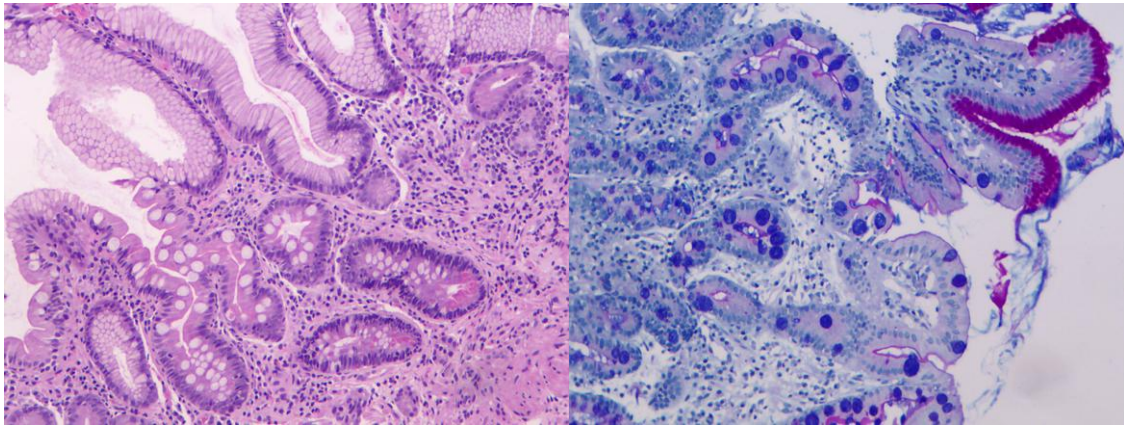
MI: Metaplasia intestinal; Mis: metaplasia intestinal sulfomucina; ID: intestino delgado; MC: metaplasia completa; MII: metaplasia intestinal incompleta

Conociendo que la mucosa gástrica normal se caracteriza por expresar los genes de las mucinas MUC1, MUC5AC y MUC6 y que la mucosa intestinal expresa MUC2 y MUC3⁸⁸, Reis *et al*⁸⁹ mediante la determinación inmunohistoquímica del tipo de mucinas, observaron que la metaplasia intestinal tipo I se caracterizaba por la

disminución o ausencia de expresión de las mucinas gástricas MUC1, MUC5AC y MUC6, y la expresión *de novo* de la mucina intestinal MUC2, mientras que la metaplasia intestinal tipo II y tipo III, coexpresaban las mucinas gástricas y las mucinas intestinales. Ante estos hallazgos, Reis *et al* pusieron en duda la secuencia clásica de evolución entre los distintos tipos de metaplasia intestinal considerando, que la pérdida de expresión de las mucinas gástricas en la metaplasia intestinal tipo I y la conservación de esta expresión por parte de la metaplasia intestinal tipo II y III hace probable que sean, o bien dos procesos de transformación divergentes desde su origen, o bien que la metaplasia intestinal tipo II sea el primer paso en la transformación metaplásica de la mucosa gástrica evolucionando al tipo I perdiendo la expresión de las mucinas gástricas o al tipo III al producirse una alteración en la síntesis de mucinas⁸⁹.

La **metaplasia intestinal completa** se caracteriza por la presencia de células caliciformes, enterocitos con borde en cepillo y células de Paneth. Las células caliciformes secretan sialomucinas propias del intestino delgado y se tiñen de azul con AA-PAS 2.5 y no se tiñen con HID 2.5. Desde el punto de vista inmunohistoquímico las células caliciformes pierden la expresión de MUC1, MUC5AC y MUC6 y expresan MUC2, adquiriendo el fenotipo propio de la mucosa del intestino delgado (Fig. 6 A y B).

La **metaplasia intestinal incompleta** se caracteriza por la presencia de células caliciformes con pequeñas vacuolas intracitoplasmáticas y células columnares. Tendría un aspecto parecido al colon. No se observan enterocitos con borde en cepillo ni células de Paneth. Las células caliciformes secretan mucinas ácidas: sialomucinas y sulfomucinas que se tiñen de azul con AA-PAS 2.5. Las células columnares secretan mucinas neutras y mucinas ácidas y se tiñen de rojo y azul respectivamente. Al secretar sulfomucinas se tiñen de marrón con HID 2.5. Desde el punto de vista inmunohistoquímico coexpresaría las mucinas propias de la mucosa gástrica, MUC1, MUC5AC y MUC6, además de MUC2 propia de la mucosa intestinal, adquiriendo un inmunofenotipo mixto (intestinal y gástrico) (Fig. 7 A, B, C y D).



A

B

Fig. 6 A y B. Metaplasia intestinal completa. (A) con la tinción de H&E se aprecian las *células de Paneth* en la base de las criptas además de las células caliciformes con vacuola intracitoplasmática única y los enterocitos con el ribete en cepillo. Con la tinción histoquímica de AAPAS 2.5 (B) la vacuola de las células caliciformes se tiñen de azul por contener mucinas acidas que contrasta con las de color rojo de las mucinas neutras propias de la mucosa gástrica. También se pone en evidencia el ribete en cepillo de los enterocito.

La metaplasia intestinal suele aparecer en la unión antro-cuerpo, a nivel de la *incisura angularis*, como focos que, con el tiempo, tienden a aumentar de tamaño, fusionarse y extenderse al antro, a la curvatura menor y al cuerpo. En el caso de los pacientes con anemia perniciosa, que se caracterizan por la existencia de atrofia limitada a la mucosa corporal gástrica, la metaplasia intestinal afectaría solo al cuerpo respetando al resto de la cavidad gástrica⁹⁰.

Aunque la metaplasia intestinal completa es más frecuente, a medida que los cambios metaplásicos se extienden, los dos tipos de metaplasia suelen coexistir pero, cuanto mayor sea la extensión de los cambios metaplásicos, la prevalencia de la metaplasia intestinal incompleta aumenta^{83,91}. Se considera extensa cuando afecta a varias regiones gástricas, es moderada o marcada en más de una muestra⁹² o cuando se observa un foco de metaplasia en una muestra muy escasa⁹¹. Se ha observado que la extensión de la metaplasia intestinal es un importante factor predictivo del riesgo de carcinoma gástrico^{83,90-93} por lo que algunos autores han establecido un sistema de estadificación histológico de las gastritis crónicas basado en la localización y el grado de la metaplasia intestinal, sin considerar el subtipo de metaplasia. Este nuevo sistema

de estadificación se denomina OLGIM (*operative link on gastric intestinal metaplasia assessment*)⁶⁹ en contrapartida al OLGA⁶³ (Tabla 5).

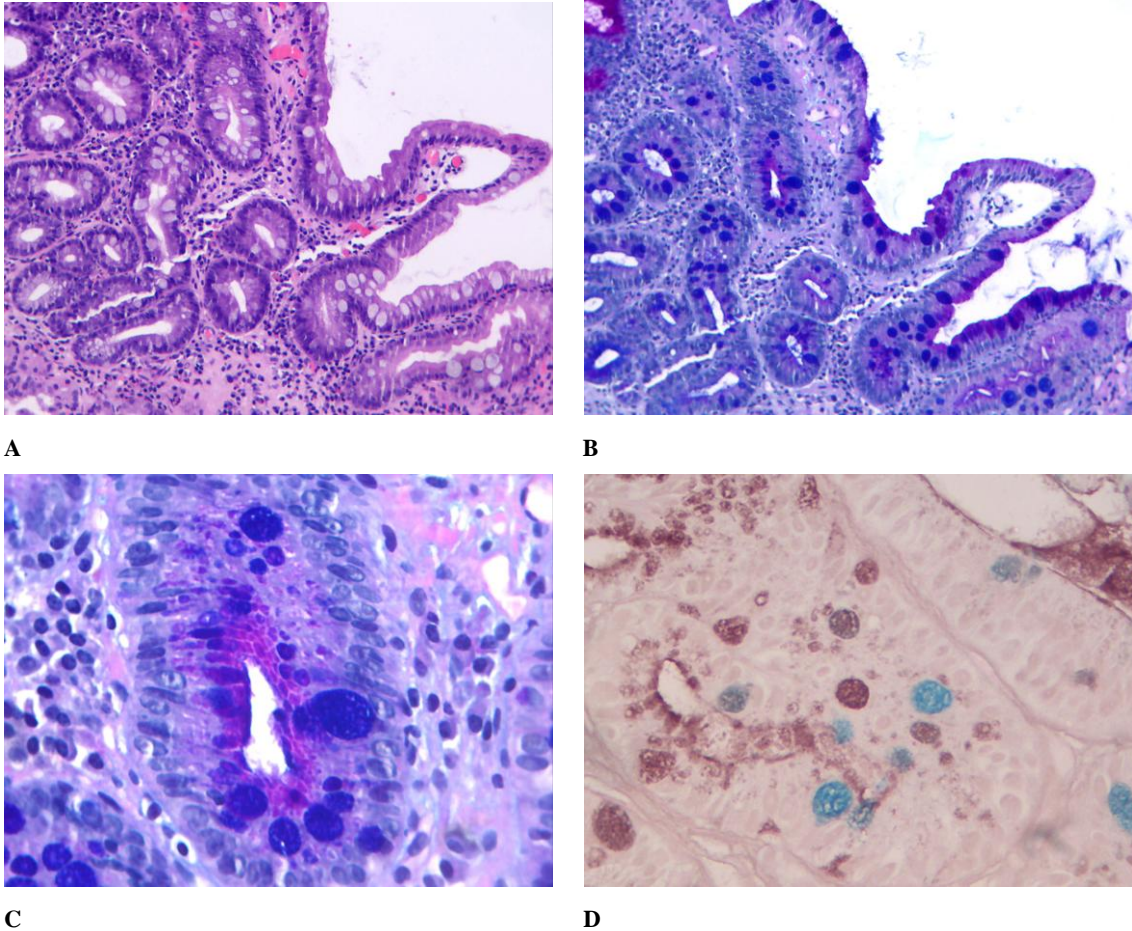


Fig. 7 A, B, C y D. Metaplasia intestinal incompleta. (A) Tinción H&E. Se caracteriza por la presencia de células caliciformes multivacuoladas, células columnares, ausencia de células de Paneth y enterocitos con rebite en cepillo. Las células caliciformes se tiñen de azul y las columnares de azul y rojo con la tinción AAPAS 2.5 (B y C) al contener sus vacuolas mucinas acidas y neutras. Las mucinas acidas corresponden a sialomucinas y sulfomucinas. Las sulfomucinas son típicas de la metaplasia intestinal incompleta se tiñen de marrón con HID 2.5 (D).

Teniendo en cuenta que la concordancia diagnóstica inter-observador para la metaplasia intestinal fue casi perfecta para estos autores, en comparación con la de la atrofia, consideran que el Sistema OLGIM es más adecuado que el Sistema OLGA para la identificación de pacientes con gastritis crónica de alto riesgo de evolución, siendo mucho más rentable a la hora del seguimiento porque define y delimita mejor los subgrupos en cada estadio⁶⁹. Un estudio de seguimiento⁹⁴ confirma estas observaciones

y pone de relevancia la importancia de la metaplasia intestinal como marcador para el seguimiento de los pacientes con gastritis crónica.

Tabla 5. Sistema OLGIM para la estadificación de la metaplasia intestinal⁶⁹.

		Cuerpo			
		No MI (Score 0)	MI leve (Score 1)	MI moderada (Score 2)	MI severa (Score 3)
Antro (incluido <i>incisura angularis</i>)	No MI (Score 0)	Estadio 0	Estadio I	Estadio II	Estadio II
	MI leve (Score 1)	Estadio I	Estadio I	Estadio II	Estadio III
	MI moderada (Score 2)	Estadio II	Estadio II	Estadio III	Estadio IV
	MI severa (Score 3)	Estadio III	Estadio III	Estadio IV	Estadio IV

MI: Metaplasia intestinal; OLGIM: *operative link on gastric intestinal metaplasia assessment*

Varios estudios^{80,83,84,86,95-109} han evidenciado la relación de la metaplasia intestinal incompleta con el carcinoma gástrico y su valor como marcador de riesgo de cáncer por lo que no solo la extensión sino además el subtipo de metaplasia intestinal podrían ayudar a identificar a los pacientes con mayor riesgo de evolución a cáncer gástrico^{87,110}.

3.2.1. Metaplasia pseudopilórica

La metaplasia pseudopilórica se produce en el cuerpo gástrico, fundus y en *la incisura angularis* cuando las glándulas oxínticas son sustituidas por glándulas mucosecretoras, parecidas a las de la mucosa antral, al ser destruidas las células parietales y principales por el proceso inflamatorio. La mucosa del cuerpo y de *la incisura angularis* adquiere un aspecto parecido al antro. La distinción entre mucosa antral y mucosa corporal o transicional con metaplasia pseudopilórica en una biopsia es difícil si la localización de la toma de la biopsia no está clara⁶¹. Suele asociarse a hiperplasia de las células endocrinas y a diferencia de las glándulas mucosecretoras de

la región antral las glándulas metaplásicas no contienen células G, secretoras de gastrina y secretan ambos tipos de pepsinógeno I y II⁵⁵.

Recientemente, se ha observado que en la mucosa corporal gástrica atrófica con metaplasia pseudopilórica se expresan altos niveles de un polipéptido espasmolítico, el TFF2 (*Trefoil factor family 2*) en la base de la unidad glandular cuando, normalmente, este polipéptido se expresa con niveles bajos en las células del cuello glandular¹¹¹. Esto ha dado pie a la definición de un nuevo patrón de metaplasia denominada metaplasia con expresión del polipéptido espasmolítico (SPEM en inglés *spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia*). En este tipo de metaplasia desaparecen las células parietales, las células principales desaparecen o se desdiferencian y la expresión de TFF2 se extiende desde el istmo a la base de la glándulas corporales metaplásicas¹¹¹. Este patrón de metaplasia comparte las características morfológicas de la metaplasia pseudopilórica, se asocia con la infección crónica por Hp y también con el adenocarcinoma gástrico por lo que podría representar otra vía carcinogénica gástrica⁷⁴.

3.3. Displasia epitelial

La displasia epitelial gástrica supone el penúltimo paso en la carcinogénesis gástrica y está asociada tanto al adenocarcinoma gástrico intramucoso como al adenocarcinoma invasivo, sobre todo al tipo intestinal¹¹². Autores japoneses como Nakamura a mediados de los años 60¹¹³ y Nagayo¹¹⁴ a principios de los años 70 del siglo pasado, ya consideraban determinadas lesiones con atipia epitelial precursoras del carcinoma gástrico, estableciendo unas de las primeras clasificaciones de la displasia (Tabla 6). Fue un patólogo alemán, Grundmann en 1975¹¹⁵, quien utilizó por primera vez el término de displasia para referirse a esas lesiones.

Los criterios histológicos que la definen, establecidos por la OMS en 1978 y recogidos por B.C. Morson⁵⁸, son tres: (1) alteraciones citológicas, (2) anomalías en la diferenciación y (3) distorsión arquitectural (Fig. 8). Se aplican tanto para el epitelio metaplásico como para el epitelio no metaplásico, así como para las lesiones planas como las polipoides. Inicialmente, en función de la severidad en que esas alteraciones se manifestaban la displasia se graduó en leve, moderada o severa⁵⁸:

- Las **alteraciones citológicas** corresponden a un aumento de la relación núcleo citoplasma, variabilidad en la talla y la forma nuclear, núcleos hipercromáticos, pérdida de la polaridad nuclear y pseudoestratificación nuclear.

- Las **anomalías en la diferenciación** consisten, en el caso del epitelio con metaplasia intestinal, en una pérdida o disminución de las células caliciformes, desaparición de células de Paneth y estratificación celular. En el caso de epitelio gástrico no metaplásico se observa una disminución de la secreción mucosa.

- La **distorsión arquitectural** se caracteriza por irregularidad y ramificación de las criptas, disminución del espacio interglándular, glándulas adosadas unas con otras, aparición de estructuras cribiformes y papilares debido a la proliferación celular intra o extra luminal.

Tabla 6. Clasificación japonesa de la displasia gástrica^{114,116}

Categoría	Definición	Descripción histológica
Grupo I	Mucosa normal y lesiones benignas sin atipia	Incluye: metaplasia intestinal, hiperplasia epitelial, regeneración epitelial
Grupo II	Lesiones benignas, no neoplásicas, con atipia	1. Mucosa gástrica metaplásica y no metaplásica con atipia arquitectural frecuentemente asociado a inflamación 2. Pólipos hiperplásicos con atipia producida por erosión
Grupo III	Lesiones <i>bordeline</i> entre benignas y malignas	Lesiones con atipia arquitectural y citológica. Se aplica frecuentemente a lesiones adenomatosas y a lesiones difíciles de clasificar como benignas (no neoplásicas) o malignas
Grupo IV	Lesiones con alta sospecha de carcinoma	Lesiones sospechosas de malignidad
Grupo V	Carcinoma	Adenocarcinoma

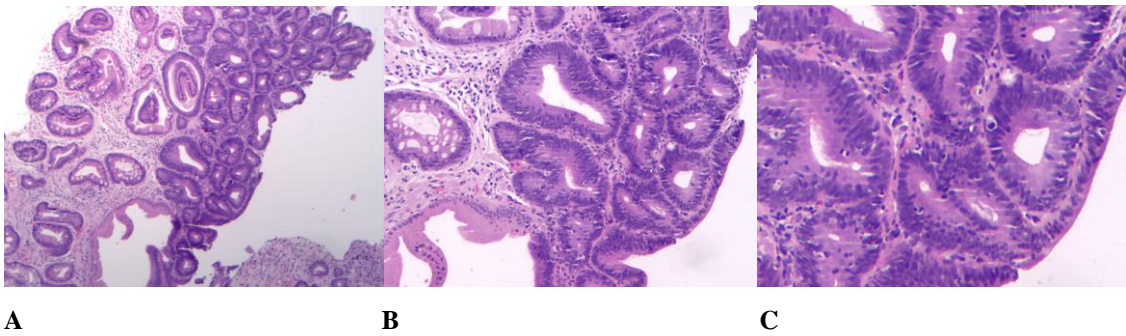


Fig. 8. Displasia epitelial gástrica. H&E. (A) Distorsión arquitectural. (B) Pérdida de la secreción. (C) Pseudoestratificación nuclear.

A pesar de los criterios definidos, existe un factor subjetivo que provoca una gran variabilidad intra- e inter-observador a la hora de su valoración¹¹⁷. La aplicación de los criterios es diferente entre los patólogos occidentales y los patólogos japoneses. Algunas lesiones que los patólogos japoneses llaman carcinoma gástrico los patólogos occidentales las consideran displasias gástricas¹¹⁸. Incluso la nomenclatura es diferente en las dos partes de mundo. Todo esto ha dado pie a la existencia de distintas clasificaciones (Tabla 7), lo que ha causado problemas a la hora de interpretar los datos de los trabajos de investigación sobre cáncer gástrico y ha dificultado la creación de protocolos clínicos para el manejo de estas lesiones¹¹⁹.

Por esta razón en abril de 1998 un grupo internacional de patólogos europeos, japoneses y norteamericanos, reunidos en la ciudad italiana de Padova, propusieron una nueva clasificación¹¹⁶, adoptada por la OMS meses después, que se conoce como Clasificación Internacional de Padova. Esta clasificación reemplaza el término de displasia por el de neoplasia no invasiva (NNi), porque los cambios histológicos y las alteraciones moleculares que subyacen, se parecen al carcinoma gástrico, diferenciándose de él en la falta de invasión. Se aplica tanto a las lesiones planas como a las polipoides. En ambos casos, gradúa la displasia en dos escalas: NNi de bajo grado y NNi de alto grado.

Tabla 7. Comparación de los diferentes sistemas de graduación de la Displasia gástrica

Nakamura 1866 Nagayo 1971 ^{113,114}	Lesión benigna con Atipia ligera	Lesiones <i>bordeline</i>	Probable carcinoma	Carcinoma
Grundmann 1975 ¹¹⁵	Displasia bajo grado		Displasia de alto grado	
Oehlert 1979 ¹²⁰	Grado I	Grado II	Grado III	
Ming 1979 ¹²¹	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Cuello et al 1979 ¹²²	Displasia hiperplasia Leve severa		Displasia adenomatosa Leve severa	
OMS 1979 ⁵⁸	Cambios regenerativos	Displasia leve	Displasia moderada	Displasia severa
ISGGC 1982 ¹²¹	Hiperplasia regenerativa Simple Atípica		Displasia Moderada severa	
Padova ¹¹⁶ Viena ^{119,123}	Negativo NNI	Indefinido	NNi bajo grado	NNi Alto grado
OMS 2009 ¹²⁴		Indefinido para NI	NI Bajo grado	NI Alto grado

NNi: Neoplasia no invasiva; NI: Neoplasia intraepitelial

Tabla basada en Goldstein *et al.*¹²⁵

La **NNi de bajo grado** se caracteriza por estructuras glandulares múltiples pequeñas y redondeadas constituidas por epitelio de células con núcleos aumentados de tamaño, alargados en forma de cigarro puro, hipercromáticos y pseudoestratificados. La secreción de las células caliciformes disminuye. Aumenta el número de mitosis y se observan en cualquier nivel de la unidad glandular. Las células atípicas alcanzan la superficie epitelial.

En la **NNi de alto grado** los túbulos glandulares son irregulares y se ramifican con frecuencia. Existe una pérdida de la polaridad celular. Se observa una marcada variabilidad en la forma y en talla nuclear. El contorno nuclear es irregular presenta nucléolos prominentes. La secreción de las células caliciformes desaparece. El número de mitosis aumenta y aparecen figuras de mitosis atípicas.

La clasificación de Padova establece distintas categorías diagnósticas con el fin de ayudar en el manejo clínico de estas lesiones. En cada categoría se incluyen aquellas entidades histológicas que requieren la misma actuación clínica (Tabla 8). Describe 5 categorías basándose en la clasificación de la Sociedad Japonesa de Investigación para el Cáncer Gástrico de 1971^{114,116} (Tabla 6), por dos razones una porque en Japón constituía un buen sistema de comunicación entre patólogos y clínicos y dos porque de esta manera, ambas clasificaciones se podían comparar¹¹⁶. La displasia, ahora como NNi, representa la categoría 3 que incluye la NNi de bajo grado y la NNi de alto grado. La sospecha de carcinoma *in situ* y el carcinoma *in situ* se integran dentro de la subcategoría NNi de alto grado.

Tabla 8. Clasificación internacional de Padova de la displasia gástrica (NNi)¹¹⁶

-
- 1. Negativo para NNi**
 - 1.0 Normal
 - 1.1 Hiperplasia foveolar reactiva
 - 1.2 Metaplasia intestinal
 - 1.2.1 Metaplasia intestinal completa
 - 1.2.2 Metaplasia intestinal incompleta
 - 2. Indefinido para displasia**
 - 2.1 Hiperproliferación foveolar
 - 2.2 Metaplasia intestinal hiperproliferativa
 - 3. NNi (plana y polipoide)**
 - 3.1 Bajo grado
 - 3.2 Alto grado
 - 3.2.1 sospecha de carcinoma *in situ*.
 - 3.2.2 carcinoma *in situ*
 - 4. Sospecha de carcinoma invasivo**
 - 5. Adenocarcinoma invasivo**
-

NNi: Neoplasia no invasiva

Padova define dos nuevas categorías: la categoría 2, “indefinida para displasia”, donde se incluyen todas aquellas lesiones en las que los patólogos no puede discriminar con seguridad si es displásica o no, debido a que la muestra recibida como biopsia es insuficiente o porque las alteraciones arquitecturales y la atipia celular es tan intensa que genera dudas sobre su naturaleza reactiva. En esta categoría se integran lesiones como la metaplasia intestinal hiperproliferativa y la hiperplasia foveolar atípica; y la

categoría 4, denominada “sospechosa de carcinoma invasivo”. En esta categoría se incluyen aquellas lesiones claramente neoplásicas pero que en la muestra no se puede identificar claramente si existe invasión.

En la categoría 1 se incluyen las lesiones en las que no existe displasia epitelial tales como: la mucosa normal, la hiperplasia foveolar reactiva y la metaplasia intestinal. La hiperplasia foveolar reactiva supone una reacción reparativa de la mucosa dañada y las alteraciones pueden ser muy prominentes y similares a los cambios displásicos pero carecen de significado preneoplásico. La categoría 5 corresponde al adenocarcinoma gástrico invasivo tanto el intramucoso como submucoso.

La clasificación de Padova presenta una buena reproductibilidad y una mínima variabilidad inter-observador entre los patólogos con experiencia en enfermedades gastrointestinales.^{116,117} Además sirvió para unificar la nomenclatura. Unos meses después de la clasificación propuesta en Padova, en septiembre de 1998 se reunieron en Viena treinta y un patólogos de doce países, incluyendo siete del grupo de Padova, y se propuso una nueva clasificación de la NNI gástrica, que evolucionó a partir de los debates en Padova. Se denominó “Clasificación de Viena”¹¹⁹. Esta clasificación y su revisión posterior¹²³ es la más utilizada actualmente (Tabla 9).

Igual que en la de Padova¹¹⁶, define 5 categorías, mantiene la denominación de NNI para referirse a la displasia y la gradúa en dos escalas: de bajo grado y de alto grado. A diferencia de la de Padova, la NNI de alto grado corresponde a la categoría 4 donde se incluyen: la displasia de alto grado, el carcinoma *in situ* y el carcinoma con sospecha de invasión. Las demás categorías se mantienen. Forman parte de la categoría 5 (neoplasia invasiva), el carcinoma intramucoso y el carcinoma submucoso¹¹⁹. En la revisión posterior de la clasificación de Viena¹²³ el carcinoma intramucoso pasa a la categoría de NNI de alto grado (categoría 4) y en la categoría 5 (Neoplasia invasiva) solo se incluye el carcinoma invasivo a partir de la submucosa.

La clasificación de Viena revisada¹²³ tiene una limitación. Al establecer categorías diagnósticas orientadas al manejo clínico, se incluyen en la misma categoría lesiones biológicamente diferentes como en el caso de la categoría 4 (NNi de alto grado) donde el carcinoma intramucoso, ya invasivo aunque afectando solo a la lámina propia

de la mucosa gástrica y por lo tanto con capacidad metastásica, se incluye con la displasia de alto grado y el carcinoma in situ, dos lesiones que por definición no son invasivas y no tienen capacidad de metastatizar. Sin embargo el manejo clínico de estas lesiones es el mismo¹¹⁷ (Tabla 10).

Tabla 9. Clasificación de Viena original y modificada de la neoplasia no invasiva^{119,123}

Clasificación de Viena	Clasificación de Viena modificada
Categoría 1 Negativo para NNI	Negativo para NNI
Categoría 2 Indefinido para NNI	Indefinido para NNI
Categoría 3 NNI de bajo grado	NNi de bajo grado
Categoría 4 NNI de alto grado	NNi de alto grado
4.1 Displasia de alto grado	4.1 Displasia de alto grado
4.2 Carcinoma in situ	4.2 Carcinoma in situ
4.3 Sospecha de carcinoma invasivo	4.3 Sospecha de carcinoma invasivo
	4.4 carcinoma intramucoso
Categoría 5 Neoplasia invasiva	Carcinoma con infiltración submucosa o más allá
5.1 Carcinoma intramucoso	
5.2 Carcinoma con infiltración submucosa o más allá	

NNI: Neoplasia no invasiva

La nueva clasificación de Viena parece práctica y ha contribuido a resolver las discrepancias entre patólogos occidentales y japoneses. También debería contribuir a mejorar la comunicación entre patólogos y clínicos y ayudar a comprender mejor los datos de los trabajos de investigación en los campos de la gastroenterología, la epidemiología y la biología molecular¹¹⁹.

En el 2009 la OMS¹²⁴ modifica la nomenclatura de la displasia y la denomina Neoplasia Intraepitelial y mantiene las 3 categorías diagnósticas propuestas en la clasificación del 2000 por su fácil manejo en la práctica diaria¹¹⁷: negativo para neoplasia intraepitelial, indefinido para neoplasia intraepitelial y neoplasia intraepitelial de bajo y alto grado.

Tabla 10. Manejo clínico de las distintas categorías diagnósticas de la displasia gástrica según clasificación de Viena original y modificada (Neoplasia no invasiva)^{119,123}

Categoría	Diagnóstico	Manejo Clínico
1	Negativo para NNI	Seguimiento opcional
2	Indefinido para NNI	Seguimiento
3	NNi de bajo grado	Resección endoscópica o seguimiento
4	NNi de alto grado 4.1 NNI de alto grado 4.2 Carcinoma in situ 4.3 Sospecha de carcinoma invasivo 4.4 carcinoma intramucoso	Resección endoscópica o quirúrgica local
5	Neoplasia invasiva	Resección quirúrgica

NNI: Neoplasia no invasiva

4. Alteraciones Moleculares en las Lesiones Precursoras de Cáncer Gástrico.

En la base de estas lesiones morfológicas se encuentran toda una serie de alteraciones moleculares relacionadas con la carcinogénesis gástrica. Dos mecanismos están implicados en dichas alteraciones moleculares: genéticos y epigenéticos. Los genéticos provocan cambios en la secuencia del ADN, mientras que los epigenéticos no, de tal manera que, los genéticos son, hasta la fecha, irreversibles mientras que los epigenéticos son potencialmente reversibles si se elimina el agente toxico o se utilizan distintas medidas terapéuticas⁶².

Entre las alteraciones genéticas, las más estudiadas en carcinogénesis gástrica han sido la inestabilidad de los microsatélites (MSI siglas en inglés de *microsatellite instability*), la pérdida de la heterozigosidad (LOH siglas en inglés de *loss of heterozygosity*) y la detección de mutaciones puntuales¹²⁶. El mecanismo epigenético más implicado en la carcinogénesis gástrica es la metilación aberrante del ADN^{127,128}. Estas alteraciones pueden afectar a oncogenes, genes supresores de tumores, genes relacionados con la reparación del ADN, a la actividad de la telomerasa, a los

reguladores del ciclo celular, a factores de crecimiento y a moléculas de adhesión celular. La mayoría de las alteraciones moleculares observadas en las LPCG se han descrito previamente en el cáncer gástrico¹²⁶.

En la metaplasia intestinal se ha detectado MSI en los pacientes con cáncer y sin cáncer considerándose como la alteración molecular más temprana en el proceso de carcinogénesis¹²⁹⁻¹³¹. Se han detectado aumento de la actividad de la telomerasa¹³², LHO en el gen de la Poliposis Colónica Adenomatosa¹³³ y mutaciones puntuales en p53¹³⁴⁻¹³⁶, sobre todo en la metaplasia intestinal incompleta. Se han encontrado alteraciones en la transcripción de una importante molécula relacionada con la adhesión celular el CD44¹³⁷. También se ha observado la sobreexpresión de cicloóxigenasa 2 (COX-2)¹³⁸ y de la ciclina D2 así como, la disminución de la expresión de p27¹³⁹, moléculas relacionadas con el ciclo celular. También la expresión *de novo* del gen *MUC2*^{88,89,140} y *CDX2*¹⁴¹ propios de la mucosa intestinal normal.

En el caso de la displasia gástrica, tanto plana como en los adenomas, se ha encontrado LHO del gen de la Poliposis Colónica Adenomatosa¹³³, mutaciones en p53^{134,135} y la sobreexpresión del antígeno carcinoembrionario (CEA en inglés *carcinoembryonic antigen*), p21ras (ciclina relacionada con el ciclo celular) y bcl2 (inhibidor de la apoptosis celular)^{142,143}.

Se ha descrito la alteración de la metilación del ADN en múltiples genes como los relacionados con el sistema de reparación de ADN, el gen de la Poliposis Colónica Adenomatosa, COX-2, E-cadherina, p16, p14 y pS2 en relación con las LPCG y se ha observado que la metilación aberrante de los genes es un defecto acumulativo a medida que progresan las lesiones¹⁴⁴⁻¹⁴⁶.

Se ha encontrado sobreexpresión de oncogenes como c-met, K-sam y c-erb2 (factores de crecimiento) en los carcinomas gástricos pero hay poca información disponible de estas alteraciones en las lesiones precursoras¹¹⁷.

A pesar de los cambios moleculares descritos en las LPCG la relación con su progresión no está demostrada¹⁴⁷. Sus perfiles moleculares son muy variables debido a las características biológicas de las lesiones *per se*, los diferentes abordajes

metodológicos en biología molecular y los diferentes criterios de clasificación de estas lesiones. Además, los hallazgos están basados en el análisis de pocos casos. Por tanto, todavía no se dispone de ningún marcador molecular útil en la práctica clínica que permita el tratamiento o pronostique la evolución de las lesiones a cáncer gástrico¹¹⁷.

5. Historia Natural de las Lesiones Precursoras de Cáncer Gástrico

Tras el desarrollo del modelo de carcinogénesis gástrica por Pelayo Correa^{23,25,60} se acepta que las lesiones siguen la siguiente evolución: gastritis crónica no atrófica – gastritis crónica atrófica no metaplásica – metaplasia intestinal completa – metaplasia intestinal incompleta – displasia y finalmente carcinoma gástrico.

Muchos estudios han investigado la tasas de progresión a carcinoma gástrico de cada una de la lesiones pero mientras que las tasas son relativamente estables para la atrofia gástrica (0%-1'8% por año), para la metaplasia intestinal y la displasia existen mucha variación (0%-10% por año para la metaplasia intestinal, y 0%-73% por año para la displasia). Estas variaciones son debidas a diferencias en el diseño del estudio, las poblaciones incluidas, la clasificación de las lesiones utilizada y los distintos métodos de toma de biopsias¹⁴⁸. En general las lesiones tienden a aumentar en intensidad y extensión con el tiempo, aunque no en todos los casos ni con la misma velocidad debido a múltiples factores²⁶.

6. Factores Relacionados con la Evolución de las Lesiones Precursoras de Cáncer Gástrico

La iniciación y la progresión de las LPCG van a depender de la interacción de múltiples factores relacionados con: la virulencia del Hp, factores medioambientales y la susceptibilidad genética del huésped.

6.1. Factores relacionados con la virulencia del *Helicobacter pylori*

El Hp es una bacteria perteneciente al orden: *Campylobacterales* familia: *Spirillaceae*, género: *Helicobacter*, especie: *pylori*. Es un bacilo Gram negativo, con forma de espiral, microaerófilo y móvil por presentar flagelos en uno de sus polos. Coloniza la mucosa gástrica humana de forma eficaz. Se transmite de persona a persona por vía oro-fecal y oro-oral^{30,149}. La morfología en espiral del bacilo es más evidente en fresco, sin embargo en los medios de cultivo son bacilos más rectos en forma de coma o de S. Se han descrito formas cocoides relacionadas con medios poco favorables para su crecimiento considerándose formas de resistencia o bacterias muertas^{150,151} (Fig. 9, 10A y 10B).

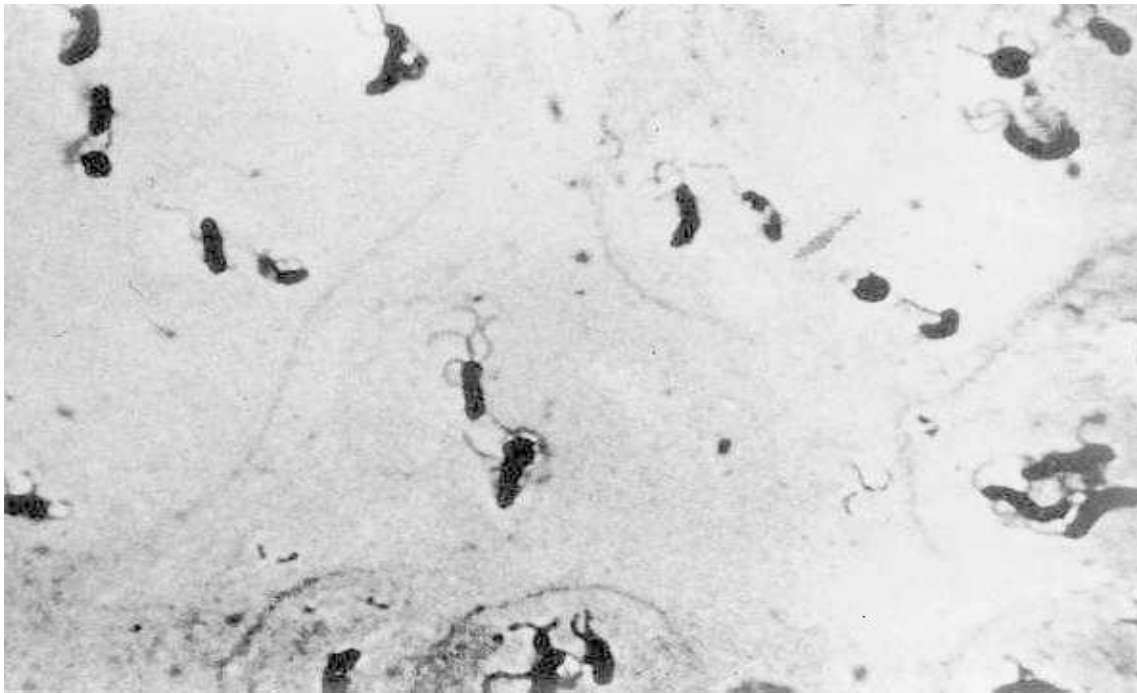


Fig. 9. *Helicobacter pylori* tras cultivo (x1000). Se observa su forma en S o en coma con los flagelos y las formas cocoides redondeadas¹⁵¹.

La infección por Hp afecta a nuestra especie en todo el planeta y su prevalencia varía en las diferentes regiones del mundo en función de dos factores: el nivel de desarrollo económico y las medidas higiénico-sanitarias. En general, la infección se adquiere durante la infancia y la prevalencia aumenta gradualmente hasta alcanzar un

máximo en la edad adulta. Se estima que la prevalencia de la infección en los adultos de edad media es del 74 % en los países en desarrollo y el 58% en los países desarrollados¹⁵².

Una de las características del Hp es su variabilidad genética debida a la capacidad para mutar y recombinar su ADN. Esto permite su adaptación a diferentes condiciones ambientales, la eliminación de mutaciones aberrantes y la existencia de diferentes cepas con distinta capacidad patogénica entre la población e incluso dentro de cada individuo infectado¹⁵³⁻¹⁵⁵. Ya se conoce la secuencia genómica completa de al menos tres cepas de Hp¹⁵⁶⁻¹⁵⁸ pudiéndose estudiar genes específicos que codifican determinados factores de virulencia relacionados con su capacidad para producir distintas enfermedades.

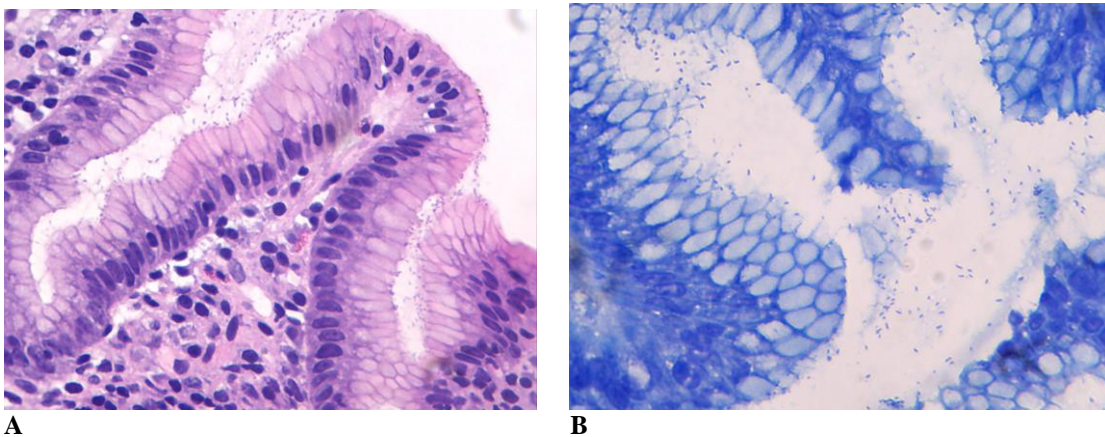


Fig. 10. *Helicobacter Pylori* en mucosa gástrica tras una biopsia (A) H&E y (B) tinción de Giemsa

El Hp es la principal causa reconocida de gastritis, úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico y algunos tipos de linfoma gástrico. Independientemente de que otros factores puedan modular el riesgo de desarrollo de enfermedades gástricas, el genotipo de la cepa infectante es un factor determinante para la evolución de las lesiones precursoras de cáncer gástrico debido a sus múltiples factores de virulencia¹⁵⁵.

6.1.1. La Ureasa

La Ureasa es una enzima producida por todas las cepas de Hp. Su función es la de catalizar la hidrólisis de la urea presente en el estómago produciéndose amonio (NH_4^+) y dióxido de carbono (CO_2). El catión amonio neutraliza el ácido gástrico aumentando el pH lo que permite a la bacteria sobrevivir en la inhóspita acidez de la cavidad gástrica. La actividad de esta enzima está regulada por un transportador de urea pH dependiente denominado UreI, que permite la entrada de urea a pH bajos y se cierra a pH neutros permitiendo a la bacteria controlar los niveles de pH en su entorno¹⁵⁹.

La ureasa es un factor muy importante para la colonización de la mucosa gástrica por parte de la bacteria. Se ha comprobado en modelos animales^{160,161} que cepas mutadas (ureasa-negativas) pierden la capacidad de colonización y su supervivencia disminuye. Además, la ureasa induce la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de la célula epitelial gástrica y de los macrófagos¹⁶² favoreciendo la reacción inflamatoria.

6.1.2. Los Flagelos

El Hp posee de 2 a 6 flagelos monopolares que le otorgan gran movilidad, potenciada por su forma en espiral. Esto le permite atravesar la capa de moco protectora de la mucosa gástrica, contrarrestar el peristaltismo gástrico y alcanzar la superficie epitelial. Cada flagelo está constituido por dos proteínas llamadas flagelinas: la FlaA, que constituye el cuerpo del flagelo y la FlaB, localizada en la porción proximal. Están codificadas por los genes *flaA* y *flaB*¹⁶³. Ambas son fundamentales para mantener la integridad de los flagelos y preservar su función¹⁶⁴ de tal manera que la falta de alguna de ellas comprometería la movilidad de la bacteria y su capacidad de colonización.

6.1.3. Lipopolisacáridos.

Los lipopolisacáridos (LPS) son moléculas complejas formadas por la unión de ácidos grasos con polisacáridos. Constituyen uno de los componentes principales de la membrana celular bacteriana. Consta de tres dominios: el lípido A, que es la endotoxina bacteriana, el oligosacárido nuclear o “core”, y el polisacárido O, que es el antígeno

bacteriano. Para evitar ser reconocido por los efectores inflamatorios y de esa manera protegerse del daño provocado por la reacción inflamatoria del huésped, algunas cepas de Hp pueden expresar antígenos del sistema sanguíneo de grupo Lewis, propios de la célula del huésped, y presentarlos en su cadena O^{165,166}. Al presentar antígenos comunes a la célula del huésped puede eludir la respuesta inflamatoria o estimularla en menor intensidad y de esa manera favorecer la colonización y la persistencia bacteriana en la mucosa gástrica¹⁶⁷. Las cepas que carecen del antígeno O tienen una menor capacidad de colonización de la mucosa gástrica¹⁶⁸.

6.1.4. Factores de adhesión

La adhesión de la bacteria a la superficie epitelial se realiza gracias a numerosas proteínas de membrana externa (OMPs en inglés *outer membrane proteins*) entre las que se incluyen las adhesinas (BabA, SabA, opiA, HopZ, AlpA/B, HorB). Las adhesinas mediante la unión a receptores específicos de la célula epitelial gástrica facilitan la colonización y activan la respuesta inflamatoria del huésped^{169,170}. La mejor caracterizada ha sido la adhesina BabA (*blood antigen binding adhesión*), codificada por gen *babA* del que se han descrito 2 alelos: *babA1* y *babA2*. Solo es funcional el gen *babA2* con capacidad para codificar la proteína BadA2. El gen *babA1* no tiene la capacidad de transcripción por lo que no es funcional. La proteína BadA2 se une al antígeno del grupo sanguíneo Lewis B (Le^b) de las células epiteliales gástricas del huésped favoreciendo la adhesión de la bacteria al epitelio del estómago. Las cepas de Hp positivas para BabA2 muestran una mayor densidad de colonización, potencian la actividad de otros factores de virulencia como *cagA* (*cytotoxin associated gene A*) y favorecen la respuesta inflamatoria¹⁷¹⁻¹⁷³.

Desde el punto de vista clínico las cepas positivas para BabA2 y además positivas para *vacAs1* (*vacuolating cytotoxin A s1*) y *cagA* se han detectado en pacientes con lesiones histológicas gástricas severas tanto inflamatorias, atróficas como metaplásicas¹⁷⁴. Estas cepas triples positivas se relacionan significativamente con un aumento de la prevalencia de la úlcera gástrica y del adenocarcinoma gástrico distal¹⁷⁵.

6.1.5. Sistemas antioxidantes

La colonización de la mucosa gástrica por el Hp provoca una reacción inflamatoria del huésped que da lugar a una gran producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS y RNS en inglés *reactive oxygen species* y *reactive nitrogen species*). Son moléculas muy inestables y altamente reactivas, capaces de provocar daños celulares, alteraciones en el ADN y oxidación de los ácidos grasos y de las proteínas, no solo en las células del huésped, sino también en los microorganismos. El Hp cuenta con mecanismos para paliar el stress oxidativo al poseer enzimas antioxidantes, sistemas de reparación del daño celular y mecanismos para impedir la generación ROS y RNS.

Como mecanismos de prevención de la generación de ROS y RNS, el Hp es capaz de producir arginasa y de inducir la secreción de arginasa por los macrófagos agotándose la arginina dentro de los fagocitos. La arginina es necesaria para la síntesis de la enzima óxido nítrico sintetasa, enzima responsable de la generación de óxido nítrico. Al agotarse la arginina, disminuye la síntesis del óxido nítrico entonces, la producción del peróxido de nitrógeno a partir de la reacción entre el óxido nítrico y el superóxido, se bloquea¹⁷⁶.

Entre las enzimas antioxidantes, el Hp es capaz de sintetizar: la superóxido dismutasa, que cataliza la conversión del superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrogeno (H_2O_2); la catalasa, que complementa la acción de la enzima superóxido dismutasa al transformar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, paso final en la neutralización de los ROS; el Tiol peroxidasa y otras peroxirredoxinas (Prxs), que catalizan la reducción de una amplia gama de peróxidos.

Otras enzimas bacterianas con potencial antioxidante son: la NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) es una quinona reductasa también llamada MdaB, que impide la producción de superóxido al reducir los quinones (metabolitos generados en la respiración bacteriana), que parece actuar cuando otros mecanismos antioxidantes bacterianos se agotan; y la enzima activadora de neutrófilos (NapA en inglés *neutrophil activating protein A*), que juega un papel en la protección frente al stress oxidativo al ayudar a prevenir la producción de superóxidos capturando los iones

de hierro intracitoplásmicos dañinos para la bacteria y al unirse con gran afinidad al ADN bacteriano protegiéndole. También otorgan una mayor capacidad para resistir el stress oxidativo: proteasas como la serina peptidasa HtrA (en inglés *High temperature requirement A*) y la proteasa caseinolítica dependiente de ATP (Clp en inglés *Caseinolytic protease p*)¹⁷⁶.

Una vez sufrido el daño, la bacteria tiene enzimas reparadoras de ADN como MutS, MutY y la Endonucleasa III (EndoIII), muy importantes para el reajuste de bases y la eliminación de mutágenos provocados por el stress oxidativo. Todas estas medidas para evitar el daño provocado por el stress oxidativo son mecanismos interdependientes y cualquier deficiencia en el sistema antioxidante es suficiente para causar la debilitación del Hp y disminuir su capacidad de supervivencia y su persistencia¹⁷⁶.

6.1.6. Citotoxina vacuolizante A

La citotoxina vacuolizante A (*vacA* en inglés *vacuolating cytotoxin A*) es una proteína hexamérica sintetizada por el Hp con capacidad para producir un daño directo en la célula epitelial gástrica¹⁷⁷. Mediante diferentes mecanismos, la citotoxina es capaz de producir la vacuolización de la célula epitelial alterando las funciones celulares, provocando la apoptosis celular y modificando la respuesta inflamatoria del huésped^{177,178}.

Está codificada por el gen *vacA* que presenta tres regiones polimórficas: la región s, que codifica el péptido señal con dos alelos s1 y s2; la región m, media, con los alelos m1 y m2¹⁷⁹; y la región i, intermedia, localizada entre las dos anteriores, con otros dos alelos i1 e i2¹⁸⁰. Recientemente se ha identificado una delección de 81 pares de bases entre la región i y la región m que se ha denominado región d, considerándose como cepas d1 aquellas que no poseen la delección y cepas d2 aquellas que la presentan¹⁸¹.

El gen *vacA* está presente en todas las cepas de Hp y la combinación entre los diferentes alelos condiciona la intensidad de la actividad de la citotoxina y por lo tanto la capacidad patogénica de las cepas¹⁷⁹. En general las cepas con genotipos s1, m1, i1 y d1 y su combinación se consideran las más citotóxicas y se asocian con las lesiones precursoras y el cáncer gástrico^{177,178,181,182}.

6.1.7. La isla de patogenicidad cag y citotoxina asociada al gen A

Las islas de patogenicidad (PAI en inglés *pathogenicity island*) son segmentos de ADN que contiene varios genes que codifican distintos factores de virulencia. En el caso del Hp la isla de patogenicidad cag (cagPAI en inglés *cag pathogenicity island*), contiene los genes que codifican la citotoxina asociada al gen A (cagA) y el sistema de secreción tipo IV (T4SS) usado para inyectar en el interior de la célula epitelial del huésped la oncoproteína cagA y el péptidoglicano^{155,178}.

En la actualidad cagPAI es el factor de virulencia mejor caracterizado y la oncoproteína cagA se utiliza como indicador de su presencia¹⁷⁸. Al contrario que el gen *vacA*, no todas las cepas de Hp contiene en su genoma esta estructura por lo tanto no todas expresan la proteína cagA. Las cepas que portan en su genoma cagPAI se clasifican como cepas tipo I y al expresar la oncoproteína cagA se denominan cagA-positivas.

La oncoproteína cagA fue el primer antígeno del Hp que se asoció a la patología gástrica. Su gen fue clonado y secuenciado por primera vez en 1993^{183,184}. Es una proteína hidrosoluble que se caracteriza por presentar una secuencia repetida de aminoácidos en su extremo carboxi-terminal (C-terminal) donde se produce su fosforilación dentro de la célula huésped. Esta secuencia es Glutamato-Prolina-Isoleucina-tirosina-alanina (GLU-PRO-ILE-TYR-ALA) y se denomina EPIYA. En función de la secuencia de aminoácidos que flanquean a EPIYA se definen cuatro EPIYA diferentes: EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C y EPIYA-D. La gran variación del número de sitios de fosforilación de la proteína genera diferencias en la capacidad patogénica de las cepas. EPIYA-A y EPIYA-B son comunes en la oncoproteína de todas las cepas. EPIYA-C (EPIYA ABC) es característico de las cepas de Hp cagA-positivas de los países occidentales (Europa, América del Norte y Australia) y se denomina "CagA occidental". EPIYA-D (EPIYA ABD) es específico del cagA producida por las cepas de los países asiáticos y se denomina "CagA asiático". Las cepas CagA EPIYA-ABD (cepas asiáticas) tienen una mayor fosforilación y mayor potencial oncogénico que las cepas CagA EPIYA-ABC (cepas occidentales)^{155,173,178}.

La oncoproteína cagA introducida en la célula epitelial gástrica puede ser fosforilada por quinasas propias de la célula huésped. Tanto en su forma fosforilada

como en la no fosforilada puede interactuar con múltiples efectores intercelulares entre ellos la fosfatasa SHP-2 y la beta-catenina. Estos efectores están relacionados con el mantenimiento de la morfología celular y con los sistemas de unión y de adhesión intercelulares. Al interactuar con la oncoproteína el funcionamiento de los efectores se altera produciéndose cambios en la forma y en la polaridad celular, lo que da lugar a la pérdida de la función de barrera y a alteraciones de los mecanismos de transporte y señalización de la célula huésped. La oncoproteína bacteriana también induce la expresión de interleuquina 8 (IL-8) en las células epiteliales. La IL-8 es un potente activador de neutrófilos. Mediante este mecanismo el Hp contribuye al mantenimiento del proceso inflamatorio¹⁷⁸.

La infección por cepas que presentan el gen *cagPAI* es decir, cepas *cagA*-positivas, se asocian a un mayor riesgo de padecer úlcera péptica, gastritis atrófica, metaplasia intestinal y carcinoma gástrico^{155,173,178,182}.

6.1.8. Péptidoglicano

El Péptidoglicano es una macromolécula que contribuye a la estructura principal de la capa externa de las bacterias dándole forma y otorgándole resistencia a la ruptura. En las cepas *cagA*-positivas el péptidoglicano es inoculado en la célula epitelial gástrica por el sistema de secreción tipo IV y una vez en el interior celular, tras interactuar con el receptor de la célula gástrica para esta molécula Nod1, activa la respuesta inflamatoria¹⁸⁵ favoreciendo la secreción de IL8. También pone en marcha otras vías de señalización relacionadas con el aumento de la secreción de interferón tipo I¹⁸⁶ y con la disminución de la apoptosis y la migración celular¹⁸⁷, circunstancias que favorecen el desarrollo de carcinoma gástrico.

6.2. Factores medioambientales y estilo de vida

Los factores medioambientales y el estilo de vida se consideran mediadores en el proceso de evolución de las LPCG debido a la variación de la incidencia observada en función de las distintas zonas geográficas, los hábitos alimentarios y las condiciones higiénico-sanitarias de la población¹⁸⁸.

La dieta juega un papel importante en el desarrollo y la evolución de las LPCG. Estudios epidemiológicos^{24,25} han encontrado que el consumo de productos con alto contenido en sal y compuestos nitrogenados como escabechados, salazones productos ahumados y carnes rojas, aumentan el riesgo de evolución a cáncer gástrico sobre todo en individuos infectados por Hp mientras que el consumo de verdura fresca, fruta y productos ricos en fibra, contribuye a un menor riesgo de desarrollar cáncer gástrico. Los primeros por contener agentes carcinógenos y los segundos por contener fitoquímicos como los beta-carotenos, vitamina C y otros agentes antioxidantes protectores^{23,25,60}.

También el consumo de tabaco se ha considerado como un factor de riesgo en el desarrollo de las LPCG¹⁸⁹⁻¹⁹¹ y se ha asociado con un mayor riesgo de cáncer gástrico¹⁹²⁻¹⁹⁵ debido a los componentes carcinogénicos del humo del tabaco. Sus efectos están potenciados por la infección por Hp¹⁹⁶.

Aunque la relación entre el consumo de alcohol y el riesgo de desarrollo de cáncer gástrico ha sido discutida, Tramacere *et al* realizaron un meta-análisis¹⁹⁷ en el que se puso de manifiesto la relación significativa entre el alto consumo de alcohol y el cáncer gástrico.

Determinadas condiciones climáticas junto con la falta de medidas de saneamiento adecuadas, además de favorecer la infección por Hp, facilitan la coinfección por otros agentes como los parásitos. Estudios en ratones¹⁹⁸ y en humanos^{199,200} detectaron que la coinfección con helmintos intestinales reducía la gravedad y la evolución de la gastritis inducida por el Hp debido a un cambio en el tipo de respuesta inmunológica. La respuesta inmune de tipo Th1 provocada por el Hp disminuía y aumentaba la respuesta inmune de tipo Th2 inducida por la infección parasitaria. La respuesta tipo Th2 es menos agresiva.

En determinadas patologías los pacientes se ven obligados a tomar aspirina y otros antiinflamatorios no esteroideos (AINES) durante tiempo. Varios meta-análisis^{201,202} han mostrado que pacientes que consumen AINES tiene un menor riesgo de desarrollar cáncer gástrico distal. Esto se debe a su propio mecanismo de acción: la inhibición de la producción de la enzima COX-2. Esta proteína es un reconocido

carcinógeno y sus niveles están elevados en las gastritis inducidas por Hp, en las LPCG y en el carcinoma gástrico^{138,203-206}.

COX-2 contribuye en la carcinogénesis al intervenir en la síntesis de algunas prostaglandinas. Las prostaglandinas promueven la inhibición de la apoptosis, la estimulación de la angiogénesis e inducen inmunosupresión, con lo que favorecen el crecimiento, la invasión y las metástasis de los tumores²⁰⁷. A pesar del efecto beneficioso de los AINES todavía no se ha recomendado su uso en el tratamiento de las LPCG. Los datos que arrojan los estudios no son concluyentes y sus resultados no se pueden comparar ya que cada estudio utiliza distinto tipo de inhibidor de COX-2; las dosis aplicadas, los tiempos de tratamiento y periodos de seguimiento varían de un estudio a otro y las poblaciones estudiadas son diferentes en cuanto a etnia y tamaño muestral^{73,117}.

Los estrógenos también se han considerado como factor potencial en la disminución del riesgo de cáncer gástrico, lo que podría explicar la menor incidencia de carcinoma en las mujeres con respecto a los hombres²⁰⁸⁻²¹⁰.

6.3. Factores relacionados con la susceptibilidad genética del individuo

Que la evolución de las LPCG sea diferente en cada individuo también se ha asociado con las variantes alélicas o polimorfismos en los genes que regulan múltiples procesos orgánicos importantes y relacionados con la carcinogénesis gástrica entre los que se incluyen: 1) los mecanismos de protección de la mucosa gástrica frente al Hp y otros agentes carcinógenos, 2) la respuesta inflamatoria frente a la infección por Hp, 3) la capacidad para paliar los efectos tóxicos de los carcinógenos y protección ante el estrés oxidativo; 4) los mecanismos de reparación del ADN y 5) procesos relacionados con la proliferación y adhesión celular²¹¹.

6.3.1. Mecanismos de protección de la mucosa gástrica frente al *Helicobacter pylori* y otros agentes carcinógenos

Uno de los principales factores en la protección de la mucosa gástrica es la capa de moco constituida por glucoproteínas de alto peso molecular conocidas como mucinas. Las mucinas son sintetizadas y secretadas por las células del epitelio gástrico. En condiciones normales la mucosa gástrica expresa tres tipos de mucinas: MUC1, MUC6 y MUC5AC. Este patrón de expresión se altera en el caso de que la mucosa gástrica sufra metaplasia intestinal disminuyendo o desapareciendo la expresión de MUC1, MUC6 Y MUC5C y apareciendo *de novo* la expresión de MUC2, mucina propia de la mucosa intestinal.^{88,89,140}. Los cambios en los niveles de expresión e incluso en los patrones de expresión de las mucinas se han relacionado con los procesos de carcinogénesis^{140,212}.

Las mucinas se caracterizan porque su dominio central está constituido por un número variable de repeticiones en tándem de aminoácidos (VNTR del inglés *variable number of tandem repeats*) donde al menos la mitad corresponden a serinas y treoninas, que les confiere una gran variabilidad en cuanto a su longitud. Se ha observado que variantes alélicas que codifiquen menor número de repeticiones en tándem en MUC1²¹³ y en MUC6²¹⁴ están relacionadas con un mayor riesgo de cáncer gástrico. También se han relacionado polimorfismos de MUC5 con un mayor riesgo de cáncer gástrico²¹⁵. Actualmente se ha identificado un polimorfismo funcional en MUC1 (rs 4072037) asociado a una mayor susceptibilidad para desarrollar carcinoma gástrico en la población asiática²¹⁵⁻²¹⁷.

Los péptidos *Trefoil*: TFF1 (también llamado pS2), TFF2 (péptido espasmolítico) y TFF3, son una familia de proteínas que también intervienen en la protección de la mucosa gástrica al contribuir al mantenimiento de la estructura de la capa de moco y favorecer la reparación de la mucosa²¹⁸. Se ha observado que en el carcinoma gástrico difuso existe una intensa expresión de TFF1²¹⁹. También se han descrito polimorfismos en el gen que codifica TFF2 con una distribución variable entre la población aunque no parece predisponer a cáncer gástrico²²⁰.

6.3.2. La respuesta inflamatoria frente a la infección por *Helicobacter pylori*

La intensidad, la duración y el efecto de la respuesta inflamatoria provocada por el Hp son diferentes en cada individuo y contribuye a la carcinogénesis gástrica. Está mediada por citoquinas y enzimas cuya actividad individual está modulada por los polimorfismos de los genes que las codifican. Entre los polimorfismos más estudiados en relación con la evolución de las LPCG están los relacionados con los genes que codifican la interleuquina 1 β (IL1 β), el receptor antagonista de interleuquina 1 (IL-1RN en inglés *Interleukin 1 Receptor Antagonist*), la interleuquina 8 (IL8), la interleuquina 10 (IL10), el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α del inglés *Tumoral necrosis factor α*) y la enzima COX-2.

La IL1 β , IL1RN, IL8 y el TNF- α son proteínas proinflamatorias y además, la IL1 β , IL1RN y el TNF- α son supresores de la secreción ácida gástrica^{221,222}. Sin embargo, la IL10 es una citoquina antiinflamatoria cuyo papel es ponerle fin al proceso inflamatorio inhibiendo la activación de linfocitos, macrófagos y monocitos²²³. La enzima COX-2 (isoformas de la enzima ciclooxigenasa) tiene un papel proinflamatorio al catalizar la síntesis de prostaglandinas que, entre otras funciones, estimulan y modulan la respuesta inflamatoria²⁰⁷. Teniendo en cuenta lo anterior, polimorfismos en los genes que provoquen un aumento de las citoquinas proinflamatorias aumentarían el riesgo de cáncer gástrico.

Los polimorfismos *IL1B-511 T* y *IL1RN*2* de los genes de la IL1 β y su receptor antagonista respectivamente, se han relacionado con un aumento del riesgo de cáncer gástrico²²⁴. En concreto, el polimorfismo *IL1RN*2* se ha identificado específicamente en la población no asiática, suponiendo un mayor riesgo para el desarrollo de carcinoma gástrico distal tanto intestinal como difuso²²⁵. El genotipo AA del polimorfismo *IL8-251* se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollo de carcinoma gástrico de tipo difuso y de localización cardial en la población asiática²²⁶. También se ha relacionado con un mayor riesgo de carcinoma gástrico entre la población asiática los polimorfismos *IL10 592*²²⁷ y *COX-2 1195*²²⁸. En el caso del TNF- α , el genotipo AA del polimorfismo *TNF- α -308* se ha relacionado con un aumento del riesgo del cáncer gástrico entre la población no asiática²²⁹.

6.3.3. Capacidad para paliar los efectos tóxicos de los carcinógenos y protección ante el estrés oxidativo

Las enzimas relacionadas con el metabolismo tienen un papel importante en la carcinogénesis al activar o neutralizar carcinógenos relacionados con el riesgo de cáncer gástrico presentes en la dieta y en el medioambiente. Existen dos tipos de enzimas: las enzimas de Fase I, como la familia del citocromo P (CYP en inglés *cytochrome P*), que catalizan las reacciones de oxidación y provocan la activación de carcinógenos y las enzimas de Fase II, como la glutatión S transferasa (GST) y la N-acetiltransferasa (NAT) que facilitan la desintoxicación de los carcinógenos²¹¹.

Varios meta-análisis encuentran una asociación entre determinadas variantes alélicas de los genes que codifican las enzimas metabólicas y el riesgo de cáncer gástrico con diferencias estadísticamente significativas respecto de otros genes. En concreto los portadores de la variante alélica de CYP2E1 (una de las enzimas de fase I que metaboliza el alcohol y las nitrosaminas del humo del tabaco y de la dieta) denominada c2, tienen un mayor riesgo de cáncer gástrico en la población asiática²³⁰. En el caso de las enzimas de fase II (protectoras frente a sustancia carcinogénicas) el genotipo nulo de la enzima GSTT1 (glutatión S transferasa T1) que resulta de la delección del gen que la codifica y provoca la ausencia de actividad enzimática, se socia a un mayor riesgo de cáncer gástrico sobre todo en la población caucásica²³¹. Al contrario del genotipo nulo de la enzima GSTM1 (glutatión S transferasa M1) que constituye un mayor riesgo de cáncer gástrico en la población asiática²³². El genotipo AA de la enzima GSTP1 (glutatión S transferasa P1) que surge como variante alélica en el condón 105 del gen que la codifica, conlleva mayor riesgo de cáncer gástrico en la población caucásica²³³.

En cuanto a los polimorfismos de los genes que la codifican la NAT1 y NAT2 que determinan la rapidez en la acetilación de los individuos (distinguiéndose acetiladores rápidos o lentos) no se ha observado una relación significativa con el riesgo de cáncer gástrico²³⁴.

La protección frente al stress oxidativo se lleva a cabo gracias a la acción protectora de ciertas enzimas como la superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2) que

cataliza la neutralización de las especies reactivas de oxígeno. Se ha descrito un aumento de la SOD en las LPCG pero todavía no se ha comprobado si las variaciones individuales en la actividad de la enzima están relacionadas con el riesgo de cáncer gástrico²¹¹.

6.3.4. Los mecanismos de reparación del ADN

La reparación de los daños en el ADN se lleva a cabo por varios mecanismos mediados por sistemas enzimáticos que tienen como finalidad proteger la integridad del genoma. El fallo en algunos de estos mecanismos promueve la carcinogénesis y los polimorfismos de los genes, que codifican las proteínas y las enzimas que participan, contribuyen a la distinta susceptibilidad para el desarrollo de cáncer²³⁵.

Uno de los genes relacionados con la reparación del ADN es el *XRCC1* (*X-ray cross complementing group 1*) que codifica la proteína XRCC1 implicada en la reparación por escisión de bases del ADN. De él se han descrito tres polimorfismos (Arg194Trp, Arg280His y Arg399Gln) y en un metaanálisis no se encontró relación con el riesgo de cáncer gástrico²³⁶.

Lys751Gln y Asp312Asn, dos polimorfismos del gen *ERCC2* (*excision repair cross-complimentary group 2*) también llamado *XPB* (*Xeroderma Pigmentosum complementation group D*), sí se han relacionado con un mayor riesgo de cáncer gástrico sobre todo en la población asiática²³⁷. El gen *ERCC2* codifica una proteína con acción helicasa necesaria para llevar a cabo la reparación por escisión de nucleótidos.

El gen *XRCC3* (*X-ray cross complementing group 3*) pertenece a la familia de genes *RAD5* que codifican proteínas necesarias para la reparación de ADN mediante recombinación homóloga. De él se han descrito tres genotipos TT, TM, MM. Se ha comprobado que el alelo *XRCC3 241M* puede actuar como un factor de riesgo de cáncer gástrico en los asiáticos mientras que el alelo *XRCC3 241T* lo haría en los caucásicos²³⁸.

El folato juega un papel importante en la síntesis y la reparación del ADN. La enzima metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) interviene en su metabolismo al

transformar el 5,10-Metilenetetrahidrofolato a 5-Metiltetrahidrofolato que es la forma del folato en el plasma y un cosustrato para la metilación de la homocisteína en metionina, importante para la síntesis del ADN²³⁹. Esta enzima es codificada por el gen *MTHFR*. El polimorfismo *MTHFR C677T* se asocia a una disminución de la actividad enzimática provocando defectos en la síntesis del ADN confiriendo mayor susceptibilidad para desarrollar cáncer gástrico^{239,240}.

6.3.5. Procesos relacionados con la proliferación y adhesión celular.

El gen oncosupresor *p53* codifica una fosfoproteína de 53 KD. Esta fosfoproteína es un factor de transcripción nuclear que induce la detención del ciclo celular ante alguna mutación, favoreciendo la apoptosis celular. Alteraciones de este gen podrían permitir la proliferación de células con importantes mutaciones y el desarrollo de tumores. Polimorfismos del gen *p53* en el codón 72 se han asociado a un mayor riesgo de cáncer gástrico entre la población asiática²⁴¹.

La E-cadherina (cadherina 1) es una proteína de adhesión celular importante en el mantenimiento de la morfología y la diferenciación tisular. Mutaciones en línea germinal del gen cadherina 1 (*CDH1*) están relacionadas con el cáncer gástrico hereditario. Esta mutación conlleva una mayor susceptibilidad al carcinoma gástrico difuso en personas jóvenes y se transmite mediante herencia autosómica dominante²⁴².

Aunque son muchos los trabajos publicados que han investigado la relación de los distintos polimorfismos genéticos con el riesgo de cáncer gástrico, los resultados son heterogéneos y todavía no se utilizan en la práctica clínica.

Justificación

La gastritis crónica es una entidad etiopatogénica que constituye la base para el desarrollo tanto de la úlcera péptica como del carcinoma gástrico. Su etiología es variada pero una de las causas más frecuentes es la infección por Hp. Es un proceso dinámico y a lo largo de su historia natural se producen una serie alteraciones morfológicas como son la atrofia gástrica, la metaplasia intestinal y la displasia epitelial. Estas tres lesiones se consideran LPCG. El adenocarcinoma gástrico (el cáncer más frecuente en el estómago, sobre todo el de localización distal: cuerpo y antro) suele estar precedido por las LPCG pero, afortunadamente, pocos pacientes con estas lesiones llegan a desarrollarlo.

La evolución de la LPCG es variable en cada individuo y depende de la interacción de factores medioambientales y estilo de vida, la susceptibilidad genética individual y la virulencia del Hp. En la mayoría de los pacientes las lesiones permanecen estables con fases de activación y no llegan a desarrollar úlcera péptica ni cáncer gástrico. Solo en muy pocos pacientes las lesiones evolucionan a un adenocarcinoma. Todavía no se han definido con exactitud factores pronósticos útiles, desde el punto de vista clínico, que permitan seleccionar entre los pacientes con lesiones precursoras aquellos con más riesgo de desarrollar un carcinoma gástrico.

Se han intentado identificar marcadores pronósticos para los pacientes con estas lesiones, pero por ahora no hay ninguno fiable ni aceptado porque hay relativamente pocos estudios publicados de seguimiento de LPCG con poblaciones suficientemente grandes y largo tiempo de seguimiento. Entre los trabajos que existen, algunos no consideran los distintos tipos de metaplasia intestinal²⁴³ y otros no tienen en cuenta la infección por Hp^{244,245}, ni la metaplasia intestinal^{244,246}.

No existe un acuerdo respecto a qué tipo de lesión precursora tiene mayor probabilidad de desarrollar un adenocarcinoma gástrico. La metaplasia intestinal es valorada de distinta forma según autores. Para unos lo más importante sería el tipo de metaplasia intestinal⁸³, para otros su extensión⁹⁰, otros solo la consideran importante por representar un marcador de atrofia, siendo la propia atrofia y no la metaplasia intestinal la lesión precursora de riesgo²⁴⁷.

En cuanto a la displasia su diagnóstico es complicado porque es poco frecuente, lo que condiciona la poca familiaridad del patólogo en su reconocimiento. Además, el diagnóstico diferencial entre la displasia de bajo grado y otras lesiones de carácter reactivo no es fácil por la similitud de las alteraciones morfológicas que se producen en ambas. También puede resultar difícil distinguir la displasia de alto grado del carcinoma por su semejanza citológica y porque en ocasiones no se puede demostrar infiltración tisular (parámetro diferenciador entre las dos entidades) sobre todo en muestra superficiales, pequeñas o mal orientadas. La historia natural de la displasia epitelial es controvertida y aunque existen múltiples trabajos que intentan establecer la progresión o la regresión de esta lesión el problema es la subjetividad a la hora de su valoración y la dificultad de muestrear en distintos tiempos la misma zona que se biopsió previamente y en la se hizo por primera vez el diagnóstico de displasia²⁴⁸.

Aunque se han hecho enormes progresos en el estudio de los factores de virulencia de Hp y su variación genética, esta información aún no ha sido utilizada en la práctica clínica porque las asociaciones entre las características bacterianas y el riesgo de evolución de las LPCG no se han definido suficientemente bien²⁴⁹. Así que en la actualidad, todavía no se ha establecido ningún marcador pronóstico ligado al Hp que permita prever la severidad y el curso de la infección. Dentro de los factores de virulencia del Hp los que se han estudiado más extensamente son el *cagA* y *vacA* aunque pocos estudios los han evaluado en relación con el riesgo de progresión de las LPCG, solo uno en el caso de *cagA*²⁵⁰ y ninguno en el caso de *vacA*.

La evolución de las LPCG también depende de la susceptibilidad genética de cada individuo, la cual está determinada por variaciones alélicas o polimorfismos en genes que regulan entre muchos otros procesos los mecanismos de protección de la mucosa gástrica frente a distintos agentes. En concreto los genes que codifican las mucinas: MUC1, MUC2, MUC5 y MUC6. Se han descrito alteraciones en la expresión de mucinas gástricas tanto en las LPCG como en el adenocarcinoma, lo que sugiere que los polimorfismos en los genes que codifican las mucinas podrían tener un gran potencial como marcadores diagnósticos y de pronóstico en el cáncer gástrico²⁵¹. Varios estudios^{213,215-217,252-256} han valorado los distintos polimorfismos de los genes de mucinas pero ninguno ha evaluado su papel en la progresión o regresión de las LPCG.

En la actualidad, todavía no se conoce qué tipo de LPCG tiene mayor probabilidad de evolucionar a cáncer gástrico, o en qué tipo de pacientes la lesión precursora va a evolucionar a un adenocarcinoma gástrico. La importancia de determinar marcadores pronósticos que ayuden a predecir la evolución de las lesiones gástricas en cada individuo radica en la posibilidad de poder detener la evolución natural de estas lesiones y prevenir la aparición del cáncer gástrico o diagnosticarlo en estadios no avanzados, así como permitir la selección de pacientes tanto para programas de diagnóstico precoz como para el ensayo de fármacos en estudios de quimioprevención.

El seguimiento de pacientes con LPCG permite conocer su evolución, por lo que representa el abordaje metodológico óptimo para profundizar en el estudio de esta patología. Además la categorización de estas lesiones en pacientes en los que conocemos su evolución permitirá la identificación de parámetros predictivos de progresión de las LPCG que puedan utilizarse para seleccionar a los pacientes con mayor riesgo de desarrollar un carcinoma gástrico. El hecho de que los pacientes procedan de un área de alto riesgo de cáncer gástrico con una población estable, fácilmente controlable, como es la provincia de Soria, hace que el material de estudio tenga un valor adicional.

Objetivos

Objetivo general

Identificar posibles parámetros que permitan seleccionar entre los pacientes con LPCG aquellos con mayor riesgo de evolucionar a cáncer gástrico.

Objetivos específicos

1.- *Evaluar la evolución de las LPCG e identificar los factores de riesgo de evolución a adenocarcinoma en los pacientes con LPCG según la infección concomitante por Hp, el consumo de tabaco, el consumo de antiinflamatorios no esteroideos, la edad, el sexo y los antecedentes familiares de cáncer gástrico.*

2.- *Evaluar el efecto de los factores de virulencia del Hp en la evolución de las LPCG estudiando la relación entre los genotipos de Hp cagA y vacA con la progresión de las LPCG.*

3.- *Evaluar el efecto de la susceptibilidad genética en la evolución de las LPCG analizando la relación entre los polimorfismos de los genes relacionados con la producción de mucinas protectoras de la mucosa gástrica: MUC 1, MUC 2 y MUC 6 y la evolución de las LPCG.*

Materiales y Método

1. Población del Estudio.

Se trata de un estudio de seguimiento de cohorte prospectiva y retrospectiva con un periodo de seguimiento comprendido entre 1988 y 2007. Se tuvieron en cuenta todos los pacientes que se habían sometido a una gastroscopia con biopsia gástrica o esofágica en el Complejo Hospitalario de Soria desde el 1 de enero de 1988 al 30 de junio de 1994. Se identificaron mediante el registro del servicio de patología (único en la provincia). Se aplicaron los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

- **Criterios de inclusión:** Pacientes de edades comprendidas entre 25 y 69 años diagnosticados de: mucosa normal, gastritis superficial, gastritis crónica atrófica sin metaplasia intestinal, metaplasia intestinal, displasia, pólipo gástrico hiperplásico, pólipo adenomatoso o úlcera gástrica.

- **Criterios de exclusión:** Pacientes que en el momento del reclutamiento o dentro de los 6 primeros meses posteriores tuvieran un diagnóstico de: cáncer gástrico u otro cáncer (no se tuvieron en cuenta los tumores malignos cutáneos no melánicos), úlcera péptica duodenal, gastrectomía total o parcial por cualquier causa y/o Enfermedad de Barret.

El estudio preliminar incluyó 2.229 pacientes con biopsias gástricas o esofágicas residentes en la provincia de Soria de ambos sexos. Se excluyeron directamente 1.427: 1.140 pacientes atendiendo a los criterios de exclusión (610 por edad fuera del rango, 290 por presentar úlcera duodenal, 127 con carcinoma gástrico, 61 con esófago de Barrett, 52 por resección gástrica previa) y 287 por información insuficiente.

Se seleccionaron para el estudio los 802 pacientes restantes con un diagnóstico histológico en la primera biopsia (biopsia de reclutamiento) de: mucosa normal, gastritis crónica sin metaplasia intestinal, metaplasia intestinal o displasia. Se revisaron todos los informes de patología y la historia clínica de estos pacientes para identificar a aquellos que habían alcanzado algún punto final del seguimiento y a los que serían candidatos a una nueva gastroscopia y biopsia al final del seguimiento.

Se consideraron como puntos finales del seguimiento: a) Diagnóstico de cáncer gástrico. La fecha del diagnóstico sería la fecha del fin de seguimiento. b) Gastrectomía total o parcial por úlcera gástrica. La fecha de la intervención sería la del fin de seguimiento y se registraría la información de la pieza quirúrgica. c) Fallecimiento. La fecha de muerte sería la del final del seguimiento. Si tenían biopsia gástrica previa o autopsia se registraría esa información. d) Realización de biopsia durante los dos años previos a la fecha final del seguimiento. La fecha de la última biopsia, sería la del final del seguimiento.

139 pacientes alcanzaron algún punto final antes de finalizar el periodo de seguimiento: 22 casos de cáncer gástrico (20 adenocarcinomas, 2 linfomas), 6 pacientes se sometieron a una gastrectomía por úlcera gástrica, 10 desarrollaron úlcera duodenal y 8, esófago de Barret. Se identificaron 49 pacientes que se habían sometido a una gastroscopia con biopsia gástrica en los 2 años anteriores al final del periodo de seguimiento por lo que no se consideró ético someterles a otra gastroscopia y biopsia. 44 pacientes fallecieron. Los pacientes que desarrollaron úlcera duodenal y esófago de Barret (18 pacientes) fueron excluidos al aplicar los criterios previos del estudio. Se incluyeron en total 121 pacientes de los que se tuvieron en cuenta, para el estudio, la última gastroscopia y biopsia registrada. En el caso de los pacientes fallecidos se examinaron los certificados de defunción para obtener la causa de la muerte.

Los 663 pacientes restantes fueron invitados, por carta y llamada telefónica a someterse a una nueva gastroscopia y biopsia gástrica, a proporcionar una muestra de sangre (30 ml) y a responder a un cuestionario, mediante entrevista personal, acerca de: el consumo de tabaco, el uso de AINES, antecedentes familiares de cáncer gástrico (en abuelos, padres, hermanos o hijos) y valorar la infección por Hp. 290 pacientes rehusaron hacerse una nueva gastroscopia y en 16 pacientes suponía un riesgo realizarla. En total 357 pacientes accedieron someterse a una nueva gastroscopia y biopsia.

La información sobre los factores de riesgo de interés en aquellos pacientes que habían alcanzado algún punto final durante el seguimiento o que no pudieron ser entrevistados, se obtuvo de los registros médicos o de sus familiares.

El número total de pacientes que participaron en el estudio fue de 478 (Fig. 11). Todos los pacientes participantes firmaron un consentimiento informado sobre todos los procedimientos a los que serían sometidos durante el estudio, cuyo protocolo fue aprobado por el Comité Ético del Complejo Hospitalario.

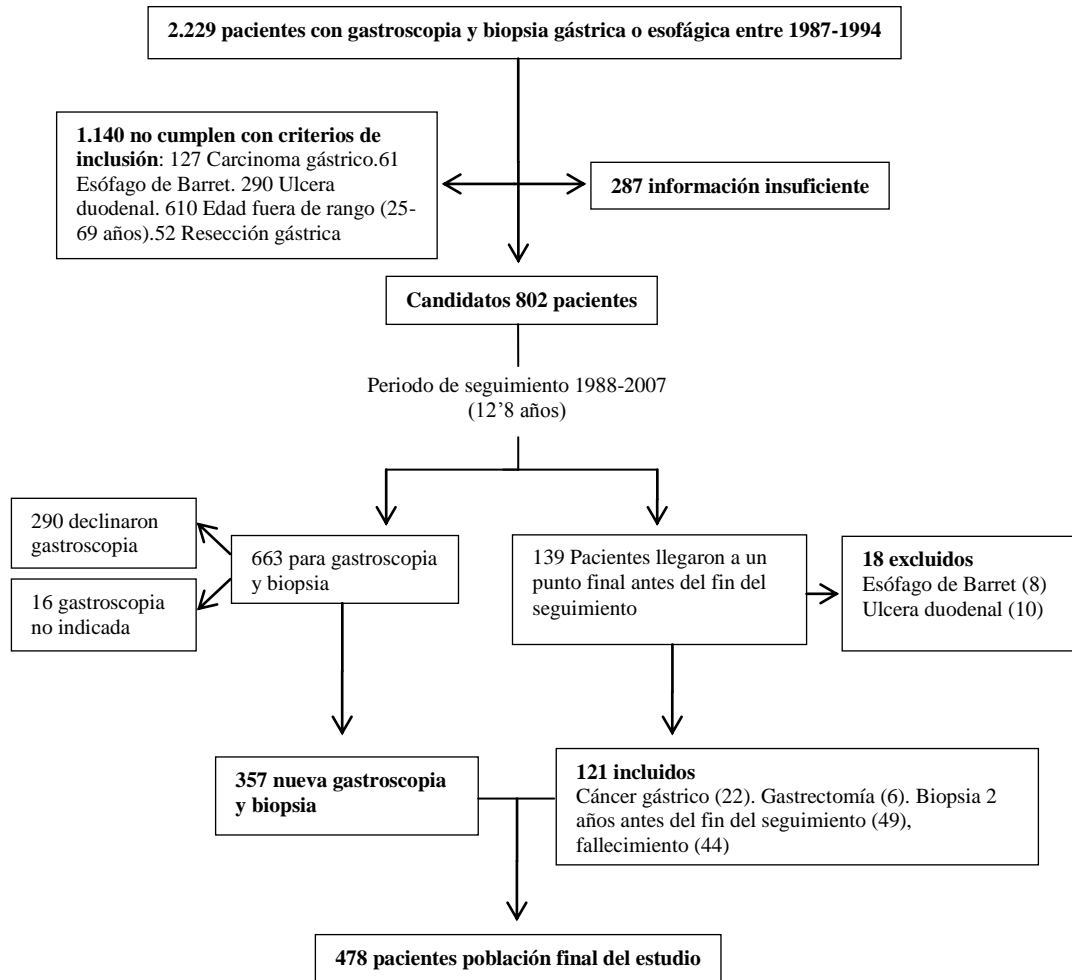


Fig. 11 Selección de pacientes para el estudio

El análisis del genotipo del Hp se realizó en 312 pacientes (65'3% de la población participante del estudio), cuyas biopsias de reclutamiento contaban con suficiente tejido para extraer ADN bacteriano de buena calidad.

Se obtuvo ADN genómico de 453 pacientes (95% de la población participante del estudio) a partir de muestras sangre (417 casos) o de bloques de tejido incluidos en parafina cuando la muestra de sangre no era posible (36 casos). Se excluyeron 66

pacientes cuyas muestras de ADN no cumplía con los criterios mínimos de calidad necesarios para la determinación del genotipo en la plataforma de Sequenom. La población de estudio para el análisis genético fue por lo tanto de 387 pacientes. (81% de los participantes en el estudio)

2. Histopatología

Para la evaluación histológica de todos los pacientes se tuvieron en cuenta como primera biopsia o biopsia de reclutamiento aquella biopsia gástrica que al menos comprendiera entre 3 y 4 fragmentos de mucosa de antro y de incisura o cuerpo teniendo en cuenta los procedimientos habituales de la institución en el periodo comprendido entre 1988 y 1994 (periodo definido como reclutamiento). Para la gastroscopia final, se siguieron las recomendaciones de Sídney⁵⁵ por lo que para la biopsia final se obtuvieron 5 muestras de mucosa gástrica: 1 de incisura, 2 de antro y 2 de cuerpo (curvatura mayor y curvatura menor). Todas las biopsias se fijaron en formaldehído taponado al 10% y se incluyeron en parafina. Se hicieron secciones de 4 micras que se tiñeron con hematoxilina-eosina, AAPAS 2,5 y Giemsa. En biopsias seleccionadas, con diagnóstico de metaplasia intestinal incompleta, algunas secciones se tiñeron con HID-AB 2.5 para detectar sulfomucinas. Tanto las biopsias de reclutamiento como las biopsias finales fueron revisadas por dos patólogos, los mismos en ambos periodos.

2.1. Clasificación de los diagnósticos histológicos

Para clasificar a cada paciente se tuvo en cuenta la lesión más avanzada observada en cualquiera de las muestras de biopsia recogidas al principio y al final del estudio. Las categorías diagnósticas fueron: 1: mucosa normal/cambio mínimo; 2: gastritis no atrófica; 3: gastritis atrófica multifocal sin metaplasia; 4: metaplasia intestinal; 5: displasia; 6: carcinoma gástrico.

La intensidad de la inflamación, la atrofia, la metaplasia y Hp se graduaron siguiendo las escalas visuales del Sistema de Sídney⁵⁵ (Fig. 1) en leve, moderada o severa. Teniendo en cuenta la morfología y la tinción para mucinas, la metaplasia

intestinal se clasificó como: metaplasia intestinal completa, metaplasia intestinal predominantemente completa, metaplasia intestinal predominante incompleta y metaplasia intestinal incompleta.

Para evaluar la variabilidad intra e inter observador en el diagnóstico histológico, una muestra aleatoria correspondiente al 10 % de las muestras patológicas se incluyeron en un estudio ciego, donde fueron examinados dos veces por el mismo patólogo y por otro patólogo que no ha participado en el estudio.

2.2. Score histológico

El valor de la atrofia gástrica (3), la metaplasia intestinal (4) y el de la displasia (5) fue modificado usando una escala continua siguiendo el modelo de Mera *et al*²⁵⁷ de tal manera que al valor de referencia se le sumaba el valor, siguiendo una escala ordinal, de cada una de las categorías establecidas según la gravedad de la lesión, el tipo y la extensión. En el caso de la atrofia se definieron cinco categorías según su intensidad: ausencia de atrofia: 0; Indefinido para la atrofia: 0'25; atrofia leve: 0'50; atrofia moderada: 0'75; y la atrofia severa: 1'0. El valor de la metaplasia intestinal se modificó de acuerdo con el tipo y la extensión. El tipo se clasificó en cuatro categorías: Metaplasia intestinal completa: 0'1; mixta predominante de tipo completo: 0'2; mixta predominante de tipo incompleto: 0'3; y metaplasia intestinal incompleta: 0'4. Para valorar la extensión de la metaplasia intestinal se consideró el número de biopsias con metaplasia intestinal/número total de biopsias y el resultado se agrupó en terciles. A cada tercil se le dio un valor de: 0'2, 0'4, ó 0'6, respectivamente. La puntuación final para la metaplasia intestinal, resultaba de la suma a su valor de partida 4 el valor del tipo y el valor de la extensión²⁵⁷. El valor de la displasia (5) se modificó en función de las distintas categorías en indefinido para displasia: 0'25, displasia de bajo grado: 0'50 y displasia de alto grado: 0'75. En los tres tipos de lesiones para los análisis estadísticos se consideró el valor más alto en cada biopsia.

3. Valoración de la Infección por *Helicobacter pylori*

La detección de Hp se realizó por: examen histológico mediante la tinción de Giemsa, revisando las historias clínicas buscando resultados de la prueba de la ureasa en la muestra de biopsia o test de aliento y entrevistando a los pacientes. Se consideró la existencia de infección por Hp, la positividad en cualquiera de los métodos anteriores. La información de la utilización de inhibidores de la bomba de protones en el tratamiento no estaba disponible, por lo que no se tiene en cuenta en el análisis.

4. Genotipado del *Helicobacter pylori*

La extracción del ADN para la determinación del genotipo de Hp y su caracterización se llevó a cabo a partir de tejido gástrico incluido en parafina de las biopsias de reclutamiento. La mayoría, a partir de biopsias antrales (76%). Cuando éstas no estaban disponibles se utilizaron muestras de la *incisura angularis* (19%) o del cuerpo (5%). Se realizaron cortes de 10 micras de cada bloque. Para evitar la contaminación cruzada se cambiaban las cuchillas con cada bloque. El ADN total se extrajo después de la digestión en una solución que contiene: 10 mM de Tris-HCl (pH 8'0), EDTA 5 mM, 0'1 % de dodecil sulfato de sodio, y 0'1 mg/ml de proteinasa K, durante al menos 12 h a 55°C. La proteinasa K se inactivó por incubación durante 10 min. a 95°C.

La detección y caracterización de los genotipos *cagA* y *vacAs* se realizó mediante PCR seguida de hibridación inversa sobre un ensayo de sonda lineal (*Labo Bio- Medical Products, Rijswijk, Países Bajos*) usando cebadores marcados con biotina y dos sondas de oligonucleótidos para *cagA* y para cada uno de los alelos de *vacA*, definidos previamente en otros trabajos^{258,259}. Se utilizaron como controles positivos y negativos ADN de cepas de Hp con genotipos conocidos.

5. Genotipado de Mucinas en cada individuo

El ADN genómico se extrajo de muestras de sangre a partir de linfocitos mediante el uso *Flexigene ADN kit* (Qiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En los casos en que se utilizaron los bloques de tejido incluido en parafina, se cortaron 10 secciones de 10 micras cada uno y se desparafinaron con xileno extrayendo el ADN mediante el *QIA-amp DNA Mini Kit* (Qiagen). La concentración de ADN se midió mediante densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (*Thermo Scientific*) y se almacenaron a -80°C en placas de 96 pocillos a una concentración de ~ 100 ng/l.

Para la selección de los SNP (*single nucleotide polymorphism*) se ha utilizado la información HapMap para los caucásicos. Se seleccionaron tagSNPs de la región genómica del gen 1q21 que contiene el gen *MUC1* y para las regiones genómicas del gen 11p15, que contiene los genes *MUC2* y *MUC6*. Se han seleccionado de una lista de SNPs entre un mínimo de 7 kb hacia el extremo 5' y de 3 kb hacia el extremo 3' para cada uno de los genes *MUC*. Debido a la ausencia de información en HapMap para el gen de *MUC5AC* este gen no se ha analizado.

Los bloques de haplotipos se definieron mediante el uso de los intervalos de confianza (IC) del método de Gabriel *et al.*²⁶⁰, tal como se aplica en el software v 4.0 Haploview²⁶¹. Los tagSNPs (SNP marcadores) fueron seleccionados mediante el uso del Algoritmo de Tagger como se aplica en Haploview. Se seleccionaron aquellos tagSNPs con una frecuencia del alelo menor (MAF en inglés *minor allele frequency*) $\geq 5\%$ en los caucásicos, una correlación entre tagSNP y SNP marcado $r^2 \geq 0.8$ y aquellos tagSNPs que solamente marcaran haplotipos con una frecuencia ≥ 0.05 . Los SNPs validados en la base de datos y potencialmente funcionales se sustituyeron por tagSNPs siempre que estuvieran en completo desequilibrio de ligamiento (LD en inglés *linkage disequilibrium*) con ellos.

Se definieron dos bloques de haplotipos para la región genómica que contiene *MUC1* (1q21) y se seleccionaron cuatro tagSNPs, dos para cada bloque. En la región cromosómica 11p15, que incluía *MUC6*, se definió un haplotipo que fue etiquetado por

seis tagSNPs y en la región genómica que incluye *MUC2* se definieron siete bloques de haplotipos etiquetados por quince tagSNPs.

Los 25 tagSNPs seleccionados para los genes *MUC1*, *MUC2* y *MUC6* se genotiparon utilizando la tecnología *IPLEX-Gold MassArray*TM (Sequenom) en el Centro Nacional de Genotipado (CEGEN), en un ensayo de diseño personalizado. Además de los controles de calidad internos incluidos por CEGEN, se genotiparon por duplicado 17 muestras (4'4%) elegidas al azar en todos tagSNPs para evaluar la tasa de error en el genotipado. La concordancia entre genotipos fue completa en todos los casos y no se observaron errores de genotipado. De los 25 SNPs seleccionados inicialmente se excluyeron 3 porque no se pudieron amplificar correctamente. El número total de SNPs genotipados con éxito y disponibles para el análisis fue de 22. Ninguno de estos SNPs se desvió del equilibrio de Hardy-Weinberg en la población analizada (test de chi-cuadrado $P > 10^{-3}$). La media de genotipado de cada SNP en las muestras fue del 98% y en ningún caso se genotiparon menos del 80% de las muestras por SNP.

6. Análisis Estadístico

Se utilizaron modelos de riesgo proporcional de Cox para estimar los HRs (*Hazards ratios*) con IC del 95%. Los análisis se basan únicamente en el carcinoma gástrico como punto final, debido al bajo número de casos observados de úlcera duodenal (n=10) y de esófago de Barrett (n=8). El riesgo de cáncer gástrico se evaluó mediante un análisis univariado y multivariado de acuerdo con el diagnóstico histológico en el reclutamiento, la edad, el sexo, el consumo tabaco y uso de AINES, los antecedentes familiares de cáncer gástrico y la prevalencia de la infección por Hp.

Para el análisis de la progresión de las LPCG según los genotipos cagA y vacA del Hp partiendo del diagnóstico del reclutamiento, se utilizó el modelo de regresión logística no condicional para calcular *odds ratio* (ORs) con IC del 95%. Se comparó el diagnóstico histológico en el momento del reclutamiento con el diagnóstico al final del seguimiento según las categorías diagnósticas definidas. Se consideró progresión cuando el diagnóstico final supuso uno o más puntos en relación con el diagnóstico del reclutamiento. La regresión fue el proceso inverso. Para el análisis se comparó a los

pacientes Hp negativos (categoría de referencia) con pacientes con cepas cagA-positiva, vacA s1, m1, s1/m1, i1, cagA-negativas, s2, m2, s2/m2, i2 y otras combinaciones de vacA. También se compararon pacientes con cepas cagA-positiva, vacA s1, m1, s1/m1 y i1 con cepas cagA-negativas, s2, m2, s2/m2, i2 y otras combinaciones de vacA. El riesgo de progresión fue valorado mediante un análisis univariante y multivariante ajustado por el diagnóstico del reclutamiento, edad, sexo, consumo de tabaco, el uso de AINES, y antecedentes familiares de cáncer gástrico.

Para el análisis de asociación entre los polimorfismos de MUC y cada grupo de evolución de las LPCG se utilizó el test χ^2 de Pearson. Con el fin de abarcar toda la variabilidad asociada con la evolución de las lesiones, se llevaron a cabo dos tipos de análisis: 1) el análisis de la progresión de la lesión, donde el grupo de pacientes cuyas lesiones progresaron se compararon con aquellos cuyas lesiones se mantuvieron estables o regresaron (grupo de referencia) y 2) el análisis de regresión de las lesiones, donde los pacientes cuyas lesiones regresaron se compararon con aquellos cuya lesiones se mantuvieron estables o progresaron. El OR y el IC del 95% se calcularon mediante regresión logística no condicional, tal como se aplica en el programa de *Biblioteca SNPassoc R*²⁶². En ambos modelos el análisis se ajustó para el sexo, la edad, el consumo AINES y de tabaco y tipo de lesión en el inicio del estudio. Todos los análisis se realizaron considerando los distintos patrones de herencia (co-dominante, dominante, recesivo y aditivo). Los análisis estratificados se realizaron teniendo en cuenta la infección por Hp y el consumo de AINES. Las interacciones potenciales entre el SNP de interés y el estado de Hp o el consumo de AINES se evaluaron mediante la prueba de razón de verosimilitud.

Para el análisis del desequilibrio del ligamento entre los polimorfismos en cada región del gen *MUC* se utilizó el programa Haploview. La Asociación entre la progresión o la regresión y cada haplotipo de *MUC* con una frecuencia > 0.01 , se valoró utilizando como referencia el haplotipo de mayor frecuencia entre los controles.

Resultados

1. Presentación de resultados

Se presentan los artículos que componen esta tesis, uno por cada objetivo, tal y como se muestran en esta tabla.

<p>Evaluar la evolución de las LPCG e identificar los factores de riesgo de evolución a adenocarcinoma en los pacientes con lesiones LPCG.</p>	<p>Gonzalez, C. A.; Pardo, M. L.; Liso, J. M.; Alonso, P.; Bonet, C.; Garcia, R. M.; Sala, N.; Capella, G.; Sanz-Anquela, J. M. Gastric cancer occurrence in preneoplastic lesions: a long-term follow-up in a high-risk area in Spain. <i>Int J Cancer.</i> 2010 Dec 1; 127(11):2654-60</p>
<p>Evaluar el efecto de los factores de virulencia del Hp en la evolución de las LPCG</p>	<p>Gonzalez, C. A.; Figueiredo, C.; Lic, C. B.; Ferreira, R. M.; Pardo, M. L.; Ruiz Liso, J. M.; Alonso, P.; Sala, N.; Capella, G.; Sanz-Anquela, J. M. Helicobacter pylori cagA and vacA genotypes as predictors of progression of gastric preneoplastic lesions: a long-term follow-up in a high-risk area in Spain. <i>Am J Gastroenterol.</i> 2011 May; 106(5):867-74</p> <p>Ferreira, R. M.; Figueiredo, C.; Bonet, C.; Pardo, M. L.; Liso, J. M.; Alonso, P.; Sala, N.; Capella, G.; Sanz-Anquela, J. M.; Gonzalez, C. A. Helicobacter pylori vacA intermediate region genotyping and progression of gastric preneoplastic lesions. <i>Am J Gastroenterol.</i> 2012 Jan; 107(1):145-6</p>
<p>Evaluar el efecto de la susceptibilidad genética en la evolución de las LPCG</p>	<p>Marin, F.; Bonet, C.; Munoz, X.; Garcia, N.; Pardo, M. L.; Ruiz-Liso, J. M.; Alonso, P.; Capella, G.; Sanz-Anquela, J. M.; Gonzalez, C. A.; Sala, N. Genetic variation in MUC1, MUC2 and MUC6 genes and evolution of gastric cancer precursor lesions in a long-term follow-up in a high-risk area in Spain. <i>Carcinogenesis.</i> 2012 May; 33(5):1072-80</p>

2. Resumen del artículo 1

Gonzalez, C. A.; Pardo, M. L.; Liso, J. M.; Alonso, P.; Bonet, C.; Garcia, R. M.; Sala, N.; Capella, G.; Sanz-Anquela, J. M. **Gastric cancer occurrence in preneoplastic lesions: a long-term follow-up in a high-risk area in Spain.** *Int J Cancer*. 2010 Dec 1; 127(11):2654-60

En la actualidad no se han establecido criterios para identificar entre los pacientes con LPCG aquellos con mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico. Con el objetivo de identificar posibles factores riesgo de progresión a cáncer gástrico en estos pacientes, se realizó un estudio de seguimiento de 12.8 años, prospectivo y retrospectivo, en la provincia de Soria con una de las mayores tasas de incidencia y mortalidad por cáncer gástrico en España. El estudio incluyó a 478 pacientes que se sometieron a una gastroscopia y biopsia gástrica entre 1988 y 1994 con diagnóstico de mucosa normal, gastritis no atrófica, gastritis atrófica multifocal sin metaplasia intestinal, metaplasia intestinal completa o metaplasia incompleta. 357 pacientes fueron sometidos a una nueva gastroscopia y biopsia al final del periodo de seguimiento (2005-2007). 121 pacientes alcanzaron algunos de los puntos finales definidos antes de acabar el periodo de seguimiento. Se evaluaron histológicamente las biopsias del reclutamiento y las del final del seguimiento. Se determinó la variabilidad inter e intra-observador del diagnóstico histológico. Se recogió información acerca de la existencia de infección por Hp, los antecedentes familiares de cáncer gástrico, el consumo de AINES y de tabaco. El riesgo del cáncer gástrico se valoró mediante un análisis univariante y multivariante de acuerdo con la edad, el sexo los antecedentes familiares de cáncer gástrico, el consumo de AINES y de tabaco, el diagnóstico histológico del reclutamiento y la infección por Hp. La edad media de los pacientes fue de 50 años, el 47% eran hombres. Durante el seguimiento, se diagnosticaron 23 cánceres gástricos (4'8%) (21 adenocarcinomas y 2 linfomas) con una incidencia de 3'77 por cada 1.000 personas al año. La tasa de incidencia de cáncer gástrico para las personas con metaplasia intestinal incompleta fue de 16'5 por cada 1.000 persona al año. De los 21 pacientes diagnosticados de adenocarcinomas, 16 ya tenían metaplasia intestinal incompleta en la biopsia de reclutamiento. Se encontró un riesgo, estadísticamente significativo, de desarrollar un adenocarcinoma gástrico con el diagnóstico previo de metaplasia

intestinal incompleta (HR 11'3; IC 95%: 3'8-33'9) y la historia familiar de cáncer gástrico (HR 6'1, IC 95% 1'7-22'4), lo que implica que el subtipo histológico de metaplasia intestinal y la historia familiar de cáncer gástrico pueden ser útiles para la identificación de pacientes de alto riesgo de progresión subsidiarios de una vigilancia más intensa.

Gastric cancer occurrence in preneoplastic lesions: a long-term follow-up in a high-risk area in Spain

Carlos A. González¹, María Luisa Pardo², Juan María Ruiz Liso², Pablo Alonso³, Catalina Bonet¹, Raul M. García¹, Núria Sala^{1,4}, Gabriel Capella⁴ and José Miguel Sanz-Anquela⁵

¹Unit of Nutrition, Environment and Cancer, Catalan Institute of Oncology (IDIBELL-ICO), Barcelona, Spain

²Pathology Department, Complejo Hospitalario de Soria, Soria, Spain

³Gastroenterology Unit, Complejo Hospitalario de Soria, Soria, Spain

⁴Translational Research Laboratory, Catalan Institute of Oncology (IDIBELL-ICO), Barcelona, Spain

⁵Department of Medical Specialities, Faculty of Medicine, University of Alcalá, Hospital Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

There are no established criteria to classify patients into high or low risk of progressing to gastric cancer (GC). The aim of the study was to identify predictors of GC occurrence among patients with gastric preneoplastic lesions. A prospective and retrospective follow-up study was carried out in a province in Spain with one of the highest risk of GC. The study included 478 patients who underwent gastric biopsy in 1988–1994 with diagnoses of normal mucosa, nonatrophic gastritis (NAG), non-metaplastic multifocal atrophic gastritis (MAG) and complete or incomplete intestinal metaplasia (IM) and who accepted to undergo a new biopsy during 2005–2007 or had an event during follow up. Inter- and intra-observer variability of histological diagnosis was assessed. Analysis was done using Cox proportional hazards risk (HR) models. The mean age of the patients was 50 years, 47% were males and the mean follow-up time was 12.8 years. During follow-up, 23 GC (4.8%) were diagnosed (21 adenocarcinomas and 2 lymphomas) with an incidence of 3.77 per 1,000 person per year. The incidence rate of GC for those with incomplete IM was 16.5 per 1,000 person years. Out the 21 adenocarcinomas, 16 had an incomplete IM in the baseline diagnosis. Incomplete IM (HR 11.3; 95% CI 3.8–33.9) and a family history of GC (HR 6.1; 95% CI 1.7–22.4) were the strongest risk factors for gastric adenocarcinoma. Subtyping of IM and family history of GC may be useful for the identification of high-risk patients who need more intensive surveillance.

Experimental and epidemiological evidence indicates that gastric cancer (GC) is the result of a long multistep and multifactorial process.¹ An inflammatory process in the antrum, usually associated with *Helicobacter pylori* (Hp) infection, is considered to be the cause of the initial lesion, which may progress toward a multifocal chronic atrophic gastritis in the corpus, intestinal metaplasia (IM), dysplasia and finally the invasive carcinoma.² This seems to be the sequence of the intestinal type of gastric adenocarcinoma, which is the predominant type of GC in many countries, and these lesions are considered as precursors of this type of cancer. IM is usually subclassified as “complete” (small intestinal type or Type I) or “incomplete” (colonic type or Types II and III), which is thought to be the most advanced stage of IM.³ The diffuse

type of GC, on the contrary, lacks well-defined precursors, although many studies have observed that it is also associated with intestinal metaplasia.³

Symptoms are often absent or nonspecific in patients suffering this long multistep process, and, therefore, GC is usually diagnosed at an advanced stage when curative options are very limited.^{4,5} Five-year relative survival rates of GC in European patients are very low (less than 23%)⁶; therefore, better control of risk factors and identification of high-risk patients at an early stage of disease represent the most effective ways for reducing the burden of this tumor.

The need to reevaluate premalignant gastric lesions is controversial. Clinical guidelines for surveillance and treatment of patients with preneoplastic lesions are lacking⁴ and there are no clear criteria to classify patients into high or low risk of progressing to GC. Several prospective studies^{7,8} have observed that the risk of progressing to more advanced preneoplastic lesions or GC depends on the severity of the lesions diagnosed at the start of follow-up and if these lesions accumulate and progress with advancing age.

A recent nationwide prospective study in the Netherlands⁹ showed that increasing severity of premalignant lesions at initial diagnosis (mainly severe dysplasia), male gender and greater age are relevant risk factors for GC development. Several years before, a higher risk of GC was found in subjects with IM Type III (incomplete type),¹⁰ and they concluded

Key words: preneoplastic lesions, gastric cancer, follow-up

Grant sponsor: Health Research Funds; **Grant number:** FIS Exp 030077; **Grant sponsor:** RETICC, Spanish Ministry of Health; **Grant number:** DR06/0020-0015

DOI: 10.1002/ijc.25273

History: Received 13 Nov 2009; Accepted 4 Feb 2010; Online 22 Feb 2010

Correspondence to: Carlos A. González, Unit of Nutrition, Environment and Cancer, Department of Epidemiology, Catalan Institute of Oncology (ICO), Barcelona, Spain, Fax: +34-932607787, E-mail: cagonzalez@iconcologia.net

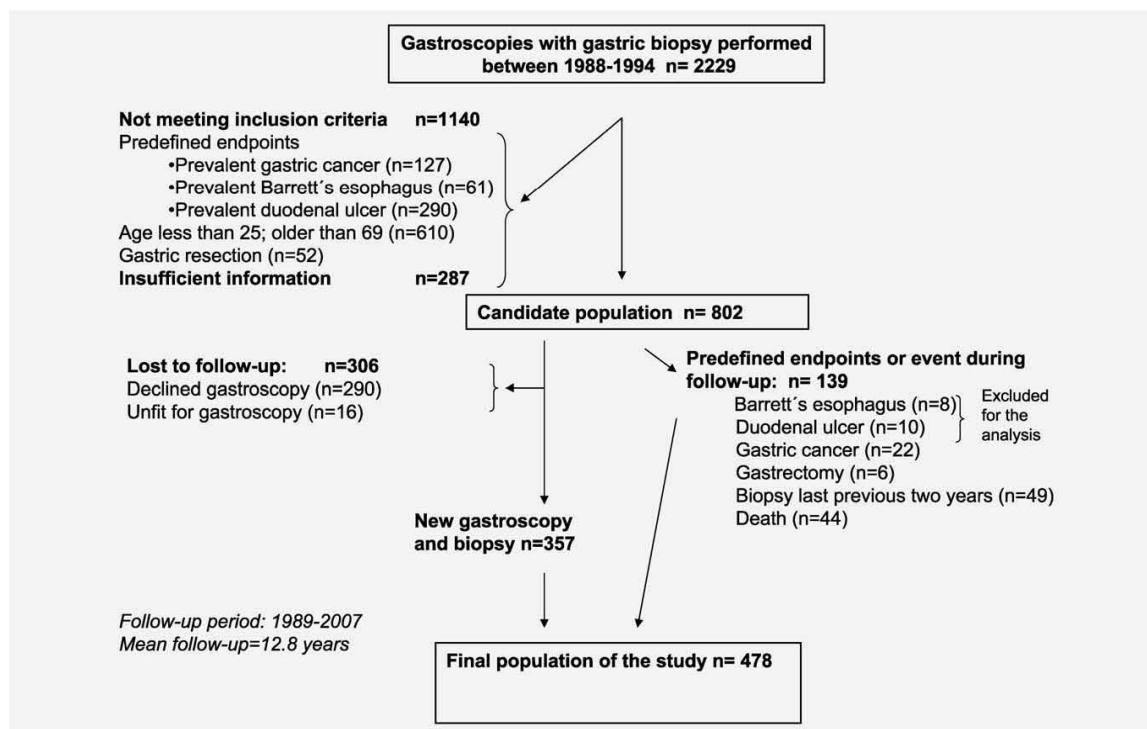


Figure 1. Participant flow diagram.

that subtyping of IM could be useful for identifying individuals at high risk of GC, although this is still controversial. Other authors¹¹ support that subtyping IM has no clinical value and that the pattern, extent and severity of atrophy is a more important predictor than IM subtype.

The aims of this study were to assess the progression of gastric preneoplastic lesions and to identify predictors of GC occurrence after a long-term follow-up in a region in Spain (province of Soria in Castilla Leon) with one of the highest incidence and mortality from GC (European adjusted mortality rates: 18.1 in males and 8.6 in females).¹²

Material and Methods

Study subjects

This is a prospective and retrospective follow-up study with 3 end points: GC, duodenal ulcer and Barrett's esophagus. In 2005, all patients who had undergone gastroscopy with gastric or esophageal biopsy ($n = 2,229$) at the Soria Hospital (the only National Health Service managed facility of a province of only 94,646 inhabitants in 2008) between January 1, 1988 and June 30, 1994, were identified from the Pathology Department Registry (Fig. 1). Preliminary study included all patients with preneoplastic gastric lesions, resident at the province of Soria, from both sexes. Of these, we excluded 1,427 patients with any of the following previous conditions: age outside the selected 25–69 year range ($n = 610$), preva-

lent peptic ulcer ($n = 290$), GC ($n = 127$) or prevalent Barrett's esophagus ($n = 61$), previous gastric resection ($n = 52$) and lack of information or other reasons ($n = 287$). The remaining 802 patients with a preliminary histological diagnosis of normal mucosa, chronic gastritis with or without IM or dysplasia in the first biopsy were selected for the study. All the patients' pathology reports were then reviewed to identify those patients who had already reached any of the pre-established end points and those were the candidates for a final gastroscopy. Ninety patients were considered to have already completed the selected follow-up outcomes. Among these, a gastric malignancy was diagnosed in 22 cases (20 adenocarcinomas, 2 lymphomas), a duodenal ulcer in 10 and Barrett's esophagus in 8 (Fig. 1). There were also 6 patients who had undergone a gastrectomy for a gastric ulcer and 44 who had died during the follow-up, for which the last previous gastroscopy and biopsy were taken into account. The death certificates were reviewed for those who had died to obtain the cause of death. Furthermore, we identified 49 patients that had undergone a gastroscopy with a gastric biopsy during the previous 2 years, and we took these biopsies as the end point, because it was considered unethical to perform a new one.

The remaining 663 patients were invited by letter and telephone call to undergo a new gastroscopy and gastric biopsy to provide a blood sample (30 ml), to answer a face-to-face

questionnaire on history of tobacco consumption, use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID), family history of GC (a case of GC in grandfathers, fathers, brothers or sons) and to assess prevalence of Hp infection. Two hundred and ninety declined and 16 were not suitable for a new gastroscopy. Information on these risk factors of interest in those patients with a predefined endpoint or event during follow-up who were not interviewed were obtained from medical records or questions to their relatives. All participating patients signed an informed consent giving permission for the procedures of the study, whose protocol was approved by the Ethical Committee of the Hospital.

Histopathology

According to the standard procedures of the institution at the time of the first gastric biopsy (between 1988 and 1994), 3–4 biopsy specimens were collected from the antrum, incisura or corpus for histological evaluation in all patients. For the final gastroscopy, the Sidney recommendations were followed and 5 specimens were obtained (1 from the angulus, 2 from the antrum and 2 from the corpus of the stomach). All biopsies (baseline and final), were formalin fixed and paraffin embedded. Sections of 4 μ m were obtained and stained with hematoxylin–eosin, Alcian blue–periodic acid Schiff (pH 2.5) and Giemsa. Additionally, for selected baseline biopsies with incomplete IM, some sections were stained with high-iron diamine–Alcian blue to detect sulfated mucins. Two pathologists (MLP and JMSA) reviewed the initial and final biopsies of all the included cases.

Hp infection

Giemsa stained Hp was detected during the histopathological examination. Furthermore, Hp infection was also identified by reviewing the medical records (results from urease test on biopsy specimen and urea breath test) and interviewing subjects about previous prevalence of Hp, treatment and results of treatment. The presence of a positive Hp infection among any of these sources of information was taken as the overall diagnosis for each subject. Information of use of proton pump inhibitors in the treatment was not available and therefore not taken into account in the analysis.

Histological diagnosis classification

The most advanced lesion observed in any of the biopsy fragments collected at the beginning and at the end of the study was used to classify every patient. For the 139 patients who completed follow-up prior to clinical reevaluation (Fig. 1), the diagnosis from either the end point biopsy (GC, duodenal ulcer, Barrett's esophagus) or the last biopsy available prior to gastrectomy or death was taken into account. The classification of the diagnosis was the following: 1: normal mucosa/minimal change; 2: nonatrophic gastritis (NAG); 3: non-metaplastic multifocal atrophic gastritis (MAG); 4: multifocal atrophic gastritis with intestinal metaplasia (IM); 5: dysplasia; 6: carcinoma. On the basis of morphology and mucin stain-

ing, IM was subclassified¹⁰ as “complete” (small intestinal type or Type I, characterized by brush border cells and goblet cells, but lacking the hybrid columnar “intermediate” cells, which are typical of the incomplete IM or “incomplete” (colonic type or Types II and III) that also contain goblet cells, but the predominant cell type is the hybrid “intermediate” nongoblet mucous columnar cells with cytoplasmic drops of different size. This hybrid mucous cells are easily identified because they show, with the mucinohistochemical AB-PAS (pH 2.5), a mixed phenotype gastric and intestinal pattern: red for neutral gastric mucins and blue for a combination of intestinal mucins. Mixed, predominant complete types or incomplete types were also considered.

To assess the observer variability of the histological diagnosis, a random sample of 10% of the pathological samples were included in a blinded study, where they were examined twice by the same pathologist (intra-observer variability) and by another pathologist not involved in the study (inter-observer variability).

Statistical analysis

Cox proportional hazards models were used to estimate hazards ratios (HRs) with 95% confidence intervals (CI). The current analysis is based only on GC end points, because of the low observed number of cases of Duodenal Ulcer ($n = 10$) and Barrett's esophagus ($n = 8$). Entry time was defined as age at recruitment and final time as the age at diagnosis of GC, the age at censoring for at-risk subjects or the age at end of follow-up. The risk of GC was measured in a univariate and multivariate analysis, according to baseline histological diagnosis, age, sex, tobacco consumption and use of NSAID, family history of GC and prevalence of Hp infection.

Results

The analysis was based on 478 subjects, after the exclusion of 10 patients diagnosed with duodenal ulcer and 8 diagnosed with Barrett's esophagus during the follow-up. The mean age of the patients was 50.0 years (SD = 12.19) and 47% were males (Table 1). The histological diagnosis at baseline examination was 1.7% ($n = 8$) normal, 11.5% ($n = 55$) with NAG, 46% ($n = 223$) with MAG and 40% ($n = 192$) with IM. No dysplasia cases were observed. Among the IM patients, 54.2% ($n = 104$) were diagnosed as complete or predominantly complete and 45.8% ($n = 88$) as incomplete or predominantly incomplete. Regarding intra-observer concordance, the weighted kappa statistic was 0.58 for diagnosis of subtype of metaplasia and 0.43 for the global histological diagnosis. For the inter-observer concordance, the ponderate kappa statistic was 0.55 for diagnosis of subtype of metaplasia and 0.41 for the global histopathological diagnosis.

Table 1 also presents the histopathological diagnoses at baseline in relation to age, gender and other risk factors. A greater proportion of males and older patients had more advanced lesions. Up to 76.4% of NAG cases were Hp positive with a steady decrease in more advanced lesions.

Table 1. Histopathology diagnoses at baseline and risk factors

Baseline	Normal (N = 8)	NAG (N = 55)	MAG (N = 223)	IM		Total (N = 478)
				Complete or Predominant Complete (N = 104)	Incomplete Predominant Incomplete (N = 88)	
Male (%)	62.5	45.4	41.3	51.0	54.5	46.7
Mean age (SD)	36.3 (11.9)	45.4 (12.8)	48.1 (12.3)	51.8 (10.9)	56.5 (9.5)	50.0 (12.2)
Hp positive (%)	0	76.4	73.1	68.3	51.1	67.2
Ever smoker (%)	50	49.1	35.4	39.4	38.6	38.7
Years of consumption (mean)	14.5	18.3	18.5	24.2	30.2	21.7
Use of NSAID (%)	50	38.2	52	39.4	43.2	46.0
Use for more than 1 year (%)	37.5	27.3	29.6	19.2	23.9	26.2
Family history of gastric cancer (%)	12.5	14.5	11.7	13.5	23.9	14.6

Abbreviations: NAG: nonatrophic gastritis; MAG: multifocal nonmetaplastic atrophy; IM: intestinal metaplasia.

Prevalence of ever smokers was 38.7% and no clear differences were observed between histopathological groups. In contrast, use of NSAID varied according to the histological diagnosis. Prevalence of family history of GC was particularly high (23.9%) in subjects with incomplete IM.

After a mean follow-up of 12.8 years (SD = 4.07), 23 GC cases (4.8%) were diagnosed (Table 2). The incidence rate was 3.77 (CI 95% 2.51–5.67) per 1,000 person/years. Of the GC cases, 21 were adenocarcinomas (2 diffuse, 16 intestinal and 3 mixed) and 2 were malignant lymphomas. Of the 21 adenocarcinomas, 16 had an incomplete IM at baseline diagnosis (including the 2 diffuse types), 1 had a complete IM and 4 had a MAG. One gastric lymphoma had a MAG at baseline diagnosis and the other had a NAG. The proportion of subjects with incomplete IM that developed a GC during the follow-up was 18.2%, while it was only 2.2% for MAG. The incidence rate of GC was 16.46 (95% CI 10.08–26.86) for incomplete IM and 1.73 (95% CI 0.72–4.16) per 1,000 person/years for MAG. To estimate the extension of IM, the number of fragments with IM and the total number of fragments was recorded for each biopsy. The percentage of fragments with IM was higher among the cases that developed a GC in comparison with those that did not develop a GC, but the differences were not statistically significant (data not shown).

Incomplete IM was the baseline diagnosis with the highest risk of developing a gastric adenocarcinoma (HR 11.3; 95% CI 3.8–33.9) (Table 3). We also found a strong and significant risk of developing a gastric adenocarcinoma for those subjects with a family history of GC (HR 6.11; 95% CI 1.67–22.4). While age and gender were significant risk factors in the univariate analysis (HR 4.18; 95% CI 1.12–15.61 for patients older than 60 years and HR 5.51; 95% CI 1.85–16.4 for males), they became weaker and nonsignificant after adjusting for the other risk factors. We observed a nonsignificant negative association between regular use of NSAID for more than 5 years and risk of GC (HR 0.43; 95% CI 0.12–1.49). Prevalence of Hp

infection at baseline and smoking were not associated with the risk of GC (data not shown).

Discussion

In a province located in a region with one of the highest incidence of and mortality from GC in Spain and Western Europe, we carried out a relatively large observational follow-up study with a long follow-up. Gastroscopies at the beginning and at the end of follow-up were performed allowing us to evaluate the occurrence of GC among patients with preneoplastic lesions and the influence of Hp infection and other factors in this process. We found that the probability of developing a GC is strongly and significantly associated with incomplete IM and a family history of GC.

During 12.8 years of follow-up, 23 patients (4.8%) developed GC, this translates to an average of 0.37% per year. This is similar to the results obtained in a prospective study in Japan⁸ where 2.9% of patients (36 incident cases) developed a GC after 7.8 years of follow-up, which is an average of 0.37% per year. A slightly lower proportion was obtained in another prospective study in a high risk area of China⁷ where 1% (34 incident cases) developed a GC after a mean of 4.5 years of follow-up, which means an average of 0.22% per year. It is well known that the age-standardized incidence rate of GC is two-fold higher in men than women¹³ and other prospective studies^{7,8} have also found a higher GC risk among males and older subjects. Moreover, it has been suggested that sex hormones may protect women against GC¹⁴ and results from recent epidemiological studies support this hypothesis.^{15,16} While in our population a higher risk of developing GC was observed for individuals older than 60 years and males in the univariate analyses, it disappeared after adjusting for other variables.

Incomplete IM was the only baseline diagnosis associated with a high and significant risk of developing GC. This supports that subtyping of IM is useful to identify subjects at high risk for GC. In addition, it has previously been shown

Table 2. Number and proportion (as percentage between brackets) of patients according to diagnoses at baseline and at the end of follow-up

Diagnoses at baseline	Diagnoses at the end of follow-up									Total
	Normal	NAG	MAG	IM complete	IM mixed pred complete	IM mixed pred incomplete	IM incomplete	Dysplasia	Gastric cancer	
Normal	3	3	1	0	0	0	1	0	0	8 (1.67)
NAG	3	24	12	5	4	1	5	0	1	55 (11.51)
MAG	16	60	94	11	14	11	10	2	5	223 (46.65)
IM complete	4	5	11	7	20	9	13	0	0	69 (14.44)
IM mixed predominant complete	1	6	2	2	11	12	0	0	1	35 (7.32)
IM mixed predominant incomplete	0	0	3	4	13	31	7	0	9	67 (14.02)
IM incomplete	1	2	6	0	2	1	2	0	7	21 (4.39)
Total	28 (5.86)	100 (20.92)	129 (26.99)	29 (6.07)	64 (13.39)	65 (13.60)	38 (7.95)	2 (0.42)	23 (4.81)	478 -100

Bold values = subjects with no changes.

Abbreviations: NAG: nanotrophic gastritis; MAG: multifocal nonmetaplastic atrophy; IM: intestinal metaplasia.

that close endoscopic surveillance of patients with type III IM (columnar cells with sulfated mucines) was associated with an increased frequency of early GC diagnosis.¹⁷ Another prospective study¹⁰ also observed a higher risk of developing GC for Types II and III IM, compared with Type I. A short follow-up study of patients with atrophic chronic gastritis or IM¹⁸ has shown that patients with Types II or III IM were at highest risk for developing a dysplasia and only patients with Type III IM progress to high grade dysplasia. A study in Italy found that type and extension of IM, and immature hyperproliferative lesions, labeled as “indefinite for dysplasia” according to the Padova classification, were the most sensitive screening parameters for identification of subjects with increased GC risk. However, evidence is not consistent and in other studies²⁰⁻²² IM subtyping was not found to play a major role in predicting GC. These studies^{20,21} were cross-sectional observations with no follow-up or limited to a small number of patients.²² Whether IM is reversible or not is still a matter of controversy.²³ A follow-up study of different subtypes of IM²⁴ concluded that Type I IM is a short-term reactive process that generally regresses while Type III IM is related to prolonged injury and chronicity and may regress or progress to dysplasia. In our study, regression to less advanced lesions was found in 29 (28%) of the 104 cases with complete or predominant complete IM and only 12 (14%) of the 88 cases with incomplete or predominant incomplete IM.

The pattern, extent and severity of gastric atrophy, with or without IM, have been postulated as the best prognostic markers of GC with pre-malignant lesions.¹¹ However, the predictive value of NAG and MAG in our population was very low since only one of the 23 incident GC arose from a NAG and 5 from a MAG. It is noteworthy that the classification of atrophic gastritis suffers from considerable inter-

Table 3. Hazard ratio¹ of gastric cancer of preneoplastic lesion after a mean of 12.8 years of follow-up, according to different factors (based on 21 adenocarcinoma cases and 478 subjects with preneoplastic lesions)

Factor	Hazard ratio	95% Confidence interval
Male (vs. female)		
Univariate	5.51	1.85–16.4
Multivariate	2.34	0.72–7.61
Age (older than 60 yr)		
Univariate	4.18	1.12–5.6
Multivariate	1.47	0.37–5.86
Incomplete or predominant incomplete intestinal metaplasia (present vs absent at baseline)		
Univariate	13.7	4.92–38.0
Multivariate	11.3	3.80–33.9
Family history of GC (yes vs. no)		
Univariate	6.92	1.93–24.8
Multivariate	6.11	1.67–22.4
NSAID use (more than 5 yr, vs. no)		
Univariate	0.43	0.13–1.40
Multivariate	0.43	0.12–1.49

¹Multivariate analysis adjusted by each of the other factors.

server variation and that recognition and grading of gastric atrophy remains inadequate.⁴ On the other hand, subtyping of IM, as described by Jass and Filipe,²⁵ showed a very good predictive value: 16 out of 23 incident GC developing from an incomplete IM. Contrary to gastric atrophy, inter-observer agreement in the classification of these subtypes of IM is generally considered satisfactory.⁴ In line with these observations,

inter- and intra-observer concordance in our study was also good for the diagnosis of type of metaplasia.

We found an almost 5 times higher GC risk in patients with a family history of GC compared to patients without family history. This is higher than the risk observed in another prospective study in Japan.²⁶ It is well known that individuals reporting a family history of GC experience an increased risk of GC.²⁷ Our result could be an indicator of the role of genetic susceptibility on the risk of GC,²⁸ which could explain, in part, the high risk in this population, but it could also be due to the effect of sharing environmental factors between family members.²⁹

Hp infection is a well-recognized risk factor for precancerous lesions of the stomach.³⁰ In our study, we found that it is not a predictor of GC. It is well known that severe chronic gastritis and extended IM in stomach mucosa create conditions in which Hp is unable to survive and favor clearance of the infection. In agreement with this, we observed that the prevalence of the infection decreased as the lesion advanced and therefore the HR was lower in the more advanced lesions. This fact, together with the low number of normal mucosa analyzed in this study, could explain our results. Similarly, several epidemiological studies^{31–34} have shown that smoking is a strong risk factor of precancerous stomach lesions and is associated with their progression toward GC. We observed a relatively high prevalence of smokers in subjects with all types of lesions, but the group of subjects with normal mucosa was too small to enable comparison to be made. We also observed a nonsignificant negative association between consumption of NSAID and the incidence of GC. A meta-analysis³⁵ has shown that users of aspirin and non-aspirin NSAID experienced a lower risk of GC than non-users, which is in agreement with the role of NSAID as inhibitors of COX-2, a stimulator of cell proliferation and angiogenesis.³⁶

Strengths of this study are the long follow-up and the relatively large size. Although the sample is not based in a random sample from the general population, the cases were selected from the single hospital facility in the small province of Soria. This meant that the study included all the cases occurring in this population, who probably visited the Hospital due to gastric related symptoms, and who had a previous gastric biopsy between January 1, 1988 and June 30, 1994. In addition, screening and surveillance of the general population is not cost-effective except in countries with a very high risk of GC like Japan. The main aim of the study was to identify markers of high risk patients among those who have had an

endoscopic examination. The same pathologists classified the patients at baseline and at the end of follow-up, and the level of agreement in the study regarding intra- and inter-observer variability was quite good. There are also some limitations: the endoscopic techniques were more standardized at the end of follow-up than at baseline, although the gastroenterologist that took the biopsies at the end of the study was one of those who performed gastric biopsies at baseline. The number of biopsies was higher at the end, when the Sidney recommendations were followed. As the accuracy of the diagnosis depends on the number of biopsy sites³⁷ and the chance of detecting advanced lesions is higher if the number of biopsies increases, some level of underestimation of advance lesion at baseline is possible in our study. The participation rate of those patients selected for a second biopsy was relatively low, although a 56% of participation for a gastroscopy and biopsy for research purposes is good, especially for a Western country. We checked for potential bias associated with the participation rate. We compared the basal diagnosis, age and sex of those who did not accept to participate with those who accepted, and we observed no differences regarding sex and basal diagnosis and only minor differences regarding age, as those who did not accept were slightly older. Finally, although serum pepsinogen status has been proposed as an effective measure to predict the development of GC,³⁸ in this study we could not assess its value because blood samples from patients at recruitment were not available.

To conclude, our study indicates that subtyping of IM and family history of GC may be useful parameters to identify high-risk patients. A study on patients with gastric lesions requiring follow-up,³⁹ that compared survival of those who accepted annual surveillance with those who declined, has shown an impressive improvement in those who accepted (50% at 5 years vs. 10%). To identify high-risk patients who should be included in a program of more intensive surveillance, further research is needed to confirm whether subtyping of IM is useful marker as well as about the role of other prognostic markers.

Acknowledgements

The authors thank the participating patients and their families and to Ms. Pilar Lopez and Ms. Amalia Solana for their valuable collaboration in the field work, as well as Dr. J.M. Arrinda Yeregui (Pathological Department, Hospital de Bidasoa, Guipuzcoa, Spain) for his collaboration in the histopathological concordance.

References

- Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 1995;19 (Suppl 1):S37–43.
- Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* 1975;2: 58–60.
- Busuttill RA, Boussioutas A Intestinal metaplasia: a premalignant lesion involved in gastric carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:193–201.
- de Vries AC, Haringsma J, Kuipers EJ The detection, surveillance and treatment of premalignant gastric lesions related to *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2007;12:1–15.
- Axon A. Symptoms and diagnosis of gastric cancer at early curable stage. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006;20:697–708.
- Sant M, Aareleid T, Berrino F, Bielska Lasota M, Carli PM, Favre J, Grosclaude

- P, Hédelin G, Matsuda T, Møller H, Möller T, Verdecchia A, et al. EUROCARE-3: survival of cancer patients diagnosed 1990–94—results and commentary. *Ann Oncol* 2003;14 (Suppl 5):v61–118.
7. You WC, Li JY, Blot WJ, Chang YS, Jin ML, Gail MH, Zhang L, Liu WD, Ma JL, Hu YR, Mark SD, Correa P, et al. Evolution of precancerous lesions in a rural Chinese population at high risk of gastric cancer. *Int J Cancer* 1999;83:615–9.
 8. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001;345:784–9.
 9. de Vries AC, van Grieken NC, Looman CW, Casparie MK, de Vries E, Meijer GA, Kuipers EJ. Gastric cancer risk in patients with premalignant gastric lesions: a nationwide cohort study in the Netherlands. *Gastroenterology* 2008;134:945–52.
 10. Filipe MI, Muñoz N, Matko I, Kato I, Pompe-Kirn V, Jutersek A, Teuchmann S, Benz M, Prijon T. Intestinal metaplasia types and the risk of gastric cancer: a cohort study in Slovenia. *Int J Cancer* 1994;57:324–9.
 11. El-Zimaity HM. Gastric atrophy, diagnosing and staging. *World J Gastroenterol* 2006;12:5757–62.
 12. Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Epidemiología. Madrid, Spain. Available at: <http://193.146.50.130/ariadna.php>. Accessed on July 2009.
 13. Boyle P, Levin B. World Cancer Report 2008. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2008.
 14. Sipponen P, Correa P. Delayed rise in incidence of gastric cancer in females results in unique sex ratio (M/F) pattern: etiologic hypothesis. *Gastric Cancer* 2002;5:213–9.
 15. Freedman ND, Chow WH, Gao YT, Shu XO, Ji BT, Yang G, Lubin JH, Li HL, Rothman N, Zheng W, Abnet CC. Menstrual and reproductive factors and gastric cancer risk in a large prospective study of women. *Gut* 2007;56:1671–7.
 16. Frise S, Kreiger N, Gallinger S, Tomlinson G, Cotterchio M. Menstrual and reproductive risk factors and risk for gastric adenocarcinoma in women: findings from the canadian national enhanced cancer surveillance system. *Ann Epidemiol* 2006;16:908–16.
 17. Rokkas T, Filipe MI, Sladen GE. Detection of an increased incidence of early gastric cancer in patients with intestinal metaplasia type III who are closely followed up. *Gut* 1991;32:1110–3.
 18. Dinis-Ribeiro M, Lopes C, da Costa-Pereira A, Guilherme M, Barbosa J, Lomba-Viana H, Silva R, Moreira-Dias L. A follow up model for patients with atrophic chronic gastritis and intestinal metaplasia. *J Clin Pathol* 2004;57:177–82.
 19. Tava F, Luinetti O, Ghigna MR, Alvisi C, Perego M, Trespi E, Klersy C, Fratti C, Fiocca R, Solcia E. Type or extension of intestinal metaplasia and immature/atypical “indefinite-for-dysplasia” lesions as predictors of gastric neoplasia. *Hum Pathol* 2006;37:1489–97.
 20. Kang KP, Lee HS, Kim N, Kang HM, Park YS, Lee DH, Choe G, Kim JS, Jung HC, Song IS. Role of intestinal metaplasia subtyping in the risk of gastric cancer in Korea. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:140–8.
 21. Conchillo JM, Houben G, de Bruïne A, Stockbrügger R. Is type III intestinal metaplasia an obligatory precancerous lesion in intestinal-type gastric carcinoma? *Eur J Cancer Prev* 2001;10:307–12.
 22. Ectors N, Dixon MF. The prognostic value of sulphomucin positive intestinal metaplasia in the development of gastric cancer. *Histopathology* 1986;10:1271–7.
 23. Walker MM. Is intestinal metaplasia of the stomach reversible? *Gut* 2003;52:1–4.
 24. Silva S, Filipe MI, Pinho A. Variants of intestinal metaplasia in the evolution of chronic atrophic gastritis and gastric ulcer. A follow up study. *Gut* 1990;31:1097–104.
 25. Jass JR, Filipe MI. The mucin profiles of normal gastric mucosa, intestinal metaplasia and its variants and gastric carcinoma. *Histochem J* 1981;13(6):931–9.
 26. Inoue M, Tajima K, Kobayashi S, Suzuki T, Matsuura A, Nakamura T, Shirai M, Nakamura S, Inuzuka K, Tominaga S. Protective factor against progression from atrophic gastritis to gastric cancer—data from a cohort study in Japan. *Int J Cancer* 1996;66:309–14.
 27. Dhillon PK, Farrow DC, Vaughan TL, Chow WH, Risch HA, Gammon MD, Mayne ST, Stanford JL, Schoenberg JB, Ahsan H, Dubrow R, West AB, et al. Family history of cancer and risk of esophageal and gastric cancers in the United States. *Int J Cancer* 2001;93:148–52.
 28. González CA, Sala N, Capellá G. Genetic susceptibility and gastric cancer risk. *Int J Cancer* 2002;100:249–60.
 29. Czene K, Lichtenstein P, Hemminki K. Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database. *Int J Cancer* 2002;99:260–6.
 30. Valle J, Gisbert JP. *Helicobacter pylori* infection and precancerous lesions of the stomach. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1548–51.
 31. Kneller RW, You WC, Chang YS, Liu WD, Zhang L, Zhao L, Xu GW, Fraumeni JF, Jr., Blot WJ. Cigarette smoking and other risk factors for progression of precancerous stomach lesions. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1261–6.
 32. Russo A, Maconi G, Spinelli P, Felice GD, Eboli M, Andreola S, Ravagnani F, Settesoldi D, Ferrari D, Lombardo C, Bertario L. Effect of lifestyle, smoking, and diet on development of intestinal metaplasia in *H. pylori*-positive subjects. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1402–8.
 33. Nakamura M, Haruma K, Kamada T, Mihara M, Yoshihara M, Sumioka M, Fukuhara T, Chayama K. Cigarette smoking promotes atrophic gastritis in *Helicobacter pylori*-positive subjects. *Dig Dis Sci* 2002;47:675–81.
 34. Leung WK, Lin SR, Ching JY, To KF, Ng EK, Chan FK, Lau JY, Sung JJ. Factors predicting progression of gastric intestinal metaplasia: results of a randomised trial on *Helicobacter pylori* eradication. *Gut* 2004;53:1244–9.
 35. Wang WH, Huang JQ, Zheng GF, Lam SK, Karlberg J, Wong BC. Non-steroidal anti-inflammatory drug use and the risk of gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1784–91.
 36. Dai Y, Wang WH. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in prevention of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006;12:2884–9.
 37. Plummer M, Buiatti E, Lopez G, Peraza S, Vivas J, Oliver W, Muñoz N. Histological diagnosis of precancerous lesions of the stomach: a reliability study. *Int J Epidemiol* 1997;26:716–20.
 38. Watabe H, Mitsushima T, Yamaji Y, Okamoto M, Wada R, Kokubo T, Doi H, Yoshida H, Kawabe T, Omata M. Predicting the development of gastric cancer from combining *Helicobacter pylori* antibodies and serum pepsinogen status: a prospective endoscopic cohort study. *Gut* 2005;54:764–8.
 39. Whiting JL, Sigurdsson A, Rowlands DC, Hallissey MT, Fielding JW. The long term results of endoscopic surveillance of premalignant gastric lesions. *Gut* 2002;50:378–81.

3. Resumen del artículo 2

Gonzalez, C. A.; Figueiredo, C.; Lic, C. B.; Ferreira, R. M.; Pardo, M. L.; Ruiz Liso, J. M.; Alonso, P.; Sala, N.; Capella, G.; Sanz-Anquela, J. M. **Helicobacter pylori cagA and vacA genotypes as predictors of progression of gastric preneoplastic lesions: a long-term follow-up in a high-risk area in Spain.** *Am J Gastroenterol.* 2011 May; 106(5):867-74.

El objetivo de este estudio fue evaluar el papel que juega en la evolución de las LPCG los factores de virulencia del Hp cagA y vacA, con el fin de determinar un factor pronóstico asociado a Hp que permita seleccionar a los pacientes con mayor riesgo de progresión a cáncer gástrico. Formaron parte de este estudio 312 pacientes con LPCG correspondientes al estudio de seguimiento de 12'8 años, ya conocido en la provincia de Soria, de los cuales se pudo obtener muestras de calidad para el genotipado del Hp. La detección y caracterización de las cepas de Hp cagA y vacA se realizó en los bloques de parafina de las muestras de la biopsia gástrica del reclutamiento mediante PCR seguida de hibridación inversa sobre un ensayo de sonda lineal. En el análisis estadístico se utilizó la regresión logística no condicional. La edad media de los pacientes fue de 48'5 años, el 45 % hombres. Las cepas de Hp cagA-positivas, vacAs1 y vacAm1 se encontraron con mayor frecuencia en los pacientes con LPCG más avanzadas. La infección con cepas cagA-positivas, vacAs1, vacAm1 y vacA/s1m1 se asociaron de forma significativa con la progresión de las LPCG (OR de 2'28 IC del 95 % 1'13-4'58; OR de 2'90 IC del 95%: 1'38-6'13 y OR de 2'75, IC del 95%: 1'27-5'95 y OR de 3'38 IC del 95%: 1'34-8'53 respectivamente). También hubo una asociación significativa entre la infección con cepas que son simultáneamente cagA-positivas y vacAs1/m1 y la progresión de las LPCG (OR de 4'80, IC del 95%: 1'71-13'5) en relación a las personas infectadas simultáneamente con cepas cagA-negativas y vacAs2/m2 (OR de 1'98, IC del 95%: 0'74-5'27). Con estos resultados se puede considerar que la determinación del tipo de cepa de Hp puede ser útil para la identificación de pacientes con alto riesgo de progresión de las LPCG.

Helicobacter pylori *cagA* and *vacA* Genotypes as Predictors of Progression of Gastric Preneoplastic Lesions: A Long-Term Follow-Up in a High-Risk Area in Spain

Carlos A. González, PhD^{1,8}, Ceu Figueiredo, PhD^{2,3,8}, C. Bonet, Lic¹, R.M. Ferreira, PhD^{2,3}, M.L. Pardo, PhD⁴, J.M. Ruiz Liso, PhD⁴, P. Alonso⁵, N. Sala, PhD^{1,6}, G. Capella, PhD⁶ and J.M. Sanz-Anquela, PhD⁷

OBJECTIVES: There are no established predictive markers of progression of gastric preneoplastic lesions. The aim of this study was to analyze the relationship between *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* genotypes and progression of gastric preneoplastic lesions.

METHODS: This was a follow-up study that carried out in a province of Spain with a high risk of gastric cancer. A total of 312 patients who underwent upper endoscopy with gastric biopsy in 1988–1994 with diagnoses of normal mucosa, non-atrophic gastritis (NAG), non-metaplastic multifocal atrophic gastritis (MAG), and complete or incomplete intestinal metaplasia (IM), and who accepted to undergo a new biopsy during 2005–2007 or had an end point during follow-up, were included in this study. Detection and characterization of *H. pylori* *cagA* and *vacA* genotypes was performed directly in baseline paraffin-embedded gastric biopsy specimens by PCR followed by reverse hybridization onto a line probe assay. Inter- and intra-observer variability of histological diagnosis was assessed. Analysis was done using unconditional logistic regression.

RESULTS: The mean age of patients was 48.5 years (45% males) and the mean of follow-up was 12.8 years. *H. pylori* strains harboring *cagA*, *vacA* s1, and *vacA* m1 genotypes were more frequently found in patients with more advanced gastric preneoplastic lesions. Infection with *cagA*-positive, *vacA* s1, and *vacA* m1 strains was associated with progression of gastric preneoplastic lesions (multivariate odds ratio (OR)=2.28, 95% confidence interval (CI) 1.13–4.58; OR=2.90, 95% CI 1.38–6.13; and OR=3.38, 95% CI 1.34–8.53, respectively). Infection with strains that are simultaneously *cagA* positive and *vacA* s1/m1 was associated with progression of gastric precancerous lesions with an OR of 4.80 (95% CI 1.71–13.5) in relation to those infected with *cagA*-negative/*vacA* s2/m2 strains.

CONCLUSIONS: *H. pylori* genotyping may be useful for the identification of patients at high risk of progression of gastric preneoplastic lesions and who need more intensive surveillance.

Am J Gastroenterol 2011; 106:867–874; doi:10.1038/ajg.2011.1; published online 1 February 2011

INTRODUCTION

Experimental and epidemiological evidence indicates that gastric cancer (GC) is the result of a long multistep and multifactorial process (1). Chronic inflammatory gastritis in the antrum, usually associated with persistent *Helicobacter pylori* infection, is considered

to be the initial lesion, which may progress toward multifocal chronic atrophic gastritis (MAG) in the corpus, intestinal metaplasia (IM), dysplasia, and finally invasive carcinoma (2). *H. pylori* chronically infects more than half of the world's population and is a well-established cause of non-cardia GC, with attributable

¹Unit of Nutrition, Environment and Cancer, Catalan Institute of Oncology (IDIBELL-ICO), Barcelona, Spain; ²Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal; ³Medical Faculty of the University of Porto, Porto, Portugal; ⁴Pathology Department, Complejo Hospitalario de Soria, Soria, Spain; ⁵Gastroenterology Unit, Complejo Hospitalario de Soria, Soria, Spain; ⁶Translational Research Laboratory, Catalan Institute of Oncology (IDIBELL-ICO), Barcelona, Spain; ⁷Pathology Department, Alcala University Hospital Principe de Asturias, Madrid, Spain; ⁸These are the senior authors for this article.

Correspondence: Carlos A. González, PhD, Unit of Nutrition Environment and Cancer, Department of Epidemiology, Catalan Institute of Oncology (ICO), Barcelona, Spain and Ceu Figueiredo, IPATIMUP and Medical Faculty of Porto, Rua Dr Roberto Frias S/N, 4200-465 Porto, Portugal. E-mails: cagonzalez@iconcologia.net and cfigueiredo@ipatimup.pt

Received 22 September 2010; accepted 17 December 2010

fractions of 74% in developed countries and 78% in developing countries (3). Progression from initial gastritis toward more severe disease occurs only in a small proportion of the infected individuals and is likely to depend on host factors, exposure to lifestyle factors, and bacterial factors (4,5).

H. pylori is a genetically diverse bacterial species, and variability in virulence factors has a role in bacterial pathogenesis (6). The *cagA* gene is a strain-specific determinant, and a marker for the presence of the *cag* pathogenicity island. The *cag* pathogenicity island encodes a type IV secretion system, responsible for the injection of the CagA protein into the host cells (7). It has been shown that patients infected with *cagA*-positive strains are at a higher risk of developing GC than those infected by *cagA*-negative strains (5,8). Furthermore, infection with *cagA*-positive strains also increases the risk of developing MAG and IM (9–11).

Another gene related to *H. pylori* pathogenesis is *vacA*, encoding a bacterial toxin with multiple activities, including the induction of cytoplasmic vacuolation (12). The *vacA* gene, unlike *cagA*, is present in all *H. pylori* strains and comprises two main polymorphic regions: the *s*-region, encoding the signal peptide and existing as an *s1* or *s2* allele; and the *m*-region, encoding a host cell-binding site and existing as an *m1* or *m2* allele (13). Mosaic combinations of the *s*- and *m*-regions exist and relate to the *in vitro* cytotoxin activity. Active forms of VacA, such as those encoded by the *s1/m1* genotype, were shown to be associated with GC and with gastric preneoplastic lesions (5,9,11). The *cagA* and *vacA* genotypes are related: the majority of *cagA*-positive strains also contain the *vacA s1/m1* genotype, whereas most *cagA*-negative strains contain the *vacA s2/m2* genotype (9,11–13).

As far as we know, no study has assessed the role of variation in *vacA* virulence factor on the risk of gastric preneoplastic lesions, and only one study has evaluated the risk of progression of those lesions in patients infected with *cagA*-positive *H. pylori* strains, observing no statistical association (9).

The aim of this study was to assess the value of virulence-associated *H. pylori cagA* and *vacA* genotypes as predictors of progression of gastric preneoplastic lesions in a long-term follow-up study in a region (province of Soria, Castilla-Leon community) with one of the highest incidences and mortality from GC in Spain (European adjusted mortality rate in 2005: 18.1 in males and 8.6 in females) (14).

METHODS

Study subjects

This is a follow-up study of preneoplastic lesions for which more details are presented elsewhere (15). The total final study population consisted of 478 patients with gastric preneoplastic lesions identified from the Pathology Department Registry of the Soria Hospital (the only National Health Service managed facility of a province of only 94,646 inhabitants), as having had undergone gastroscopy with gastric biopsy between 1988 and 1994. Patients were followed-up until 2005–2007. Of the 478 patients, 121 were found to have a predefined end point diagnosed during follow-up. The remaining 357 patients were invited and they accepted to

undergo a new gastroscopy and biopsy, to provide a blood sample, and to answer a face-to-face questionnaire on history of tobacco consumption, use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, family history of GC, and prevalence of *H. pylori* infection. For 312 (65.3%) of the patients, who constitute the specific study population for this article, it was possible to obtain enough tissue of paraffin blocks from the baseline biopsy to extract good-quality DNA, which was used for *H. pylori* genotyping. All patients signed an informed consent giving permission for the procedures of the study, whose protocol was approved by the ethical committee of the Hospital.

Histopathology

According to the standard procedures of the institution at the time of the first gastric biopsy (between 1988 and 1994), 3 to 4 biopsy specimens (from antrum, incisura, or corpus) were collected for histological evaluation, whereas for the final gastroscopy, the Sydney recommendations were followed and five specimens were obtained (one from the incisura angularis, two from the antrum, and two from the corpus) (16). All biopsies (baseline and final) were formalin fixed and paraffin embedded. Sections of 4 μ m were obtained and stained with hematoxylin–eosin, Alcian blue–periodic acid Schiff (pH 2.5) and Giemsa. Additionally, baseline biopsies with incomplete IM were also stained with high-iron diamine–Alcian blue to detect sulfated mucins. Two pathologists (M.L.P. and J.M.S.-A.) reviewed the initial and final biopsies of all included cases.

H. pylori infection

H. pylori was detected during the histopathological examination in Giemsa-stained sections. Furthermore, the medical records (results from urease test on biopsy specimen and urea breath test) were reviewed and subjects were interviewed about previous prevalence of *H. pylori*.

DNA isolation from gastric biopsies and *H. pylori cagA* detection and *vacA s*- and *m*-region genotyping. *H. pylori* detection and characterization was performed in DNA extracted from paraffin-embedded gastric tissue of the baseline biopsy specimens. DNA was extracted mostly from gastric antral biopsies (76%). When these were not available, samples from the incisura angularis (19%) or corpus (5%) were used. Cuts of 10 μ m of formalin-fixed and paraffin-embedded blocks were obtained from each biopsy specimen, changing the blade after each block to avoid cross-contamination. Total DNA was extracted after digestion in a solution containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA, 0.1% sodium dodecyl sulfate, and 0.1 mg/ml proteinase K for at least 12 h at 55 °C. Proteinase K was inactivated by incubation for 10 min at 95 °C.

For PCR of the human housekeeping gene *GAPDH* (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), 10 μ l of the lysate was used, to monitor the DNA isolation procedure. In addition, 10 μ l of the lysate was used for separate PCR reactions for the *cagA* gene and for the *vacA s*- and *m*-regions, using biotin-labeled primers previously described (17,18). For detection and characterization of *H. pylori*, denaturated amplimers were reverse hybridized onto a

line probe assay (Labo Bio-Medical Products, Rijswijk, The Netherlands), containing two oligonucleotide probes for *cagA*, and for each of the *vacA* s1a, s1b, s1c, m1, m2a, and m2b genotypes, also as previously described (17,18). DNA from *H. pylori* strains with known genotypes were used as positive and negative controls.

Histological diagnosis classification

The most advanced lesion observed in any of the biopsy fragments collected at baseline and at the end of the study was used to classify every patient. For the 121 patients who completed follow-up before clinical re-evaluation, the diagnosis from either the end point biopsy (GC) or the last biopsy available before gastrectomy or death was taken into account. The classification of the diagnosis, based on morphology and mucin staining, was the following: 1, normal mucosa/minimal change; 2, non-atrophic gastritis (NAG); 3, MAG; 4, multifocal atrophic gastritis with complete or predominantly complete IM (small intestinal type or type I), characterized by brush border cells and goblet cells, but lacking hybrid columnar "intermediate" cells; 5, multifocal atrophic gastritis with incomplete or predominantly incomplete IM (colonic type or type II and III) that also contains goblet cells, but the predominant cell type is hybrid "intermediate" non-goblet mucous columnar cells with cytoplasmic drops of different sizes; 6, dysplasia; and 7, carcinoma.

To assess the observer variability of the histological diagnosis, a random selection of 10% of the pathological samples were included in a blinded study, in which slides were examined twice by the same pathologist (intraobserver variability), and by another pathologist not involved in the study (interobserver variability). The ponderate κ statistic was 0.58 for diagnosis of subtype of metaplasia, and 0.43 for the global histological diagnosis of the intraobserver concordance. For the interobserver concordance, the ponderate κ statistic was 0.55 for diagnosis of subtype of metaplasia and 0.41 for the global histopathological diagnosis.

Statistical analysis

The unconditional logistic regression model was used to estimate odds ratio (ORs) with 95% confidence intervals (CIs) of progression of gastric preneoplastic lesions according to *cagA* and *vacA* genotypes in the baseline. Progression was defined for each patient by comparing the baseline histological diagnosis with the outcome diagnosis. Progression was considered when the outcome diagnosis advanced one or more steps in relation to the baseline diagnosis, among the seven diagnostic categories between normal/minimum changes to cancer that define the sequence of the gastric carcinogenesis pathway. Regression was the inverse process. For the analysis we compared those who were *H. pylori* negative (reference category) with those who were *cagA* positive, *vacA* s1/m1, *vacA* s2/m2, and other combinations of *vacA* variants as well as using *cagA* negative, s2, m2, and s2/m2 as categories of reference. The risk for progression was measured in univariate and multivariate analyses (adjusting for baseline histological diagnosis, age, sex, tobacco consumption, use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and family history of GC).

RESULTS

The analysis was based on 312 patients, the mean age was 48.5 years (44.5% males), and mean of follow-up was 12.8 years. The number of cases according to the histological classification of the diagnosis at baseline was the following: 6 of normal mucosa/minimal change, 28 of NAG, 168 of MAG, 61 of complete or predominantly complete IM, and 49 of incomplete or predominantly incomplete IM. Overall, 243 (77.9%) of the patients included in the study were positive for *H. pylori* by PCR (Table 1). Of these, the status of *cagA* gene and *vacA* s- and m-region genotypes could be determined in 237 (97.5%), 222 (91.4%), and 229 (94.2%) cases, respectively.

Of the 243 infected patients, 113 (47.7%) harbored *cagA*-positive strains (Table 1). Genotyping of the *vacA* s-region revealed multiple strain infection in 14 (6.8%) cases, in whom both s1 and s2 alleles were found. Among these, the following combinations of s alleles were found: s1a + s2 ($n=2$), s1b + s2 ($n=9$), and s1a + s1b + s2 ($n=3$). Three cases were simultaneously infected with s1a and s1b strains, and for the analysis were considered as infected with s1 strains. Considering infection with a single s-region allele, *vacA* s2 strains were the most prevalent (53.6%), whereas the remaining (40.1%) patients were infected with s1 strains, the majority of whom were of the s1b subtype (26.8%). No s1c strains were found. In the *vacA* m-region, multiple strain infection was observed in 19.2% of patients, in whom both the m1 and the m2 alleles were detected. Infection with single strains, as assessed by the m-region genotyping, showed that *vacA* m2 strains were more common (52.0%) than *vacA* m1 strains (28.8%). All m2 strains were of the m2a subtype. Taking together the *vacA* s- and m-regions, the most prevalent strains were s2/m2 (41.3%), whereas the rare *vacA* s2/m1 strains were found in only 1.9% of patients. The presence of *cagA* was associated with *vacA* s1 as well as *vacA* m1 alleles (Table 2). In that sense, most of the strains that were *vacA* s1/m1 were positive for *cagA* (86.1%), whereas almost all *vacA* s2/m2 strains lacked the *cagA* gene (90.6%).

Infection with *H. pylori* was more frequent in NAG (92.9%) than in MAG (78.0%) or in IM (78.2%) (Table 3). The *cagA*-positive, *vacA* s1, and *vacA* m1 strains were more prevalent in patients with more severe lesions as complete and incomplete IM. In contrast, *cagA*-negative, *vacA* s2, and *vacA* m2 strains were more frequently found in patients with less severe lesions as MAG and NAG. No consistent relationships were observed between infection by multiple strains and the different histological diagnoses.

After a mean of 12.8 years of follow-up, 78 (25.0%) of the patients showed progression of their lesions, whereas in 103 (33.0%) patients regression was observed (Table 4). Progression to a more severe histological diagnosis occurred in a similar proportion in *H. pylori*-infected and -uninfected patients. However, in *H. pylori*-infected patients ($n=243$), progression was always more frequent in those infected with *cagA*-positive (30.1%), *vacA* s1 (34.8%), and *vacA* m1 (37.9%) strains than in those infected with the less virulent *cagA*-negative (20.1%), *vacA* s2 (18.5%), and *vacA* m2 (20.2%) strains. Progression was also more frequent in patients infected with *vacA* s1 and *vacA* m1 strains than in those infected with multiple strains. Taking together the *vacA* s- and m-regions,

Table 1. Baseline *Helicobacter pylori*, *cagA* status, and *vacA* s- and m-region genotypes in patients (N=312) with preneoplastic gastric lesions

	Frequency	Percent
<i>H. pylori</i> (n=312)		
Negative	69	22.1
Positive	243	77.9
<i>cagA</i> status ^a (n=237)		
Positive	113	47.7
Negative	124	52.3
<i>vacA</i> gene ^b		
s-region (n=222)		
s1	89	40.1
s2	119	53.6
s1s2	14	6.3
m-region (n=229)		
m1	66	28.8
m2	119	52.0
m1m2	44	19.2
s- and m-regions (n=211) ^c		
s1/m1	45	21.3
s1/m2	26	12.3
s2/m1	4	1.9
s2/m2	85	40.3

^aIn six cases, the *cagA* status could not be determined.
^bIn 21 and 14 cases, the *vacA* s- and m-regions, respectively, could not be genotyped.
^cOther *vacA* combinations, n=51 (24.2%).

the proportion of progression of lesions in patients infected with *vacA* s1/m1 strains (42.2%) was more than twofold higher than that of lesions of patients infected with *vacA* s2/m2 strains (17.7%). Considering the combination of *cagA* status with the *vacA* genotypes, patients infected with *cagA*-positive/*vacA* s1/m1 strains had a proportion of progression almost threefold higher (45.9%) than that of patients infected with strains with the lowest virulence combination of *cagA*-negative/*vacA* s2/m2 (16.9%). On the contrary, regression was higher in those patients who were *H. pylori* and *cagA* negative, *vacA* s2, *vacA* m2, *vacA* m1/m2, and *vacA* s2/m2.

Finally, we estimated the risk of progression of gastric preneoplastic lesions according to *H. pylori* *cagA* and *vacA* genotypes of the infecting strains at baseline, in a multivariate analysis adjusted for several risk factors (Table 5). Patients infected with *cagA*-positive strains were associated with a higher risk of progression when compared with those infected with *cagA*-negative strains (OR 2.28; 95% CI 1.13–4.58). An increased risk of progression was also associated with *vacA* s1 in comparison with *vacA* s2, (OR=2.90; 95% CI 1.38–6.13), and for *vacA* m1 in comparison with *vacA* m2 strains (OR 2.75; 95% CI 1.27–5.95). Infection with multiple

Table 2. Relationship between *vacA* types and the *cagA* status in *Helicobacter pylori*-infected patients at baseline

<i>vacA</i> ^b	<i>cagA</i> ^a		Total, N (%) ^c
	Positive, N (%)	Negative, N (%)	
s1	72 (84.7)	13 (15.3)	85 (39.6)
s2	17 (14.4)	101 (85.6)	118 (54.6)
s1s2	10 (76.9)	3 (23.1)	13 (6.0)
m1	49 (76.6)	15 (23.4)	64 (28.6)
m2	32 (27.4)	85 (72.7)	117 (52.2)
m1m2	25 (58.1)	18 (41.8)	43 (19.2)
s1/m1	37 (86.1)	6 (14.0)	43 (20.9)
s1/m2	21 (84.0)	4 (16.0)	25 (12.1)
s2/m1	0 (0.0)	4 (100.0)	4 (1.9)
s2/m2	8 (9.4)	77 (90.6)	85 (41.3)

^aIn six patients, *cagA* status could not be determined.
^bIn 21 and 14 patients, the *vacA* s- and m-regions respectively, could not be genotyped. There are 49 patients with other *vacA* combinations.
^cPercentages refer to 216 and 223 patients for whom information on *cagA* and s and *cagA* and m, respectively, was available.

H. pylori strains was not associated with the risk for progression (OR 0.86, 95% CI 0.16–4.56; and OR 0.55, 95% CI 0.19–1.61, for multiples strains determined by evaluation of the *vacA* s- and of the *vacA* m-region, respectively). When the *vacA* s- and m-region genotypes were considered together for the analysis, patients infected with *vacA* s1/m1 strains were more likely to show progression than those infected with *vacA* s2/m2. Furthermore, the combination of the *cagA* gene status with the *vacA* genotypes revealed that the risk of progression of gastric preneoplastic lesions in patients infected with *cagA*-positive/*vacA* s1/m1 strains was almost fivefold higher than that of patients infected with *cagA*-negative/*vacA* s2/m2 strains (OR 4.80; 95% CI 1.71–13.5). The risk of regression on the contrary (Table 6) was associated with *vacA* s2 strains. Regression was higher, but not significant, in patients infected with *vacA* m2, s2/m2, and *cagA*-negative *vacA* s2/m2 strains.

DISCUSSION

In a province located in a region with one of the highest incidence of and mortality from GC in Spain and Western Europe, we carried out an observational longitudinal study with a long follow-up. Gastroscopies at the beginning and at the end of follow-up allowed us to evaluate, in a relatively large sample, the risk of genetic variation in *H. pylori* virulence factors *cagA* and *vacA* associated with progression of gastric preneoplastic lesions. The major and novel finding of this study is that infection with virulent *H. pylori* strains (*cagA* positive, *vacA* s1, and *vacA* m1) is associated with a significant increased risk of progression of gastric preneoplastic lesions. The risk of progression was even higher when patients were infected with strains that were simultaneously *cagA* positive and *vacA* s1/m1. To the best of our knowledge, this

Table 3. *Helicobacter pylori*, cagA status, and vacA s- and m-region genotypes according to histological diagnoses of preneoplastic gastric lesions at baseline

	Normal, N (%)	NAG, N (%)	MAG, N (%)	Complete IM, N (%)	Incomplete IM, N (%)	Total
<i>H. pylori</i>						
Negative	6 (100)	2 (7.2)	37 (22.0)	11 (18.0)	13 (25.6)	69
Positive	0 (0.0)	26 (92.8)	131 (78.0)	50 (82.0)	36 (74.4)	243
cagA status ^a						
Positive	0 (0.00)	10 (41.7)	41 (31.8)	35 (71.4)	27 (77.1)	113
Negative	0 (0.00)	14 (58.3)	88 (68.2)	14 (28.6)	8 (22.9)	124
vacA gene ^b						
s-region						
s1	0 (0.0)	9 (37.5)	33 (26.6)	29 (64.4)	18 (62.1)	89
s2	0 (0.0)	14 (58.3)	84 (67.7)	13 (28.9)	8 (27.6)	119
s1s2	0 (0.0)	1 (4.2)	7 (5.7)	3 (6.7)	3 (10.3)	14
m-region						
m1	0 (0.0)	6 (23.1)	26 (21.1)	20 (40.8)	14 (45.2)	66
m2	0 (0.0)	12 (46.2)	77 (62.6)	18 (36.7)	12 (38.7)	119
m1m2	0 (0.0)	8 (30.8)	20 (16.3)	11 (22.5)	5 (16.1)	44
s- and m-regions ^c						
s1/m1	0 (0.0)	4 (16.7)	18 (15.4)	15 (34.1)	8 (30.8)	45
s1/m2	0 (0.0)	4 (16.7)	9 (7.7)	7 (15.9)	6 (23.1)	26
s2/m1	0 (0.00)	1 (4.2)	2 (1.7)	1 (2.3)	0 (0.0)	4
s2/m2	0 (0.00)	7 (29.2)	64 (54.7)	8 (18.2)	6 (23.1)	85

IM, intestinal metaplasia; MAG, multifocal atrophic gastritis; NAG, non-atrophic gastritis.
^aIn six cases, the cagA status could not be determined.
^bIn 21 and 14 cases, the vacA s- and m-regions, respectively, could not be genotyped. Percentages refer to the total number of cases with the same histological diagnosis.
^cThere are 51 patients with other vacA combinations.

is the first study assessing the effect of vacA genotypes and of the combined cagA and vacA genotypes in the progression of gastric preneoplastic lesions. The only study so far that has evaluated the effect of variation in virulence factors in the risk of progression of preneoplastic lesions was in a population from Venezuela with a larger sample size (9). Although a slight risk of progression was observed associated with cagA-positive strains in comparison with cagA-negative strains, the difference was not significant, probably because of the short time of follow-up (only 3.5 years).

GC is the final step of a pathway that is initiated by a chronic inflammatory process in response to *H. pylori* infection. Progression through this multistep process occurs only in some patients and seems to depend on bacterial, lifestyle, and host genetic factors (4–6). Infection with cagA-positive and vacA s1 and vacA m1 strains increases the risk for developing MAG, IM, as well as gastric carcinoma (5,9–11). We found, as in other studies, that cagA-positive, vacA s1, and vacA m1 strains were more prevalent in patients with more advanced lesions (complete and incomplete IM), than cagA-negative, vacA s2, and vacA m2 strains (5,9–11). Also, in keeping with previous observations,

H. pylori strains possessing cagA were most likely to possess the vacA s1/m1 genotype and conversely, strains that lacked cagA were most likely to possess the vacA s2/m2 genotype (9,11,13). It is known that this association is due neither to clonality nor to genetic linkage, as cagA and vacA genes are distant in the bacterial chromosome (19).

CagA is injected in the host cells via the type IV secretion system (T4SS) where it can be tyrosine phosphorylated by host cell kinases (7,20,21). Both phosphorylated and nonphosphorylated CagA can interact and activate multiple signaling factors leading to cell proliferation, cytoskeletal rearrangements, and disruption of cell–cell junctions (21,22). CagA phosphorylation occurs at specific Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA)-containing motifs, and to date, four different EPIYA motifs (A, B, C, and D) have been identified (23). In Western strains, those with increased number of EPIYA-C motifs have more profound CagA-induced cellular effects and are associated with increased risk for gastric carcinoma (24). CagA and the T4SS also stimulate production of the proinflammatory interleukin-8 by epithelial cells (25,26). Using the Mongolian gerbil model in long-term infection experiments,

Table 4. Progression and regression of gastric preneoplastic gastric lesions according to *Helicobacter pylori* infection, *cagA*, and *vacA* genotypes

	Progression		Regression		Total
	No	Yes	No	Yes	
<i>H. pylori</i>					
Negative	52 (75.4%)	17 (24.6%)	41 (59.4%)	28 (40.6%)	69
Positive	182 (74.9%)	61 (25.1%)	168 (69.1%)	75 (30.9%)	243
<i>cagA</i> status ^a					
Positive	79 (69.9%)	34 (30.1%)	81 (71.7%)	32 (28.3%)	113
Negative	99 (79.8%)	25 (20.2%)	82 (66.1%)	42 (33.9%)	124
<i>vacA</i> gene ^b					
s-region					
s1	58 (65.2%)	31 (34.8%)	67 (75.3%)	22 (24.7%)	89
s2	97 (81.5%)	22 (18.5%)	75 (63.0%)	44 (37.0%)	119
s1s2	12 (85.7%)	2 (14.3%)	9 (64.3%)	5 (35.7%)	14
m-region					
m1	41 (62.1%)	25 (37.9%)	50 (75.8%)	16 (24.2%)	66
m2	95 (79.8%)	24 (20.2%)	82 (68.9%)	37 (31.1%)	119
m1m2	36 (81.8%)	8 (18.2%)	26 (59.1%)	18 (40.9%)	44
s- and m-regions ^c					
s1/m1	26 (57.8%)	19 (42.2%)	34 (75.6%)	11 (24.4%)	45
s1/m2	18 (69.2%)	8 (30.8%)	20 (76.9%)	6 (23.1%)	26
s2/m1	3 (75.0%)	1 (25.0%)	4 (100.0%)	—	4
s2/m2	70 (82.3%)	15 (17.7%)	55 (64.7%)	30 (35.3%)	85
<i>cagA</i> and <i>vacA</i>					
<i>cagA</i> pos, <i>vacA</i> s1/m1	20 (54.1%)	17 (45.9%)	28 (75.7%)	9 (24.3%)	37
<i>cagA</i> neg, <i>vacA</i> s2/m2	64 (83.2%)	13 (16.8%)	48 (62.3%)	29 (37.7%)	77
Other combinations	73 (79.3%)	19 (20.7%)	63 (68.5%)	29 (31.5%)	92
Total	234 (75.0%)	78 (25.0%)	209 (67.0%)	103 (33.0%)	312

^aIn six cases, the *cagA* status could not be determined.

^bIn 21 and 14 cases, the *vacA* s- and m-regions, respectively, could not be genotyped.

^cThere are 51 patients with other *vacA* combinations.

it has been shown that the T4SS is essential for the induction of an early and severe corpus inflammation, associated with increased expression of proinflammatory cytokines and histopathological changes such as atrophic gastritis and IM (27). At late time points, only animals infected with T4SS-competent bacteria developed hypochlorhydria and hypergastrinemia, in parallel to focal dysplasia (27).

VacA toxin can induce multiple host cell activities. In mice, purified VacA induces gastric epithelial erosions whereas *in vitro*, the addition of VacA to epithelial cells results in cell vacuolation, membrane channel formation, disruption of endosomal/lysosomal function, and apoptosis (12,28). Interestingly, VacA interaction with parietal cells inhibits gastric acid secretion, mimicking the hypochlorhydric phenotype observed in *H. pylori*-infected patients (29).

In addition to the previously identified two main polymorphic regions of *vacA* gene, a third polymorphic determinant of vacuolating activity, the intermediate (i)-region, was described recently, and can exist as an i1 or i2 genotype (30). The *vacA* s1/i1/m1 and s1/i1/m2 strains, encoding active VacA forms, have been associated with gastric carcinoma (24). In this study, elucidating the *vacA* i-region genotype in the patients with s1/m2 strains could have refined the virulence of this group of strains. Although progress has been made, the mechanisms through which *H. pylori* infection with strains possessing CagA or active forms of VacA leads to cancer are still poorly understood.

The strengths of this study are the long follow-up and its relatively large size. Although the study is not based in a random sample from the general population, cases were selected from the single hospital facility in the small province of Soria,

Table 5. Risk of progression of gastric preneoplastic lesions according to *Helicobacter pylori* infection and cagA and vacA genotypes (unconditional logistic regression)

Risk factor	Multivariate ^a OR (95% CI)	
cagA positive	1.31 (0.61–2.82) (a)	2.28 (1.13–4.58) (b)
vacA s1	1.55 (0.70–3.41) (a)	2.90 (1.38–6.13) (c)
vacA m1	1.83 (0.79–4.24) (a)	2.75 (1.27–5.95) (d)
vacA s1/m1	2.11 (0.86–5.21) (a)	3.38 (1.34–8.53) (e)
cagA positive vacA s1/m1	2.73 (1.03–7.22) (a)	4.80 (1.71–13.5) (f)

CI, confidence interval; OR, odds ratio.

^aAdjusted for age, sex, histological diagnosis, smoking, family history of gastric cancer, consumption of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), and vacA s2/m2 or cagA-positive genotype; (a) *H. pylori* negative, (b) cagA negative, (c) vacA s2, (d) vacA m2, (e) vacA s2/m2, and (f) cagA negative vacA s2/m2 were used as reference categories.

Table 6. Risk of regression of gastric preneoplastic lesions according to *Helicobacter pylori* infection and cagA and vacA genotypes (unconditional logistic regression)

Risk factor	Multivariate ^a OR (95% CI)
cagA negative	1.42 (0.75–2.68) (a)
vacA s2	2.13 (1.07–4.25) (b)
vacA m2	1.66 (0.78–3.53) (c)
vacA s2/m2	1.76 (0.72–4.28) (d)
cagA-negative vacA s2/m2	1.98 (0.74–5.27) (e)

CI, confidence interval; OR, odds ratio.

^aAdjusted for age, sex, histological diagnosis, smoking, family history of gastric cancer, consumption of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), and vacA s1/m1 or cagA-negative genotype; (a) cagA positive, (b) vacA s1, (c) vacA m1, (d) vacA s1/m1, and (e) cagA positive vacA s1/m1 were used as reference categories.

which means that the study included all the cases occurring in this population, and attending the Hospital, probably because of gastric-related symptoms, where a gastric biopsy was performed between 1988 and 1994. The same pathologists classified the patients at baseline and at the end of follow-up, and the level of agreement in the histological classification was quite good according to intra- and inter-observer variability values. Technically, we succeeded in genotyping *H. pylori* cagA and vacA directly from paraffin-embedded gastric biopsy specimens in this relatively large sample. The highly sensitive PCR followed by hybridization to specific probes has been shown to have superior sensitivity when compared with culture and histopathology (17,18,31).

There are also some limitations: the endoscopic techniques were more standardized at the end of follow-up than at baseline, although the gastroenterologist who took the biopsies at the end of the study was one of those who performed gastric biopsies at

baseline. The number of biopsies was higher at the end, when the Sydney recommendations were followed. As the accuracy of the diagnosis depends on the number of biopsy sites, and the chance of detecting advanced lesions is higher if the number of biopsies increases, some level of underestimation of advanced lesion at baseline is likely. We compared the basal diagnosis, age, and sex of those who did not accept to participate in the study (44%) with those who accepted to go through a second gastric biopsy (56%), and we observed no differences regarding sex and basal diagnosis and only minor differences regarding age, being older than those who did not accept. In terms of characterization of other putative *H. pylori* virulence indicators, so far not much is known about sequence variation in the CagA EPIYA region and vacA i-region, and this has precluded the establishment of robust and reliable genotyping systems to be used in paraffin-embedded tissues.

To conclude, our study indicates that cagA-positive, vacA s1, and vacA m1 strains are significantly associated with the risk for progression of gastric preneoplastic lesions in this population. Genotypes of *H. pylori* could be useful for identifying high-risk patients who could be included in a program of more intensive surveillance of gastric preneoplastic lesions. Further studies in other populations are needed to confirm our findings.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the participating patients and their families and Pilar Lopez and Amalia Solana for their valuable collaboration in the field work, as well as Dr J.M. Arrinda Yeregui (Pathological Department, Hospital de Bidasoa, Guipuzcoa, Spain) for his collaboration in the histopathological concordance and Raúl Garcia for his collaboration as data manager.

CONFLICT OF INTEREST

Guarantors of the article: Carlos A. González, PhD and Ceu Figueiredo, PhD.

Specific author contributions: C.A. González, M.L. Pardo, J.M. Ruiz Liso, P. Alonso, N. Sala, G. Capella, and J.M. Sanz-Anquela have contributed to the conception and design of the study and to the collection of samples; C. Figueiredo and R.M. Ferreira have contributed to the genotyping; P. Alonso has contributed to the gastroscopy; C. Bonet has contributed to the statistical analysis; M.L. Pardo, J.M. Ruiz Liso, and J.M. Sanz-Anquela have contributed to the pathological review; and C.A. González and C. Figueiredo have contributed to the drafting of manuscript and preparation of the final version. All authors have contributed to the interpretation of results, revised all manuscript drafts, and approved the final version.

Financial support: This study was funded by the Health Research Funds (FIS Exp 030077 and PI081420) and RETICC (DR06/0020-0015) of the Spanish Ministry of Health, by the integrated action of the Ministry of Science and Innovation (MICINN PT2009-0177), by the EEA Financial Mechanism (Project PT0009), and by Calouste Gulbenkian Foundation. R.M.F. has a PhD grant from the Portuguese Foundation of Science and Technology.

Potential competing interests: None.

Study Highlights

WHAT IS CURRENT KNOWLEDGE

- ✓ Gastric cancer (GC) is the result of a long multistep and multifactorial process.
- ✓ Progression from preneoplastic lesions to more severe disease occurs only in a small proportion of those infected by *Helicobacter pylori*.
- ✓ It is likely to depend on host factors, lifestyle factors, and *H. pylori* virulence factors.
- ✓ There are no predictive clinical markers of progression.
- ✓ Strains possessing *cagA* and *vacA* s1/m1 are associated with a higher risk of preneoplastic lesions and GC.
- ✓ Only one study has evaluated the effect of *cagA*-positive strains in the risk of progression and none in relation with *vacA* s1/m1 strains.

WHAT IS NEW HERE

- ✓ The risk of progression in those infected with *cagA*-positive, *vacA* s1, and *vacA* m1 strains was more than two- to three-fold higher than in those infected with *cagA*-negative and s2 and m2 strains.
- ✓ The risk of progression was almost five times higher for those infected with *cagA*-positive and *vacA* s1/m1 strains in relation to those infected with *cagA*-negative/*vacA* s2/m2 strains.
- ✓ Genotyping *H. pylori* in patients with preneoplastic lesion could be useful for identifying patients with higher risk of progression who could be included in a program of more intensive surveillance.

REFERENCES

1. Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 1995;19 (Suppl 1): S37-43.
2. Correa P, Haenszel W, Cuello C *et al.* A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* 1975;2:58-60.
3. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 2006;118:3030-44.
4. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH *et al.* The role of interleukin-1 polymorphisms in the pathogenesis of gastric cancer. *Nature* 2001;412:99.
5. Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P *et al.* *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:1680-7.
6. Correa P, Schneider BG. Etiology of gastric cancer: what is new? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1865-8.
7. Odenbreit S, Püls J, Sedlmaier B *et al.* Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 2000;287:1497-500.
8. Huang JQ, Zheng GF, Sumanac K *et al.* Meta-analysis of the relationship between *cagA* seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology* 2003;125:1636-44.
9. Plummer M, van Doorn LJ, Franceschi S *et al.* *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated genotype and gastric precancerous lesions. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:1328-34.
10. Kuipers EJ, Pérez-Pérez GI, Meuwissen SG *et al.* *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the *cagA* status. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1777-80.
11. Nogueira C, Figueiredo C, Carneiro F *et al.* *Helicobacter pylori* genotypes may determine gastric histopathology. *Am J Pathol* 2001;158:647-54.
12. Cover TL, Blanke SR. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:320-32.
13. Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr *et al.* Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995;270:17771-7.
14. Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Epidemiología. Madrid, Spain; <http://193.146.50.130/ariadna.php>.
15. González CA, Pardo ML, Ruiz Liso JM *et al.* Gastric cancer occurrence in preneoplastic lesions: a long term follow up in a high-risk area in Spain. *Int J Cancer* 2010;127:2654-60.
16. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH *et al.* Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996;20:1161-81.
17. van Doorn LJ, Figueiredo C, Rossau R *et al.* Typing of *Helicobacter pylori* *vacA* gene and detection of *cagA* gene by PCR and reverse hybridization. *J Clin Microbiol* 1998;36:1271-6.
18. van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R *et al.* Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* *vacA*. *J Clin Microbiol* 1998;36:2597-603.
19. Bukanov NO, Berg DE. Ordered cosmid library and high-resolution physical-genetic map of *Helicobacter pylori* strain NCTC11638. *Mol Microbiol* 1994;11:509-23.
20. Selbach M, Moese S, Hauck CR *et al.* Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2002;277:6775-8.
21. Tammer I, Brandt S, Hartig R *et al.* Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: a novel kinase for CagA and crucial mediator of host cell scattering. *Gastroenterology* 2007;132:1309-19.
22. Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A *et al.* Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* 2003;300:1430-4.
23. Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A *et al.* Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:14428-33.
24. Basso D, Zambon CE, Letley DP *et al.* Clinical relevance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* gene polymorphisms. *Gastroenterology* 2008;135:91-9.
25. Brandt S, Kwok T, Hartig R *et al.* NF- κ B activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:9300-5.
26. Viala J, Chaput C, Boneca IG *et al.* Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. *Nat Immunol* 2004;5:1166-74.
27. Wiedemann T, Loell E, Mueller S *et al.* *Helicobacter pylori* *cag*-Pathogenicity island-dependent early immunological response triggers later precancerous gastric changes in Mongolian gerbils. *PLoS One* 2009;4:e4754.
28. Telford JL, Ghiara P, Dell'Orco M *et al.* Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp Med* 1994;179:1653-8.
29. Wang F, Xia B, Wu F *et al.* *Helicobacter pylori* VacA disrupts apical membrane-cytoskeletal interactions in gastric parietal cells. *J Biol Chem* 2008;283:26714-25.
30. Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M *et al.* A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology* 2007;133:926-36.
31. Scholte GH, van Doorn LJ, Cats A *et al.* Genotyping of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded gastric biopsy specimens: relation to histological parameters and effects on therapy. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1687-95.

3.1. Ampliación del artículo 2

Ferreira, R. M.; Figueiredo, C.; Bonet, C.; Pardo, M. L.; Liso, J. M.; Alonso, P.; Sala, N.; Capella, G.; Sanz-Anquela, J. M.; Gonzalez, C. A. **Helicobacter pylori vacA intermediate region genotyping and progression of gastric preneoplastic lesions.** *Am J Gastroenterol.* 2012 Jan; 107(1):145-6.

Con posteridad al trabajo anterior se valoró la relación de los polimorfismos i1 e i2 de la región intermedia i del gen vacA con la evolución de las LPCG. Formaron parte de este estudio 194 pacientes, Hp positivos, con muestras de ADN adecuadas (80% de la población Hp positiva). Se consiguió la amplificación de la región i en el 95% de los casos. El 30'4% fueron vacAi1, 55'7% fueron vacAi2 y el 8'8% vacAi1/vacAi2. Tras una media de 12'8 de seguimiento la progresión de las lesiones se produce con más frecuencia en los pacientes con cepas vacAi1 (32'2%) que en los pacientes con cepas vacAi2 (18'5%). La proporción de pacientes infectados por cepas de Hp vacAi1 que progresaron es similar a la que observó en pacientes con cepas vacAs1 (34'8%), vacAm1 (37'9%) o cagA-positivas (30'1%). Tras el análisis multivariante ajustado por la edad, el sexo los antecedentes familiares de cáncer gástrico, el consumo de AINES y de tabaco y el diagnóstico histológico, la infección con cepas positivas vacAi1 se asocia significativamente con la progresión de las LPCG (OR de 3'4 IC 95%: 1'4-8'1). Tras comparar los diferentes modelos de cepas de Hp según cada factor de virulencia y sus polimorfismos, el modelo que mejor explica los resultados es el que combina los factores vacAs vacAm y cagA. Conclusión el genotipado de la región i de vacA no mejora la predicción en la evolución de las lesiones con respecto al genotipado de la región s y m de vacA o del cagA.

C-reactive protein levels normalized and the patient was discharged in good clinical condition.

Syphilis is a highly infectious disease characterized by a chronic change between acute flares and latent phases. Primary syphilis, as a result of direct contact of skin or mucous membranes with spirochetes, is predominantly characterized by a solitary, painless ulcer (chancre), localized at the inoculation site (1). If untreated, exanthema, mucosal lesions, and lymphadenopathy will develop in most patients after 4–10 weeks. Pathophysiologically, symptoms are a consequence of widespread vascular and lymphatic dissemination of the spirochete *T. pallidum* (2). After secondary syphilis, most patients enter a latent disease stage called latent syphilis. At this stage of disease, it may take decades until patients show symptoms of tertiary syphilis including neurosyphilis and aortitis. However, spontaneous remission is possible and finally, up to one-fourth of patients will relapse from tertiary syphilis to secondary syphilis (3). Due to the highly contagious nature and serious cardiovascular and neurological complications of advanced stage of disease, early detection of syphilis is of utmost importance.

We present the complex presentation of an inflammatory bowel disease patient with an accelerated course from secondary to tertiary syphilis receiving infliximab. On admission, our patient presented with classical symptoms of secondary syphilis. Positive TPPA testing in cerebrospinal fluid was indicative of neurosyphilis, since Castro *et al.* (4) could recently demonstrate a high sensitivity of TPPA testing in cerebrospinal fluid for the detection of neurosyphilis. Due to the increasing use of immunosuppressants, inflammatory bowel disease patients are at increased risk of opportunistic infections (5). For this reason, gastroenterologists should be able to diagnose clinical symptoms of syphilis and consider immunosuppression as a risk factor of accelerated course of disease.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Eccleston K, Collins L, Higgins SP. Primary syphilis. *Int J STD AIDS* 2008;19:145–51.

2. Mullooly C, Higgins SP. Secondary syphilis: the classical triad of skin rash, mucosal ulceration and lymphadenopathy. *Int J STD AIDS* 2010;21:537–45.
3. Gjestland T. The Oslo study of untreated syphilis: an epidemiologic investigation of the natural course of the syphilitic infection based upon a re-study of the Boeck-Bruusgaard material. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 1955;35 (Suppl 34): 3–368; Annex I–LVI.
4. Castro R, Prieto ES, Aguas MJ *et al.* Evaluation of the *Treponema pallidum* particle agglutination technique (TPPA) in the diagnosis of neurosyphilis. *J Clin Lab Anal* 2006;20:233–8.
5. Toruner M, Loftus Jr EV, Harmsen WS *et al.* Risk factors for opportunistic infections in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2008;134: 929–36.

¹Department of Medicine B, University of Münster, Albert-Schweitzer-Campus, Münster, Germany;

²Gastroenterologische Gemeinschaftspraxis am Germania Campus, Münster, Germany;

³Dermatologische Gemeinschaftspraxis Warendorfer Strasse, Münster, Germany;

⁴Dermatopathologie, Friedrichshafen, Germany.

Correspondence: Dominik Bettenworth, MD, Department of Medicine B, University of Münster, Albert-Schweitzer-Campus, Gebäude A1, D-48149 Münster, Germany. E-mail: dominik.bettenworth@ukmuenster.de

Helicobacter pylori vacA Intermediate Region Genotyping and Progression of Gastric Preneoplastic Lesions

Rui M. Ferreira, BSc^{1,2,8}, Ceu Figueiredo, PhD^{1,2,8}, Catalina Bonet, Lic³, Maria L. Pardo, PhD⁴, Juan M. Ruiz Liso, PhD⁴, Pablo Alonso, PhD⁵, Nuria Sala, PhD^{3,6}, Gabriel Capella, PhD⁶, Jose M. Sanz-Anquela, PhD⁷ and Carlos A. González, PhD³

doi:10.1038/ajg.2011.389

To the Editor: In the May issue of the *American Journal of Gastroenterology*, we published that the risk of progression of gastric preneoplastic lesions was higher in patients infected with the most virulent *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* genotypes than in patients infected with the least virulent strains (1). In that study performed in a region with a high risk of gastric cancer, we focused on the s- and m-region genotypes of *vacA*.

A third polymorphic region of *vacA*, the intermediate (i)-region has been described that exists as an i1 or i2 genotype (2), having the i1 genotype been associated with gastric carcinoma (2,3). At the time of publication, we were unable to characterize the i-region due to the inexistence of suitable genotyping systems for paraffin-embedded tissues. Recently, we have been able to set up the adequate primers and polymerase chain reaction conditions for this region in these difficult samples. We have utilized them to characterize the i-region in the aforementioned population and to refine the risk of virulent *H. pylori* strains in progression of gastric preneoplastic lesions (1). In all, we tested 194 *H. pylori*-positive cases with DNA available, representing 80% of the *H. pylori*-infected population in the study (1), and achieved effective amplification of the i-region in 95% of the cases.

vacA i1 was present in 59 (30.4%) and *vacA* i2 was present in 108 (55.7%) cases. The remaining 17 (8.8%) cases had both i1 and i2 genotypes. After a mean of 12.8 years of follow-up, progression to more severe histological diagnosis occurred more frequently in patients infected with *vacA* i1 (32.2%) than in patients infected with *vacA* i2 (18.5%) strains. The proportion of patients that showed lesion progression when infected with *vacA* i1 strains was similar to that observed for patients infected with *vacA* s1 (34.8%), *vacA* m1 (37.9%), or *cagA*-positive (30.1%) strains. In multivariate analysis adjusted for age, sex, histological diagnosis, smoking, family history of gastric cancer, and consumption of non-steroidal anti-inflammatory drugs, infection with *vacA* i1 strains was associated with lesion progression with odds ratio of 3.4 (95% confidence interval: 1.4–8.1). We next fitted different models, for each bacterial virulence-associated locus (*vacA* s-, *vacA* m-, *vacA* i-regions, and *cagA*) and for *loci* combinations, and used the Akaike's information criterion to compare them. The model that best explains our results is the one that combines the *vacA* s- and m-regions and *cagA*.

In conclusion, genotyping of the *vacA* i-region in this population does not improve the prediction of progression given by the other *H. pylori* virulence-associated *loci*, at

least in the way that progression was previously defined (1).

CONFLICT OF INTEREST

Guarantors of the article: Ceu Figueiredo, PhD and Carlos A. González, PhD.
Specific author contributions: Study concept, design and sample collection: C.A. González, M.L. Pardo, J.M. Ruiz Liso, P. Alonso, N. Sala, G. Capella, and J.M. Sanz-Anquela; method design for *H. pylori* genotyping, sample typing, manuscript draft, and final version: R.M. Ferreira and C. Figueiredo; gastroscopies: P. Alonso; statistical analyses: C. Bonet; pathology reviews: M.L. Pardo, J.M. Ruiz Liso, and J.M. Sanz-Anquela; result interpretation and final approval of the manuscript: all authors.

Financial support: Health Research Funds (FIS Exp 030077 and PI081420) and RETICC (DR06/0020-0015) of the Spanish Ministry of Health; Integrated action of the Ministry of Science and Innovation (MICINN PT2009-0177); ERA-NET Pathogenomics (ERA-PTG/0001/2010) and Portuguese Foundation for Science and Technology (PTDC/SAU-SAP/120024/2010 and SFRH/BD/45841/2008).

Potential competing interests: None.

REFERENCES

- Gonzalez CA, Figueiredo C, Bonet C *et al.* *Helicobacter pylori cagA and vacA* genotypes as predictors of progression of gastric pre-neoplastic lesions: a long term follow up in a high-risk area in Spain. *Am J Gastroenterol* 2011;106:867-74.
- Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M *et al.* A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin

determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology* 2007;133:926-36.

- Basso D, Zambon CE, Letley DP *et al.* Clinical relevance of *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* gene polymorphisms. *Gastroenterology* 2008; 135:91-9.

¹Institute of Molecular Pathology and Immunology, University of Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal;

²Faculty of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal;

³Unit of Nutrition, Environment and Cancer, Catalan Institute of Oncology (IDIBELL-ICO), Barcelona, Spain;

⁴Pathology Department, Complejo Hospitalario de Soria, Soria, Spain;

⁵Gastroenterology Unit, Complejo Hospitalario de Soria, Soria, Spain;

⁶Translational Research Laboratory, IDIBELL-ICO, Barcelona, Spain;

⁷Pathology Department, Alcala University Hospital Principe de Asturias, Madrid, Spain;

⁸These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Ceu Figueiredo, PhD, Institute of Molecular Pathology and Immunology, University of Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal.

E-mail: cfigueiredo@ipatimup.pt

4. Resumen del artículo 3

Marin, F.; Bonet, C.; Munoz, X.; Garcia, N.; Pardo, M. L.; Ruiz-Liso, J. M.; Alonso, P.; Capella, G.; Sanz-Anquela, J. M.; Gonzalez, C. A.; Sala, N. **Genetic variation in MUC1, MUC2 and MUC6 genes and evolution of gastric cancer precursor lesions in a long-term follow-up in a high-risk area in Spain.** *Carcinogenesis*. 2012 May; 33(5):1072-80.

Es la primera vez que se realiza un estudio para valorar si la variabilidad genética o polimorfismos en los genes de las mucinas se asocian con la evolución de las LPCG. Para ello se genotiparon 22 tagSNPs en los genes de *MUC1*, *MUC2* *MUC6* de 387 pacientes con LPCG en el estudio de seguimiento de 12'8 años ya conocido en la provincia de Soria. Teniendo en cuenta el diagnóstico del reclutamiento y del final del seguimiento, las lesiones no se modificaron en el 43'1% de los pacientes, regresaron en el 28'7% y progresaron en el 28'2%. Tres SNPs, localizados en la región 3' de *MUC2* se asociaron significativamente con un menor riesgo de progresión de las lesiones. Se observó un aumento significativo de la probabilidad de regresión de las lesiones en tres SNPs localizados en la región 5' de *MUC2*. También se encontró una disminución significativa de la probabilidad de regresión en un SNP localizado en la misma región de *MUC2*. En el análisis estratificado la significación estadística se mantuvo sólo en aquellos sujetos positivos para la infección por Hp y en aquellos que no consumían AINES. El análisis de haplotipos mostró que tres haplotipos protegen frente a la progresión de las LPCG: dos haplotipos, uno en cada mitad del gen de *MUC2*, se asociaron significativamente con la disminución del riesgo de progresión de las lesiones (OR = 0'49, IC 95% = 0'28-0'85 y OR = 0'46, IC 95% = 0'25 -0'86, respectivamente) y otro haplotipo localizado en el extremo 5' se asoció con una mayor probabilidad de regresión (OR = 1'67, IC 95% = 1'02-2'73). No se encontró asociación significativa con los SNPs en los genes de *MUC1* y de *MUC6*. Los resultados del trabajo indican, por primera vez, que la variabilidad genética en el gen de *MUC2* se asocia con la evolución de las LPCG, especialmente en pacientes infectados por Hp, lo que sugiere que la mucina MUC2 tiene un papel relevante en la carcinogénesis gástrica.

Genetic variation in *MUC1*, *MUC2* and *MUC6* genes and evolution of gastric cancer precursor lesions in a long-term follow-up in a high-risk area in Spain

Fátima Marín^{1,2}, Catalina Bonet², Xavier Muñoz^{1,2},
 Nadia García^{1,2}, María Luisa Pardo³, Juan María Ruiz-Liso³,
 Pablo Alonso⁴, Gabriel Capellà¹, José Miguel Sanz-Anquela⁵,
 Carlos A. González² and Núria Sala^{1,2,*}

¹Translational Research Laboratory, Institut Català d'Oncologia (IDIBELL-ICO), Gran Via, km 2.7 s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain, ²Unit of Nutrition, Environment and Cancer, Cancer Epidemiology program, Institut Català d'Oncologia (IDIBELL-ICO), L'Hospitalet de Llobregat, Spain,

³Pathology Department, Complejo Hospitalario de Soria, Spain,

⁴Gastroenterology Unit, Complejo Hospitalario de Soria, Spain and

⁵Department of Medical Specialties, College of Medicine, Alcalá University, Hospital Príncipe de Asturias, Spain

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 932607464;
 Fax: +34 932607466;
 Email: nsala@iconcologia.net

In order to assess whether inherited genetic variability in the mucin genes associates with the evolution of gastric cancer precursor lesions (GCPLs), we genotyped 22 tagSNPs in *MUC1*, *MUC6* and *MUC2* genes of 387 patients with GCPLs that had been followed up for 12.8 years. According to the diagnosis at recruitment and at the end of follow-up, the lesions did not change in 43.1% of the patients, regressed in 28.7% and progressed in 28.2%. Three SNPs in the 3'-moiety of *MUC2* were significantly associated with a decreased risk of progression of the lesions, whereas another four SNPs, located at the 5'-moiety, were found to be significantly associated either with increased [one single-nucleotide polymorphism (SNP)] or decreased (three SNPs) probability of regression. Stratified analysis indicated that significance was maintained only in those subjects positive for *Helicobacter pylori* infection and in those not consuming non-steroidal anti-inflammatory drugs, which were found protective against lesion progression. Haplotype analyses indicated the presence of two haplotypes, one in each moiety of the gene, that were significantly associated with decreased risk of progression of the lesions [odds ratio (OR) = 0.49 and 0.46; 95% confidence interval (CI) = 0.28–0.85 and 0.25–0.86, respectively]. The 5'-end haplotype was also associated with increased probability of regression (OR = 1.67; 95% CI = 1.02–2.73), altogether suggesting a protective role against progression of the precancerous lesions. No significant association was found with variants in *MUC1* and *MUC6* genes. These results indicate, for the first time, that genetic variability in *MUC2* is associated with evolution of GCPLs, especially in *H.pylori* infected patients, suggesting a role of this secreted mucin in gastric carcinogenesis.

Introduction

Mucins are high-molecular weight glycoproteins (50–80% O-linked oligosaccharides) synthesized by specialized epithelial cells as membrane-bound or secretory proteins that form higher-order structures (1,2). These glycoproteins represent the major constituents of the protective mucous layer of the gastrointestinal tract where they have a central role in maintaining epithelial homeostasis (3,4).

Normal gastric mucosa shows cell type-specific expression of secreted mucins MUC6, in glandular structures, and MUC5AC, in the surface epithelium. High levels of membrane-bound MUC1 have

Abbreviations: CI, confidence interval; GCPL, gastric cancer precursor lesion; IM, intestinal metaplasia; LD, linkage disequilibrium; NAG, non-atrophic gastritis; NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug; MAG, multifocal atrophic gastritis; OR, odds ratio; SNP, single-nucleotide polymorphism; TR, tandem repeat.

also been detected in both deep glands and superficial epithelium. This specific pattern of expression is altered in the process of neoplastic transformation of the stomach, with decreased expression of MUC6, overexpression of MUC1 and the novo expression of secreted MUC2 (5–7). Alteration in the expression pattern of mucins may modify their epithelial functions, which in turn may influence the tumorigenicity and metastatic properties of cancer cells (8,9).

Gastric cancer is the result of a long multistep and multifactorial process that involves well-characterized sequential stages. The initial lesion is an inflammatory process, usually associated with *Helicobacter pylori* infection, that results in a chronic superficial gastritis, which progresses toward atrophic gastritis, intestinal metaplasia and, finally, to dysplasia and adenocarcinoma (10,11). Although *H.pylori* is the most important established risk factor for gastric cancer development, other environmental and lifestyle factors, as well as host genetic susceptibility, are involved in the cancer process (12).

MUC2 and *MUC6* genes are located at 11p15.5, in a recombination-rich region containing a 400 kb gene cluster which also contains two other mucin genes (*MUC5AC* and *MUC5B*). Their 5' region is highly similar and is clearly differentiated from the 3' region by a large central tandem repeat (TR) domain, which is in exon 30 in *MUC2* and in exon 31 in *MUC6*. In contrast, the C-terminal domain is encoded by 19 exons in *MUC2* and only 2 exons in *MUC6* (13). *MUC1* localizes in 1q21 and it is a smaller gene with its TR region in exon 2. Some studies have addressed the role of genetic polymorphisms in mucosal protection genes but most of them have been focused on the serine and threonine-rich VNTR (variable number of TRs), characteristic of the *MUC* genes (14–20). More recently, a functional single-nucleotide polymorphism (SNP) (rs4072037) in *MUC1* has been strongly associated with gastric cancer in Asian populations (21–23). However, none of these studies have assessed how these inherited genetic variants predispose to progression or regression of premalignant lesions of the stomach, although MUCs have been long implicated in the pathogenesis of gastric carcinogenesis (4,9).

In the present study, we have used comprehensive genetic markers that capture the most common variability at each locus to analyze the constitutional genetic variability of *MUC1* (gene ID: 4582), *MUC2* (gene ID: 4583) and *MUC6* (gene ID: 4588) genes and to assess its relationship with the evolution of gastric cancer precursor lesions (GCPLs) after a long-term follow-up in a Spanish region with one of the highest incidence and mortality from gastric cancer.

Methods

Study population

The study population for association with the evolution of GCPLs consisted of 478 subjects from a follow-up study described in detail previously (24). Briefly, patients with GCPLs were identified from the Pathology Department Registry of the Soria Hospital as having undergone gastroscopy with gastric biopsy between 1988 and 1994. Patients were followed up until 2005–2007 (12.8 years of mean follow-up) when a new gastroscopy with biopsy was performed. Genomic DNA, either from blood ($n = 417$) or from paraffin-embedded tissue blocks when blood sampling was not possible ($n = 36$), was obtained from 453 (95%) patients. Sixty-six samples had to be excluded from this study because their DNA did not fulfill the minimum criteria required for genotyping in the Sequenom platform. The specific study population for genetic analysis was therefore of 387 patients with GCPLs (Table I).

Gastric lesions were classified, at recruitment and at the end of follow-up, as: 1 = normal, 2 = non-atrophic gastritis, 3 = non-metaplastic multifocal atrophic gastritis, 4 = complete intestinal metaplasia (IM, including predominant complete IM), 5 = incomplete IM (including predominant incomplete IM), 6 = dysplasia and 7 = gastric cancer. Based on the diagnosis at recruitment and at the end of follow-up, it was considered that the lesions had progressed or regressed if they had respectively advanced or regressed at least one point of in the overall score (1 to 7). The lesions were considered to be stable if they maintained the same score.

Table I. Main characteristics of the analyzed population

Characteristics	Total		No change		Regression		Progression		P value ^a
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Sex									
Men	178	46.0	74	44.3	46	41.4	58	53.2	
Women	209	54.0	93	55.7	65	58.6	51	46.8	0.182
Age									
<40	113	29.2	46	27.5	36	32.4	31	28.4	
40–50	85	22.0	37	22.2	26	23.4	22	20.2	
50–60	122	31.5	53	31.7	38	34.2	31	28.4	
>60	67	17.3	31	18.6	11	9.9	25	22.9	0.312
Use of NSAID									
No	196	51.7	76	46.3	55	49.5	65	62.5	
Yes	183	48.3	88	53.7	56	50.5	39	37.5	0.031
Family history									
No	317	84.5	145	87.9	89	82.4	83	81.4	
Yes	58	15.5	20	12.1	19	17.6	19	18.6	0.277
Smoking status									
Never	219	57.0	97	58.4	64	58.2	58	53.7	
Current	103	26.8	41	24.7	32	29.1	30	27.8	
Ex-smoker	62	16.2	28	16.9	14	12.7	20	18.5	0.727
<i>Helicobacter pylori</i> infection									
No	88	23.0	42	25.3	19	17.1	27	25.5	
Yes	295	77.0	124	74.7	92	82.9	79	74.5	0.219
Type of lesion ^b									
Normal	7	1.8	3	1.8	0	0.0	4	3.7	
NAG	44	11.4	20	12.0	2	1.8	22	20.2	
MAG	190	49.1	84	50.3	60	54.1	46	42.2	
Complete IM	68	17.6	31	18.6	26	23.4	11	10.1	
Incomplete IM	78	20.2	29	17.4	23	20.7	26	23.9	0.00028
Total	387	100	167	100	111	100	109	100	

MAG, multifocal atrophic gastritis; NAG, non-atrophic gastritis.

^aP value of the association between each variable and evolution status based on chi square.

^bType of lesion diagnosed at recruitment.

DNA extraction

Genomic DNA from blood samples was extracted from lymphocytes by use of the Flexigene DNA kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Paraffin-embedded tissue blocks were cut into 10 sections of 10 µm and deparaffinized in xylene. Genomic DNA extraction from the deparaffinized tissue was carried out using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). DNA concentrations were measured by optical density at 260 nm on a NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) spectrophotometer and stored at -80°C in 96-well plates at a concentration ~100 ng/µl.

SNP selection criteria

We selected tagSNPs from the 1q21 genomic region containing *MUC1* gene and from the mucin cluster in 11p15, which contains *MUC2* and *MUC6* genes. We used HapMap information for Caucasians [phase II CEU population, release 24, where CEU refers to CEPH (Utah residents with ancestry from northern and western Europe) population] to compile a list of SNPs from a minimum of 7 kb upstream to 3 kb downstream of each of the *MUC* genes. Unfortunately, due to absence of HapMap information for most of the *MUC5AC* gene, which also locates in the same cluster region, this gene could not be analyzed. Haplotype blocks were defined by use of the confidence intervals (CIs) method of Gabriel *et al.* (25), as implemented in Haploview v4.0 software (26). Tagging SNPs were selected by use of the Tagger algorithm as implemented in Haploview. Parameters used for tagSNPs selection were minor allele frequency ≥5% in Caucasians, $r^2 \geq 0.8$ between each pair of tagged and tagging SNPs (pairwise tagging) and SNPs tagging haplotypes with a frequency ≥0.05. Validated potentially functional SNPs replaced tagger selected tagSNPs only if they were in complete linkage disequilibrium (LD) with them.

Following these criteria, we defined two haplotype blocks spanning 51 kb in the 1q21 genomic region containing *MUC1* (4.4 kb) and part of *TRIM46* gene (at 855 bp 3'-downstream of *MUC1*) and we selected four tagSNPs, two for each block. In chromosome region 11p15, we defined a 29 kb haplotype block that included *MUC6* (23.9 kb) and was tagged by six tagSNPs. Also in 11p15, in the 47 kb genomic region that includes *MUC2* (29.5 kb), we defined seven haplotype blocks and 15 tagSNPs (Figure 1). Table II shows the main characteristics and location of all selected SNPs.

SNP genotyping and data filtering

The set of 25 tagSNPs selected in *MUC1*, *MUC2* and *MUC6* genes (Table II) were genotyped using the MassArray™ iPLEX-Gold technology (Sequenom) at the National Genotyping Center of Spain (CEGEN), in a customized assay design. In addition to the internal genotyping controls included by CEGEN, 17 samples (4.4%) chosen randomly were genotyped in duplicate for all tagSNPs to assess the genotyping error rate. Concordance of their genotypes was complete in all cases and no genotyping errors were observed. From the 25 SNPs initially selected, 3 were excluded (Table II) because they could not be amplified or their genotyping signal or cluster separation was not good enough. The total number of SNPs successfully genotyped and available for analysis was therefore 22. None of these SNPs deviated from Hardy-Weinberg equilibrium in the total analyzed population (chi-square test $P > 10^{-3}$; Table II). The average call rate of the analyzed SNPs was 98% and none of them had a call rate <80%.

Helicobacter pylori infection diagnosis

Helicobacter pylori infection was detected by histopathological examination of Giemsa-stained biopsies. Infection status was also identified by reviewing the medical records (results from rapid urease test on biopsy specimen and urea breath test) and interviewing subjects about previous prevalence of *H.pylori*. Finally, DNA was isolated from paraffin-embedded tissue blocks from available gastric biopsies ($n = 312$) and *H.pylori* detection and strain characterization was carried out as described previously (27). A positive result for any of these tests was taken as a positive *H.pylori* infection in the analyzed patient.

Association analyses

The Pearson χ^2 test was used to examine differences among the GCPLs evolution groups according to the main baseline characteristics of the population. In order to capture all the variability associated with the evolution of lesions, two type of analyses were performed (i) in the analysis of lesion progression, the group of patients whose lesions progressed were compared with those whose lesions remained stable or regressed (reference group); (ii) in the analysis of lesion regression, those patients whose lesions regressed were compared with those whose lesions remained stable or progressed. Odds ratios (OR) and 95% CIs were estimated using unconditional logistic regression, as

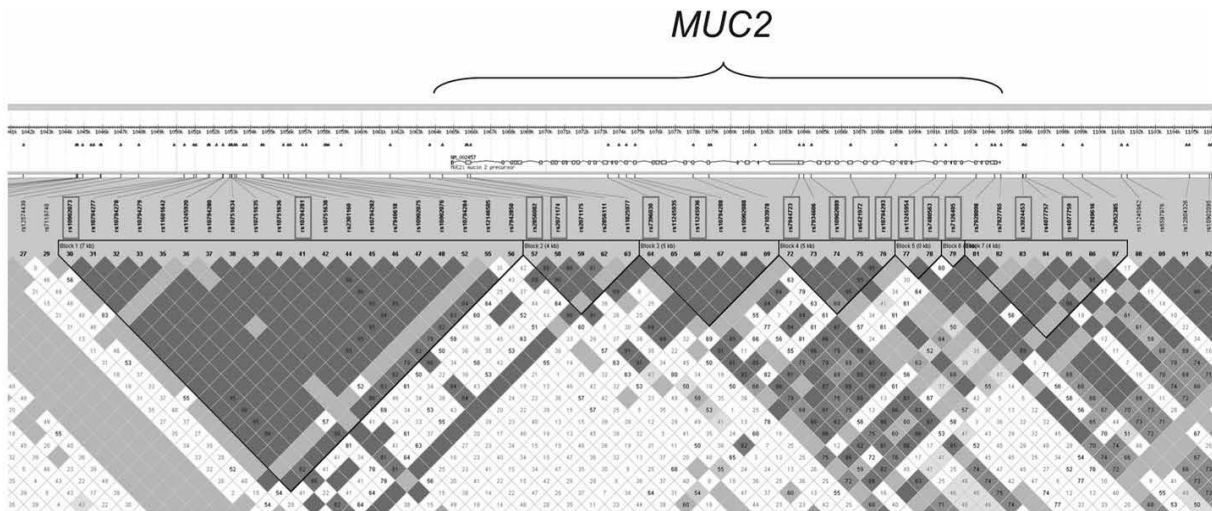


Fig. 1. LD structure in the 11p15.5 genomic region around *MUC2*, according to Haploview analysis of genotype data downloaded from HapMap (phase II CEU population, release 24 based on dbSNP version 126 and NCBI genome build 36). The LD map is shown as a confidence bounds scheme using Haploview, where black boxes indicate strong evidence of LD while white ones indicate strong evidence of recombination and the grey ones showing intermediate values. The 15 tagSNPs selected for study are indicated in square boxes and their numbering, from left (5') to right (3'), is the same as listed in Table 2, for *MUC2* SNPs, from top to bottom. The position and exon–intron structure of *MUC2*, in this region, is also indicated.

Table II. Selected SNPs in *MUC* genomic regions and genotyping results

Polymorphism	Gene	Allele ^a	Location ^b	Chromosome	Position ^c	Total		No change		Progression		Regression		HWE
						MAF	N	MAF	N	MAF	N	MAF	N	
rs3814316	<i>TRIM46</i>	C/T	T287T	1	153416342	0.32	383	0.31	164	0.35	108	0.31	111	0.1287
rs9426886	<i>TRIM46</i>	A/T	Intronic	1	153418378	0.42	387	0.42	167	0.45	109	0.39	111	0.2117
rs4072037 ^d	<i>MUC1</i>	A/G	T31T	1	153428691	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
rs1045253	<i>MUC1</i>	C/T	5'-upstream	1	153467859	0.31	372	0.29	161	0.33	104	0.33	107	0.7168
rs4076950	<i>MUC6</i>	C/T	Intronic	11	1005021	0.38	380	0.40	164	0.36	107	0.37	109	0.5150
rs7481521	<i>MUC6</i>	A/G	V615M	11	1017811	0.37	354	0.36	156	0.40	101	0.35	97	0.1391
rs11604757 ^d	<i>MUC6</i>	C/T	Intronic	11	1019320	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
rs11246384	<i>MUC6</i>	C/T	Intronic	11	1020448	0.09	385	0.10	165	0.07	109	0.09	111	0.3418
rs6597947	<i>MUC6</i>	G/T	5'-upstream	11	1027029	0.07	379	0.05	163	0.09	106	0.07	110	0.0194
rs9794921	<i>MUC6</i>	G/T	5'-upstream	11	1029867	0.13	366	0.11	158	0.16	102	0.15	106	0.2527
rs10902073	<i>MUC2</i>	C/A	5'-upstream	11	1050934	0.38	380	0.39	164	0.43	107	0.32	109	0.5150
rs10794281	<i>MUC2</i>	T/C	5'-upstream	11	1053149	0.44	359	0.45	157	0.48	99	0.38	103	0.5221
rs2856082	<i>MUC2</i>	C/G	5'-upstream	11	1061562	0.12	383	0.11	164	0.13	108	0.11	111	0.6278
rs2071174	<i>MUC2</i>	T/C	5'-upstream	11	1063712	0.29	383	0.29	165	0.25	108	0.34	110	0.5365
rs7396030	<i>MUC2</i>	C/T	Intronic	11	1073364	0.20	385	0.21	166	0.19	108	0.18	111	0.4211
rs11245936	<i>MUC2</i>	G/A	G832S	11	1074362	0.06	374	0.07	161	0.06	105	0.07	108	0.1846
rs7944723	<i>MUC2</i>	C/G	P1832P	11	1083710	0.19	375	0.21	166	0.19	106	0.17	103	0.8689
rs10902089 ^d	<i>MUC2</i>	A/G	Intronic	11	1084357	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
rs6421972	<i>MUC2</i>	G/A	I2154T	11	1086494	0.39	381	0.40	166	0.34	105	0.40	110	1
rs10794293	<i>MUC2</i>	C/T	Intronic	11	1088939	0.33	387	0.34	167	0.27	109	0.36	111	0.9081
rs11245954	<i>MUC2</i>	A/G	V2459V	11	1091078	0.07	382	0.08	165	0.06	108	0.05	109	1
rs7480563	<i>MUC2</i>	A/G	T2524P	11	1091649	0.48	367	0.50	158	0.43	102	0.50	107	0.0756
rs7126405	<i>MUC2</i>	A/G	Q2653P	11	1093296	0.09	387	0.10	167	0.08	109	0.08	111	1
rs3924453	<i>MUC2</i>	G/A	3'-downstream	11	1095806	0.29	387	0.31	167	0.25	109	0.30	111	0.7110
rs4077759	<i>MUC2</i>	T/C	3'-downstream	11	1095976	0.37	379	0.40	162	0.31	106	0.38	111	0.5810

HWE, Hardy–Weinberg equilibrium; MAF, minor allele frequency; N, individuals tested.

^aThe more common allele in Caucasians is reported first.

^bSNP location relative to each gene in the region.

^cChromosome position corresponding to Genome Build 36.3.

^dSelected tagSNPs that failed in the genotyping platform.

implemented in SNPpassc R library software (28). Final models included sex, age, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) consumption and type of lesion at recruitment, as covariables for adjustment. All analyses were done under codominant, dominant, recessive and log-additive (per allele) inheritance models. Stratified analyses were carried out according to *H.pylori* infection and NSAID consumption. Potential interactions between the SNP

of interest and *H.pylori* status or NSAID consumption were assessed by means of the likelihood ratio test.

LD between polymorphisms in each *MUC* gene region was explored with the Haploview software and haplotype frequencies were inferred using the expectation-maximization algorithm as implemented in the haplo.stats R package. Association between progression or regression and each *MUC* haplotype

with a frequency >0.01 was measured using the most frequent haplotype among controls as reference.

Results

Evolution of the lesions was assessed based on the diagnosis at recruitment and at the end of the follow-up. We identified 167 patients (43.1%) whose lesions did not change, 111 (28.7%) regressed and 109 (28.2%) progressed. The main characteristics of the analyzed population ($n = 387$) are shown in Table I. The use of NSAIDs was protective against lesion progression (OR = 0.57, 95% CI: 0.34–0.87, $P = 0.01$).

MUC genes genotype frequencies and association with evolution of the lesions

The total number of SNPs successfully genotyped and available for analysis was 22. Of these, 3 localized in *MUC1*, 5 in *MUC6* and 14 in *MUC2* genomic regions. Table II shows their minor allele frequencies in the total population and in each evolution group.

No significant association was observed between evolution of the GCPLs and the genotyped variants in *MUC1* and *MUC6* genes (data not shown). On the other hand, as shown in Table III, three SNPs in *MUC2*, rs10794293 in intron 37 and rs3924453 and rs4077759 in 3'-downstream from the gene, associated with a decreased risk of progression of the lesions. The A allele of rs3924453 and the C allele of rs4077759 appeared as protective factors for progression of the lesions and this effect was significant under the log-additive and recessive inheritance models, as well as the codominant model for rs4077759. Both SNPs tagged a 4 kb haplotype block containing the 3' end and downstream region of *MUC2* (Figure 1). The T allele of rs10794293 in intron 37 was also associated with a decreased risk of progression under the log-additive and dominant inheritance models. This SNP tags a haplotype block also downstream from the central TR region of the gene.

As shown in Table IV, another four *MUC2* SNPs located at the central and 5' region of the gene (rs10902073, rs10794281, rs2071174 and rs7944723) were found to be significantly associated with regression of the lesions. SNPs rs10902073 and rs10794281, which tag the main *MUC2* 7 kb haplotype block at 5'-upstream of the gene, were associated with a reduced probability of regression under the log-additive and dominant models. A significant association with less regression was also observed for rs7944723, a synonymous coding SNP in central exon 30, under the recessive model. On the other hand, the C allele of rs2071174, located at 5'-upstream of *MUC2* and tagging the haplotype block that contains the promoter region and the first exons of the gene, was associated with an increased probability of regression of the lesions, under the codominant and recessive models. Altogether, our results point to a protective effect of SNPs at *MUC2* during evolution of GCPLs.

Effect modification by Helicobacter pylori

When the effect of those *MUC2* SNPs significantly associated with the evolution of the GCPLs was analyzed according to *H. pylori* infection, it was seen that in all cases the association was significant only in those subjects positive for the infection (Tables III and IV), being the interaction statistically significant for rs4077759, under the codominant and recessive models (Table III), as well as for rs10902073 and rs10794281, under the log-additive, dominant and codominant models (Table IV).

Effect modification by consumption of NSAIDs

When the effect of those *MUC2* SNPs significantly associated with the evolution of the GCPLs was analyzed according to consumption of NSAIDs, it was seen that all SNPs but rs10902073 and rs7944723 were significantly associated with the evolution of the lesions in non-NSAID users, but not in users, and that in all cases, the association was in agreement with the one observed with the non-stratified

analyses (data not shown), but no interaction was observed between these *MUC2* variants and NSAIDs consumption.

Mucin haplotypes and evolution of lesions

Measures of LD (r^2 and D') between the analyzed SNPs in the mucin genes were in good agreement with those measured in HapMap for Caucasians (data not shown). In the same way, haplotype analysis showed similar results to those observed in HapMap from Caucasians.

Regarding *MUC2* gene, haplotype analysis was performed separately in the 5' and 3' regions. Six SNPs were located from central exon 30 to the 5' region and tagged 10 different haplotypes with frequencies between 0.345 and 0.014. Eight SNPs were located in 3'-half region of the gene and these tagged another 10 haplotypes with frequencies between 0.322 and 0.018 (Table V). The haplotype CTCCCG, at the 5' region, was significantly associated with a decreased risk of progression of the lesions as well as an increased probability of regression (Table V). This haplotype carried the minor allele (C) of rs2071174 that had also been found associated with an increased probability of regression and the two common alleles of SNPs rs10902073 (C/A) and rs10794281 (T/C) whose variant alleles associated with a reduced probability of regression in the individual SNP analysis. In the 3' region, haplotype CATAGAAC also was associated with a decreased risk of progression (Table V). This haplotype carried the three alleles (T, A and C of rs10794293, rs3924453 and rs4077759, respectively) that had also been found associated with a decreased risk of progression in individual SNP analysis. The haplotype resulting from the combination of these two significant haplotypes in the 5' and 3' regions (CTCCCGCATAGAAC, with a frequency of 0.120) also showed a trend as protector for progression (OR = 0.53, 95% CI: 0.26–1.07, $P = 0.075$) when compared with the ACCTCGCGCAAAGT (frequency of 0.147), although it did not reach statistical significance (results not shown).

As expected, no significant association with progression or regression of the GCPLs was found with the six inferred *MUC1* haplotypes with frequencies between 0.01 and 0.46 and with the six inferred *MUC6* haplotypes with frequencies between 0.06 and 0.37.

Discussion

In this study, we have assessed whether genetic variability in three genes (*MUC1*, *MUC2* and *MUC6*) involved in the mucosal protection associates with the evolution, either progression or regression, of GCPLs after a mean follow-up of 12.8 years in a region with one of the highest incidence of and mortality from GC in Spain and Western Europe (24). The major novel finding is that variability in *MUC2* gene is protective regarding the evolution of GCPLs and this effect is more evident in *H. pylori*-infected patients and in those not consuming NSAIDs.

MUC2 is the major constituent of the secreted mucus barrier in the small and large intestines, where it is mainly produced by goblet cells (29,30). A number of reports have provided evidence on the role of *MUC2* in maintaining the integrity of the protective mucus layer in intestine and reduced *MUC2* expression has been related to inflammation and development of several intestinal diseases, including cancer (3,9,30,31). In contrast, *MUC2*, which is not normally expressed in stomach, is present at increased levels in intestinal metaplasia and in gastric adenocarcinoma (5–7,32,33). It has been reported that *MUC2* overexpression might be the consequence of its activation by proinflammatory cytokines expressed after *H. pylori* infection (33). *MUC2* overexpression may also reflect the stomach transformation during intestinal metaplasia into an intestinal-type epithelium in which glandular gastric cells are replaced by goblet cells. With regard to its role in gastric carcinogenesis, it has been suggested that *MUC2* might contribute to malignant phenotype by protecting against recognition by antitumor immune effectors (9). Therefore, genetic variation in the *MUC2* gene that would modify its expression or biological activity could result in an altered pathway toward gastric carcinogenesis. Only one study has recently assessed the association between

Table III. ORs and 95% CIs for SNPs in *MUC2* locus showing a nominal significant association with progression of preneoplastic gastric lesions, stratified by *Helicobacter pylori* infection status

SNP	Model	Genotype	Progression			<i>H. pylori</i> +			<i>H. pylori</i> -			<i>P</i> interaction
			Controls/cases	OR (CI 95%) ^a	<i>P</i> value	Controls/cases	OR (CI 95%) ^a	<i>P</i> value	Controls/cases	OR (CI 95%) ^a	<i>P</i> value	
rs10794293	Codominant	CC	117/57	1.00		90/45	1.00		26/10	1.00		
		CT	125/40	0.66 (0.40-1.10)		102/29	0.52 (0.29-0.94)		23/11	1.48 (0.48-4.62)		
	Dominant	TT	33/7	0.43 (0.17-1.08)	0.0905	21/4	0.32 (0.10-1.06)	0.0328	12/3	0.71 (0.14-3.58)	0.6123	0.4392
		CC	117/57	1.00		90/45	1.00		26/10	1.00		
	Recessive	CT-TT	158/47	0.61 (0.38-1.00)	0.0476	123/33	0.49 (0.28-0.87)	0.0133	35/14	1.22 (0.42-3.53)	0.7117	0.2645
		CC-CT	242/97	1.00		192/74	1.00		49/21	1.00		
rs3924453	Log-additive	TT	33/7	0.52 (0.21-1.28)	0.1382	21/4	0.45 (0.14-1.44)	0.1538	12/3	0.59 (0.13-2.63)	0.4731	0.9130
		CC, CT, TT	275/104	0.66 (0.45-0.96)	0.0284	213/78	0.54 (0.34-0.87)	0.0092	61/24	0.96 (0.47-1.98)	0.9131	0.3445
	Codominant	GG	155/60	1.00		112/47	1.00		23/12	1.00		
		GA	112/40	0.77 (0.47-1.27)		82/30	0.83 (0.47-1.46)		29/9	0.70 (0.20-2.43)		
	Dominant	AA	28/4	0.30 (0.10-0.93)	0.0597	19/1	0.12 (0.01-0.94)	0.0292	9/3	0.36 (0.07-1.97)	0.4600	0.3487
		GG	135/60	1.00		112/47	1.00		23/12	1.00		
Recessive	GA-AA	140/44	0.67 (0.42-1.00)	0.1074	101/51	0.7 (0.40-1.22)	0.2053	38/12	0.56 (0.19-1.70)	0.3066	0.6686	
	GG-GA	247/100	1.00		194/77	1.00		52/21	1.00			
rs4077759	Log-additive	AA	28/4	0.34 (0.11-1.01)	0.0320	19/1	0.13 (0.02-1.00)	0.0099	9/3	0.40 (0.08-2.11)	0.2665	0.1895
		GG, GA, AA	275/104	0.66 (0.44-0.97)	0.0317	213/78	0.63 (0.39-1.01)	0.0488	61/24	0.62 (0.29-1.34)	0.2203	0.9133
	Codominant	TT	105/47	1.00		89/36	1.00		16/10	1.00		
		TC	119/48	0.86 (0.52-1.44)		85/38	1.05 (0.59-1.87)		34/9	0.53 (0.14-1.97)	0.5782	0.0353
	Dominant	CC	46/7	0.35 (0.14-0.85)	0.0437	35/2	0.14 (0.03-0.65)	0.0045	10/5	0.56 (0.12-2.53)	0.2966	0.4481
		TT	105/47	1.00		89/36	1.00		16/10	1.00		
Recessive	TC-CC	165/55	0.72 (0.44-1.18)	0.1897	120/40	0.80 (0.45-1.40)	0.4267	44/14	0.54 (0.17-1.72)	0.2966	0.4481	
	TT-TC	224/95	1.00		174/74	1.00		50/19	1.00			
Log-additive	CC	46/7	0.37 (0.16-0.88)	0.0148	35/2	0.14 (0.03-0.62)	0.0010	10/5	0.74 (0.18-3.00)	0.6685	0.0295	
	TT, TC, CC	270/102	0.68 (0.47-0.98)	0.0338	209/76	0.64 (0.42-1.00)	0.0439	60/24	0.71 (0.34-1.51)	0.3732	0.7062	

Significant *P* values are given in bold.

^aUnconditional logistic regression analysis, adjusted for sex, age, NSAID consumption and lesion at recruitment.

Table IV. ORs and 95% CIs for SNPs in *MUC2* locus showing a nominal significant association with regression of preneoplastic gastric lesions stratified by *Helicobacter pylori* infection status

SNP	Model	Genotype	Regression			H.pylori+			H.pylori-			P interaction	
			Controls/cases	OR (CI 95%) ^a	P value	Controls/cases	OR (CI 95%) ^a	P value	Controls/cases	OR (CI 95%) ^a	P value		
rs10902073	Codominant	CC	88/50	1.00		57/45	1.00		29/5	1.00			
		CA	134/48	0.59	(0.36-0.97)	102/37	0.41	(0.23-0.73)	31/11	2.03	(0.58-7.04)		
	Dominant	AA	41/11	0.47	(0.22-1.04)	36/9	0.34	(0.14-0.82)	5/2	1.45	(0.19-11.10)	0.5249	
		CC	88/50	1.00		57/45	1.00		29/5	1.00			
	Recessive	CA-AA	175/59	0.56	(0.35-0.91)	138/46	0.39	(0.23-0.68)	36/13	1.92	(0.57-6.44)	0.2791	
		CC-CA	222/98	1.00		159/82	1.00		60/16	1.00			
	Log-additive	CC, CA, AA	41/11	0.64	(0.31-1.33)	36/9	0.56	(0.25-1.27)	5/2	0.95	(0.15-6.17)	0.9559	
		Codominant	263/109	0.65	(0.46-0.94)	195/91	0.52	(0.34-0.79)	65/18	1.43	(0.59-3.44)	0.4294	
	rs10794281	Codominant	TT	72/41	1.00		45/35	1.00		26/6	1.00		
			TC	121/45	0.60	(0.35-1.04)	89/37	0.47	(0.25-0.87)	30/8	1.26	(0.35-4.52)	0.5459
Dominant		CC	55/17	0.53	(0.27-1.06)	48/12	0.32	(0.14-0.71)	7/5	2.38	(0.50-11.20)	0.0486	
		TT	72/41	1.00		45/35	1.00		26/6	1.00			
Recessive		TC-CC	176/62	0.58	(0.35-0.96)	137/49	0.42	(0.23-0.75)	37/6	1.53	(0.47-5.01)	0.4787	
		TT-TC	193/86	1.00		134/72	1.00		56/13	1.00			
Log-additive		CC, TC, CC	55/17	0.71	(0.38-1.33)	48/12	0.50	(0.24-1.03)	7/5	2.09	(0.53-8.20)	0.0518	
		Codominant	248/103	0.71	(0.50-1.00)	182/84	0.55	(0.37-0.82)	63/19	1.51	(0.69-3.29)	0.2972	
rs2071174		Codominant	TT	138/53	1.00		105/44	1.00		31/9	1.00		
			TC	110/40	0.93	(0.56-1.54)	78/34	0.98	(0.56-1.73)	31/6	0.77	(0.23-2.61)	0.7917
	Dominant	CC	17/17	2.76	(1.24-6.13)	14/14	2.66	(1.09-6.50)	3/3	4.36	(0.61-31.34)	0.2304	
		TT	138/53	1.00		105/44	1.00		31/9	1.00			
	Recessive	TC-CC	127/57	1.17	(0.73-1.86)	92/48	1.21	(0.71-2.05)	34/9	4.36	(0.34-3.20)	0.9471	
		TT-TC	248/93	1.00		183/78	1.00		62/15	1.00			
	Log-additive	CC, TC, CC	17/17	2.85	(1.32-6.14)	14/14	2.68	(1.13-6.32)	3/3	4.98	(0.76-32.71)	0.0967	
		Codominant	169/69	1.00		125/57	1.00		42/12	1.00			
	rs7944723	Codominant	CC	83/33	0.91	(0.54-1.51)	61/27	0.90	(0.51-1.60)	21/6	0.91	(0.28-2.95)	0.9807
			CG	12/1	0.15	(0.02-1.22)	9/0	NA	NA	3/1	0.84	(0.07-9.76)	0.2190
Dominant		CC	169/69	1.00		125/67	1.00		42/12	1.00			
		CG-GG	95/34	0.79	(0.48-1.31)	70/32	0.77	(0.44-1.35)	24/7	0.90	(0.29-2.77)	0.8508	
Recessive		CC-CG	252/102	1.00		186/84	1.00		63/18	1.00			
		GG	12/1	0.16	(0.02-1.25)	9/0	NA	NA	3/1	0.87	(0.08-9.73)	0.9098	
Log-additive		CC, CG, GG	264/103	0.72	(0.47-1.12)	195/84	0.67	(0.41-1.12)	66/19	0.91	(0.36-2.50)	0.8437	

Significant P values are given in bold.
^aUnconditional logistic regression analysis, adjusted for sex, age, NSAID consumption and lesion at recruitment. NA, not available.

Table V. MUC2 haplotypes and association with evolution of lesions

Region ^a	Haplotype	Frequency	Progression			Regression			
			OR	(CI 95%) ^b	P value	OR	(CI 95%) ^b	P value	
5'	ACCTCG	0.3447	1.00	Reference		1.00	Reference		
	CTCTCG	0.2698	0.72	(0.46–1.12)	0.1478	1.58	(0.99–2.52)	0.0548	
	CTCCCG	0.1576	0.49	(0.28–0.85)	0.0117	1.67	(1.02–2.73)	0.0407	
	CTGCTG	0.0463	0.81	(0.33–1.99)	0.6502	1.72	(0.71–4.17)	0.2268	
	CTCTTG	0.0393	0.60	(0.22–1.61)	0.3080	1.25	(0.45–3.52)	0.6697	
	CTCTTA	0.0349	0.84	(0.32–2.21)	0.7279	0.69	(0.23–2.08)	0.5114	
	CGGCTA	0.0334	0.57	(0.20–1.63)	0.2963	1.81	(0.76–4.32)	0.1786	
	CGGCTG	0.0203	0.83	(0.21–3.30)	0.7898	0.29	(0.03–2.64)	0.2707	
	ACCCCG	0.0153	0.46	(0.09–2.42)	0.3584	2.38	(0.44–13.01)	0.3156	
	ACCTTG	0.0140	0.20	(0.02–1.88)	0.1607	1.49	(0.19–11.56)	0.7014	
	3'	CGCAAAGT	0.3223	1.00	Reference		1.00	Reference	
		CATAGAAC	0.1400	0.46	(0.25–0.86)	0.0156	1.16	(0.69–1.95)	0.5810
		CGCAGAGT	0.0927	0.77	(0.39–1.54)	0.4583	1.00	(0.51–1.97)	0.9989
		CGCAGAAC	0.0888	0.73	(0.36–1.45)	0.3667	0.86	(0.45–1.65)	0.6439
GATAAAGT		0.0771	0.49	(0.21–1.14)	0.0991	1.19	(0.59–2.39)	0.6293	
GACAAAAGT		0.0696	1.51	(0.74–3.06)	0.2558	0.52	(0.23–1.17)	0.1130	
CGCGGGGC		0.0671	0.83	(0.39–1.79)	0.6378	0.57	(0.26–1.24)	0.1552	
CATAGAGT		0.0340	0.93	(0.34–2.51)	0.8835	1.34	(0.51–3.57)	0.5523	
GATAAAAC		0.0153	1.26	(0.30–5.27)	0.7532	0.86	(0.19–3.87)	0.8436	
GATAGAAC		0.0178	0.86	(0.17–4.29)	0.8543	0.43	(0.07–2.70)	0.3679	

Statistically significant values are given in bold.

^a5' region includes the following SNPs: rs10902073, rs10794281, rs2856082, rs2071174, rs7396030 and rs11245936; 3' region includes the following SNPs: rs7944723, rs6421972, rs10794293, rs11245954, rs7480563, rs7126405, rs3924453 and rs4077759.

^bUnconditional logistic regression analysis, adjusted for sex, age, NSAID consumption and lesion at recruitment, log-additive model.

candidate SNPs in *MUC2*, as well as in *MUC5B*, *MUC6* and *MUC1*, with the risk of chronic atrophic gastritis, a specific GCPL, but no association was identified (34).

Interestingly, polymorphisms associated with regression of the GCPLs were located from the central to the 5'-upstream genomic region of the gene, whereas polymorphisms associated with progression were located in the 3' and downstream region. When haplotype analyses were carried out, it was observed that the CTCCCG haplotype in the 5' region of the gene was associated with regression of the GCPLs and, in agreement with it, it also had a protective role against progression of the lesions. Furthermore, the CATAGAAC haplotype in the central and 3' region of the gene was also significantly associated with a decreased risk of progression of the lesions, thereby also indicating a protective role of this haplotype against progression. Finally, when the haplotype analysis was done with all *MUC2* SNPs, it was observed that the CTCCCGCATAGAAC haplotype, which combines the 5' and 3' protective haplotypes, also shows a clear although not significant tendency toward protection against progression of the GCPLs. All these results suggest that either the combination of different genetic variants in the gene or the effect of a yet an unknown variant in LD with the analyzed ones in each side of the central gene region modify the capacity of the lesions to progress toward gastric carcinoma.

Our results do not inform on the nature of the functional variant/s responsible for the observed associations. Nevertheless, since we used a tagSNP genotyping strategy, it is likely that the causative variants are in strong LD with the genotyped and significant ones. Although functional studies and association analyses with expression levels should be performed to analyze the causal relationships between the associated variants and gastric carcinogenesis, several lines of evidence indicate that this relationship might exist. Thus, rs10902073 and rs10794281 tag a strong LD block in the genomic region 5'-upstream of *MUC2*, suggesting that the variant responsible for increased probability of regression might be present in the upstream regulatory sequences of the gene expression. Rs2071174, which was associated with an increased probability of regression, tags a common non-synonymous Val116Met SNP (rs11825977) that has been suggested to be responsible for significant downregulation of *MUC2* in Crohn's disease, due to reduced messenger RNA expression (35).

Rs7944723, located at the end of central exon 30, which encodes for the highly polymorphic TR region, with properties essential to the surface epithelial protective function of mucins (8). This SNP, together with rs10794293 and rs6421972, tags a 5 kb haplotype block in 3' region of the gene that corresponds to C-terminus domain containing an autocatalytic proteolytic cleavage site predicted to cause disassembly of *MUC2* polymers and to affect the mucus viscosity (36,37). Finally, rs4077759 and rs3924453 are tags of a 4 kb haplotype block containing the last exons of the gene and the 3' downstream genomic region where there are other potentially functional variants in the region, such as some missense coding SNPs and 3'-UTR variants. It is interesting to note that we have not found association with any of the *MUC2* missense SNPs analyzed (Table II), which could be indicative of association being more probably due to variants that regulate *MUC2* expression.

The effect of all associated SNPs with GCPLs was found to be stronger and only significant in *H.pylori*-infected patients, being the interaction statistically significant for rs10902073, rs10794281 and rs4077759. Despite the relative low number of patients negative for *H.pylori* infection (23%) and the consequent statistical power limitations, the calculated ORs do not follow the same trend in infected and non-infected patients, suggesting a real interaction between gene variability and infection by the bacteria in the evolution of the lesions. Although a physical interaction between *H.pylori* and *MUC2* has not been established, the importance of this secreted mucin in bacterial colonization and infection by pathogens has been broadly demonstrated in the intestine (31,38). In stomach, *H.pylori* infection has been reported to cause an aberrant expression of *MUC2* gene in gastric carcinoma cells (39). Moreover, ectopic expression of *MUC2* has been associated with the induction of *CDX1* by cagA strain of *H.pylori* in gastric epithelial cells that have been arrested in G1 (40). Therefore, although we do not know the precise molecular mechanism by which variation in *MUC2* may interact with *H.pylori* infection to influence the evolution of GCPLs, the fact that the infection associates with aberrant expression of *MUC2* and that, as stated in the above paragraph, genetic variants of *MUC2* may influence its expression or protein function, provide biological support to the joint effect of these two factors. In contrast, although our results show that the effect of these *MUC2* variants on the evolution of the

lesions is significant only in non-NSAID users, no interaction was found between both factors. Given the protective effect of NSAID consumption on the progression of the lesions observed in this study, it seems that the protective effect of genetic variation in *MUC2* is more clearly observed in those patients not already protected by NSAID consumption.

Strengths of this study are the long and well-defined follow-up and its relatively large size that allowed us to evaluate the risk for progression and regression of lesions conferred by genetic variants in *MUC* genes. To our knowledge, only one study has analyzed the association between genetic variability (in DNA repair genes in this case) with evolution of GCPLs, also with the identification of some significant associations (41). Among the weaknesses, it is to mention that although the sample size is relative large considering the characteristics of the follow up, it was not large enough to avoid power limitations to detect other potential associations with some of the analyzed SNPs and genes, such as *MUC1* and *MUC6*. Furthermore, failure in the genotyping of three of the selected tagSNPs, among which *MUC1* rs4072037 that has recently been found associated with gastric cancer (21–23), has reduced the coverage of the genetic variability of these genes by 40% in the case of *MUC1*, but only <10% of *MUC2* and *MUC6*. Therefore, additional genotyping and association analyses in a larger sample series are needed to comprehensively elucidate and confirm the role in the gastric carcinogenesis pathway of genetic variability in the mucin genes, as well as their interaction with other risk factors such as infection by *H.pylori*.

In conclusion, this is the first study to address the association of mucin gene variants with progression and regression of precursor lesions of gastric cancer. Our analysis has provided evidence that genetic polymorphisms in *MUC2* gene are associated with evolution of GCPLs, especially in *H.pylori*-infected patients, suggesting an important role of this secreted mucin in gastric carcinogenesis.

Funding

Spanish Ministry of Health Research Funds ISCIII Exp.030077 and PI081420 and ISCIII RETICC DR06/0020-0015.

Acknowledgements

We thank the participating patients and their families and Pilar Lopez and Amalia Solana for their valuable collaboration in the field work, as well as Raúl Garcia for his collaboration as data manager. We also want to acknowledge the collaboration of Dr Maria Torres, from the Spanish National Genotyping Center (CEGEN), Santiago node.

Conflict of Interest Statement: None declared.

References

- Gum, J.R. Jr (1992) Mucin genes and the proteins they encode: structure, diversity, and regulation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **7**, 557–564.
- Kim, Y.S. *et al.* (1995) Diversity of mucin genes, structure, function, and expression. *Gastroenterology*, **109**, 999–1001.
- Hollingsworth, M.A. *et al.* (2004) Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 45–60.
- Senapati, S. *et al.* (2008) The MUC gene family: their role in the diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Histol. Histopathol.*, **23**, 1541–1552.
- Ho, S.B. *et al.* (1995) Mucin gene expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human gastric epithelium. *Cancer Res.*, **55**, 2681–2690.
- Reis, C.A. *et al.* (1999) Intestinal metaplasia of human stomach displays distinct patterns of mucin (*MUC1*, *MUC2*, *MUC5AC*, and *MUC6*) expression. *Cancer Res.*, **59**, 1003–1007.
- Babu, S.D. *et al.* (2006) Expression profile of mucins (*MUC2*, *MUC5AC* and *MUC6*) in *Helicobacter pylori* infected pre-neoplastic and neoplastic human gastric epithelium. *Mol. Cancer*, **5**, 10.
- Andrianifahanana, M. *et al.* (2006) Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1765**, 189–222.
- Kufe, D.W. (2009) Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 874–885.
- Correa, P. (1992) Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process—First American cancer Society Award Lecture on cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res.*, **52**, 6735–6740.
- Yuasa, Y. (2003) Control of gut differentiation and intestinal-type gastric carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 592–600.
- Gonzalez, C.A. *et al.* (2002) Genetic susceptibility and gastric cancer risk. *Int. J. Cancer*, **100**, 249–260.
- Rousseau, K. *et al.* (2004) The complete genomic organization of the human *MUC6* and *MUC2* mucin genes. *Genomics*, **83**, 936–939.
- Swallow, D.M. *et al.* (1987) The human tumour-associated epithelial mucins are coded by an expressed hypervariable gene locus PUM. *Nature*, **328**, 82–84.
- Gendler, S.J. *et al.* (1990) Molecular cloning and expression of human tumour-associated polymorphic epithelial mucin. *J. Biol. Chem.*, **265**, 15286–15293.
- Carvalho, F. *et al.* (1999) *MUC1* gene polymorphism does not explain the different cancer in Portugal and Denmark. *Ann. Hum. Genet.*, **63**, 187–191.
- Carvalho, F. *et al.* (1997) *MUC1* gene polymorphism and gastric cancer—an epidemiological study. *Glycoconj. J.*, **14**, 107–111.
- Garcia, E. *et al.* (1997) *MUC6* gene polymorphism in healthy individuals and in gastric cancer patients from northern Portugal. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **6**, 1071–1074.
- Silva, F. *et al.* (2001) *MUC1* gene polymorphism in the gastric carcinogenesis pathway. *Eur. J. Hum. Genet.*, **9**, 548–552.
- Silva, F. *et al.* (2003) *MUC1* polymorphism confers increased risk for intestinal metaplasia in a Colombian population with chronic gastritis. *Eur. J. Hum. Genet.*, **11**, 380–384.
- Xu, Q. *et al.* (2009) Risk of gastric cancer is associated with the *MUC1* 568 A/G polymorphism. *Int. J. Oncol.*, **35**, 1313–1320.
- Jia, Y. *et al.* (2010) A comprehensive analysis of common genetic variation in *MUC1*, *MUC5AC*, *MUC6* genes and risk of stomach cancer. *Cancer Causes Control*, **21**, 313–321.
- Saeki, N. *et al.* (2011) A functional single nucleotide polymorphism in mucin 1, at chromosome 1q22, determines susceptibility to diffuse-type gastric cancer. *Gastroenterology*, **140**, 892–902.
- Gonzalez, C.A. *et al.* (2010) Gastric cancer occurrence in preneoplastic lesions: a long-term follow-up in a high-risk area in Spain. *Int. J. Cancer*, **127**, 2654–2660.
- Gabriel, S.B. *et al.* (2002) The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*, **296**, 2225–2229.
- Barrett, J.C. *et al.* (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*, **21**, 263–265.
- Gonzalez, C.A. *et al.* (2011) *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* genotypes as predictors of progression of gastric preneoplastic lesions: a long-term follow-up in a high-risk area in Spain. *Am. J. Gastroenterol.*, **106**, 867–874.
- Gonzalez, J.R. *et al.* (2007) SNPassoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics*, **23**, 644–645.
- Chang, S.K. *et al.* (1994) Localization of mucin (*MUC2* and *MUC3*) messenger RNA and peptide expression in human normal intestine and colon cancer. *Gastroenterology*, **107**, 28–36.
- Kim, Y.S. *et al.* (2010) Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.*, **12**, 319–330.
- McGuckin, M.A. *et al.* (2011) Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.*, **9**, 265–278.
- Silva, E. *et al.* (2002) Mucins as key molecules for the classification of intestinal metaplasia of the stomach. *Virchows Arch.*, **440**, 311–317.
- Mejias-Luque, R. *et al.* (2010) Inflammation modulates the expression of the intestinal mucins *MUC2* and *MUC4* in gastric tumors. *Oncogene*, **29**, 1753–1762.
- Frank, B. *et al.* (2012) Polymorphisms in *MUC1*, *MUC2*, *MUC5B* and *MUC6* genes are not associated with the risk of chronic atrophic gastritis. *Eur. J. Cancer*, **48**, 114–120.
- Moehle, C. *et al.* (2006) Aberrant intestinal expression and allelic variants of mucin genes associated with inflammatory bowel disease. *J. Mol. Med.*, **84**, 1055–1066.
- Lidell, M.E. *et al.* (2003) An autocatalytic cleavage in the C terminus of the human *MUC2* mucin occurs at the low pH of the late secretory pathway. *J. Biol. Chem.*, **278**, 13944–13951.
- Lidell, M.E. *et al.* (2006) *Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the *MUC2* mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 9298–9303.
- Moran, A.P. *et al.* (2011) Sweet-talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal tract. *Gut*, **60**, 1412–1425.
- Matsuda, K. *et al.* (2008) Quantitative analysis of the effect of *Helicobacter pylori* on the expressions of *SOX2*, *CDX2*, *MUC2*, *MUC5AC*, *MUC6*,

F. Marín *et al.*

- TFF1, TFF2, and TFF3 mRNAs in human gastric carcinoma cells. *Scand. J. Gastroenterol.*, **43**, 25–33.
40. Murata-Kamiya, N. *et al.* (2007) *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene*, **26**, 4617–4626.
41. Li, W. Q. *et al.* (2009) Association between genetic polymorphisms of DNA base excision repair genes and evolution of precancerous gastric lesions in a Chinese population. *Carcinogenesis*, **30**, 500–505.

Received November 10, 2011; revised February 15, 2012; accepted March 3, 2012

5. Resumen de resultados más destacados

1.- El adenocarcinoma gástrico es más frecuente en hombres que en mujeres y en mayores de 60 años, pero ni la edad ni el sexo fueron factores pronósticos independientes en la evolución de las LPCG.

2.- El riesgo de progresión de las LPCG a adenocarcinoma de pacientes con antecedentes familiares de cáncer gástrico es 5 veces mayor que en aquellos sin antecedentes familiares. Las diferencias resultaron estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

3.- La metaplasia intestinal incompleta resultó ser la LPCG con mayor riesgo de progresión a cáncer gástrico (HR 11'3; 95% IC 3'8-33'99).

4.- El riesgo de progresión de las LPCG en aquellos pacientes infectados por cepas de Hp cagA-positivas, vacAs1 y vacAm1 es de 2 a 3 veces mayor que en aquellos infectados por cepas cagA-negativas, vacAs2 y vacAm2. El riesgo de progresión de las LPCG en los pacientes infectados por cepas de Hp que son simultáneamente cagA-positivas y vacAm1/s1 es 5 veces mayor que en aquellos infectados por cepas que son simultáneamente cagA-negativas y vacAm2/s2. Las diferencias resultaron estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

5.- En cuanto a la susceptibilidad genética del individuo SNP del gen *MUC2*, se asociaron significativamente con la protección frente a la progresión de las LPCG. El efecto resultó más evidente en pacientes infectados por Hp y en aquellos que no consumen AINES.

Discusión

El carcinoma gástrico es en la actualidad la quinta neoplasia maligna más frecuente en el mundo y la tercera causa de muerte por cáncer. Más del 70% de los casos se dan en los países en desarrollo y la mitad de los casos del mundo corresponden a Asia oriental principalmente China. En España supone la octava neoplasia maligna más frecuente teniendo en cuenta ambos sexos con una incidencia 3'6% y una tasa de incidencia ajustada por edad de 7'8 por 100.000 personas y año^{263,264}.

Generalmente se diagnostica en estadios avanzados debido a la falta de síntomas específicos y las alternativas terapéuticas curativas son limitadas¹⁴⁸. España presenta una supervivencia a los 5 años baja, aproximadamente del 25%, estando dentro de la media europea²⁶⁵. Prevenirlo o diagnosticarlo en estadios precoces sería la forma de mejorar esas cifras.

Se admite que el cáncer gástrico más frecuente, el adenocarcinoma, sobre todo el de tipo intestinal y de localización distal, está precedido por tres lesiones precursoras: atrofia gástrica, metaplasia intestinal y la displasia, resultado de la evolución natural de una gastritis crónica^{23,25,60} cuyo agente causal más frecuente es el Hp. El proceso es largo y va a depender de múltiples factores: las características del Hp, la susceptibilidad genética del huésped y factores medioambientales²¹¹.

Nuestro trabajo mediante un largo seguimiento de pacientes con LPCG ha conseguido identificar parámetros pronósticos relacionados significativamente con el riesgo de evolución de estas lesiones a cáncer gástrico.

1. Factores involucrados en la evolución de las lesiones precursoras del cáncer gástricos

1.1. Edad y sexo como factores implicados en la evolución de las lesiones precursoras de cáncer gástrico

La tasa de incidencia de carcinoma gástrico estandarizada por edad es dos veces mayor en los hombres que en las mujeres^{263,264}. Esa diferencia se podría explicar por el carácter protector de los estrógenos frente al carcinoma gástrico^{208-210,266}. Tener una edad avanzada también aumenta el riesgo de carcinoma^{243,267}. En nuestro trabajo los

hombres y los individuos mayores de 60 años también tiene un riesgo significativamente mayor, siempre y cuando se consideren esas variables por separado porque su significación estadística se pierde cuando se consideran junto con otros factores.

1.2. El tabaco como factor de riesgo de evolución de las lesiones precursoras de cáncer gástrico

El consumo de tabaco está considerado como un factor de riesgo en el desarrollo de LPCG¹⁸⁹⁻¹⁹¹ y de cáncer gástrico^{192-194,197} sobre todo en pacientes con infección por Hp.¹⁹⁶. Aunque hemos encontrado en todos los grupos de individuos con LPCG una alta prevalencia de fumadores no hemos podido determinar su valor pronóstico en nuestra serie al ser el grupo de individuos con mucosa normal muy pequeño para establecer comparaciones.

1.3. La infección por *Helicobacter pylori*

En nuestro estudio la infección por Hp no supuso un factor predictivo de cáncer gástrico. La gastritis crónica grave y la metaplasia intestinal extensa crean condiciones en las que Hp es incapaz de sobrevivir y favorecen la resolución de la infección. Hemos observado que la prevalencia de la infección disminuye a medida que progresan las lesiones y por lo tanto la HR fue menor en las lesiones más avanzadas. Este hecho, junto con el bajo número de casos con mucosa normal analizados en este estudio, podría explicar nuestros resultados.

1.4. El consumo de antiinflamatorios no esteroideos como protectores en la evolución a cáncer gástrico

Dos meta-análisis^{201,202} han puesto en evidencia que pacientes que toman AINES presentan un menor riesgo de desarrollar carcinoma gástrico. En nuestro estudio, el consumo de AINES ha resultado ser un factor de protección frente al desarrollo de cáncer gástrico aunque sin significación estadística.

1.5. Antecedentes familiares de cáncer gástrico como factor de riesgo de evolución de las lesiones precursoras

Hemos observado que los individuos con antecedentes familiares de cáncer gástrico tienen 5 veces más riesgo de desarrollar un adenocarcinoma gástrico respecto de aquellos sin antecedente, siendo esta diferencia muy fuerte y estadísticamente significativa. Varios estudios²⁶⁸⁻²⁷⁰ han encontrado que la historia familiar de cáncer gástrico es un riesgo para el desarrollo de carcinoma gástrico y que este riesgo es 3 veces mayor para el cáncer gástrico que para otros tipos de cánceres en el adulto.

Si bien esto puede ser debido a cierta susceptibilidad genética, hay que tener en cuenta que los miembros de una unidad familiar comparten un mismo estilo de vida y están expuestos a los mismos factores medioambientales, más importantes si cabe en el desarrollo del cáncer que los polimorfismos genéticos de riesgo. Aunque nosotros no hemos estudiado la interacción entre los factores medioambientales y la susceptibilidad genética entre los miembros de una misma familia, estudios que ajustaron sus análisis para uno o más factores de riesgo en el seno familiar observaron, que el riesgo de una historia familiar positiva no se atenuaba²⁷⁰ lo que va a favor de la susceptibilidad genética como causa de la agrupación familiar, aunque los genes que podrían estar implicados no se conocen con certeza. Solamente en el caso del adenocarcinoma gástrico difuso familiar se conoce la existencia de mutaciones en línea germinal del gen *CDH1* responsable del cáncer gástrico hereditario²⁴².

Aunque las bases moleculares de la agregación familiar del cáncer gástrico no se conocen con precisión una historia familiar positiva es un factor de riesgo fuerte para el desarrollo del adenocarcinoma gástrico y puede ayudar a seleccionar entre los pacientes con LPCG aquellos susceptibles de seguimiento.

1.6. La metaplasia intestinal incompleta como marcador de riesgo de cáncer gástrico

La extensión de la metaplasia intestinal está bien reconocida como marcador de riesgo de cáncer gástrico^{83,90-93} hasta el punto de que se ha desarrollado un sistema de estadificación de las gastritis crónicas basado en la localización y la severidad de la

metaplasia intestinal en la mucosa gástrica denominado OLGIM⁶⁹ con valor pronóstico⁹⁴. En la última guía publicada sobre el manejo de los pacientes con lesiones precursoras de cáncer gástrico⁷³ se recomienda el seguimiento periódico de los pacientes con metaplasia intestinal extensa, independientemente del tipo de metaplasia. Para algunos autores no existe suficiente evidencia del valor pronóstico del subtipo de metaplasia intestinal y consideran que no es necesario consignarlo en los informes anatomopatológicos⁷³.

Sin embargo un numeroso grupo de trabajos^{80,83,84,86,95-100,102,103,105,108} han evidenciado que el subtipo de metaplasia intestinal, en concreto, la metaplasia intestinal incompleta es un marcador significativo de progresión de las lesiones y de desarrollo de carcinoma gástrico. Las causas de que algunos trabajos no confirmen este hecho^{247,271-274} hay que buscarlas en su corto periodo de seguimiento, en su baja potencia estadística por un tamaño muestral pequeño al perder muchos pacientes durante el seguimiento, o bien en la población a estudio cuyo riesgo es, de por sí, muy bajo por proceder de áreas geográficas de bajo riesgo de cáncer gástrico¹¹⁰.

Nuestro trabajo que incluye un largo periodo de seguimiento, una muestra poblacional amplia y suficiente, procedente de un área con riesgo alto/moderado de cáncer gástrico, ha encontrado que existe una asociación entre la metaplasia intestinal incompleta y el riesgo de desarrollar un adenocarcinoma gástrico, con diferencias estadísticamente significativas respecto de otras lesiones. Aceptar este hecho por la totalidad de los autores ayudaría a la selección de pacientes para un seguimiento más exhaustivo y limitaría más la población a seguir.

De nuestro estudio y de otros¹⁰³ se desprende que el seguimiento de pacientes con metaplasia intestinal incompleta aumenta la probabilidad de diagnosticar un carcinoma gástrico en fase precoz. Además el diagnóstico histológico de la metaplasia intestinal mediante la tinción con hematoxilina-eosina no es difícil y al contrario de lo esgrimido en algunas publicaciones⁷³ no se requieren técnicas sofisticadas para su detección. Si hicieran falta, bastaría con la tinción de AA-PAS 2,5 que es una técnica histoquímica habitual en los laboratorios de anatomía patológica y tiene un bajo coste al no tratarse de inmunohistoquímica.

Teniendo en cuenta que la probabilidad de encontrar metaplasia intestinal incompleta es mayor cuanto más extensa sea la metaplasia intestinal^{83,91}, podemos asumir que la presencia de metaplasia intestinal incompleta en una biopsia gástrica es un indicador de que existe metaplasia intestinal extensa. Solo por ello supondría que el paciente tiene un aumento del riesgo de cáncer gástrico⁹¹ y debería ser seguido. Si se atendiera solamente a la extensión de la metaplasia intestinal y no al subtipo, se necesitarían un elevado número de muestras para precisar la extensión, mayor incluso que las cinco del protocolo Sídney. Es evidente que esto representa un problema a efectos prácticos teniendo en cuenta que ni siquiera el protocolo de Sídney está incorporado de forma generalizada. Por lo tanto sí sería importante consignar el tipo de metaplasia intestinal en los informes de anatomía patológica, sobre todo cuando el número de muestras es pequeño como suele pasar en la práctica diaria, aunque solamente fuera por representar un inequívoco marcador de la extensión de la metaplasia intestinal.

En nuestro trabajo se ha observado que entre los pacientes que desarrollaron un carcinoma gástrico el número de fragmentos en la biopsia de reclutamiento con metaplasia intestinal era mayor que en los pacientes que no desarrollaron cáncer. Considerando esto como una estimación de la extensión de la metaplasia, este parámetro también se relacionaría con un aumento del riesgo de cáncer aunque en nuestro estudio los resultados no llegaron a ser estadísticamente significativos.

En resumen, existe suficiente evidencia científica del valor de la metaplasia intestinal incompleta como marcador de riesgo de carcinoma gástrico y su diagnóstico no requiere técnicas sofisticadas. Si el riesgo de evolución es debido a una peculiaridad intrínseca de la historia natural de la lesión, o a que es un marcador de la extensión de la metaplasia, es irrelevante. En la práctica, tanto el subtipo de metaplasia intestinal como el número de fragmentos con metaplasia intestinal sobre el número total de fragmentos, deberían ser consignados en los informes de anatomía patológica porque ayuda al gastroenterólogo a seleccionar entre los pacientes con LPCG a aquellos que se beneficiarían de un seguimiento periódico⁸⁷. Añadir estos parámetros en los informes anatomopatológicos no representa ningún aumento de la complejidad diagnóstica, ni del tiempo necesario para la emisión del informe.

Algunos autores consideran que el patrón, la extensión y severidad de la atrofia gástrica es mejor parámetro que el subtipo de metaplasia intestinal para valorar el riesgo de carcinoma gástrico^{247,275}. En nuestro caso el valor predictivo de la atrofia fue muy bajo, de los 21 adenocarcinomas gástricos diagnosticados 4 correspondían a pacientes con gastritis atrófica no metaplásica en el momento del reclutamiento frente a 16 que ya tenían metaplasia intestinal incompleta en ese momento. Teniendo en cuenta que la metaplasia es una lesión multifocal es posible que esos 4 pacientes no estuvieran suficientemente muestreados. Quizá por esta razón los pacientes con atrofia extensa o que afecte a varias regiones gástricas a un sin metaplasia deberían ser seguidos.

Sin embargo se sabe que el diagnóstico de atrofia está sujeto a una gran variabilidad intra e inter-observador⁷⁰⁻⁷² debido a la subjetividad en su reconocimiento. Su diagnóstico no es fácil si no existe una muestra con suficiente espesor y una buena orientación de los fragmentos a la hora de confeccionar el bloque de parafina. El nivel de concordancia para la metaplasia intestinal es casi perfecto, tres veces superior al de la atrofia⁶⁹ y además es un marcador de atrofia (conceptualmente toda metaplasia intestinal es una forma de atrofia) por lo que la metaplasia intestinal es el parámetro diagnóstico más fiable para predecir el riesgo de carcinoma gástrico en la práctica diaria.

1.7. Los factores de virulencia bacteriana *vacA* y *cagA* como factores pronósticos en pacientes con lesiones precursoras gástricas

El genotipo de la cepa infectante de Hp es uno de los factores que influyen en el desarrollo y evolución de las LPCG¹⁵⁵. En concreto las cepas *vacAs1*, *vacAm1* *vacAil*, *vacAd1* y aquellas que poseen la isla de patogenicidad *cagA*, cepas tipo I *cagA*-positivas, se han relacionado con un mayor riesgo de desarrollo de atrofia gástrica, metaplasia intestinal y de carcinoma gástrico^{177,178,180,182,250,276,277}.

En nuestro trabajo como en otros estudios^{177,178,180,182,250,276,277} hemos observado que las cepas de Hp *cagA*-positivas, *vacAs1* y *vacAm1* son más prevalentes en pacientes con lesiones más avanzadas, como la metaplasia intestinal, que las cepas *cagA*-negativas, *vacAs2* y *vacAm2*. Además las cepas *cagA*-positivas con frecuencia eran *vacAs1/vacAm1*, mientras que las cepas *cagA*-negativas eran *vacAs2/vacAm2*. Esta

asociación no se debe a la clonalidad ni a un ligamento genético porque esos genes se localizan en locus distanciados en el cromosoma bacteriano²⁷⁸.

Parece claro en la literatura que las cepas de Hp *cagA*-positivas, *vacAs1* y *vacAm1* son cepas muy virulentas que están relacionadas con lesiones gástricas más graves e intensas, pero existen pocos trabajos en la literatura que hayan relacionado los factores de virulencia *vacA* y *cagA* con el riesgo de evolución de las lesiones precursoras. Ninguno en el caso de *vacA* y solo uno lo ha hecho en relación con *cagA*²⁵⁰. Este último estudio valoró el riesgo de progresión de las lesiones precursoras en función del factor de virulencia *cagA* en una amplia población y aunque sus resultados no fueron estadísticamente significativos, se observó que los individuos infectados por cepas *cagA*-positivas tenían un ligero aumento en el riesgo de progresión que aquellos infectados por cepas *cagA*-negativas.

Nuestro estudio es el primero en valorar el riesgo de progresión de las lesiones precursoras en función del factor de virulencia *vacA* y de la combinación de los genotipos *vacA* y *cagA* y hemos observado que el riesgo de progresión de las lesiones en pacientes infectados por cepas *cagA*-positivas, *vacAs1* y *vacAm1* es significativamente mayor que en aquellos infectados por cepas *cagA*-negativas, *vacAs2*, y *vacAm2*. Cuando ambos factores de virulencia (*cagA* y *vacA*) se combinan, los pacientes infectados simultáneamente por cepas *cagA*-positivas y *vacAs1/m1* tienen un riesgo de progresión mayor que los pacientes infectados por cepas *cagA*-negativas y *vacAs2/m2*, siendo la diferencia estadísticamente significativa. También se ha observado que las lesiones tienden a progresar más en el caso de pacientes con cepas *vacAi1* que con cepas *vacAi2*, pero la proporción de pacientes que progresan infectados por cepas *vacAi1* es parecida a la de los pacientes infectados por cepas *cagA*-positivas, *vacAs1* o *vacAm1* por lo que su tipificación no aporta más información respecto al pronóstico.

Hemos comprobado como los factores de virulencia del Hp están relacionados significativamente con un aumento del riesgo de progresión de las LPCG por lo tanto la determinación del genotipo de la cepa infectante en pacientes con lesiones precursoras puede ayudar a identificar a aquellos subsidiarios de un seguimiento más exhaustivo.

1.8. Polimorfismos del gen *MUC2* como factor asociado a la evolución de las lesiones precursoras de cáncer gástrico.

La glucoproteína MUC2 es el componente fundamental del moco que actúa como capa protectora de la mucosa en todo el intestino siendo secretada por las células caliciformes del epitelio intestinal^{279,280}. Esta es codificada por el gen *MUC2* localizado en el cromosoma 11 en la región 11p15.5 rica en recombinaciones que contiene 400kb. Su dominio central constituido por múltiples repeticiones en tándem está codificado por el exón 30 y el dominio C-terminal o carboxilo está codificado por 19 exones.

MUC2 se expresa *de novo* en la mucosa gástrica en los casos en que exista metaplasia intestinal y también en el adenocarcinoma gástrico^{88,89,140}. Los niveles de MUC2 tienden a elevarse por la sobreestimulación celular producida por citoquinas proinflamatorias secretadas después de la infección por Hp²⁸¹. Su papel en la carcinogénesis gástrica se ha explicado al impedir el reconocimiento celular de los anticuerpos antitumorales²¹². Por lo tanto variaciones genéticas en el gen *MUC2* que provoquen una modificación en la expresión o en la función de esta proteína provocarían alteraciones en la vía carcinogénica gástrica.

Varios estudios han detectado que polimorfismos en los genes protectores de la mucosa gástrica se relacionan con el riesgo de desarrollo de carcinoma gástrico²¹³⁻²¹⁷ y en concreto, un polimorfismo funcional en el gen *MUC1* se ha asociado a un mayor riesgo de cáncer en la población asiática²¹⁶, pero ningún trabajo ha estudiado la relación de las distintas variaciones genéticas de estos genes con la evolución de las LPCG.

Este sí ha sido uno de los objetivos de nuestro estudio y al analizar los distintos polimorfismos de los genes de MUC1, MUC2 y MUC6 en relación con la evolución de las lesiones precursoras se ha observado por primera vez que variantes genéticas del gen *MUC2* están relacionadas significativamente con la evolución de las LPCG y algunas de ellas actúan como factores protectores frente a su progresión, siendo este efecto más evidente en los pacientes infectados por Hp y en los que no consumen AINES. Solo un trabajo había analizado antes la relación de los polimorfismos de *MUC2* con el riesgo de atrofia gástrica pero no encontró ninguna asociación²⁸².

En nuestro estudio, considerando por separado cada polimorfismos de *MUC2*, los asociados con la regresión de las lesiones se localizaban en la segmento genómico situado entre la región central y el extremo 5' y los polimorfismos relacionados con la progresión de las lesiones se localizaban entre la región central y el extremo 3'. Sin embargo cuando tenemos en cuenta los haplotipos CTCCCG y CATAGAAC situados en la región 5' y 3' respectivamente, estos están asociados significativamente con la regresión y la disminución del riesgo de progresión, por lo que tienen un papel protector frente a la progresión de las lesiones. Cuando el haplotipo analizado incluye todos los polimorfismos de *MUC2* el haplotipo que surge de la combinación de los dos anteriores (CTCCCGCATAGAAC) también muestra un efecto protector frente a la progresión aunque no es estadísticamente significativo. Esto sugiere que, o bien la combinación de diferentes variantes genéticas en el gen o el efecto de una variante genética, todavía desconocida, asociada con los polimorfismos de cada lado de la región central puede modificar la capacidad de las lesiones para progresar hacia carcinoma gástrico.

Por la estrategia de análisis utilizada (análisis de tagSNPs o SNPs marcadores de otros SNPs correlacionados) los SNPs que hemos encontrado asociados a la protección frente a la progresión de las lesiones no son forzosamente los SNPs causales de la asociación. No obstante sí que hemos observado que los SNPs asociados se localizan en regiones genómicas relacionadas con las secuencias reguladoras de su expresión genética, la transcripción de ARNm y con secuencias que codifican propiedades funcionales esenciales de la proteína.

Se ha observado que el efecto de los polimorfismos relacionados con las LPCG es más intenso en los pacientes infectados por Hp que en los no infectados, sobre todo los polimorfismos rs10902073, rs10794281 y rs4077759, con diferencias estadísticamente significativas. A pesar de que el porcentaje de pacientes Hp negativos es bajo los ORs calculados no siguen la misma tendencia en los pacientes infectados y en los no infectados, lo que sugiere una interacción real entre las variaciones genéticas del gen *MUC2* y la infección por Hp.

Se ha publicado que la expresión ectópica de *MUC2* en el estómago se asocia con la inducción de *CDX1* por cepas *cagA-positivas* en las células epiteliales²⁸³ y que existe una expresión aberrante del gen *MUC2* en las células del carcinoma gástrico en la

infección por Hp²⁸⁴ por lo tanto aunque no conocemos los mecanismos moleculares por los cuales las variaciones genéticas de MUC2 al interactuar con la infección por Hp provocan una variación en la evolución de las lesiones, el hecho de que la infección por Hp provoque una expresión aberrante de MUC2 y que los polimorfismos del gen produzcan alteraciones en la función y expresión de la proteína, constituyen una base biológica que justifica la asociación de estos dos factores.

Sin embargo a pesar de que se ha observado como el efecto de los polimorfismos de *MUC2* en la evolución de las lesiones es estadísticamente significativo en los pacientes que no consumen AINES, no hemos encontrado ninguna interacción. Puesto que los AINES ya tienen un papel protector es lógico que el efecto protector sea más evidente en los pacientes que no los consumen.

2. Fortalezas y limitaciones del estudio

2.1. Fortalezas del estudio

Nuestro estudio se basa en un seguimiento prospectivo y retrospectivo bien definido, con un largo periodo de seguimiento y una población muestral suficiente. Aunque la población seleccionada no es una muestra aleatoria de la población general, la constituyen todos los casos de pacientes con LPCG de la población, al ser seleccionadas del único registro hospitalario existente.

El estudio histológico con la clasificación de las lesiones tanto en las biopsias de reclutamiento como en las del final del seguimiento se ha realizado por los mismos patólogos, de esta manera se han mantenido constantes los criterios de evaluación de las biopsias en ambos periodos existiendo una buena concordancia inter e intra observador.

Es la primera vez que se analizan los factores de virulencia del Hp y las variantes genéticas de los genes de mucinas en relación con la evolución de las LPCG. Solo una publicación recoge haber trabajado previamente en este sentido pero teniendo en cuenta las variaciones en los genes reparadores de ADN²⁸⁵.

2.2. Limitaciones del estudio

Puede existir una cierta subestimación de las lesiones al principio de seguimiento porque en aquellos años no existía un protocolo estandarizado acerca del número de biopsias gástricas a realizar durante la exploración endoscópica, así que el número de biopsias gástricas de cada paciente en el periodo de reclutamiento es inferior al del final del seguimiento donde se utilizó el sistema de Sídney. Se sabe que el diagnóstico y la estadificación de las lesiones dependen del número y localización de las muestras²⁸⁶ por lo que es posible que esta subestimación se debiera a un error de muestreo.

Algunos autores consideran que el protocolo de toma de biopsias del Sistema de Sídney infravalora la existencia de metaplasia intestinal en un 50% de los casos y detecta la atrofia en el cuerpo gástrico solo cuando esta es extensa, por lo que para estos autores el Sistema de Sídney no es adecuado para establecer la prevalencia de las lesiones precursoras ni estimar su riesgo en los estudios de seguimiento. Ellos recomiendan un mínimo de 8 biopsias en vez de 5²⁸⁷. Otros autores consideran que el protocolo de Sídney es suficiente para la identificación de las lesiones sobre todo en áreas geográficas de alto riesgo de carcinoma gástrico²⁸⁸, pero no lo es para áreas de bajo riesgo. En este último caso con 7 biopsias: 3 de antro, 3 de cuerpo (1 curvatura mayor y 2 de curvatura menor) y 1 de incisura, se diagnostican el 97% de la metaplasia intestinal y todos los casos de displasia y cáncer gástrico²⁸⁹. El sistema de OLGIM⁶⁹ propone 12 biopsias: 4 de antro, 4 de cuerpo (2 de curvatura mayor, 2 de curvatura menor de cada región), 2 de incisura y 2 de cardias.

El hecho de que existan distintos métodos de muestreo hace que las estimaciones de la prevalencia de las lesiones varíen en cada estudio. Parece que en el caso de áreas con un elevado riesgo de cáncer basta con pocas biopsias para el diagnóstico y estadificación de las lesiones precursoras probablemente porque las lesiones ya están muy extendidas^{267,290,291}. Teniendo en cuenta que este tipo de lesiones tienden a ser multifocales la utilización de protocolos con un amplio número de biopsias no evita cierto error de muestreo en los estudios^{55,287,292,293}. La guía actual europea para el manejo de la patología de la mucosa gástrica recomienda al menos 4 biopsias: 2 de cuerpo y 2 de antro para el diagnóstico y estadificación de estas lesiones⁷³.

La tasa de participación para una segunda endoscopia y biopsia fue del 56%, es una tasa muy buena para fines de investigación, sobre todo en occidente, pero no deja de ser baja.

Debido a que no se disponía de muestras de sangre al inicio del seguimiento no se pudo evaluar la relación de las lesiones precursoras con los niveles séricos de pepsinógeno.

Uno de los factores de virulencia del Hp el EPIYA no se pudo caracterizar al no encontrar un método adecuado para su genotipado en muestras incluidas en parafina.

Aunque la población para el genotipado de los polimorfismos de mucinas fue amplia no fue suficiente para analizar los polimorfismos de *MUC1* y *MUC6*. Además el fallo en el genotipado de tres de los tagSNPs (entre los que se incluía el polimorfismo de *MUC1* rs4072037 asociado con mayor riesgo de cáncer gástrico²¹⁵⁻²¹⁷) supuso que la cobertura de la variabilidad genética se redujera en un 40% para el gen *MUC1* y en menos de un 10% para los genes *MUC2* y *MUC6*. Serían necesarios estudios de asociación y genotipados más amplios en una población mayor para comprender y confirmar el papel de la variabilidad de los genes de mucinas en la carcinogénesis gástrica y su interacción con la infección por Hp.

Conclusiones

De los resultados obtenidos y discutidos en este trabajo se desprenden las siguientes conclusiones:

1. La identificación de metaplasia intestinal incompleta permite la selección de pacientes con mayor riesgo de progresión a cáncer gástrico. El diagnóstico de metaplasia intestinal incompleta no exige técnicas diagnósticas especiales. En la medida que el gastroenterólogo lo demande, el patólogo informará del tipo de metaplasia intestinal en sus informes.
2. El genotipado de las cepas de Hp ayuda a la selección de pacientes con LPCG con mayor riesgo de progresión a cáncer gástrico.
3. La relación significativa de los distintos SNP del gen *MUC2* con la evolución de las LPCG determina que los factores protectores de la mucosa juegan un papel importante en la carcinogénesis gástrica.
4. La historia familiar de carcinoma gástrico, el subtipo de metaplasia intestinal, el genotipo de las cepas de Hp, así como, las variantes genéticas del gen *MUC2* se pueden utilizar para identificar entre los pacientes con LPCG, aquellos con mayor riesgo de progresión y por lo tanto subsidiarios de un seguimiento más exhaustivo.

Bibliografía

1. Vilardell F. Chronic gastritis. In: W.B. Saunders Company, ed. *Gastroenterology by bockus, H.L. vol.I examination of the patient, the esophagus and the stomach.* 2nd ed. Philadelphia; 1963:368-368.
2. Correa P. Chronic gastritis: A clinico-pathological classification. *Am J Gastroenterol.* 1988;83(5):504-509.
3. Correa P. The gastric precancerous process. *Cancer Surveys.* 1983;2:437-450.
4. Siurala M. The story of gastritis. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1991;186:1-3.
5. Mackay IR, Hislop IG. Chronic gastritis and gastric ulcer. *Gut.* 1966;7(3):228-233.
6. Jarvi O, Lauren P. On the role of heterotopias of the intestinal epithelium in the pathogenesis of gastric cancer. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 1951;29(1):26-44.
7. Morson BC. Carcinoma arising from areas of intestinal metaplasia in the gastric mucosa. *Br J Cancer.* 1955;9(3):377-385.
8. Morson BC. Intestinal metaplasia of the gastric mucosa. *Br J Cancer.* 1955;9(3):365-376.
9. Siurala M, Seppala K. Atrophic gastritis as a possible precursor of gastric carcinoma and pernicious anemia. results of follow-up examinations. *Acta Med Scand.* 1960;166:455-474.
10. Bonne C, Hartz H, Klerks JV, Posthuma JH, Radsma W, Tjokronegoro S. Morphology of the stomach and gastric secretion in malays and chinese and the

different incidence of gastric ulcer and cancer in these races . *The American Journal of Cancer*. 1938;33(2):265-279.

11. Sipponen P. Chronic gastritis in former times and now. *Helicobacter*. 2007;12 Suppl 2:16-21.

12. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. an attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965;64:31-49.

13. Gear MW, Truelove SC, Whitehead R. Gastric ulcer and gastritis. *Gut*. 1971;12(8):639-645.

14. Lambert R. Chronic gastritis. A critical study of the progressive atrophy of the gastric mucosa. *Digestion*. 1972;7(1):83-126.

15. Strickland RG, Mackay IR. A reappraisal of the nature and significance of chronic atrophic gastritis. *Am J Dig Dis*. 1973;18(5):426-440.

16. Whitehead R, Truelove SC, Gear MW. The histological diagnosis of chronic gastritis in fiberoptic gastroscope biopsy specimens. *J Clin Pathol*. 1972;25(1):1-11.

17. Correa P. The epidemiology and pathogenesis of chronic gastritis: Three etiologic entities. *Front Gastrointest Res*. 1980;6:98-108.

18. Imai T, Kubo T, Watanabe H. Chronic gastritis in japanese with reference to high incidence of gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1971;47(1):179-195.

19. Siurala M, Varis K, Wiljasalo M. Studies of patients with atrophic gastritis: A 10-15-year follow-up. *Scand J Gastroenterol*. 1966;1(1):40-48.

20. Correa P, Cuello C, Duque E. Carcinoma and intestinal metaplasia of the stomach in colombian migrants. *J Natl Cancer Inst.* 1970;44(2):297-306.
21. Correa P, Sasano N, Stemmermann GN, Haenszel W. Pathology of gastric carcinoma in japanese populations: Comparisons between miyagi prefecture, japan, and hawaii. *J Natl Cancer Inst.* 1973;51(5):1449-1459.
22. Haenszel W, Kurihara M, Segi M, Lee RK. Stomach cancer among japanese in hawaii. *J Natl Cancer Inst.* 1972;49(4):969-988.
23. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet.* 1975;2(7924):58-60.
24. Haenszel W, Correa P. Developments in the epidemiology of stomach cancer over the past decade. *Cancer Res.* 1975;35(11 Pt. 2):3452-3459.
25. Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res.* 1988;48(13):3554-3560.
26. Correa P, Haenszel W, Cuello C, et al. Gastric precancerous process in a high risk population: Cohort follow-up. *Cancer Res.* 1990;50(15):4737-4740.
27. Jerzy Glass GB, Pitchumoni CS. Atrophic gastritis. Structural and ultrastructural alterations, exfoliative cytology and enzyme cytochemistry and histochemistry, proliferation kinetics, immunological derangements and other causes, and clinical associations and sequallae. *Hum Pathol.* 1975;6(2):219-250.
28. Siurala M, Vuorinen Y. Follow-up studies of patients with superficial gastritis and patients with a normal gastric mucosa. *Acta Med Scand.* 1963;173:45-52.

29. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1984;1(8390):1311-1315.
30. Marshall B. Helicobacter pylori: 20 years on. *Clin Med*. 2002;2(2):147-152.
31. Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, et al. Transfer of campylobacter pylori and campylobacter mustelae to helicobactergen. nov. as helicobacter pylori comb. nov. and helicobacter mustelae comb. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1989;39(4):397-405.
32. Marshall BJ, Armstrong JA, McGeachie DB, Glancy RJ. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric campylobacter. *Med J Aust*. 1985;142(8):436-439.
33. Morris A, Nicholson G. Ingestion of campylobacter pyloridis causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Am J Gastroenterol*. 1987;82(3):192-199.
34. Sobala GM, Crabtree JE, Dixon MF, et al. Acute helicobacter pylori infection: Clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology, and gastric juice ascorbic acid concentrations. *Gut*. 1991;32(11):1415-1418.
35. Dixon MF. Helicobacter pylori and peptic ulceration: Histopathological aspects. *J Gastroenterol Hepatol*. 1991;6(2):125-130.
36. Dooley CP, Cohen H, Fitzgibbons PL, et al. Prevalence of helicobacter pylori infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. *N Engl J Med*. 1989;321(23):1562-1566.
37. Rauws EA, Langenberg W, Houthoff HJ, Zanen HC, Tytgat GN. Campylobacter pyloridis-associated chronic active antral gastritis. A prospective study of its prevalence

and the effects of antibacterial and antiulcer treatment. *Gastroenterology*. 1988;94(1):33-40.

38. Genta RM, Hamner HW, Graham DY. Gastric lymphoid follicles in helicobacter pylori infection: Frequency, distribution, and response to triple therapy. *Hum Pathol*. 1993;24(6):577-583.

39. Megraud F, Lamouliatte H. Helicobacter pylori and duodenal ulcer. evidence suggesting causation. *Dig Dis Sci*. 1992;37(5):769-772.

40. Sipponen P, Varis K, Fraki O, Korri UM, Seppala K, Siurala M. Cumulative 10-year risk of symptomatic duodenal and gastric ulcer in patients with or without chronic gastritis. A clinical follow-up study of 454 outpatients. *Scand J Gastroenterol*. 1990;25(10):966-973.

41. Labenz J, Borsch G. Evidence for the essential role of helicobacter pylori in gastric ulcer disease. *Gut*. 1994;35(1):19-22.

42. Graham DY, Lew GM, Klein PD, et al. Effect of treatment of helicobacter pylori infection on the long-term recurrence of gastric or duodenal ulcer. A randomized, controlled study. *Ann Intern Med*. 1992;116(9):705-708.

43. Infection with helicobacter pylori. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 1994;61:177-240.

44. Parsonnet J, Vandersteen D, Goates J, Sibley RK, Pritikin J, Chang Y. Helicobacter pylori infection in intestinal- and diffuse-type gastric adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst*. 1991;83(9):640-643.

-
45. Talley NJ, Zinsmeister AR, Weaver A, et al. Gastric adenocarcinoma and helicobacter pylori infection. *J Natl Cancer Inst.* 1991;83(23):1734-1739.
46. Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among japanese americans in hawaii. *N Engl J Med.* 1991;325(16):1132-1136.
47. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, et al. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med.* 1991;325(16):1127-1131.
48. Forman D, Newell DG, Fullerton F, et al. Association between infection with helicobacter pylori and risk of gastric cancer: Evidence from a prospective investigation. *BMJ.* 1991;302(6788):1302-1305.
49. Correa P. Bacterial infections as a cause of cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(7):E3.
50. Correa P. Is gastric carcinoma an infectious disease? *N Engl J Med.* 1991;325(16):1170-1171.
51. Sipponen P, Price AB. The sydney system for classification of gastritis 20 years ago. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011;26 Suppl 1:31-34.
52. Misiewicz JJ. The sydney system: A new classification of gastritis. introduction. *J Gastroenterol Hepatol.* 1991;6(3):207-208.
53. Correa P, Yardley JH. Grading and classification of chronic gastritis: One american response to the sydney system. *Gastroenterology.* 1992;102(1):355-359.

-
54. Rubin CE. Histological classification of chronic gastritis: An iconoclastic view. *Gastroenterology*. 1992;102(1):360-361.
55. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. the updated sydney system. international workshop on the histopathology of gastritis, houston 1994. *Am J Surg Pathol*. 1996;20(10):1161-1181.
56. Wyatt JJ, Dixon MF. Chronic gastritis--a pathogenetic approach. *J Pathol*. 1988;154(2):113-124.
57. Price AB. The sydney system: Histological division. *J Gastroenterol Hepatol*. 1991;6(3):209-222.
58. Morson BC, Sobin LH, Grundmann E, Johansen A, Nagayo T, Serck-Hanssen A. Precancerous conditions and epithelial dysplasia in the stomach. *J Clin Pathol*. 1980;33(8):711-721.
59. Correa P. Precursors of gastric and esophageal cancer. *Cancer*. 1982;50(11 Suppl):2554-2565.
60. Correa P. Human gastric carcinogenesis: A multistep and multifactorial process--first american cancer society award lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Res*. 1992;52(24):6735-6740.
61. Rugge M, Correa P, Dixon MF, et al. Gastric mucosal atrophy: Interobserver consistency using new criteria for classification and grading. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002;16(7):1249-1259.

-
62. Nardone G, Rocco A, Malfertheiner P. Review article: Helicobacter pylori and molecular events in precancerous gastric lesions. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;20(3):261-270.
63. Rugge M, Genta RM. Staging and grading of chronic gastritis. *Hum Pathol.* 2005;36(3):228-233.
64. Rugge M, Genta RM, OLGA Group. Staging gastritis: An international proposal. *Gastroenterology.* 2005;129(5):1807-1808.
65. Rugge M, Correa P, Di Mario F, et al. OLGA staging for gastritis: A tutorial. *Dig Liver Dis.* 2008;40(8):650-658.
66. Rugge M, Meggio A, Pennelli G, et al. Gastritis staging in clinical practice: The OLGA staging system. *Gut.* 2007;56(5):631-636.
67. Satoh K, Osawa H, Yoshizawa M, et al. Assessment of atrophic gastritis using the OLGA system. *Helicobacter.* 2008;13(3):225-229.
68. Rugge M, de Boni M, Pennelli G, et al. Gastritis OLGA-staging and gastric cancer risk: A twelve-year clinico-pathological follow-up study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010;31(10):1104-1111.
69. Capelle LG, de Vries AC, Haringsma J, et al. The staging of gastritis with the OLGA system by using intestinal metaplasia as an accurate alternative for atrophic gastritis. *Gastrointest Endosc.* 2010;71(7):1150-1158.

70. el-Zimaity HM, Graham DY, al-Assi MT, et al. Interobserver variation in the histopathological assessment of helicobacter pylori gastritis. *Hum Pathol.* 1996;27(1):35-41.
71. Chen XY, van der Hulst RW, Bruno MJ, et al. Interobserver variation in the histopathological scoring of helicobacter pylori related gastritis. *J Clin Pathol.* 1999;52(8):612-615.
72. Offerhaus GJ, Price AB, Haot J, et al. Observer agreement on the grading of gastric atrophy. *Histopathology.* 1999;34(4):320-325.
73. Dinis-Ribeiro M, Areia M, de Vries AC, et al. Management of precancerous conditions and lesions in the stomach (MAPS): Guideline from the european society of gastrointestinal endoscopy (ESGE), european helicobacter study group (EHSg), european society of pathology (ESP), and the sociedade portuguesa de endoscopia digestiva (SPED). *Endoscopy.* 2012;44(1):74-94.
74. Gutierrez-Gonzalez L, Wright NA. Biology of intestinal metaplasia in 2008: More than a simple phenotypic alteration. *Dig Liver Dis.* 2008;40(7):510-522.
75. McDonald SA, Greaves LC, Gutierrez-Gonzalez L, et al. Mechanisms of field cancerization in the human stomach: The expansion and spread of mutated gastric stem cells. *Gastroenterology.* 2008;134(2):500-510.
76. Houghton J, Wang TC. Helicobacter pylori and gastric cancer: A new paradigm for inflammation-associated epithelial cancers. *Gastroenterology.* 2005;128(6):1567-1578.
77. Correa P, Houghton J. Carcinogenesis of helicobacter pylori. *Gastroenterology.* 2007;133(2):659-672.

-
78. Kawachi T, Kogure K, Tanaka N, Tokunaga A, Sugimura T. Studies of intestinal metaplasia in the gastric mucosa by detection of disaccharidases with "tes-tape". *J Natl Cancer Inst.* 1974;53(1):19-30.
79. Teglbjaerg PS, Nielsen HO. "Small intestinal type" and "colonic type" intestinal metaplasia of the human stomach, and their relationship to the histogenetic types of gastric adenocarcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand A.* 1978;86A(5):351-355.
80. Sipponen P, Seppala K, Varis K, et al. Intestinal metaplasia with colonic-type sulphomucins in the gastric mucosa; its association with gastric carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand A.* 1980;88(4):217-224.
81. Segura DI, Montero C. Histochemical characterization of different types of intestinal metaplasia in gastric mucosa. *Cancer.* 1983;52(3):498-503.
82. Baracchini P, Fulcheri E, Lapertosa G. Patterns of intestinal metaplasia in gastric biopsies. A comparison of different histochemical classifications. *Histochem J.* 1991;23(1):1-9.
83. Filipe MI, Munoz N, Matko I, et al. Intestinal metaplasia types and the risk of gastric cancer: A cohort study in slovenia. *Int J Cancer.* 1994;57(3):324-329.
84. Matsukura N, Suzuki K, Kawachi T, et al. Distribution of marker enzymes and mucin in intestinal metaplasia in human stomach and relation to complete and incomplete types of intestinal metaplasia to minute gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 1980;65(2):231-240.
85. Ramirez V. *Estudio de lesiones precursoras de cáncer gástrico en la provincia de soria.* [1994th]. Facultad de Medicina. Universidad de Zaragoza; 1994.

-
86. Jass JR, Filipe MI. A variant of intestinal metaplasia associated with gastric carcinoma: A histochemical study. *Histopathology*. 1979;3(3):191-199.
87. Correa P, Piazuelo MB, Wilson KT. Pathology of gastric intestinal metaplasia: Clinical implications. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(3):493-498.
88. Ho SB, Shekels LL, Toribara NW, et al. Mucin gene expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human gastric epithelium. *Cancer Res*. 1995;55(12):2681-2690.
89. Reis CA, David L, Correa P, et al. Intestinal metaplasia of human stomach displays distinct patterns of mucin (MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6) expression. *Cancer Res*. 1999;59(5):1003-1007.
90. Stemmermann GN. Intestinal metaplasia of the stomach. A status report. *Cancer*. 1994;74(2):556-564.
91. Cassaro M, Rugge M, Gutierrez O, Leandro G, Graham DY, Genta RM. Topographic patterns of intestinal metaplasia and gastric cancer. *Am J Gastroenterol*. 2000;95(6):1431-1438.
92. de Vries AC, Haringsma J, de Vries RA, et al. The use of clinical, histologic, and serologic parameters to predict the intragastric extent of intestinal metaplasia: A recommendation for routine practice. *Gastrointest Endosc*. 2009;70(1):18-25.
93. Leung WK, Lin SR, Ching JY, et al. Factors predicting progression of gastric intestinal metaplasia: Results of a randomised trial on helicobacter pylori eradication. *Gut*. 2004;53(9):1244-1249.

-
94. den Hoed CM, Holster IL, Capelle LG, et al. Follow-up of premalignant lesions in patients at risk for progression to gastric cancer. *Endoscopy*. 2013;45(4):249-256.
95. Heilmann KL, Hopker WW. Loss of differentiation in intestinal metaplasia in cancerous stomachs. A comparative morphologic study. *Pathol Res Pract*. 1979;164(3):249-258.
96. Rothery GA, Day DW. Intestinal metaplasia in endoscopic biopsy specimens of gastric mucosa. *J Clin Pathol*. 1985;38(6):613-621.
97. Silva S, Filipe MI. Intestinal metaplasia and its variants in the gastric mucosa of portuguese subjects: A comparative analysis of biopsy and gastrectomy material. *Hum Pathol*. 1986;17(10):988-995.
98. Turani H, Lurie B, Chaimoff C, Kessler E. The diagnostic significance of sulfated acid mucin content in gastric intestinal metaplasia with early gastric cancer. *Am J Gastroenterol*. 1986;81(5):343-345.
99. Huang CB, Xu J, Huang JF, Meng XY. Sulphomucin colonic type intestinal metaplasia and carcinoma in the stomach. A histochemical study of 115 cases obtained by biopsy. *Cancer*. 1986;57(7):1370-1375.
100. Kini U, Nirmala V, Thomas JA. Intestinal metaplasia in benign and malignant gastric lesions. *Indian J Pathol Microbiol*. 1990;33(2):137-143.
101. Silva S, Filipe MI, Pinho A. Variants of intestinal metaplasia in the evolution of chronic atrophic gastritis and gastric ulcer. A follow up study. *Gut*. 1990;31(10):1097-1104.

102. Craanen ME, Blok P, Dekker W, Ferwerda J, Tytgat GN. Prevalence of subtypes of intestinal metaplasia in gastric antral mucosa. *Dig Dis Sci*. 1991;36(11):1529-1536.
103. Rokkas T, Filipe MI, Sladen GE. Detection of an increased incidence of early gastric cancer in patients with intestinal metaplasia type III who are closely followed up. *Gut*. 1991;32(10):1110-1113.
104. Sirigu F, Dessi A, Tocco G, Usai P. Intestinal metaplasia of the gastric mucosa: A study of its incidence in various disease states. *Riv Eur Sci Med Farmacol*. 1991;13(1-2):25-28.
105. Wu MS, Shun CT, Lee WC, et al. Gastric cancer risk in relation to helicobacter pylori infection and subtypes of intestinal metaplasia. *Br J Cancer*. 1998;78(1):125-128.
106. Lin CK, Lai KH, Lo GH, et al. Cathepsin E and subtypes of intestinal metaplasia in carcinogenesis of the human stomach. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)*. 2001;64(6):331-336.
107. Dinis-Ribeiro M, Lopes C, da Costa-Pereira A, et al. A follow up model for patients with atrophic chronic gastritis and intestinal metaplasia. *J Clin Pathol*. 2004;57(2):177-182.
108. Vukobrat-Bijedic Z, Radovic S, Husic-Selimovic A, Gornjakovic S. Incomplete intestinal metaplasia as an indicator for early detection of gastric carcinoma in the events of helicobacter pylori positive chronic atrophic gastritis. *Bosn J Basic Med Sci*. 2006;6(4):48-53.
109. Kang KP, Lee HS, Kim N, et al. Role of intestinal metaplasia subtyping in the risk of gastric cancer in korea. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009;24(1):140-148.

-
110. Gonzalez CA, Sanz-Anquela JM, Gisbert JP, Correa P. Utility of subtyping intestinal metaplasia as marker of gastric cancer risk. A review of the evidence. *Int J Cancer*. 2013;133(5):1023-1032.
111. Mills JC, Shivdasani RA. Gastric epithelial stem cells. *Gastroenterology*. 2011;140(2):412-424.
112. Lauwers GY, Riddell RH. Gastric epithelial dysplasia. *Gut*. 1999;45(5):784-790.
113. Nakamura K, Sugano H, Takagi K, Fuchigami A. Histopathological study on early carcinoma of the stomach: Criteria for diagnosis of atypical epithelium. *Gan*. 1966;57(6):613-620.
114. Nagayo T. Histological diagnosis of biopsied gastric mucosa with special reference to the borderline cases. *Gann Monograph on Cancer Research*. 1971;11:245-256.
115. Grundmann E. Histologic types and possible initial stages in early gastric carcinoma. *Beitr Pathol*. 1975;154(3):256-280.
116. Rugge M, Correa P, Dixon MF, et al. Gastric dysplasia: The padova international classification. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(2):167-176.
117. Rugge M, Capelle LG, Cappellesso R, Nitti D, Kuipers EJ. Precancerous lesions in the stomach: From biology to clinical patient management. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2013;27(2):205-223.
118. Schlemper RJ, Kato Y, Stolte M. Review of histological classifications of gastrointestinal epithelial neoplasia: Differences in diagnosis of early carcinomas between japanese and western pathologists. *J Gastroenterol*. 2001;36(7):445-456.

-
119. Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, et al. The vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut*. 2000;47(2):251-255.
120. Oehlert W, Keller P, Henke M, Strauch M. Gastric mucosal dysplasia: What is its clinical significance? *Front Gastrointest Res*. 1979;4:173-182.
121. Ming SC, Bajtai A, Correa P, et al. Gastric dysplasia. significance and pathologic criteria. *Cancer*. 1984;54(9):1794-1801.
122. Cuello C, Lopez J, Correa P, Murray J, Zarama G, Gordillo G. Histopathology of gastric dysplasias: Correlations with gastric juice chemistry. *Am J Surg Pathol*. 1979;3(6):491-500.
123. Dixon MF. Gastrointestinal epithelial neoplasia: Vienna revisited. *Gut*. 2002;51(1):130-131.
124. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND. *WHO classification of tumours*. 4^a ed. ; 2010.
125. Goldstein NS, Lewin KJ. Gastric epithelial dysplasia and adenoma: Historical review and histological criteria for grading. *Hum Pathol*. 1997;28(2):127-133.
126. Gologan A, Graham DY, Sepulveda AR. Molecular markers in helicobacter pylori-associated gastric carcinogenesis. *Clin Lab Med*. 2005;25(1):197-222.
127. Merchant JL. Inflammation, atrophy, gastric cancer: Connecting the molecular dots. *Gastroenterology*. 2005;129(3):1079-1082.

128. Ushijima T, Hattori N. Molecular pathways: Involvement of helicobacter pylori-triggered inflammation in the formation of an epigenetic field defect, and its usefulness as cancer risk and exposure markers. *Clin Cancer Res.* 2012;18(4):923-929.
129. Hamamoto T, Yokozaki H, Semba S, et al. Altered microsatellites in incomplete-type intestinal metaplasia adjacent to primary gastric cancers. *J Clin Pathol.* 1997;50(10):841-846.
130. Ottini L, Palli D, Falchetti M, et al. Microsatellite instability in gastric cancer is associated with tumor location and family history in a high-risk population from tuscany. *Cancer Res.* 1997;57(20):4523-4529.
131. Leung WK, Kim JJ, Kim JG, Graham DY, Sepulveda AR. Microsatellite instability in gastric intestinal metaplasia in patients with and without gastric cancer. *Am J Pathol.* 2000;156(2):537-543.
132. Chung IK, Hwang KY, Kim IH, et al. Helicobacter pylori and telomerase activity in intestinal metaplasia of the stomach. *Korean J Intern Med.* 2002;17(4):227-233.
133. Sanz-Ortega J, Sanz-Esponera J, Caldes T, Gomez de la Concha E, Sobel ME, Merino MJ. LOH at the APC/MCC gene (5Q21) in gastric cancer and preneoplastic lesions. prognostic implications. *Pathol Res Pract.* 1996;192(12):1206-1210.
134. Brito MJ, Williams GT, Thompson H, Filipe MI. Expression of p53 in early (T1) gastric carcinoma and precancerous adjacent mucosa. *Gut.* 1994;35(12):1697-1700.
135. Shiao YH, Rugge M, Correa P, Lehmann HP, Scheer WD. P53 alteration in gastric precancerous lesions. *Am J Pathol.* 1994;144(3):511-517.

136. Ochiai A, Yamauchi Y, Hirohashi S. P53 mutations in the non-neoplastic mucosa of the human stomach showing intestinal metaplasia. *Int J Cancer*. 1996;69(1):28-33.
137. Higashikawa K, Yokozaki H, Ue T, et al. Evaluation of CD44 transcription variants in human digestive tract carcinomas and normal tissues. *Int J Cancer*. 1996;66(1):11-17.
138. Sung JJ, Leung WK, Go MY, et al. Cyclooxygenase-2 expression in helicobacter pylori-associated premalignant and malignant gastric lesions. *Am J Pathol*. 2000;157(3):729-735.
139. Yu J, Leung WK, Ng EK, et al. Effect of helicobacter pylori eradication on expression of cyclin D2 and p27 in gastric intestinal metaplasia. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001;15(9):1505-1511.
140. Babu SD, Jayanthi V, Devaraj N, Reis CA, Devaraj H. Expression profile of mucins (MUC2, MUC5AC and MUC6) in helicobacter pylori infected pre-neoplastic and neoplastic human gastric epithelium. *Mol Cancer*. 2006;5:10.
141. Satoh K, Mutoh H, Eda A, et al. Aberrant expression of CDX2 in the gastric mucosa with and without intestinal metaplasia: Effect of eradication of helicobacter pylori. *Helicobacter*. 2002;7(3):192-198.
142. Li J, Zhao A, Lu Y, Wang Y. Expression of p185erbB2 and p21ras in carcinoma, dysplasia, and intestinal metaplasia of the stomach: An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Semin Surg Oncol*. 1994;10(2):95-99.

-
143. Nardone G, Staibano S, Rocco A, et al. Effect of helicobacter pylori infection and its eradication on cell proliferation, DNA status, and oncogene expression in patients with chronic gastritis. *Gut*. 1999;44(6):789-799.
144. Lefebvre O, Chenard MP, Masson R, et al. Gastric mucosa abnormalities and tumorigenesis in mice lacking the pS2 trefoil protein. *Science*. 1996;274(5285):259-262.
145. Kang GH, Shim YH, Jung HY, Kim WH, Ro JY, Rhyu MG. CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res*. 2001;61(7):2847-2851.
146. Kang GH, Lee S, Kim JS, Jung HY. Profile of aberrant CpG island methylation along the multistep pathway of gastric carcinogenesis. *Lab Invest*. 2003;83(5):635-641.
147. Busuttill RA, Boussioutas A. Intestinal metaplasia: A premalignant lesion involved in gastric carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009;24(2):193-201.
148. de Vries AC, Haringsma J, Kuipers EJ. The detection, surveillance and treatment of premalignant gastric lesions related to helicobacter pylori infection. *Helicobacter*. 2007;12(1):1-15.
149. Sherman PM. Appropriate strategies for testing and treating helicobacter pylori in children: When and how? *Am J Med*. 2004;117 Suppl 5A:30S-35S.
150. Perez-Perez GI, Blaser MJ. Campylobacter and helicobacter. In: Baron S, ed. *Medical microbiology*. 4th ed. Galveston (TX): The University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. NBK8417 [bookaccession].

-
151. Goodwin CS, Worsley BW. Microbiology of helicobacter pylori. *Gastroenterol Clin North Am.* 1993;22(1):5-19.
152. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer.* 2006;118(12):3030-3044.
153. Kersulyte D, Chalkauskas H, Berg DE. Emergence of recombinant strains of helicobacter pylori during human infection. *Mol Microbiol.* 1999;31(1):31-43.
154. Israel DA, Salama N, Krishna U, et al. Helicobacter pylori genetic diversity within the gastric niche of a single human host. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(25):14625-14630.
155. Correa P, Piazeulo MB. Evolutionary history of the helicobacter pylori genome: Implications for gastric carcinogenesis. *Gut Liver.* 2012;6(1):21-28.
156. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen helicobacter pylori. *Nature.* 1997;388(6642):539-547.
157. Alm RA, Ling LS, Moir DT, et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen helicobacter pylori. *Nature.* 1999;397(6715):176-180.
158. Oh JD, Kling-Backhed H, Giannakis M, et al. The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis helicobacter pylori strain: Evolution during disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(26):9999-10004.

159. Weeks DL, Eskandari S, Scott DR, Sachs G. A H⁺-gated urea channel: The link between helicobacter pylori urease and gastric colonization. *Science*. 2000;287(5452):482-485.
160. Tsuda M, Karita M, Morshed MG, Okita K, Nakazawa T. A urease-negative mutant of helicobacter pylori constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infect Immun*. 1994;62(8):3586-3589.
161. Solnick JV, Josenhans C, Suerbaum S, Tompkins LS, Labigne A. Construction and characterization of an isogenic urease-negative mutant of helicobacter mustelae. *Infect Immun*. 1995;63(9):3718-3721.
162. Beswick EJ, Suarez G, Reyes VE. H pylori and host interactions that influence pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2006;12(35):5599-5605.
163. O'Toole PW, Lane MC, Porwollik S. Helicobacter pylori motility. *Microbes Infect*. 2000;2(10):1207-1214.
164. Josenhans C, Labigne A, Suerbaum S. Comparative ultrastructural and functional studies of helicobacter pylori and helicobacter mustelae flagellin mutants: Both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in helicobacter species. *J Bacteriol*. 1995;177(11):3010-3020.
165. Liechti G, Goldberg JB. Outer membrane biogenesis in escherichia coli, neisseria meningitidis, and helicobacter pylori: Paradigm deviations in H. pylori. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:29.
166. Monteiro MA, Appelmelk BJ, Rasko DA, et al. Lipopolysaccharide structures of helicobacter pylori genomic strains 26695 and J99, mouse model H. pylori sydney

strain, *H. pylori* P466 carrying sialyl lewis X, and *H. pylori* UA915 expressing lewis B classification of *H. pylori* lipopolysaccharides into glyco-type families. *Eur J Biochem.* 2000;267(2):305-320.

167. Salaun L, Saunders NJ. Population-associated differences between the phase variable LPS biosynthetic genes of *helicobacter pylori*. *BMC Microbiol.* 2006;6:79.

168. Logan SM, Conlan JW, Monteiro MA, Wakarchuk WW, Altman E. Functional genomics of *helicobacter pylori*: Identification of a beta-1,4 galactosyltransferase and generation of mutants with altered lipopolysaccharide. *Mol Microbiol.* 2000;35(5):1156-1167.

169. Unemo M, Aspholm-Hurtig M, Ilver D, et al. The sialic acid binding SabA adhesin of *helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils. *J Biol Chem.* 2005;280(15):15390-15397.

170. Posselt G, Backert S, Wessler S. The functional interplay of *helicobacter pylori* factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis. *Cell Commun Signal.* 2013;11:77-811X-11-77.

171. Stoicov C, Saffari R, Cai X, Hasyagar C, Houghton J. Molecular biology of gastric cancer: *Helicobacter* infection and gastric adenocarcinoma: Bacterial and host factors responsible for altered growth signaling. *Gene.* 2004;341:1-17.

172. Yamaoka Y. Roles of *helicobacter pylori* BabA in gastroduodenal pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 2008;14(27):4265-4272.

173. Roesler BM, Rabelo-Goncalves EM, Zeitune JM. Virulence factors of : A review. *Clin Med Insights Gastroenterol.* 2014;7:9-17.

174. Prinz C, Schoniger M, Rad R, et al. Key importance of the helicobacter pylori adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. *Cancer Res.* 2001;61(5):1903-1909.
175. Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, et al. Clinical relevance of the helicobacter pylori gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(22):12778-12783.
176. Stent A, Every AL, Sutton P. Helicobacter pylori defense against oxidative attack. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012;302(6):G579-87.
177. Atherton JC, Cover TL, Papini E, Telford JL. Vacuolating cytotoxin. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, eds. *Helicobacter pylori: Physiology and genetics.* Washington (DC): ASM Press; 2001. NBK2454 [bookaccession].
178. Wroblewski LE, Peek RM,Jr, Wilson KT. Helicobacter pylori and gastric cancer: Factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(4):713-739.
179. Atherton JC, Cao P, Peek RM,Jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of helicobacter pylori. association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem.* 1995;270(30):17771-17777.
180. Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, et al. A new helicobacter pylori vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology.* 2007;133(3):926-936.

181. Ogiwara H, Sugimoto M, Ohno T, et al. Role of deletion located between the intermediate and middle regions of the helicobacter pylori vacA gene in cases of gastroduodenal diseases. *J Clin Microbiol.* 2009;47(11):3493-3500.
182. Nogueira C, Figueiredo C, Carneiro F, et al. Helicobacter pylori genotypes may determine gastric histopathology. *Am J Pathol.* 2001;158(2):647-654.
183. Tummuru MK, Cover TL, Blaser MJ. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of helicobacter pylori: Evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun.* 1993;61(5):1799-1809.
184. Covacci A, Censini S, Bugnoli M, et al. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of helicobacter pylori associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(12):5791-5795.
185. Viala J, Chaput C, Boneca IG, et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the helicobacter pylori cag pathogenicity island. *Nat Immunol.* 2004;5(11):1166-1174.
186. Watanabe T, Asano N, Fichtner-Feigl S, et al. NOD1 contributes to mouse host defense against helicobacter pylori via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling pathway. *J Clin Invest.* 2010;120(5):1645-1662.
187. Nagy TA, Frey MR, Yan F, Israel DA, Polk DB, Peek RM, Jr. Helicobacter pylori regulates cellular migration and apoptosis by activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *J Infect Dis.* 2009;199(5):641-651.
188. Lauwers GY. Defining the pathologic diagnosis of metaplasia, atrophy, dysplasia, and gastric adenocarcinoma. *J Clin Gastroenterol.* 2003;36(5 Suppl):S37-43; discussion S61-2.

-
189. Kneller RW, You WC, Chang YS, et al. Cigarette smoking and other risk factors for progression of precancerous stomach lesions. *J Natl Cancer Inst.* 1992;84(16):1261-1266.
190. Nakamura M, Haruma K, Kamada T, et al. Cigarette smoking promotes atrophic gastritis in helicobacter pylori-positive subjects. *Dig Dis Sci.* 2002;47(3):675-681.
191. Russo A, Maconi G, Spinelli P, et al. Effect of lifestyle, smoking, and diet on development of intestinal metaplasia in H. pylori-positive subjects. *Am J Gastroenterol.* 2001;96(5):1402-1408.
192. Gonzalez CA, Pera G, Agudo A, et al. Smoking and the risk of gastric cancer in the european prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Int J Cancer.* 2003;107(4):629-634.
193. La Torre G, Chiaradia G, Gianfagna F, et al. Smoking status and gastric cancer risk: An updated meta-analysis of case-control studies published in the past ten years. *Tumori.* 2009;95(1):13-22.
194. Ladeiras-Lopes R, Pereira AK, Nogueira A, et al. Smoking and gastric cancer: Systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Cancer Causes Control.* 2008;19(7):689-701.
195. Tredaniel J, Boffetta P, Buiatti E, Saracci R, Hirsch A. Tobacco smoking and gastric cancer: Review and meta-analysis. *Int J Cancer.* 1997;72(4):565-573.
196. Malfertheiner P, Bornschein J, Selgrad M. Role of helicobacter pylori infection in gastric cancer pathogenesis: A chance for prevention. *J Dig Dis.* 2010;11(1):2-11.

197. Tramacere I, Negri E, Pelucchi C, et al. A meta-analysis on alcohol drinking and gastric cancer risk. *Ann Oncol.* 2012;23(1):28-36.
198. Fox JG, Beck P, Dangler CA, et al. Concurrent enteric helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces helicobacter-induced gastric atrophy. *Nat Med.* 2000;6(5):536-542.
199. Du Y, Agnew A, Ye XP, Robinson PA, Forman D, Crabtree JE. Helicobacter pylori and schistosoma japonicum co-infection in a chinese population: Helminth infection alters humoral responses to H. pylori and serum pepsinogen I/II ratio. *Microbes Infect.* 2006;8(1):52-60.
200. Whary MT, Sundina N, Bravo LE, et al. Intestinal helminthiasis in colombian children promotes a Th2 response to helicobacter pylori: Possible implications for gastric carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(6):1464-1469.
201. Wang WH, Huang JQ, Zheng GF, Lam SK, Karlberg J, Wong BC. Non-steroidal anti-inflammatory drug use and the risk of gastric cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(23):1784-1791.
202. Yang P, Zhou Y, Chen B, et al. Aspirin use and the risk of gastric cancer: A meta-analysis. *Dig Dis Sci.* 2010;55(6):1533-1539.
203. Tatsuguchi A, Sakamoto C, Wada K, et al. Localisation of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in helicobacter pylori related gastritis and gastric ulcer tissues in humans. *Gut.* 2000;46(6):782-789.
204. Chan FK, To KF, Ng YP, et al. Expression and cellular localization of COX-1 and -2 in helicobacter pylori gastritis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2001;15(2):187-193.

205. Wambura C, Aoyama N, Shirasaka D, et al. Effect of helicobacter pylori-induced cyclooxygenase-2 on gastric epithelial cell kinetics: Implication for gastric carcinogenesis. *Helicobacter*. 2002;7(2):129-138.
206. Nardone G, Rocco A, Vaira D, et al. Expression of COX-2, mPGE-synthase1, MDR-1 (P-gp), and bcl-xL: A molecular pathway of H pylori-related gastric carcinogenesis. *J Pathol*. 2004;202(3):305-312.
207. Saukkonen K, Tomasetto C, Narko K, Rio MC, Ristimaki A. Cyclooxygenase-2 expression and effect of celecoxib in gastric adenomas of trefoil factor 1-deficient mice. *Cancer Res*. 2003;63(12):3032-3036.
208. Freedman ND, Chow WH, Gao YT, et al. Menstrual and reproductive factors and gastric cancer risk in a large prospective study of women. *Gut*. 2007;56(12):1671-1677.
209. Frise S, Kreiger N, Gallinger S, Tomlinson G, Cotterchio M. Menstrual and reproductive risk factors and risk for gastric adenocarcinoma in women: Findings from the canadian national enhanced cancer surveillance system. *Ann Epidemiol*. 2006;16(12):908-916.
210. Lindblad M, Ye W, Rubio C, Lagergren J. Estrogen and risk of gastric cancer: A protective effect in a nationwide cohort study of patients with prostate cancer in sweden. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(12):2203-2207.
211. Gonzalez CA, Sala N, Capella G. Genetic susceptibility and gastric cancer risk. *Int J Cancer*. 2002;100(3):249-260.
212. Kufe DW. Mucins in cancer: Function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(12):874-885.

213. Carvalho F, Seruca R, David L, et al. MUC1 gene polymorphism and gastric cancer--an epidemiological study. *Glycoconj J*. 1997;14(1):107-111.
214. Garcia E, Carvalho F, Amorim A, David L. MUC6 gene polymorphism in healthy individuals and in gastric cancer patients from northern portugal. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1997;6(12):1071-1074.
215. Jia Y, Persson C, Hou L, et al. A comprehensive analysis of common genetic variation in MUC1, MUC5AC, MUC6 genes and risk of stomach cancer. *Cancer Causes Control*. 2010;21(2):313-321.
216. Saeki N, Saito A, Choi IJ, et al. A functional single nucleotide polymorphism in mucin 1, at chromosome 1q22, determines susceptibility to diffuse-type gastric cancer. *Gastroenterology*. 2011;140(3):892-902.
217. Xu Q, Yuan Y, Sun LP, et al. Risk of gastric cancer is associated with the MUC1 568 A/G polymorphism. *Int J Oncol*. 2009;35(6):1313-1320.
218. Katoh M. Trefoil factors and human gastric cancer (review). *Int J Mol Med*. 2003;12(1):3-9.
219. Fujimoto J, Yasui W, Tahara, et al. DNA hypermethylation at the pS2 promoter region is associated with early stage of stomach carcinogenesis. *Cancer Lett*. 1999;149:125-134.
220. dos Santos Silva E, Kayademir T, Regateiro F, et al. Variable distribution of TFF2 (spasmolysin) alleles in europeans does not indicate predisposition to gastric cancer. *Hum Hered*. 1999;49(1):45-47.

221. El-Omar EM. The importance of interleukin 1beta in helicobacter pylori associated disease. *Gut*. 2001;48(6):743-747.
222. El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, et al. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology*. 2003;124(5):1193-1201.
223. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:683-765.
224. Wang P, Xia HH, Zhang JY, Dai LP, Xu XQ, Wang KJ. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with gastric cancer: A meta-analysis. *Int J Cancer*. 2007;120(3):552-562.
225. Persson C, Canedo P, Machado JC, El-Omar EM, Forman D. Polymorphisms in inflammatory response genes and their association with gastric cancer: A HuGE systematic review and meta-analyses. *Am J Epidemiol*. 2011;173(3):259-270.
226. Wang J, Pan HF, Hu YT, Zhu Y, He Q. Polymorphism of IL-8 in 251 allele and gastric cancer susceptibility: A meta-analysis. *Dig Dis Sci*. 2010;55(7):1818-1823.
227. Zhuang W, Wu XT, Zhou Y, et al. Interleukin10 -592 promoter polymorphism associated with gastric cancer among asians: A meta-analysis of epidemiologic studies. *Dig Dis Sci*. 2010;55(6):1525-1532.
228. 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(6):1042-1050.

229. Lu PH, Tang Y, Li C, et al. Meta-analysis of association of tumor necrosis factor alpha-308 gene promoter polymorphism with gastric cancer. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 2010;44(3):209-214.
230. Boccia S, De Lauretis A, Gianfagna F, van Duijn CM, Ricciardi G. CYP2E1PstI/RsaI polymorphism and interaction with tobacco, alcohol and GSTs in gastric cancer susceptibility: A meta-analysis of the literature. *Carcinogenesis*. 2007;28(1):101-106.
231. Chen B, Cao L, Zhou Y, et al. Glutathione S-transferase T1 (GSTT1) gene polymorphism and gastric cancer susceptibility: A meta-analysis of epidemiologic studies. *Dig Dis Sci*. 2010;55(7):1831-1838.
232. Chen B, Zhou Y, Yang P, Wu XT. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism and gastric cancer risk: An updated analysis. *Arch Med Res*. 2010;41(7):558-566.
233. Zhou Y, Li N, Zhuang W, et al. Glutathione S-transferase P1 gene polymorphism associated with gastric cancer among caucasians. *Eur J Cancer*. 2009;45(8):1438-1442.
234. Zhong X, Hui C, Xiao-Ling W, Yan L, Na L. NAT2 polymorphism and gastric cancer susceptibility: A meta-analysis. *Arch Med Res*. 2010;41(4):275-280.
235. Berwick M, Vineis P. Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: An epidemiologic review. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(11):874-897.
236. Xue H, Ni P, Lin B, Xu H, Huang G. X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1) genetic polymorphisms and gastric cancer risk: A HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2011;173(4):363-375.

237. Chen B, Zhou Y, Yang P, Wu XT. ERCC2 Lys751Gln and Asp312Asn polymorphisms and gastric cancer risk: A meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011;137(6):939-946.
238. Fang F, Wang J, Yao L, Yu XJ, Yu L, Yu L. Relationship between XRCC3 T241M polymorphism and gastric cancer risk: A meta-analysis. *Med Oncol.* 2011;28(4):999-1003.
239. Kim YI. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: A paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. *Nutr Rev.* 2000;58(7):205-209.
240. Dong X, Wu J, Liang P, Li J, Yuan L, Liu X. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and gastric cancer: A meta-analysis. *Arch Med Res.* 2010;41(2):125-133.
241. Zhou Y, Li N, Zhuang W, et al. P53 codon 72 polymorphism and gastric cancer: A meta-analysis of the literature. *Int J Cancer.* 2007;121(7):1481-1486.
242. Huntsman DG, Carneiro F, Lewis FR, et al. Early gastric cancer in young, asymptomatic carriers of germ-line E-cadherin mutations. *N Engl J Med.* 2001;344(25):1904-1909.
243. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, et al. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med.* 2001;345(11):784-789.
244. Inoue M, Tajima K, Matsuura A, et al. Severity of chronic atrophic gastritis and subsequent gastric cancer occurrence: A 10-year prospective cohort study in Japan. *Cancer Lett.* 2000;161(1):105-112.

-
245. Whiting JL, Sigurdsson A, Rowlands DC, Hallissey MT, Fielding JW. The long term results of endoscopic surveillance of premalignant gastric lesions. *Gut*. 2002;50(3):378-381.
246. You WC, Zhang L, Gail MH, et al. Gastric dysplasia and gastric cancer: Helicobacter pylori, serum vitamin C, and other risk factors. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(19):1607-1612.
247. El-Zimaity HM, Ramchatesingh J, Saeed MA, Graham DY. Gastric intestinal metaplasia: Subtypes and natural history. *J Clin Pathol*. 2001;54(9):679-683.
248. Misdraji J, Lauwers GY. Gastric epithelial dysplasia. *Semin Diagn Pathol*. 2002;19(1):20-30.
249. Suerbaum S, Michetti P. Helicobacter pylori infection. *N Engl J Med*. 2002;347(15):1175-1186.
250. Plummer M, van Doorn LJ, Franceschi S, et al. Helicobacter pylori cytotoxin-associated genotype and gastric precancerous lesions. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(17):1328-1334.
251. Senapati S, Sharma P, Bafna S, Roy HK, Batra SK. The MUC gene family: Their role in the diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Histol Histopathol*. 2008;23(12):1541-1552.
252. Swallow DM, Gendler S, Griffiths B, Corney G, Taylor-Papadimitriou J, Bramwell ME. The human tumour-associated epithelial mucins are coded by an expressed hypervariable gene locus PUM. *Nature*. 1987;328(6125):82-84.

-
253. Gendler SJ, Lancaster CA, Taylor-Papadimitriou J, et al. Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J Biol Chem.* 1990;265(25):15286-15293.
254. Carvalho F, Peixoto A, Steffensen R, Amorim A, David L, Sobrinho-Simoes M. MUC1 gene polymorphism does not explain the different incidence of gastric cancer in portugal and denmark. *Ann Hum Genet.* 1999;63(Pt 3):187-191.
255. Silva F, Carvalho F, Peixoto A, et al. MUC1 polymorphism confers increased risk for intestinal metaplasia in a colombian population with chronic gastritis. *Eur J Hum Genet.* 2003;11(5):380-384.
256. Silva F, Carvalho F, Peixoto A, et al. MUC1 gene polymorphism in the gastric carcinogenesis pathway. *Eur J Hum Genet.* 2001;9(7):548-552.
257. Mera R, Fontham ET, Bravo LE, et al. Long term follow up of patients treated for helicobacter pylori infection. *Gut.* 2005;54(11):1536-1540.
258. van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, et al. Expanding allelic diversity of helicobacter pylori vacA. *J Clin Microbiol.* 1998;36(9):2597-2603.
259. van Doorn LJ, Figueiredo C, Rossau R, et al. Typing of helicobacter pylori vacA gene and detection of cagA gene by PCR and reverse hybridization. *J Clin Microbiol.* 1998;36(5):1271-1276.
260. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science.* 2002;296(5576):2225-2229.

-
261. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21(2):263-265.
262. Gonzalez JR, Armengol L, Sole X, et al. SNPAssoc: An R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics*. 2007;23(5):644-645.
263. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
264. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012 v1.0, cancer incidence and mortality worldwide. <http://globocan.iarc.fr>. Updated 2015. Accessed julio 28 2015, 2015.
265. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, et al. Cancer survival in europe 1999-2007 by country and age: Results of EURO CARE--5-a population-based study. *Lancet Oncol*. 2014;15(1):23-34.
266. Sipponen P, Correa P. Delayed rise in incidence of gastric cancer in females results in unique sex ratio (M/F) pattern: Etiologic hypothesis. *Gastric Cancer*. 2002;5(4):213-219.
267. You WC, Li JY, Blot WJ, et al. Evolution of precancerous lesions in a rural chinese population at high risk of gastric cancer. *Int J Cancer*. 1999;83(5):615-619.
268. Inoue M, Tajima K, Kobayashi S, et al. Protective factor against progression from atrophic gastritis to gastric cancer--data from a cohort study in japan. *Int J Cancer*. 1996;66(3):309-314.

269. Dhillon PK, Farrow DC, Vaughan TL, et al. Family history of cancer and risk of esophageal and gastric cancers in the united states. *Int J Cancer*. 2001;93(1):148-152.
270. Yaghoobi M, Bijarchi R, Narod SA. Family history and the risk of gastric cancer. *Br J Cancer*. 2010;102(2):237-242.
271. Ramesar KC, Sanders DS, Hopwood D. Limited value of type III intestinal metaplasia in predicting risk of gastric carcinoma. *J Clin Pathol*. 1987;40(11):1287-1290.
272. Ectors N, Dixon MF. The prognostic value of sulphomucin positive intestinal metaplasia in the development of gastric cancer. *Histopathology*. 1986;10(12):1271-1277.
273. Tava F, Luinetti O, Ghigna MR, et al. Type or extension of intestinal metaplasia and immature/atypical "indefinite-for-dysplasia" lesions as predictors of gastric neoplasia. *Hum Pathol*. 2006;37(11):1489-1497.
274. Matsukuma A, Mori M, Enjoji M. Sulphomucin-secreting intestinal metaplasia in the human gastric mucosa. an association with intestinal-type gastric carcinoma. *Cancer*. 1990;66(4):689-694.
275. El-Zimaity HM. Gastric atrophy, diagnosing and staging. *World J Gastroenterol*. 2006;12(36):5757-5762.
276. Kuipers EJ, Perez-Perez GI, Meuwissen SG, Blaser MJ. Helicobacter pylori and atrophic gastritis: Importance of the cagA status. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87(23):1777-1780.

277. Cover TL, Blanke SR. Helicobacter pylori VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(4):320-332.
278. Bukanov NO, Berg DE. Ordered cosmid library and high-resolution physical-genetic map of helicobacter pylori strain NCTC11638. *Mol Microbiol.* 1994;11(3):509-523.
279. Chang SK, Dohrman AF, Basbaum CB, et al. Localization of mucin (MUC2 and MUC3) messenger RNA and peptide expression in human normal intestine and colon cancer. *Gastroenterology.* 1994;107(1):28-36.
280. Kim YS, Ho SB. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep.* 2010;12(5):319-330.
281. Mejias-Luque R, Linden SK, Garrido M, et al. Inflammation modulates the expression of the intestinal mucins MUC2 and MUC4 in gastric tumors. *Oncogene.* 2010;29(12):1753-1762.
282. Frank B, Weck MN, Muller H, et al. Polymorphisms in MUC1, MUC2, MUC5B and MUC6 genes are not associated with the risk of chronic atrophic gastritis. *Eur J Cancer.* 2012;48(1):114-120.
283. Murata-Kamiya N, Kurashima Y, Teishikata Y, et al. Helicobacter pylori CagA interacts with E-cadherin and deregulates the beta-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene.* 2007;26(32):4617-4626.
284. Matsuda K, Yamauchi K, Matsumoto T, Sano K, Yamaoka Y, Ota H. Quantitative analysis of the effect of helicobacter pylori on the expressions of SOX2, CDX2, MUC2,

MUC5AC, MUC6, TFF1, TFF2, and TFF3 mRNAs in human gastric carcinoma cells.

Scand J Gastroenterol. 2008;43(1):25-33.

285. Li WQ, Zhang L, Ma JL, et al. Association between genetic polymorphisms of DNA base excision repair genes and evolution of precancerous gastric lesions in a chinese population. *Carcinogenesis.* 2009;30(3):500-505.

286. Plummer M, Buiatti E, Lopez G, et al. Histological diagnosis of precancerous lesions of the stomach: A reliability study. *Int J Epidemiol.* 1997;26(4):716-720.

287. El-Zimaity HM, Graham DY. Evaluation of gastric mucosal biopsy site and number for identification of helicobacter pylori or intestinal metaplasia: Role of the sydney system. *Hum Pathol.* 1999;30(1):72-77.

288. Guarner J, Herrera-Goepfert R, Mohar A, et al. Diagnostic yield of gastric biopsy specimens when screening for preneoplastic lesions. *Hum Pathol.* 2003;34(1):28-31.

289. de Vries AC, Haringsma J, de Vries RA, et al. Biopsy strategies for endoscopic surveillance of pre-malignant gastric lesions. *Helicobacter.* 2010;15(4):259-264.

290. Satoh K, Kimura K, Taniguchi Y, et al. Biopsy sites suitable for the diagnosis of helicobacter pylori infection and the assessment of the extent of atrophic gastritis. *Am J Gastroenterol.* 1998;93(4):569-573.

291. Dursun M, Yilmaz S, Yukselen V, Kilinc N, Canoruc F, Tuzcu A. Evaluation of optimal gastric mucosal biopsy site and number for identification of helicobacter pylori, gastric atrophy and intestinal metaplasia. *Hepatogastroenterology.* 2004;51(60):1732-1735.

292. el-Zimaity HM, al-Assi MT, Genta RM, Graham DY. Confirmation of successful therapy of helicobacter pylori infection: Number and site of biopsies or a rapid urease test. *Am J Gastroenterol*. 1995;90(11):1962-1964.

293. El-Zimaity HM, Ota H, Graham DY, Akamatsu T, Katsuyama T. Patterns of gastric atrophy in intestinal type gastric carcinoma. *Cancer*. 2002;94(5):1428-1436.