

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

---

---



**ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA**

**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**EXPRESIÓN DE CITOCINAS Th1, Th2 Y Th3 EN BIOPSIAS  
OBTENIDAS DE PACIENTES CON  
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**PRESENTA:**

**VERÓNICA MUÑOZ PÉREZ**

**DIRECTORES DE TESIS**

**D. EN C. MARÍA ALICIA DÍAZ Y OREA  
D. EN C. ELEAZAR LARA PADILLA**

Puebla, Pue. Julio 2011

## ÍNDICE

	Página
Agradecimientos .....	6
Acta de revisión .....	8
Glosario .....	9
Relación de Figuras, Gráficas y Tablas .....	3
Resumen .....	11
Summary .....	13
Antecedentes .....	15
Planteamiento del Problema .....	57
Hipótesis .....	57
Objetivo .....	57
Material y Métodos .....	58
Resultados .....	69
Análisis .....	77
Discusión de resultados .....	89
Conclusiones .....	95
Recomendaciones.....	96
Bibliografía .....	97
Anexos .....	124

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cáncer gástrico temprano (cáncer tipo 0).....	27
<b>Figura 2.</b> Clasificación del cáncer gástrico avanzado según Borrmann.....	29
<b>Figura 3.</b> Agrupación de estadíos.....	30
<b>Figura 4.</b> Escalas visuales de los infiltrados inflamatorios .....	34
<b>Figura 5.</b> Mediadores de la respuesta inmune contra tumores.....	38
<b>Figura 6.</b> Efectos de las citocinas.....	40
<b>Figura 7.</b> Acciones del INF- $\gamma$ .....	42
<b>Figura 8.</b> IL-2R.....	43
<b>Figura 9.</b> Th1-Th2.....	46
<b>Figura 10.</b> TGF- $\beta$ .....	48
<b>Figura 11.</b> Adenocarcinoma Tipo Difuso .....	74
<b>Figura 12.</b> Adenocarcinoma Tipo Intestinal .....	74
<b>Figura 13.</b> Adenocarcinoma Tipo Mixto.....	75
<b>Figura 14.</b> Expresión de IL-2 por inmunohistoquímica en biopsias de pacientes con Adenocarcinoma gástrico.....	79
<b>Figura 15.</b> Expresión de IL-4 por inmunohistoquímica en biopsias de pacientes con Adenocarcinoma gástrico.....	74
<b>Figura 16.</b> Expresión de IL-10 por inmunohistoquímica en biopsias de pacientes con Adenocarcinoma gástrico.....	80
<b>Figura 17.</b> Expresión de TGF- $\beta$ por inmunohistoquímica en biopsias de pacientes con Adenocarcinoma gástrico.....	80

## INDICE DE GRAFICAS

<b>Grafica 1.</b> Distribución de pacientes por edad.....	71
<b>Gráfica 2.</b> Distribución de pacientes por género.....	71
<b>Gráfica 3.</b> Distribución de pacientes por procedimiento quirúrgico.....	72
<b>Gráfica 4.</b> Distribución de pacientes por tipo histológico.....	73
<b>Gráfica 5.</b> Reacción inflamatoria.....	75
<b>Gráfica 6.</b> Distribución de pacientes por estadios de acuerdo a la clasificación TNM.....	76
<b>Grafica 7.</b> Expresión de IL-2 por inmunohistoquímica en biopsias de pacientes con Adenocarcinoma gástrico.....	77
<b>Grafica 8.</b> Expresión de IL-4 por inmunohistoquímica en biopsias de pacientes con Adenocarcinoma gástrico.....	78
<b>Grafica 9.</b> Expresión de IL-10 por inmunohistoquímica en biopsias de pacientes con Adenocarcinoma gástrico.....	79
<b>Gráfica 10.</b> Porcentaje de casos con adenocarcinoma gástrico según número de IL positivas y negativas.....	81

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Edad promedio de los pacientes (total y de acuerdo a sexos) .....	72
<b>Tabla 2.</b> Asociación entre la IL-2 de los casos de adenocarcinoma gástrico y el género .....	82
<b>Tabla 3.</b> Asociación entre la IL-4 de los casos de adenocarcinoma gástrico y el género .....	82
<b>Tabla 4.</b> Asociación entre la IL-10 de los casos de adenocarcinoma gástrico y el género .....	82
<b>Tabla 5.</b> Asociación entre la IL-2 de los casos de adenocarcinoma gástrico y el estadio clínico .....	83
<b>Tabla 6.</b> Asociación entre la IL-4 de los casos de adenocarcinoma gástrico y el estadio clínico .....	83
<b>Tabla 7.</b> Asociación entre la IL-10 de los casos de adenocarcinoma gástrico y el estadio clínico .....	84
<b>Tabla 8</b> Asociación entre la IL-2 de los casos de adenocarcinoma gástrico y el infiltrado inflamatorio.....	85
<b>Tabla 9</b> Asociación entre la IL-4 de los casos de adenocarcinoma gástrico y el infiltrado inflamatorio.....	86
<b>Tabla 10</b> Asociación entre la IL-10 de los casos de adenocarcinoma gástrico y el infiltrado inflamatorio.....	86
<b>Tabla 11</b> Asociación entre la IL-2 de los casos de adenocarcinoma gástrico y clasificación histológica .....	87
<b>Tabla 12</b> Asociación entre la IL-4 de los casos de adenocarcinoma gástrico y clasificación histológica .....	88
<b>Tabla 13</b> Asociación entre la IL-10 de los casos de adenocarcinoma gástrico y clasificación histológica.....	88

## **AGRADECIMIENTOS**

Se agradece a la Secretaría de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional, al IMSS, al ESM BUAP y al CONCYTEP por el apoyo para la realización de este trabajo de tesis, el cual deriva del proyecto de investigación “Expresión de citocinas Th1, Th2 Y Th3 en biopsias obtenidas de pacientes con adenocarcinoma gástrico”.



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 8:00 horas del día 1 del mes de julio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M. para examinar la tesis titulada:

**"EXPRESIÓN DE CITOCINAS Th1, Th2 Y Th3 EN BIOPSIAS OBTENIDAS DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA GÁSTRICO"**

Presentada por la alumna:

<b>Muñoz</b>	<b>Pérez</b>	<b>Verónica</b>
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)

Con registro: 

A	0	9	0	7	5	8
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

**Maestría en Ciencias de la Salud**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Eleazar Lara Padilla

Dra. María Alicia Díaz y Orea

Dr. Angel Millar García

Dra. Gisela Gutiérrez Iglesias

Dra. María Elena Hernández Campos

### PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Eleazar Lara Padilla



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA  
IPN  
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
DIRECCION  
CONTRATO ESCOLAR



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México el día 1 del mes julio del año 2011, el que suscribe Muñoz Pérez Verónica alumno del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud con número de registro A090758 adscrito a La Escuela Superior De Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Eleazar Lara Padilla, Dra. María Alicia Díaz y Orea y cede los derechos del trabajo intitulado “EXPRESIÓN DE CITOCINAS Th1, Th2 Y Th3 EN BIOPSIAS OBTENIDAS DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA GÁSTRICO”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección vemupe10@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
Verónica Muñoz Pérez

Nombre y firma

## GLOSARIO

**Cáncer gástrico.** El carcinoma gástrico es una neoplasia maligna de estirpe epitelial con diferenciación glandular, el cual en la actualidad representa uno de los tumores más frecuentes y de estos, el adenocarcinoma es el más encontrado independientemente de la edad, raza o factores predisponentes que presente el paciente (etiología multifactorial).

**Clasificación de Lauren:** Se divide en los siguientes tipos: Difuso, intestinal y mixto. También se le denomina DIO (difuse, intestinal and other). Los de tipo intestinal por su semejanza con la mucosa de intestino delgado o grueso y los difusos los cuales no norman un patrón específico.

**Clasificación T.N.M:** De acuerdo a la extensión del tumor primario (T), compromiso ganglionar linfático regional (N) y presencia de metástasis a distancia (M). Basado en estos factores se define el sistema de estadíaje más utilizado TNM.

**Tinción de hhematoxilina-eosina:** Corresponde a la mezcla de hematoxilina y eosina. La tinción hematoxilina y eosina es el método más popular de tinción utilizado en histología y medicina diagnostica. La hematoxilina, que por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos Azul y Púrpura, como por ejemplo los núcleos celulares; y el uso de eosina que tiñe componentes básicos (acidófilos) en tonos de color rosa, gracias a su naturaleza aniónica o ácida, como el citoplasma.

**Inmunohistoquímica:** Es un procedimiento histopatológico que se basa en la utilización de un anticuerpo específico, previamente marcado mediante un enlace químico con una enzima que puede transformar un sustrato en visible, sin afectar la capacidad del anticuerpo para formar un complejo con el antígeno, aplicado a una muestra de tejido orgánico, correctamente fijada e incluida en parafina.

## 1. RESUMEN

**Introducción:** Existen diferentes tipos de cáncer que se presentan en el estómago, pero el más frecuente es adenocarcinoma independientemente de la edad, raza o factores predisponentes que presente el paciente (etiología multifactorial). En los últimos años ha aumentado su prevalencia a nivel mundial. Se han realizado numerosos estudios clínicos y moleculares, sin embargo no se han realizado estudios relacionados con la respuesta inmunológica asociada a este tipo de tumor maligno, la finalidad de implementar terapias inmunológicas enfocadas al tratamiento de esta enfermedad. Con el propósito de identificar el tipo de respuesta inmunológica que se presenta en los tejidos de pacientes mexicanos con adenocarcinoma gástrico, estudiados en un hospital de concentración de tercer nivel del estado de Puebla, el objetivo de este trabajo fue determinar la expresión de citocinas Th1, Th2 Y Th3 en biopsias dichos de pacientes. **Material y métodos:** Se realizó un estudio transversal, observacional, exploratorio en el laboratorio de Inmunología Experimental de la Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y en el Servicio de Patología de la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional General de División "Manuel Ávila Camacho" del Instituto Mexicano del Seguro Social, Puebla, durante el período comprendido de enero de 2010 a junio de 2011. Se incluyeron pacientes de ambos sexos con diagnóstico de adenocarcinoma gástrico por histopatología. A los pacientes que ameritaron gastrectomía total se le tomó una biopsia, la cual se procesó y se le realizó tinción de hematoxilina eosina para identificar el tipo histológico, estadificarlo y observar

el grado de infiltrado inflamatorio, así como Inmunohistoquímica para observar la respuesta inmunológica asociada a este tipo de tumoración. **Resultados:** Se estudiaron 30 biopsias de pacientes con adenocarcinoma gástrico, 15 de mujeres y 15 de hombres, con edad de 31 a 88 años (promedio 58.34  $p = 0.49$ ). En base a la clasificación de Lauren, el 60% fue difuso, 20% intestinal y 20% mixto. El 16.6% fueron estadio I, 26.6% estadio II, 30% estadio III y 26.6%, estadio IV. De los casos con citocinas positivas, el 23% correspondieron a IL-2, 26.7% a IL-4, 16.6% a IL-10 y en ningún caso se detectó TGF- $\beta$  positivo. El 100% de las IL-2 positivas se observaron en los estadios I-II ( $p = 0.009$ ), el 87.5 % de las IL-4 positivas se observaron en los estadios I-II ( $p = 0.005$ ) y 100.0 % de las IL-10 positivas se observaron en los estadios I-II ( $p = 0.009$ ). Sin embargo, al correlacionar las citocinas positivas con el género, infiltrado inflamatorio y clasificación histológica no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

**Conclusiones:** A menores edades, Las mujeres son mas propensas que los hombres para tener adenocarcinoma gástrico. En el cáncer gástrico hay una respuesta Th1 en la mayoría de hombres y una respuesta Th2 en menos casos, en tanto que en las mujeres sucede lo contrario. El cáncer gástrico se presenta en mayor proporción en estadios clínicos avanzados. En los estadios clínicos tempranos predomina una respuesta inmunológica Th2 y en los estadios más avanzados la respuesta inmunológica es casi nula.

**Palabras clave:** Cáncer gástrico, citocinas Th1, Th2 Y Th3, biopsia gástrica.

## 1. SUMMARY

**Introduction:** There are many kinds of cancer that can be present in the stomach. The adenocarcinoma is the most common in people, without taking considerations such as age, race or medical history of the patient. Among the last years, its prevalence has increased worldwide. A great amount of clinical and molecular tests in relation with this kind of cancer had been realized. However, tests intending to treat this pathology involving immunological response associated to this kind of malignancy had never been done before. That was the reason why an immunohistochemistry test in Mexican population was held in a third level hospital at Puebla, which could allow us to identify what kind of immunological response exists. The **Objective** of this work was to determine the expression of Th1, Th2 and Th3 cytokines in the biopsies of patients with gastric adenocarcinoma.

**Process and material:** A transversal, observational and exploratory study was done at the Pathology service of the Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional General de División "Manuel Ávila Camacho", of the Instituto Mexicano del Seguro Social, Puebla and at the Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma of Puebla, from January 2009 to June 2011. It was include male and female patients with gastric adenocarcinoma diagnosis for histology. The patients with total gastrectomy was stratified and they were took a biopsy, which was processed and underwent hematoxylin and eosin staining and immunohistochemistry to identify the histological type and immune response associated with this type of malignancy.

**Results:** Of the 30 biopsies from patients with gastric adenocarcinoma accounted

for 15 women and 15 men with age range from 31 to 88 years (average 58.34 p = 0.49). Based on the Lauren classification, 60% were diffuse, intestinal 20% and 20% mixed. 16.6% were stage I, 26.6% stage II, stage III 30% and 26.6% stage IV. Positive cases of cytokines, 23% were IL-2, 26.7% IL-4, 16.6% IL-10 and in no case was detected TGF- $\beta$  positive. Cytokines in positive correlation with gender, histological grading inflammatory infiltrate and there was no statistical difference. Statistically significant differences were found only for the following variables: 100% of IL-2 positive were observed in stages I-II ( $p = 0.009$ ), 87.5% of the positive IL-4 were observed in stages I -II ( $p = 0.005$ ) and 100.0% of the positive IL-10 were observed in stages I-II ( $p = 0.009$ ). **Conclusions:** In women younger men are more likely to have gastric adenocarcinoma. In gastric cancer there is a Th1 response in most men, they also present a Th2 response but in fewer cases in women and the opposite happens. Gastric cancer has a higher proportion advanced clinical stages. In early clinical stages predominantly Th2 immune response and the more advanced stages of gastric adenocarcinoma immune response is negligible.

**Key words:** Gastric cancer, of Th1, Th2 and Th3 cytokines, gastric biopsy.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 GENERALES**

#### **Cáncer Gástrico.**

El carcinoma gástrico es una neoplasia maligna de estirpe epitelial con diferenciación glandular, el cual en la actualidad representa uno de los tumores más frecuentes y de estos, el adenocarcinoma es el más común independientemente de la edad, raza o factores predisponentes que presente el paciente (etiología multifactorial). Los carcinomas gástricos pueden clasificarse de acuerdo al sitio de origen (antrales, fúndicos, o de la unión cardioesofágica). Desde el punto de vista microscópicos pueden ser polipoides, ulcerados, difusos o infiltrantes. Microscópicamente los podemos dividir en dos subgrupos los de tipo intestinal por su semejanza con la mucosa de intestino delgado o grueso y los difusos los cuales no tienen un patrón específico. El grado de malignidad que presentan estos tumores lo podemos definir por su diferenciación que puede ser leve, moderada o severa dependiendo de su semejanza de lo normal a lo anaplásico (1,2).

#### **Epidemiología**

A pesar de la disminución de la incidencia del carcinoma gástrico en los últimos años, esta enfermedad todavía es la causa de muerte más común por cáncer en todo el mundo, siendo el segundo tumor maligno más frecuente (3).

La incidencia es muy variable en todos los países (4). La incidencia más alta se observa en países como Japón, Chile, Costa Rica, Corea, Gran Bretaña, China, Colombia, Venezuela y otros países de Asia, Sudamérica y Europa del Este (5). Según el Reporte Histopatológico Nacional de Neoplasia Malignas en México, en la información nacional de morbilidad 2003 se reportaron 3,584 casos, de los cuales 55.60% fueron hombres y 44.39% mujeres. Globalmente ocupó el 17° lugar en tumores malignos tanto en hombres como en mujeres. La mortalidad en México alcanzó 5 por cada 100 000 habitantes, consolidándose como el tumor digestivo maligno más frecuente.

La mortalidad por cáncer de estómago en el estado de Puebla en el 2003 se ubicó dentro de las 5 principales causas. En varones el cáncer de estómago ocupa el cuarto lugar después del cáncer de próstata, bronquios y pulmón e hígado. En las mujeres también ocupa el cuarto lugar, atrás del cáncer de útero, mama e hígado. También se observa que a mayor edad, mayor incremento, independientemente del género (6).

### **Factores de riesgo**

Se han descrito diversos factores de riesgo del cáncer gástrico:

**Genéticos.** En familias de pacientes con cáncer gástrico la incidencia es 2 a veces mayor. Aproximadamente el 10-15% de los cánceres de estómago surgen en los individuos con una condición heredo-familiar (7,8), por ejemplo, mutaciones en el gen CDH1, que codifica para la proteína de adhesión de células epiteliales E-cadherina (8). Se ha sugerido que un genotipo inactivo de la enzima glutatión transferasa (la cual está involucrada en procesos de detoxificación de

compuestos potencialmente carcinogénicos) puede estar asociado con un riesgo incrementado de cáncer gástrico en la población de China.

El carcinoma gástrico ocasionalmente se desarrolla en familias con mutaciones germinales en ATM5, TP53 (síndrome de Li Fraumeni) (9-122).

**Edad y sexo.** El carcinoma gástrico es extremadamente raro en pacientes con edad menor a los 30 años, a partir de entonces se incrementa más rápidamente y de manera constante hasta los grupos de de edad más avanzada, tanto en hombres como en mujeres. Después de los 50 años aumenta bruscamente la incidencia de este cáncer. El tipo intestinal aumenta más rápidamente con la edad que el tipo difuso, es más frecuente en hombres que en mujeres. El carcinoma difuso tiende a afectar a individuos más jóvenes, principalmente a mujeres, con frecuencia tiene características hereditarias, tal vez moduladas por influencias del medio ambiente (13,14).

Los factores hormonales están comúnmente más asociados con las mujeres mientras que los factores ambientales están más comúnmente asociados a pacientes masculinos con cáncer gástrico a temprana edad (15).

**Grupo sanguíneo A.** El antecedente de cáncer gástrico familiar e individuos del grupo sanguíneo A han mostrado aproximadamente 20% más asociación que aquellos del grupo O, B o AB. Algunos datos sugieren que el grupo sanguíneo A está particularmente asociado al cáncer gástrico de tipo difuso. Las células de cáncer son similares a las células del grupo sanguíneo A, por lo que no pueden ser detectadas por el sistema inmunológico de dicho grupo como células extrañas. Además el grupo sanguíneo A tiene "una defensa del sistema inmunológico demasiado tolerante", de manera que el cáncer puede ganar terreno muy bien en

los sujetos con tal grupo sanguíneo. Además, individuos con este grupo sanguíneo tienen sangre más densa con tendencia a la coagulación. Eso es un factor más que los hace propensos al cáncer (16). *Helicobacter pylori* se adhiere al antígeno del grupo sanguíneo Lewis y después es un importante hospedero facilitando su infección crónica y el subsecuente riesgo de cáncer (17).

**Ocupacionales.** Trabajadores de las minas de carbón, ceramistas, trabajadores del caucho y personas relacionadas con procesamiento de la madera.

**Ambientales.** Alimentación (variable de cada país): el cáncer del estómago está relacionado con el tipo de alimentación, lo cual es especialmente cierto en carcinomas de tipo intestinal, cuya aparición se favorece al ingerir grandes cantidades de alimentos ahumados, vegetales conservados en vinagre, pescados secos y salados, alimentos muy condimentados, carnes rojas, elevado consumo de sal (incrementa el poder mutagénico de los nitritos) (18,19), alimentos refrigerados, alta cantidad de carbohidratos complejos y baja ingesta de frutas (sobre todo cítricos) y vegetales (20), que protegen gracias a sus efectos antioxidantes, (21, 22) . Por otra parte, consumir productos integrales, frutas, verduras y vegetales frescos que contengan vitamina A y C parece disminuir el riesgo de cáncer del estómago. **Bebidas calientes, nitrato de sodio** (18,19, 23).

**Tabaquismo y tabaco masticado.** El hábito de fumar aumenta el riesgo de cáncer del estómago. El riesgo de cáncer del estómago es alrededor del doble para los fumadores (24).

Entre los componentes del humo del cigarrillo, la nicotina y sus derivados nitrosaminas 4 - (methylnitrosamino) -1 - (3-piridilo)-1-butanona (NNK) son los carcinógenos más potentes. Se ha demostrado que COX-2 y la PGE2 juegan un

papel fundamental en muchos tipos de cáncer asociados con el tabaquismo, incluyendo los cánceres de pulmón, estómago y vejiga (25).

**Obesidad.** El sobrepeso y la obesidad han sido identificados como una causa principal de muchos cánceres, especialmente el de estómago (26).

**Premalignos.** Gastritis Atrófica, metaplasia intestinal y displasia (27). Pelayo Correa fue el primero en describir la historia natural del cáncer gástrico de tipo intestinal en sus estudios clásicos. Según su teoría aceptada mundialmente, el cáncer gástrico de tipo intestinal surge de un proceso que se inicia como gastritis crónica, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal (madura o inmadura) y finalmente displasia (leve, moderada o severa). Todo este proceso toma, en teoría, entre ocho y diez años, aunque permanece sin aclararse si la metaplasia intestinal es un proceso premaligno o un factor de riesgo para la aparición del cáncer (28-30).

**Anemia perniciosa.** Es 20 veces más frecuentes que en sujetos sanos. Ciertas células en el recubrimiento del estómago producen normalmente una sustancia necesaria para la absorción de vitamina B12 de los alimentos. Si no hay suficiente cantidad de esta sustancia, se produce una deficiencia de vitamina B12, lo que conduce a problemas en la producción de suficientes glóbulos rojos (anemia). Además de la anemia, existe un riesgo levemente aumentado de cáncer del estómago para los pacientes con esta enfermedad (31).

**Enfermedad de Menetrier.** (10% de asociación con cáncer gástrico) (32).

**Pólipos gástricos.** Hiperplásicos múltiples, mayores de 2 cm con cierto grado de displasia (0.4-4% de asociación con cáncer gástrico). Los tipos de pólipos

adenomatosos – también llamada adenomas – algunas veces se pueden convertir en cáncer (32).

**Cirugía gástrica.** Los cánceres del estómago son más propensos a originarse en las personas a quienes se les ha extraído parte del estómago para tratar enfermedades no cancerosas como las úlceras, así como en las gastrectomías (más frecuente Bilioth II), oscila entre 5-15%, después de 20 años de operado (33).

**Infeciosos.** Sobrecrecimiento bacteriano.

***Helicobacter pylori.*** Para producir enfermedad depende tanto de los factores de virulencia bacterianos como de variaciones de la respuesta del huésped. Esta bacteria coloniza el estómago del humano y se asocia con gastritis, desordenes duodenales, incluyendo gastritis crónica y adenocarcinoma gástrico (34, 35), aproximadamente 1-2% de los individuos infectados desarrollan adenocarcinoma gástrico, es el cuarto diagnóstico más común de cáncer y la segunda causa más común de muertes por cáncer en el mundo (36, 37). La infección del estómago a largo plazo con la bacteria *Helicobacter pylori* puede resultar en una gastritis atrófica crónica (inflamación y daño de la capa más interna del estómago), un posible cambio pre-canceroso del recubrimiento del estómago. Los pacientes con adenocarcinoma del estómago tienen una tasa más alta de infección que las personas que no tienen cáncer. No obstante, la mayoría de las personas que portan esta bacteria en sus estómagos nunca contraen cáncer (38).

## **Síntomas y signos**

Dependen del tiempo de la enfermedad, edad del paciente, localización, la extensión y el tipo de tumor. En etapa temprana se asocia con escasos síntomas sistémicos. A menudo no causa síntomas, aunque un 50% de los pacientes pueden tener síntomas gastrointestinales inespecíficos, tales como dispepsia. Los carcinomas pueden mantenerse crónicamente silenciosos hasta una fase muy tardía o asociarse con síntomas vagos como anorexia o molestias epigástricas. Los síntomas sistémicos tales como anorexia y pérdida de peso sugieren difusión de la enfermedad (39). El carcinoma incluye dolor abdominal, a menudo persistente y no se alivia al comer, dificultad para deglutir, en particular cuando se incrementa con el tiempo y vómitos con sangre, en el caso de los tumores que obstruyen la salida gástrica, en tanto que los tumores ulcerados pueden causar sangrado y hematemesis, mal aliento, eructos excesivos, exceso de gases (flatulencia), inapetencia, náusea, llenura abdominal prematura después de las comidas, pérdida involuntaria de peso, llenura abdominal vaga, debilidad o fatiga y deterioro de la salud en general. La mayoría de los pacientes se diagnostican con la enfermedad avanzada (40).

### **Diagnóstico de cáncer de gástrico**

Es necesario insistir acerca de la importancia del diagnóstico temprano del adenocarcinoma gástrico. Además de la exploración y la historia clínica completa por parte del médico, los procedimientos para el diagnóstico del cáncer de estómago pueden incluir los siguientes (41):

Pruebas complementarias:

**Examen de sangre oculta en las heces.** Busca indicios de sangre escondida (oculta) en las heces. Es positiva en más del 60% de casos. El cáncer de estómago puede sangrar en pequeñas cantidades que no son visibles a simple vista. Con una pequeña muestra de las heces del paciente y mediante una reacción química en el laboratorio es posible saber si se está perdiendo sangre. Sirve sólo como método de sospecha porque también las úlceras y otras enfermedades diferentes al cáncer pueden sangrar (41).

**Bioquímica con función hepática.** Al comienzo del estudio es necesario buscar datos de anemia, enfermedad del hígado o sustancias presentes en la sangre en excesiva cantidad que hagan sospechar la existencia de un tumor maligno (marcadores tumorales) (41).

**Marcadores tumorales.** La medición de marcadores tumorales séricos en pacientes con cáncer gástrico puede resultar de utilidad como factor pronóstico o como medidor de respuesta al tratamiento (41). El CEA es una proteína de superficie celular altamente glicosilada que se encuentra elevada en el 15-65% de los pacientes con cáncer gástrico (41,42). La elevación de CEA se ha correlacionado con afectación ganglionar y metástasis peritoneales (42) y como predictor de respuesta al tratamiento y de supervivencia (44). No es específico de este tumor, generalmente se asocia a enfermedad avanzada. La elevación de Ca 125 puede ser un factor predictor de la presencia de metástasis peritoneales y un factor de mal pronóstico en cáncer gástrico avanzado (42). Existen otros marcadores de utilidad en carcinoma gástrico: Ca 19.9, Ca 72 y a-fetoproteína (44).

**La endoscopia.** Es ampliamente considerada como la prueba diagnóstica más sensible y específica para el cáncer gástrico. Con una alta resolución endoscopia es posible detectar ligeros cambios en el color, relieve y arquitectura de la superficie de la mucosa que sugieren cáncer gástrico temprano. La detección endoscópica de estas lesiones iniciales puede ser mejorada con cromoendoscopia (por ejemplo, con la solución de índigo carmín al 0.4%) (45).

**Endoscopia con fluorescencia e imagen por espectroscopia.** Ofrece más alternativa para observar lesiones malignas y premalignas que no se observan en la endoscopia con luz convencional (45).

**La serie gastrointestinal (GI) superior.** También llamada esofagografía, es un método de diagnóstico que examina los órganos de la parte superior del sistema digestivo: el esófago, el estómago y el duodeno. Se ingiere un líquido denominado bario (un producto químico metálico, con apariencia de líquido yesoso, utilizado para recubrir el interior de los órganos de forma que aparezcan en una placa de rayos X). Después se toman los rayos X para evaluar los órganos digestivos (46).

**Esofagogastroduodenoscopia.** También llamada EGD o endoscopia superior. Es un procedimiento que le permite al médico examinar el interior del esófago, el estómago y el duodeno. Un tubo con luz, delgado y flexible, llamado endoscopio, se pasa por la boca y la garganta, y luego por el esófago, el estómago y el duodeno. El endoscopio le permite al médico ver dentro de esta área del cuerpo, así como introducir instrumentos a través del endoscopio para tomar muestras de tejido y realizar una biopsia, si es necesario (47).

**Ecografía endoscópica.** Esta técnica de imagen utiliza ondas sonoras para crear una imagen computarizada del interior del esófago y del estómago. El endoscopio se pasa por la boca y la garganta, y luego por el esófago y el estómago. Como en una endoscopia normal, esto le permite al médico ver el interior de esta área del cuerpo, así como introducir instrumentos para tomar muestras de tejido (biopsia) (48).

**Biopsia gástrica.** Consiste en la obtención de un pequeño trozo de la pared del estómago para analizarlo luego al microscopio. Este análisis es capaz de confirmar que la lesión observada a simple vista es en realidad un cáncer; también nos dirá el tipo y el grado de invasión de la pared del estómago. La biopsia se realiza introduciendo un diminuto bisturí a través del tubo que puede ser accionado desde el exterior mediante un cable. La toma de biopsia es la principal exploración complementaria para el diagnóstico del carcinoma gástrico. El número de biopsias tomadas incrementa la exactitud diagnóstica: la confirmación de cáncer gástrico es de 70% con una biopsia, 95% con cuatro y se eleva a 98% con siete biopsias (49).

**Estadaje:** cuando la biopsia ha confirmado que existe cáncer en el estómago es necesario saber que tan extendido está y cuál es su agresividad. Esta evaluación es imprescindible para saber cuál es el tratamiento apropiado de cada paciente: se llama 'estadiar' o conocer el estadio de un cáncer. Para ello se recurre a diferentes pruebas (50):

1. La tomografía axial computarizada (**TAC**) permite ver si la enfermedad afecta a órganos cercanos al estómago como el hígado, el páncreas o los ganglios linfáticos y también otras zonas más distantes como el pulmón. Requiere la inyección de medio de contraste por la vena para resaltar las imágenes (48).
2. La **ecografía abdominal** es una prueba más rápida, sencilla e indolora que proporciona buena información sobre el hígado y el páncreas aunque las imágenes son a veces más difíciles de interpretar por el médico (48).
3. **Laparoscopia o cirugía:** a veces es necesaria la inspección directa del interior del abdomen para conocer con exactitud la afectación del estómago y sobre todo de los ganglios linfáticos cercanos. El cirujano extrae todos los ganglios próximos al estómago que son analizados al microscopio por un patólogo. El número de ganglios invadidos por el tumor está directamente relacionado con la gravedad de cada caso y con el tipo de tratamiento que precisa (48).

### **Clasificación**

El adenocarcinoma ha sido clasificado de muchas maneras y por diversos autores. De acuerdo al estadiaje se clasifica en temprano y avanzado por un lado y según el sistema TNM por otro. El temprano, desde el punto de vista macroscópico en 0, I, IIa, IIc, IIb y III y sus combinaciones, denominándosele tipo 0 al cáncer temprano y al cáncer avanzado, por costumbre se le ha denominado como Borrmann: I, II, III y IV. Se incluye el tipo V que correspondería al carcinoma no clasificable. La clasificación histológica según Lauren comprende el tipo intestinal, el difuso y el mixto (51).

De acuerdo a la extensión del tumor y su aspecto macroscópico se clasifica en cáncer temprano y cáncer avanzado (52):

- **Cáncer gástrico temprano (cáncer tipo 0):**

Compromete mucosa o mucosa y submucosa pudiendo presentar metástasis regionales. Este cáncer puede estar confinado por mucho tiempo superficialmente en el epitelio sin llegar a la lámina propia, se le ha denominado como “cáncer mucoso” o “cáncer in situ”, debiéndosele llamar “neoplasia maligna intraepitelial”. Es importante señalar, que a este tipo de “cáncer temprano” (“cáncer” confinado al epitelio de la mucosa) no es un verdadero cáncer, ya que este término etimológicamente deriva de la palabra griega “cangrejo”, es decir, tiene el carácter de infiltrante o invasivo (53, 54).

La clasificación del cáncer gástrico temprano o Tipo 0, fue establecida por la Sociedad de Endoscópica Japonesa para la descripción de los tumores T1 y se le clasifica en la siguiente forma (Figura 1) (55):

Tipo 0 I: La lesión tiene un grosor de más del doble de la mucosa normal.

Tipo 0 IIa: La lesión tiene un espesor de hasta el doble de la mucosa normal.

Tipo 0 IIb: La lesión tiene un espesor semejante a la de la mucosa normal.

Tipo 0 IIc: La lesión es ulcerada y tiene una depresión superficial en la mucosa normal.

Tipo 0 III: La lesión es ulcerada y excavada hasta la submucosa (55).

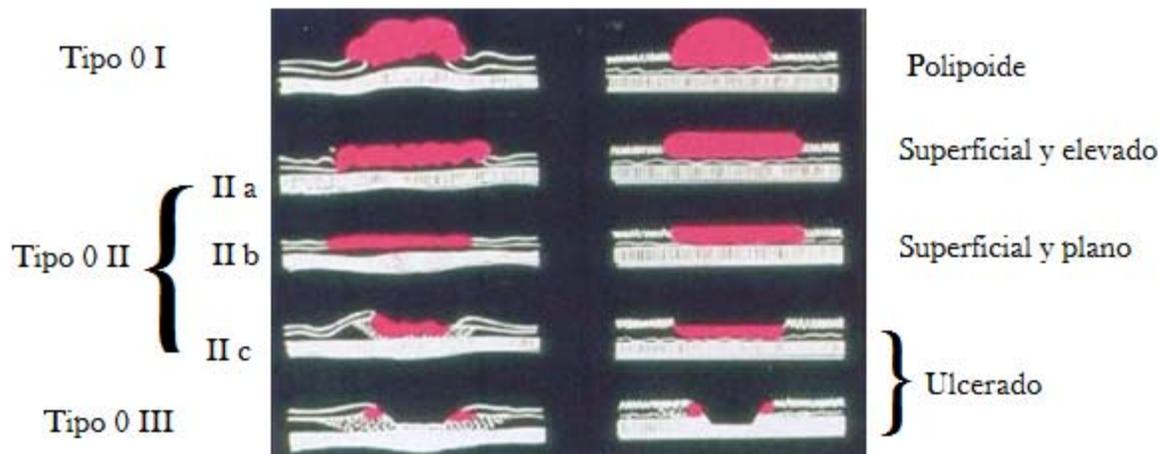


Figura 1. Cáncer gástrico temprano (cáncer tipo 0). Más explícitamente se les clasifica en formas fundamentales y formas combinadas. En el tipo superficial combinado, se pone primero el tipo que ocupa la mayor superficie seguido por el tipo que está en menor proporción, por ejemplo, IIc + III.

- **Cáncer avanzado :**

La clasificación de Borrmann se emplea exclusivamente para el cáncer avanzado que excede los 3-4 cm de tamaño e invade la muscular como mínimo y se le denomina como lo señaló el mismo en el año 1926 (56):

Tipo I, Tipo II, Tipo III y Tipo IV.

Y en honor al autor se les llama Borrmann I, II, III, y IV. Borrmann no describió el tipo V. Borrmann hizo la primera clasificación pronóstica de supervivencia del

carcinoma gástrico según el aspecto morfológico y microscópico de la lesión (Figura 2).

Actualmente la clasificación queda como sigue:

Tipo 0: Cáncer Temprano

Tipo 1 o Borrmann I polipiode: cánceres circunscritos, solitarios y sin ulceración, de localización preferente en fundus o curvatura mayor. Son los de mejor pronóstico. Son la forma de presentación menos frecuente.

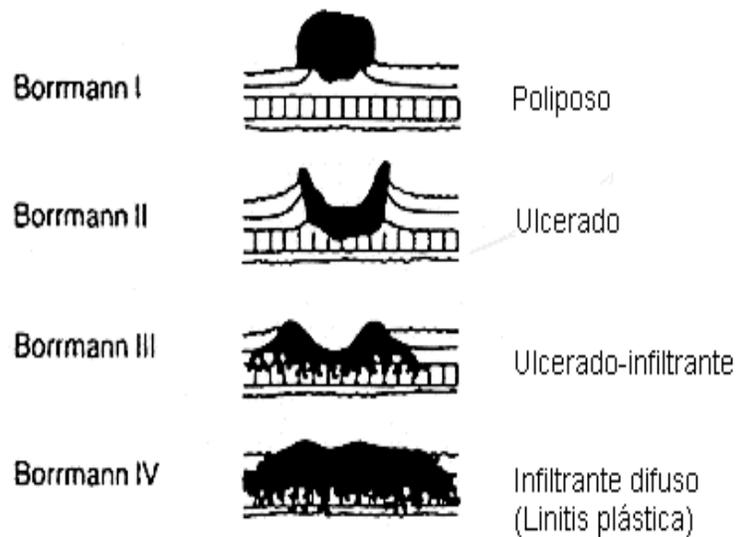
Tipo 2 o Borrmann II ulcerado: con elevación marginal de tipo parietal y con contornos bien definidos. Es la forma más frecuente. Son poco infiltrantes, de crecimiento lento y metástasis tardías.

Tipo 3 o Borrmann III crateriforme: corresponden a cánceres ulcerados; en parte con elevación marginal y diseminación difusa parcial. Se localizan con frecuencia en antro y curvatura menor.

Tipo 4 o Borrmann IV difuso: infiltrante a linitis plástica. Son tumores de gran crecimiento por la submucosa y subserosa. Se distinguen dos tipos:

- Escirro: crecimiento infiltrante muy rico en tejido conectivo.
- Linitis plástica de Brinton: es el tumor más maligno.

Tipo 5 o Borrmann V que indica un cáncer avanzado no clasificable (56).



**Figura 2.** Clasificación del cáncer gástrico avanzado según Borrmann.

### **Clasificación T.N.M**

La profundidad de invasión tumoral y la afectación ganglionar son los factores pronósticos independientes más importantes en el carcinoma gástrico (57). Basado en estos dos factores se define el sistema de estadíaje más utilizado TNM (Figura 3) (58).

#### *Extensión del tumor primario (T).*

Tx: El tumor primario no puede evaluarse.

T0: No hay evidencia de tumor primario.

Tis: Carcinoma in situ: tumor intraepitelial sin penetración de la lámina propia.

T1: Carcinoma en la mucosa y submucosa.

T2: Carcinoma que se extiende a la muscular propia o la subserosa.

T3: Carcinoma que rompe la subserosa (peritoneo visceral) sin invadir las estructuras adyacentes.

T4: Carcinoma que compromete estructuras vecinas (adyacentes).

*Presencia de ganglios linfáticos regionales (N)*

NX: Los ganglios regionales no pueden evaluarse.

N0: No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales.

N1: Metástasis en 1 a 6 ganglios linfáticos regionales.

N2: Metástasis en 7 a 15 ganglios linfáticos regionales.

N3: Metástasis en más de 15 ganglios linfáticos regionales.

*Presencia o ausencia de metástasis en órganos distantes (M).*

MX: Las metástasis a distancia no pueden establecerse.

M0: Sin metástasis a distancia

M1: Metástasis a distancia (50).

<b>Estadio 0</b>	<b>Tis</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>
<b>Estadio IA</b>	<b>T1</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>
<b>Estadio IB</b>	<b>T1</b>	<b>N1</b>	<b>M0</b>
	<b>T2</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>
<b>Estadio II</b>	<b>T1</b>	<b>N2</b>	<b>M0</b>
	<b>T2</b>	<b>N1</b>	<b>M0</b>
	<b>T3</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>
<b>Estadio IIIA</b>	<b>T2</b>	<b>N2</b>	<b>M0</b>
	<b>T3</b>	<b>N1</b>	<b>M0</b>
	<b>T4</b>	<b>N0</b>	<b>M0</b>
<b>Estadio IIIB</b>	<b>T3</b>	<b>N2</b>	<b>M0</b>
<b>Estadio IV</b>	<b>T1, T2, T3</b>	<b>N3</b>	<b>M0</b>
	<b>T4</b>	<b>N1, N2, N3</b>	<b>M0</b>
	<b>cualquier T</b>	<b>cualquier N</b>	<b>M1</b>

**Figura 3.** Agrupación de estadios.

## **Clasificación histológica**

La clasificación celular sólo se refiere a los adenocarcinomas y no a otros tipos de células como linfomas y sarcomas (59).

Aunque existen varias clasificaciones histológicas reportadas en la literatura, en el presente trabajo solo se describe la clasificación de Lauren, que es como se diagnosticará nuestra población de estudio.

### **Clasificación de Lauren**

Se divide en los siguientes tipos: Difuso, intestinal y mixto. También se le denomina DIO (difusse, intestinal and other). Con una frecuencia de 33% y 53% respectivamente. Un 14% no está encuadrado dentro del patrón intestinal o difuso, pero se le considera como indiferenciado sin producción de moco (mixto) (60).

#### **Tipo intestinal**

Corresponde a los carcinomas gástricos bien o moderadamente diferenciados. Se caracteriza por la presencia de formaciones glandulares y células epiteliales que recuerdan a las células intestinales, tienden a crecer formando nódulos con amplios frentes cohesivos. La cohesión celular es buena y el tumor está usualmente bien delimitado por un claro margen. Habitualmente este tipo de tumor se localiza en el antro, y asienta en zonas donde previamente existía metaplasia intestinal, especialmente la de tipo incompleto o colónico, y macroscópicamente adopta la forma polipoide (Tipo I) o ulcerada con bordes elevados (Tipo II) de la clasificación de Borrmann (61).

#### **Tipo difuso**

Corresponde a la variedad infiltrativa. Son carcinomas mal diferenciados, con células dispersas que invaden en forma individual o en pequeños grupos, y en los que es posible observar células en anillo de sello y mucina dispersa por el estroma; su patrón de crecimiento es infiltrativo a los fascículos y al tejido conjuntivo. Se localiza preferentemente en el fondo (61).

Estos dos subtipos tienen distintas vías de carcinogénesis. El tipo intestinal presenta una serie de lesiones precursoras: gastritis superficial, gastritis atrófica, metaplasia intestinal y displasia. En este proceso intervienen genes como k-ras (62), p-53 y DDC, que intervienen en diferentes escalones evolutivos. En el tipo difuso no pueden distinguirse lesiones preneoplásicas y son otros factores moleculares, como la ausencia de cadherinas, las que intervienen en su carcinogénesis (63).

#### Tipo Mixto

Para los casos que no cumplen los criterios anteriores se consideró un tercer grupo llamado mixto y no clasificado, donde mixto corresponde a los casos que mostraron hallazgos de los dos tipos (intestinal o difuso) en igual proporción y no clasificado cuando el cáncer no pudo ser clasificado en ninguna de las dos categorías (64).

- Localización. Los tumores localizados en el tercio proximal o unión cardioesofágica conllevan un peor pronóstico y un aumento de la frecuencia de tumores difusos (60,65).

## **Reacción inflamatoria**

La inflamación crónica se caracteriza por la infiltración de varios tipos de células inflamatorias en la mucosa gástrica; entre ellas están los neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos T. Dicha respuesta inflamatoria está mediada por un complejo grupo de citoquinas proinflamatorias, quimiotácticas e inmunosupresoras, y moléculas reactivas derivadas de oxígeno y nitrógeno, las cuales son producidas por células inflamatorias y células epiteliales en respuesta a estímulos inducidos (66,67,68).

La secreción excesiva y prolongada de los mediadores de inflamación anteriormente mencionados, tiene consecuencias importantes en el contexto de la inflamación y la fisiología gástrica, las cuales podrían traducirse en un mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico. Algunas de las citoquinas que participan como mediadores de la respuesta inflamatoria, han sido asociadas con un mayor riesgo de desarrollar lesiones gástricas precancerosas y cáncer gástrico (68).

El grupo internacional de expertos reunido en Houston en 1994, para la revisión del Sistema Sydney de clasificación y gradación de las gastritis llegó a los siguientes acuerdos:

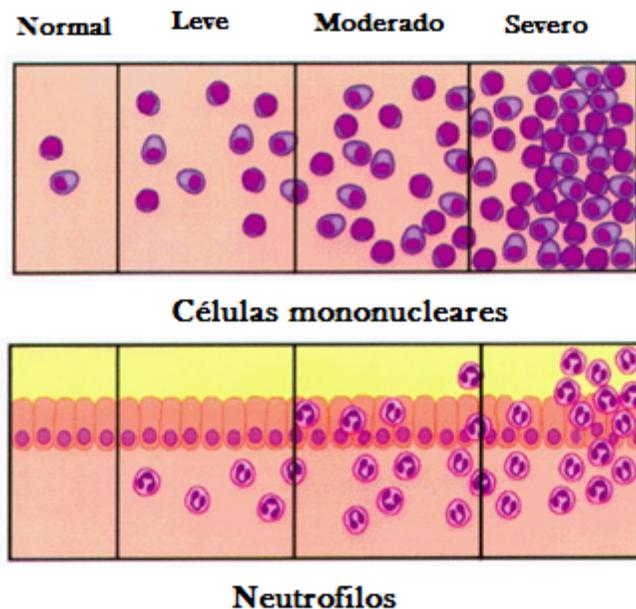
No activa: Ausencia total de PMN en la lámina propia y en el epitelio glandular y el de las criptas. La densidad inflamatoria medida en el seno de la lámina propia es de un máximo de 2 a 5 linfocitos, células plasmáticas y macrófagos por campo de gran aumento.

Actividad leve: Presencia de escasos PMN únicamente en la lámina propia. La densidad inflamatoria medida en el seno de la lámina propia es de un máximo de 5 a 10 linfocitos, células plasmáticas y macrófagos por campo de gran aumento

Actividad moderada: Cuando los PMN se encuentran no sólo en la lámina propia sino también infiltrando el epitelio glandular y el de las criptas.

Actividad severa: Cuando se encuentran abundantes PMN tanto en la lámina propia como en el epitelio glandular y el de las criptas.

La valoración de la densidad del componente inflamatorio debe realizarse en la mucosa alejada de posibles folículos o agregados foliculares linfoides (69).



**Figura 4.** Escalas visuales de los infiltrados inflamatorios, grados 0 – 1 – 2 – 3 del Sistema Sydney renovado, 1994.

## **Respuesta inmunoreguladora**

El sistema inmune es una red intrincada en la que participan diferentes tipos de células y de moléculas. La acción coordinada de todos sus elementos permite que se desarrolle una respuesta eficaz contra los tumores. Sin embargo, la célula tumoral presenta diversos mecanismos de evasión que permiten el desarrollo del mismo. La interacción de factores genéticos y estímulos ambientales provoca alteraciones en las células, que frecuentemente llevan a una proliferación celular anormal. El sistema inmune presenta diversos mecanismos celulares y moleculares que le permiten reconocer y eliminar las células transformadas, en estos eventos hay interacción de distintas moléculas como las del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), el receptor de antígenos de linfocitos T (TCR), moléculas de adhesión, antígenos tumorales y citoquinas. Sin embargo, en algunas ocasiones, la respuesta inmunológica no es lo suficientemente efectiva para controlar el crecimiento celular anormal, lo que trae como consecuencia el desarrollo de un tumor (70).

A pesar de la inmunovigilancia, las células tumorales poseen mecanismos de evasión a la respuesta inmunológica, que permiten su crecimiento.

Algunos de los mecanismos hasta ahora identificados son:

- a) escasa inmunogenicidad de los antígenos tumorales;
- b) velocidad de crecimiento tumoral que supera la respuesta inmunológica;
- c) ausencia o enmascaramiento de los antígenos del CMH clase I;
- d) activación de una respuesta inflamatoria local que impide el reclutamiento de las células efectoras contra el tumor; y,

e) secreción de factores que inhiben la activación de la respuesta inmunológica (71).

La inmunovigilancia tumoral se mide mediante dos tipos de mecanismos: la respuesta inmunológica innata y la respuesta inmunológica adaptativa. La respuesta inmunológica innata se considera como la primera barrera contra células tumorales, las cuales son reconocidas por un proceso independiente de antígeno. Este mecanismo es mediado por un patrón de receptores y de moléculas de superficie celular expresados en la célula tumoral. Entre las principales células que reconocen a la célula tumoral se encuentran las células asesinas naturales NK, las cuales reconocen la baja o nula expresión de moléculas MHC I sobre la célula tumoral, así como proteínas relacionadas con estrés, como la expresión de MICA y MICB, que son ligandos de los receptores NKG2D expresados por las células NK (72).

El sistema inmunológico de los mamíferos funciona como una red intrincada y perfectamente regulada, en la que participan varias poblaciones celulares (linfocitos T y B, macrófagos y otras células), así como moléculas solubles (citoquinas). La interacción de todos estos elementos permite que se desarrolle una respuesta inmunológica eficaz contra tumores.

En relación con la respuesta inmunológica adaptativa, ésta requiere del reconocimiento de antígenos tumorales para detectar y eliminar la célula tumoral por medio de las células efectoras de la respuesta inmunológica. Se ha demostrado que la respuesta inmunológica mediada por células es la más importante para eliminar células neoplásicas. Esta respuesta es dependiente de la

activación de los linfocitos T y de las células presentadoras de antígenos profesionales APC (73).

Para que se produzca una respuesta inmunológica celular eficiente contra tumores, se requiere primero que los determinantes antigénicos sean expresados por las células tumorales; luego que los antígenos sean eficientemente presentados por las moléculas del CMH, posteriormente que el reconocimiento de estos antígenos estimule la respuesta de los linfocitos T (CD4+ y CD8+), linfocitos B y macrófagos y finalmente que las células efectoras sean capaces de llegar al sitio del mismo. Para que los primeros pasos puedan realizarse, es necesaria la participación de varios tipos de moléculas, como son las del MHC, el TCR, las moléculas de adhesión y antígenos tumorales (73).

Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad.

Son dos grupos de proteínas transmembranales: las de clase I (HLA-A, B, C) y las de clase II (HLADP, DQ, DR). Una característica de estas moléculas es que presentan un gran polimorfismo, por lo que cada persona posee un grupo único de alelos de MHC (74).

Sirven como moléculas presentadoras de antígenos procesados (clase I para los endógenos y clase II para los exógenos) presentándolos en la superficie de las células (75).

La activación de los linfocitos T, requiere que las células dendríticas (CD) capturen y procesen los antígenos, migren a los nódulos linfáticos regionales donde van a presentar los antígenos tumorales digeridos a los linfocitos T CD8+ mediante las moléculas del MHC clase I. En este proceso se activan tanto los linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos contra los péptidos tumorales. Los linfocitos T CD8+



La inflamación, como parte de la respuesta inmunitaria innata contra antígenos biológicos, químicos y/o físicos, puede dañar el DNA, inducir proliferación celular y modular la apoptosis, mecanismos todos ellos importantes en aparición y progresión del proceso tumoral, regulado por citocinas y quimiocinas (78).

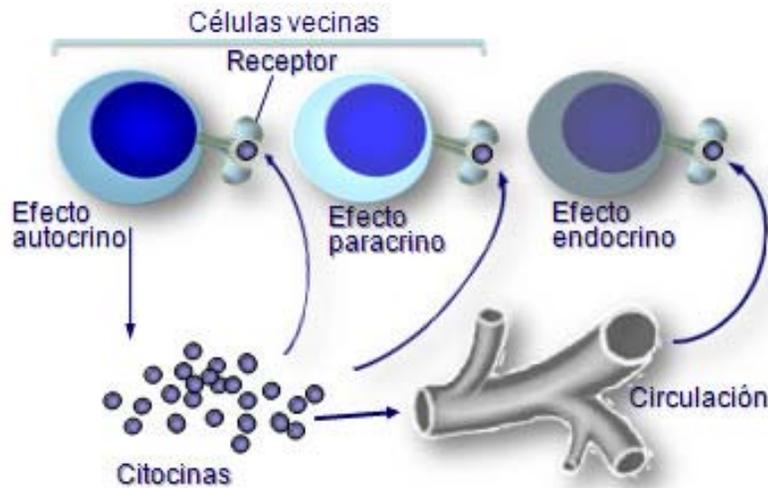
La apoptosis, o muerte celular programada, es una parte fundamental en la cinética celular normal para un adecuado equilibrio entre proliferación y muerte celular. La pérdida de apoptosis espontánea se ha correlacionado con un peor pronóstico en el carcinoma gástrico (79).

El proceso inflamatorio crónico contribuye al desarrollo del cáncer gástrico. La inflamación progresiva activa la respuesta de las citocinas, células inflamatorias, radicales libres, y subsecuentemente la transformación maligna. Las respuestas individuales de inflamación, mediciones de variaciones genéticas pueden influenciar el proceso inflamatorio y el riesgo de cáncer (80).

### **Citocinas**

Muchos de los eventos de la respuesta inmunológica están regulados por moléculas solubles llamadas citocinas, las cuales son secretadas por una gran variedad de tipos celulares, pero principalmente las producen los linfocitos TCD4+. Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular, que pueden secretarse o permanecer unidas a la membrana celular. Para realizar su función biológica se requieren en concentraciones de nanogramos a picogramos. Las citocinas actúan de manera autocrina al modular la actividad celular, o de manera paracrina al inducir la producción de otras citocinas mediante otras extirpes celulares. Además

las citocinas son importantes en la regulación de la proliferación y diferenciación celular, en la quimiotaxis celular y en la activación de células de la respuesta inmunológica (Figura 5) (81).



**Figura 6.** Efectos de las citocinas. Las citocinas pueden ejercer su efecto de forma autocrina (misma célula), paracrina (células vecinas) y endocrina (células lejanas a través de la sangre). Las citocinas son moléculas que poseen una vida media muy corta y actúan a muy bajas concentraciones, mediante la unión a receptores se alta afinidad.

Las citocinas que están directa o indirectamente involucradas en los procesos inflamatorios reciben el nombre de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-2, IL-6, IFN $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) y promueven la respuesta inmunológica mediada por células. Las citocinas que suprimen la actividad de las citocinas proinflamatorias son las citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10 e IL-13, que son potentes mediadores de los

linfocitos B. De esta manera, el perfil de expresión de citocinas presentes en una enfermedad determinará el tipo de respuesta inmunológica que se genere (82,83).

Las citoquinas presentan diversos mecanismos de acción a través de los cuales pueden provocar el rechazo de tumores, ya sea:

a) actuando directamente contra la célula tumoral (citólisis, quimiotaxis, daño vascular y diferenciación celular);

b) aumentando la expresión de moléculas del MHC clases I y II, moléculas de adhesión y otros antígenos (algunas de ellas específicas o asociadas a tumores);

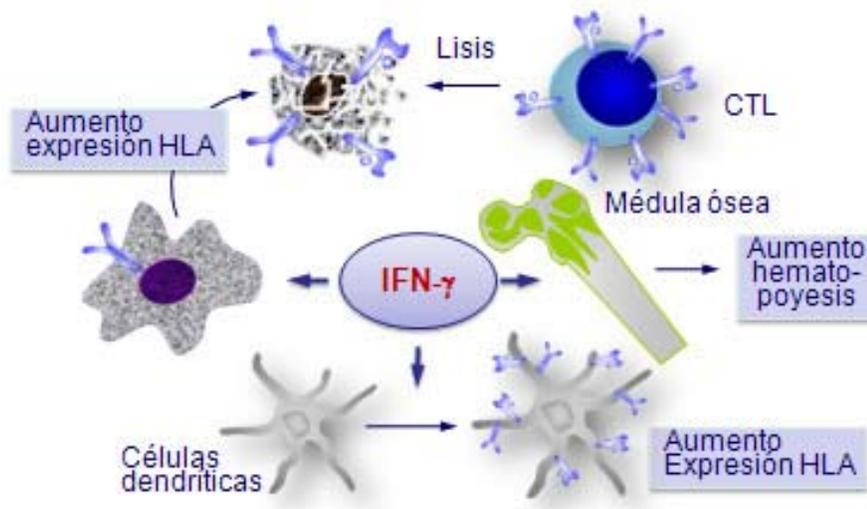
c) reclutando, expandiendo y estimulando células efectoras contra el tumor; tal es el caso para los mecanismos de acción del rechazo tumoral (84).

### **Interferón gamma INF- $\gamma$**

El INF- $\gamma$  es producido por linfocitos Th1, CTL y por células NK. Además de su efecto antiviral posee una importante actividad inmunomoduladora. Incrementa la expresión de antígenos de HLA de clase I y II en varios tipos celulares, lo que facilita su función presentadora de Ag y activa a los macrófagos, incrementando su capacidad de defensa contra las infecciones.

Actúa de forma autocrina sobre las propias células NK que lo producen, aumentando su actividad citolítica y, como consecuencia, incrementando su efecto antitumoral. Sobre los linfocitos Th2 inhibe la proliferación, de manera que su presencia durante la estimulación antigénica induce la diferenciación de linfocitos T hacia células efectoras tipo Th1 favoreciendo, por lo tanto, el desarrollo de las respuestas inflamatorias.

Se considera como uno de los principales inmunoreguladores de la respuesta inmunológica celular. El INF- $\gamma$  tiene mayor actividad contra neoplasias. Favorece la expresión de las moléculas de MHC clase I y potencia el efecto protector (85). El INF- $\gamma$  es crucial para el control de la infección de *H. pylori* pero también produce cambios preneoplásicos en la mucosa gástrica infectada (Figura 6) (86).



**Figura 7.** Acciones del INF- $\gamma$  sobre las células dendríticas y células tumorales donde aumenta la expresión de moléculas HLA y sobre la médula, aumentando el proceso hematopoyético de manera significativa.

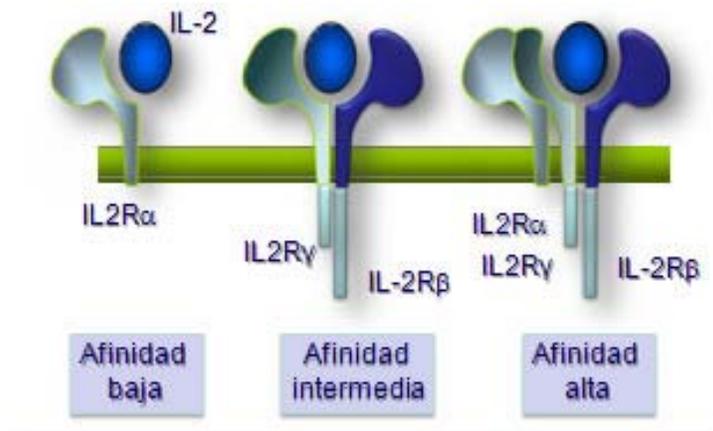
## IL-2

Es producida mayoritariamente por linfocitos T en respuesta Th1, aunque su producción puede ser también inducida en células dendríticas y monocitos/macrófagos.

Es un potente activador de los linfocitos T, activa a las células NK, macrófagos, linfocitos B y estimula la liberación de varias citocinas. Su efecto antitumoral es mediado por promover la activación de las células NK, células asesinas activadas

por linfocinas (LAK) y otras células citotóxicas, así como la inducción de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  (87).

La IL-2 juega un papel importante en la activación de la respuesta inmunológica contra tumores; tiene mayor actividad antitumoral, "in vitro" e "in vivo". Se ha demostrado que la aplicación de IL-2 estimula la actividad citotóxica de linfocitos T contra tumores y permite que se lleve a cabo el rechazo de tumores (Figura 7).



**Figura 8.** IL-2R: La IL2 posee distintos grados de afinidad con el IL-2R según esté formado por una, dos o las tres cadenas. De esta manera se regula la intensidad del efecto en cada caso. El IL-2R $\alpha$  equivale al marcador de activación CD25.

En experimentos con células tumorales poco inmunogénicas transfectadas con el gen de IL-2, se suprime en forma marcada el crecimiento "in vitro". El grado de supresión del crecimiento se correlaciona directamente con la cantidad de IL-2 producida por la célula tumoral. En estos modelos se observó además que las células efectoras que participan en el rechazo de los tumores son del fenotipo CD4+ (88,89).

La administración de IL-2 recombinante en pacientes con cáncer puede provocar fases de remisión. En pacientes con leucemia mielocítica crónica (LMC), la

aplicación de IL-2 posterior al trasplante de médula ósea (TMO) mostró elevación en la actividad de células asesinas naturales (NK) con reactividad hacia las células tumorales. Estos pacientes tuvieron una mejor respuesta que aquellos que no mostraron elevación de sus niveles de NK (90).

La activación y propagación inducida con IL-2 sobre linfocitos no específicos, resulta en la generación de células con actividad citotóxica o linfocitos asesinos activados por linfoquinas (LAK), que tienen la capacidad de atacar a las células tumorales "in vitro". En pacientes con melanoma metastásico y carcinoma renal, el tratamiento con IL-2 y células LAK autólogas produjo disminución en el tamaño de los tumores (91). Sin embargo, la frecuencia de respuesta completa en estos pacientes fue sólo del 15 al 20%. Los linfocitos infiltrantes de tumores (LIT) son células con mayor especificidad hacia las células tumorales y pueden ser aisladas a partir de las células que infiltran los tumores como parte de la respuesta inflamatoria. En pacientes con melanoma metastásico, el tratamiento con IL-2 y LIT resultó en un 50% de mejoría (92).

#### **IL-4**

Es secretada por células del subgrupo Th2, mastocitos, basófilos, células del estroma de la médula ósea. Es una citocina muy pleiotrópica, ya que ejerce numerosos efectos en diferentes tipos celulares. Promueve la diferenciación de linfocitos T vírgenes hacia células de tipo Th2, inhibiendo la generación de células Th1. Por otra parte, promueve un patrón de cambio de clase que produce IgG que no activa la vía del complemento. La IL-4 también aumenta el desarrollo de la

respuesta inmunológica humoral a través de la inducción del crecimiento y diferenciación de linfocitos B produciendo el cambio de isotipo hacia IgM a IgE. Este efecto en la producción de IgE se engrana con la diferenciación y activación de eosinófilos por IL-5. Por todo ello, los efectos de esta citocina se han relacionado también con el desarrollo de procesos alérgicos al estar relacionados con un incremento de IgE. La IL-4 y la IL-10 suprimen la expansión de poblaciones de células Th1 (93).

La IL-4 estimula a linfocitos B y a macrófagos; produce inhibición del crecimiento tumoral, pero el mecanismo parece ser diferente a la inhibición causada por IL-2. En tumores productores de IL-4, el crecimiento se suprime considerablemente tanto en ratones atímicos como en normales (94). En ratones atímicos, las células infiltrantes del tejido tumoral se han identificado como macrófagos activados y eosinófilos, pero no linfocitos. No está claro si estas células son efectoras o no, aunque una de las principales actividades de IL-4 es la inducción de macrófagos con actividad antitumoral (95).

### **IL-10**

Es producida por linfocitos T CD8, Th2, así como también por células como monocitos/macrófagos, linfocitos B, queratinocitos y otros varios tipos celulares (96).

La IL-10 inhibe la expresión del gen y síntesis de las células T y los macrófagos, citoquinas proinflamatorias y suprime la función de células presentadoras de antígeno (96). Es la citocina inmunosupresora por excelencia, inhibiendo la

síntesis de muchas otras citocinas, entre las que podemos citar IFN-gamma, TNF-alfa, IL-2, IL-12, y la expresión de MHC-II (Figura 8), e inhibiendo la producción de los reactantes dependientes de oxígeno y moléculas de adhesión en monocitos (Figura 8). También tiene efectos antiproliferativos sobre muchos tipos celulares. La IL-10 ejerce además múltiples actividades inmunomoduladoras (97).



**Figura 8.** Th1-Th2: Estos linfocitos poseen capacidad distinta de producir citocinas. De ahí que tengan diferente función en la respuesta inmune: los primeros son inductores de respuesta celular, mientras que los segundos los son inductores de respuesta humoral. A su vez ambos tipos de linfocitos se inhiben mutuamente mediante IFN- $\gamma$  (a los Th1) y la IL-10 (a los Th2). Algunos polimorfismos localizados en la región 5' del gen IL-10 han sido asociados con cambios en los niveles de expresión de esta proteína (98, 99). Varios estudios han vinculado algunos de estos polimorfismos con un mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico y lesiones gástricas precancerosas (100, 101, 102). De acuerdo con la función de IL-10, una menor expresión de esta proteína podría resultar un escaso control en la producción de citoquinas proinflamatorias, lo cual se

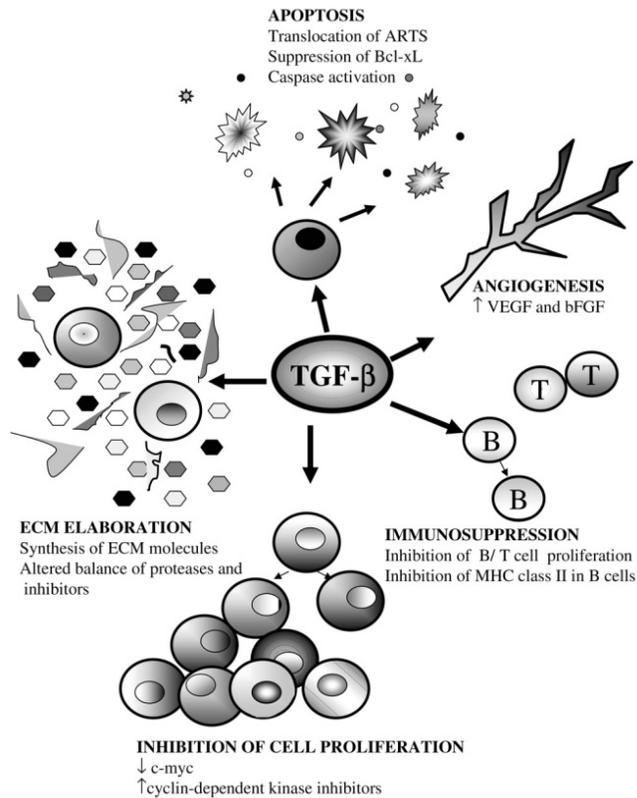
traduciría en una respuesta inflamatoria excesiva y, consecuentemente, esto podría resultar en un mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico.

### **TGF- $\beta$**

El TGF-  $\beta$  como la IL-10, no sólo es un potente inmunosupresor y citocina anti-inflamatoria, también es un regulador central de la proliferación y función de células T (103, 104).

Es sintetizado por muchas estirpes celulares como linfocitos T, macrófagos, plaquetas y células dendríticas, y su expresión regula de manera autócrina o parácrina la diferenciación, proliferación y el estado de activación de éstas y muchas otras células. En general, el TGF-  $\beta$ 1 tiene propiedades pleiotrópicas en el contexto de la respuesta inmunológica durante el desarrollo de infecciones y procesos neoplásicos. El conocimiento de los mecanismos moleculares de la regulación del TGF- $\beta$ 1 puede representar una importante estrategia de tratamiento del cáncer (105,106).

El TGF- $\beta$  es una citocina multifuncional que inhibe el crecimiento de las células epiteliales, induce la apoptosis en una variedad de tipos de células, estimula el crecimiento de nuevos vasos, y es un potente inmunosupresor (Figura 9). Además, entre las funciones del TGF- $\beta$  está la elaboración de la matriz extracelular (104). Existen varias isoformas del TGF- $\beta$  designadas como TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ 4 y TGF- $\beta$ 5. Adicionalmente, un heterodímero del TGF- $\beta$ 12, se ha identificado en plaquetas porcinas. Las isoformas 1, 2, y 3 se encuentran codificadas en los cromosomas humanos 19q13, 1q41 y 14q24 (107-108).



**Figura 10.** El TGF- $\beta$  puede actuar como un mitógeno indirecto sobre células mesenquimales o como estimulador de la síntesis de proteínas de matriz extracelular. Sin embargo, es también un potente inhibidor de la proliferación de células epiteliales, endoteliales, linfoides y mieloides.

Todas las células normales y la mayoría de las células neoplásicas tienen receptores en su superficie para el TGF- $\beta$ 1. Los receptores T $\beta$ RI y T $\beta$ RII son los responsables de los efectos biológicos de TGF- $\beta$ 1 en las células B de los mamíferos; sin embargo, los receptores T $\beta$ RIII, constituidos por los betaglicanos y la endoglina, son también capaces de unirse a TGF- $\beta$ 1 (108).

El TGF- $\beta$ 1 es el inhibidor más potente de la proliferación de células de origen mieloide, mesenquimal, epitelial, linfoide, endotelial y de varios tipos de células malignas, puede estimular la proliferación de fibroblastos normales, de células no epiteliales y ciertos tipos de células mesenquimales, regula factores de crecimiento que intervienen en la diferenciación celular (109).

En el contexto de la respuesta inmunológica, dependiendo de la concentración del TGF- $\beta$ 1, induce o inhibe la producción de citocinas por monocitos, pero inhibe la respuesta protectora de estas mismas células; promueve la quimiotaxis de fibroblastos, monocitos y neutrófilos; aumenta las funciones efectoras y de memoria de los linfocitos T CD4+ antígeno-específicos; estimula la secreción de IgA; inhibe la proliferación de linfocitos, células endoteliales, hepatocitos, queratinocitos y ciertas líneas celulares tumorales; inhibe la secreción de IgG e IgM; suprime la hematopoyesis dependiente de IL-3 (110-115).

El TGF- $\beta$ 1 tiene un espectro muy amplio de funciones, las cuales dependen del estado de activación celular, de su concentración, del balance de expresión de otras citocinas y de las condiciones fisiológicas de las células sobre las que actúa; asociada con el estado de diferenciación celular. La acción del TGF- $\beta$ 1 corresponde a la inhibición del ciclo celular. En los puntos de control del ciclo celular entre las fases G1 a S y G2 a M, puede bloquear el ciclo celular en la transición de la fase G1 a la fase S, mediante la inducción de un conjunto de genes conocidos como inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas Kip (116).

## **2.2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS**

### **Citocinas y microambiente tumoral**

En virtud de que las citocinas tienen funciones pleiotrópicas, es difícil determinar la participación de una citocina en particular en la progresión del cáncer. Esto se debe a la relación con otras citocinas, factores de crecimiento y hormonas, que actúan simultáneamente en el sitio del tumor, así como con el blanco celular sobre el que actúan (117).

Por encima de la producción normal de citocinas inflamatorias, el cambio de polimorfismos en sus regiones promotoras, se ha vinculado a un incremento de riesgo de cáncer gástrico (100, 118, 119).

Se ha determinado que en diversos tipos de cáncer se producen citocinas inmunosupresoras en el sitio tumoral, las cuales favorecen la progresión del proceso neoplásico (120).

Hay dos mecanismos que pueden explicar la participación de las citocinas en el desarrollo del cáncer. 1) Es posible que las citocinas favorezcan el desarrollo tumoral al interactuar con factores de proliferación, inducir la actividad de la angiogénesis del tumor y promover la metástasis por el incremento de la adhesión celular. 2) Las citocinas como mediadores de la respuesta inmunológica pueden inhibir la expresión de las moléculas y de receptores, tanto de las células de la respuesta inmunológica como de la célula tumoral, las cuales están involucradas en la identificación y destrucción de la célula tumoral (como la desregulación de

las moléculas MHC clase I y II, de moléculas coestimuladoras y la desregulación de la cadena zeta del complejo TcR/CD3) (121,122).

En diferentes neoplasias, se ha observado una tendencia en la expresión de citocinas antiinflamatorias y una disminución de expresión de citocinas proinflamatorias (123).

Este cambio en la expresión de citocinas proinflamatorias a antiinflamatorias podría facilitar la progresión tumoral por la subversión de los mecanismos de inmunovigilancia celular. La expresión de las citocinas IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$ 1 correlaciona con la severidad de la enfermedad (124).

La expresión de un perfil de citocinas antiinflamatorias en el microambiente tumoral favorece un estado de inmunosupresión local, el cual se asocia con la desregulación de varias moléculas de la respuesta inmunológica (125). A favor de esta hipótesis, se ha informado sobre varias alteraciones de la respuesta inmunológica en pacientes con lesiones premalignas y malignas. Por ejemplo, se ha informado de una baja expresión de moléculas del MHC clase I asociada a la baja expresión de TAP1 (126), de la disminución de la expresión de las moléculas coestimuladoras como B7 sobre la célula tumoral (127), de baja expresión de CD25 (128) y de la cadena  $\zeta$  del complejo TcR/CD3 en linfocitos T infiltrantes de tumor y en células NKTs (129,130).

Las células tumorales tienen baja capacidad para activar a la respuesta inmunológica, como resultado de la disminución de la expresión de moléculas del MHC clase I y II, de moléculas de adhesión celular y de moléculas coestimuladoras. Esto impide la adecuada presentación de los antígenos tumorales y la activación de los linfocitos T. Este efecto se confirma por la

secreción de citocinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- $\beta$ 1 y una nula expresión de citocinas proinflamatorias involucradas en la activación de la respuesta inmunológica. La identificación de las citocinas y quimiocinas como inductores de la maduración, activación y migración de células efectoras de la respuesta inmunológica ha permitido que sean utilizadas como activadores de la respuesta inmunológica contra varios tumores. En varios modelos tumorales se ha determinado que las citocinas pueden favorecer la regresión del tumor, al activar la respuesta inmunológica mediada por células (131).

Las citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, IL-18 y el factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos (GM-CSF) se han utilizado preferentemente en la inmunoterapia contra el cáncer. Estas citocinas promueven la activación de linfocitos T contra antígenos tumorales, activan la respuesta inmunológica no específica e inducen la expresión de otras citocinas activadoras. Además, también pueden activar varias células de la respuesta inmunológica como: las células NK, monocitos y macrófagos. Estas citocinas favorecen la presentación de los antígenos específicos del tumor por parte de las propias células malignas (131).

El mecanismo de inhibición del desarrollo tumoral por IL-2 se ha determinado por la capacidad para promover el infiltrado de linfocitos T y células NKs al sitio del tumor, lo que aumenta el nivel de actividad lítica. La presencia de IL-2 favorece la expresión de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  del receptor IL-2 en células tumorales, las cuales se requieren para los eventos de traducción de señales (132).

Las citocinas IL-10, TNF $\gamma$  e IL-6 pueden funcionar en una forma autocrina y paracrina, cabe mencionar que los polimorfismos de las citocinas IL-10, IL-8 y

TNF $\alpha$  en las células tumorales, se han relacionado con la progresión al cáncer gástrico (133).

Muy pocos estudios han evaluado el papel directo de la IL-10 en la carcinogénesis. Los niveles de la IL-10 intracelular en los monocitos de pacientes con cáncer gástrico avanzado es significativamente mayor comparado con los niveles en pacientes con enfermedad temprana o con los niveles de individuos sanos (134). La expresión de IL-10 en tejido de pacientes con cáncer gástrico esta correlacionada con resultados poco alentadores (135, 136). Cada vez hay más evidencias que una elevada concentración de IL-10 en suero y en la cavidad peritoneal, está asociada con la progresión del tumor y con el pronóstico de los pacientes con cáncer gástrico (137-141). Estos hallazgos sugieren que las propiedades inmunosupresoras de la IL-10 pueden contribuir a la progresión del tumor a través de la supresión de la inmunidad antitumoral del hospedero. Aunque la IL-10 recientemente la han reportado como un potente factor angiogénico en las células de carcinoma de pulmón, surgen discrepancias por presentar una propiedad similar en células de cáncer gástrico (142).

#### *Función del TGF- $\beta$ 1 en la oncogénesis.*

Los TGF- $\beta$  regulan la proliferación de muchas células normales; sin embargo, en las células tumorales ocurre la pérdida de respuesta a esta citocina. En muchos estudios han encontrado una correlación entre el aumento de la expresión de la proteína y del RNAm de los TGF- $\beta$ s con los estados avanzados de la tumorigénesis, así como la disminución de la supervivencia en los cánceres epiteliales, neuroectodérmicos y de origen mesenquimal (143-148). Estos hallazgos sostienen la hipótesis de que el aumento de la expresión del TGF- $\beta$ 1 lleva a la pérdida de la

respuesta inhibitoria de la proliferación celular inducida por éste, y puede representar un mecanismo de escape de la célula tumoral que favorece la evolución del proceso neoplásico (146). Se ha demostrado que el carcinoma de colon y el glioblastoma tienen una pérdida progresiva de la respuesta inhibitoria de la proliferación por el TGF- $\beta$ 1, lo cual varía directamente con la evolución del tumor (149,150).

Una vez que la célula tumoral pierde su capacidad para inhibir su proliferación por el TGF- $\beta$ 1, produce cantidades masivas de esta citocina. Esta condición proporciona una ventaja selectiva para la sobrevivencia de la célula tumoral, ya que el TGF- $\beta$ 1 induce de novo la angiogénesis y el desarrollo de un estado de inmunosupresión, incluyendo la inhibición de la respuesta antitumoral de las células NK (151,152). Además el TGF- $\beta$ 1 tiene funciones importantes en la regulación del ciclo celular, por lo que no es sorprendente que las alteraciones genéticas asociadas con el desarrollo del cáncer ocurran en genes que están involucrados en la regulación de la proliferación celular por el TGF- $\beta$ 1. Defectos en los receptores del TGF- $\beta$ 1, en genes involucrados en la transducción de señal por el TGF- $\beta$ 1 y en proteínas que regulan el ciclo celular relacionadas con éste, tienen implicaciones importantes en el proceso oncogénico (153).

#### *Alteraciones en los receptores de TGF- $\beta$ en el cáncer*

Se ha demostrado que el gen de T $\beta$ RII tiene alteraciones genéticas, deleciones y pérdida del gen homocigoto en cánceres de cabeza y cuello, gástrico, de mama, en células pequeñas de carcinoma de pulmón y en carcinoma endometrial. Tanto T $\beta$ RI como T $\beta$ RII tienen mutaciones o disminución de su expresión del gen o de la proteína en muchos cánceres humanos (154-157).

*Alteraciones de la transducción de señal del TGF- $\beta$ 1 en el cáncer.*

En la vía de transducción de señal inducida por el TGF- $\beta$ 1, las proteínas Smad son un blanco con una alta frecuencia de mutaciones con potencial tumorigénico, las cuales transforman a las células tumorales para superar la inhibición de la proliferación inducida por el TGF- $\beta$ 1 (158).

La expresión de TGF-  $\beta$ 1 fue detectada en el 22.8% de los pacientes con cáncer gástrico, en quienes la expresión fue principalmente localizada en el citoplasma de las células con carcinoma. Además de su actividad inmunosupresora, el TGF-  $\beta$  parece poseer funciones pleiotrópicas en términos de progresión de cáncer gástrico (158). El TGF-  $\beta$  promueve la invasión y metástasis de células de cáncer gástrico a través de la JNK y las vías señalización extracelulares de la quinasa (159). El TGF- $\beta$  producido por los fibroblastos gástricos estimula la invasión de las células de cáncer gástrico (160). La interrupción en las señales de TGF-  $\beta$  en las células de cáncer gástrico de tipo difuso aceleran el crecimiento del tumor a través de aumento de la angiogénesis. Estas discrepancias en los resultados puede deberse a los diferentes tipos de células de cáncer que se emplearon en estos estudios, es decir, células de cáncer tipo difuso o de tipo intestinal, o a los diferentes subtipos de TGF-  $\beta$  (161). Algunos estudios clínicos han demostrado una evolución positiva cuando se expresa el TGF-  $\beta$ 1 en pacientes con metástasis en ganglios linfáticos y mal pronóstico en pacientes con cáncer gástrico (162-163). Existe una fuerte correlación entre la expresión del TGF-  $\beta$ 1 y la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en tejidos con cáncer gástrico, lo que sugiere que la progresión del tumor es promovido indirectamente por la

estimulación de la angiogénesis a través de la regulación de la expresión de VEGF (164).

Otro papel importante del TGF- $\beta$  es la inducción y activación de células T reguladoras, las cuales pueden inhibir la respuesta inmunológica mediada por los linfocitos T CD4 (+) y CD8 (+) (165-166). Hay evidencia de que el aumento de las poblaciones de células T reguladoras está presente en pacientes con cáncer gástrico (167-168). Las poblaciones de células T reguladoras en sangre periférica son significativamente altas en pacientes con cáncer gástrico y esofágico en comparación con personas sanas o que tienen la mucosa normal. Por otra parte el papel del TGF-  $\beta$  en la supresión directa del tumor y/o en su progresión puede ser dependiente de la etapa y el tipo celular del cáncer, así como también depende de la inmunosupresión sistémica inducida y de las propiedades anti-inflamatorias de esta molécula (169).

La evolución del carcinoma gástrico es acompañada por decremento en la función citotóxica de las células NK y niveles elevados en suero de IL-10 y TGF-  $\beta$ 1 (170). Las citocinas juegan un papel fundamental en la progresión del crecimiento tumoral y metástasis en diversas neoplasias (171-172).

Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que las quimiocinas y los receptores de las quimiocinas pueden contribuir directamente al crecimiento del tumor en forma autocrina y / o de manera paracrina, y también puede promover la metástasis del tumor a través de la angiogénesis y de células de adhesión (173).

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El adenocarcinoma gástrico es el tumor maligno más frecuente del estómago, cuya incidencia se ha incrementado en los últimos años, siendo más frecuente en la población hispana, sobre todo en hombres. Se han realizado numerosos estudios clínicos y moleculares asociados al cáncer gástrico, sin embargo no se han realizado estudios relacionados a la respuesta inmunológica asociada a este tipo de patología en población Mexicana. Por lo anterior el presente estudio tuvo como propósito describir el perfil de citocinas expresadas en las biopsias de las gastrectomías de pacientes con adenocarcinoma gástrico en las diferentes etapas clínicas, con la finalidad de correlacionar dicha expresión de las citocinas con el tipo histológico y la reacción inflamatoria, lo que a futuro puede permitir implementar terapias inmunológicas enfocadas al tratamiento de esta patología.

### **4. HIPOTESIS**

La expresión de citocinas Th1, Th2 Y Th3 en biopsias obtenidas de pacientes con adenocarcinoma gástrico se encuentra modificada en las diferentes etapas clínicas.

### **5. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la expresión de citocinas Th1, Th2 Y Th3 en biopsias de pacientes con adenocarcinoma gástrico en las diferentes etapas clínicas.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Tipo de Estudio:**

Se realizó un estudio transversal, observacional, exploratorio.

### **6.2 Población y Muestra:**

En 30 biopsias de pacientes con adenocarcinoma gástrico, a quienes se les realizó gastrectomía total, se estudiaron las siguientes variables: edad, género, clasificación histológica, infiltrado inflamatorio y el estadio clínico. Las biopsias provinieron del Servicio de Patología de la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional General de División “Manuel Ávila Camacho” del del Instituto Mexicano del Seguro Social, Puebla y fueron captadas de enero de 2008 a diciembre de 2009.

### **6.3 Criterios de Selección:**

#### a) Criterios de inclusión

Biopsias procedentes de gastrectomías totales realizadas a pacientes con: Diagnóstico de adenocarcinoma gástrico, corroborado por reporte histopatológico y por endoscopia.

Sexo masculino o femenino.

Edad de 34 a 83 años.

#### b) Criterios de exclusión

Biopsias con;

Otro tipo de cáncer.

Alguna otra neoplasia agregada.

Insuficientes para un diagnóstico.

#### **6.4 Formación de los grupos de estudio**

Se evaluó la expresión de citocinas en las biopsias de los pacientes que cumplieron los criterios de Inclusión/exclusión, estas se agruparon por estadio clínico, edad y sexo, se procesaron y se les realizó el estudio inmunohistoquímico.

#### **6.5 Metodología.**

Las biopsias fueron incluidas en parafina y diagnosticadas histológicamente por el departamento de Anatomía Patológica del mismo Hospital.

Se sacaron 6 cortes de 4 micras de cada bloque de parafina por cada paciente, a un corte se realizó tinción de hematoxilina-eosina, se observó en el microscopio de luz para determinar la diferenciación histológica del adenocarcinoma gástrico y el grado de reacción inflamatoria. A los cortes restantes se les realizó inmunohistoquímica y se observó en el microscopio de luz para determinar las siguientes citocinas IL-2, IL-4, IL-10, TGF $\beta$  de manera cualitativa por inmunoperoxidasa indirecta.

#### ***Procesamiento de las muestras***

##### ***Fijación de las biopsias***

Las biopsias se fijaron en formalina neutra al 10% estabilizada por inmersión, ya que la formalina es el mejor fijador para especímenes patológicos, para la preservación de los tejidos, deteniendo de este modo la autólisis y permitiendo que los tejidos permanezcan sin cambios para subsecuentes tratamientos, debido a que la formalina preserva las proteínas para que mantengan el glicógeno. Con

este fijador las biopsias se endurecen ligeramente pero no se fragmentan, lo que permite que no se encojan y estén muy cerca del estado en vivo. La formalina penetra al tejido 1mm por hora por lo que las biopsias se dejaron aproximadamente 4 horas como mínimo.

La fijación de las biopsias se hizo inmediatamente, ya que cualquier demora seca el tejido y acelera la autolisis, debido a que la congelación antes de la fijación puede producir cambios morfológicos severos y si se colocan en solución salina inicia o acelera la autolisis.

### ***Deshidratación de las biopsias.***

La deshidratación se hizo con alcoholes, con la finalidad de eliminar por completo el agua, ya que gran parte del tejido está hidratado y para que se pueda embeber adecuadamente en el medio de inclusión es necesario deshidratarlo. Los reactivos deshidratantes utilizados no deben alterar las estructuras tisulares y se deben poder mezclar con el reactivo intermediario o agente aclarante, por lo que se utilizaron una serie de alcoholes a concentración ascendente, ya que la acción brusca de un alcohol de elevada graduación sobre el tejido provoca una marcada retracción de este. Se usaron las siguientes concentraciones de alcohol etílico (karal, S.A. de C.V. México): 70%, 80%, 96% y 100%.

Alcohol al 70%	1 hora
Alcohol al 80%	1 hora
Alcohol al 96%	1 hora
Alcohol al 96%	1 hora
Alcohol al 96%	1 hora

Alcohol al 100%	1 hora
Alcohol al 100%	1 hora
Alcohol al 100%	1 hora

### **Aclaramiento o enlace**

Luego de deshidratar el tejido, se pasó a una solución de Xilol o Xileno (SIGMA de México, S.A. de C.V. México), que es miscible tanto con el alcohol como con el medio de inclusión, parafina líquida. Se llama aclaramiento ya que el tejido se torna transparente o claro en el xileno, esto se debe a que cambia su índice de refracción.

Xilol 100%	1 hora
Xilol 100%	1 hora

### **Infiltración**

Se colocó la muestra de tejido en un recipiente y se le agregó la parafina (CTR SCIENTIFIC, Control técnico y representaciones, S.A. de C.V., México) fundida a 60° C. Debido al calor, el xilol se evaporó y los espacios anteriormente ocupados por él fueron ocupados por la parafina.

Parafina	1 hora
Parafina	1 hora

### **Inclusión de las biopsias**

Para la obtención de cortes suficientemente finos, de modo que puedan ser observados al microscopio, los tejidos se incluyeron y envolvieron por parafina

(CTR SCIENTIFIC, Control técnico y representaciones, S.A. de C.V., México). El objetivo de la inclusión fue, distinguir entre sí las células superpuestas en un tejido y la matriz extracelular y tener un objeto lo suficientemente duro para su manejo y corte.

Se colocó la parafina fundida, a no más de 60°C, en un molde de metal de forma rectangular y se sumergió el tejido hasta el fondo, se dejó solidificar a temperatura ambiente o con la ayuda de un refrigerante, formándose un bloque sólido de parafina con el trozo de tejido incluido.

### ***Preparación de los portaobjetos con poli-L-lisina***

Los portaobjetos se limpiaron perfectamente con acetona posteriormente se sumergieron en una dilución de 1:10 de poli-L-lisina (P 8920, SIGMA-ALDRICH, USA) por 10 minutos se sacaron y se dejaron secar a temperatura ambiente. Para diluir la poli-L-lisina se utilizó agua destilada (174).

### ***Sección o corte.***

El bloque se cortó en secciones de 4 micras, lo suficientemente delgadas para permitir el paso de la luz. Se utilizó un Micrótopo (LEICA RM2125RT, Laica Microsystems Nussloch GmbH, Alemania) con cuchillas desechables (Triangle Biomedical Sciences, North Carolina). También se utilizó un baño de flotación de

tejidos (Thermo, Electrom Corporation, Inglaterra), con la finalidad de extender los tejidos después del corte.

Una vez preparados, un corte del tejido del bloque de parafina se montó sobre un portaobjetos sin previa preparación con poli-l-lisina para la tinción de hematoxilina-eosina y los cuatro cortes restantes del tejido del bloque se montaron sobre portaobjetos previamente cubiertas con poli-l-lisina (P 8920, SIGMA-ALDRICH, USA) para el estudio de inmunohistoquímica.

### ***Para la tinción de hematoxilina-eosina***

Se utilizaron los cortes de los tejidos de los bloques de parafina que se montaron sobre un portaobjetos con un diámetro de 3mm y se procesaron de la siguiente manera:

### ***Desparafinar las muestras***

Las laminillas con las muestras se metieron en un horno a 60°C de 40 a 60 minutos. Ya que es necesario eliminar los restos de parafina por que puede dar un falso positivo.

### ***Hidratación de las muestras***

La hidratación se hizo para que el tejido se pudiera embeber con el colorante que es base agua.

Después de desparafinar se metió inmediatamente a:

Xilol 100%	5 minutos
Xilol 100%	5 minutos
Xilol 100%	5 minutos

Alcohol 100%	10 baños
Alcohol 100%	10 baños
Alcohol 96%	10 baños
Alcohol 96%	10 baños
Agua corriente	10 baños

Después de hidratar las muestras se sometieron a la:

***Tinción de hematoxilina-eosina***

Hematoxilina-eosina	5 minutos
Agua corriente	10 baños
Alcohol al 96%-Acido clorhídrico (al 1%)	1 baño
Agua corriente	10 baños
Agua destilada-hidróxido de amonio (al 1%)	1 baño
Agua corriente	10 baños
Alcohol al 96%	5 baños
Eosina alcohólica	10 baños
Alcohol 96%	10 baños
Alcohol 96%	10 baños
Alcohol 100%	10 baños
Alcohol 100%	10 baños
Alcohol 100%	10 baños
Xilol	10 baños
Xilol	10 baños
Xilol	10 baños

Se sacó y se montaron con resina (Entellan®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), se les puso cubreobjetos y se observaron en un microscopio de luz (Nikon, eclipse E600, Japón) para determinar la diferenciación histológica del adenocarcinoma gástrico y el grado de reacción inflamatoria.

## FUNDAMENTOS QUÍMICOS DE LA COLORACIÓN

La EOSINA es un colorante ácido y sus propiedades tintoriales pueden ser explicadas sobre la base de lo que se sabe acerca de la acción de las anilinas ácidas. La HEMATOXILINA aunque no es un colorante básico, posee propiedades muy semejantes a las anilinas básicas (175).

### ***Inmunohistoquímica***

Las biopsias que se cortaron en el micrótopo en secciones de 4 micras y se montaron en los portaobjetos con poli-L-lisina (P 8920 POLY-L-LYSINE SOLUTION, SIGMA-ALDRICH, USA) y se procesaron simultáneamente tanto los casos problema como los controles positivos de la siguiente manera:

### ***Desparafinar las muestras***

Lo principal para la tinción es que las laminillas deben ser desparafinadas para remover el medio de embebido y poder ser rehidratadas.

Las laminillas con las muestras se metieron en un horno a 60°C de 40 a 60 minutos. Ya que es necesario eliminar los restos de parafina por que puede dar un falso positivo.

### ***Rehidratación de las muestras***

Las muestras se rehidrataron en soluciones decrecientes de alcohol etílico y finalmente en buffer fosfato salino (PBS 0.15 M Ph 7.3).

Después de desparafinar se metió inmediatamente en un baño de xilol durante 5 ( $\pm 1$ ) minutos. Se cambio de baño y se repitió nuevamente, este paso es importante para que el tejido se adhiriera mejor a la laminilla:

Xilol I 100%                      5 minutos

Xilol II 100%                      5 minutos

Se elimino el exceso de xilol y las laminillas se sumergieron en etanol absoluto por 5 ( $\pm 1$ ) minutos. Se cambio de baño y se repitió nuevamente este paso:

Etanol I 100%                      5 minutos

Etanol II 100%                      5 minutos

Se eliminó el exceso del etanol absoluto y las laminillas se sumergieron en etanol al 96% por 5 ( $\pm 1$ ) minutos, Se cambio de baño y se repitió nuevamente este paso pero ahora con etanol al 80% por 5 ( $\pm 1$ ) minutos y con etanol al 70% por 5 ( $\pm 1$ ) minutos y finalmente con PBS 0.15 M pH 7.3 (Buffer) 5 minutos.

Etanol 96%                      5 minutos

Etanol 80%                      5 minutos

Etanol 70%                      5 minutos

PBS 1X                      5 minutos

Las soluciones de xilol y alcoholes se fueron cambiando después de cada 40 laminillas.

Después de hidratar las muestras se sometieron a la tinción de Inmunohistoquímica:

***Paso 1. Bloqueo de la peroxidada endógena.***

Se eliminó el exceso de buffer. Las laminillas se sumergieron en un coplin con peróxido de hidrogeno (Omnichen sac, México) al 10% durante 5 minutos,

transcurrido el tiempo las laminillas se lavaron con PBS 0.15 M pH 7.3 tres veces por 5 minutos cada lavado.

### ***Paso 2. Recuperación antigénica***

Este paso es importante para romper los puentes de hidrogeno que se formaron con el formol y la parafina y así exponer los epitopes que fueron enmascarados durante la fijación del tejido.

Se llenó un vaso de coplin con la cantidad suficiente de la solución recuperador antigénico (Taget Retrieval solution, pH9 ready-to-use, DakoCytomation DenmarkA/S, Dinamarca) para cubrir las laminillas con las secciones de tejido, se tapó el coplin y se colocó en baño maría en una olla de presión, se llevo a una temperatura de 95-99 ° C (sin hervir) una vez que se llegó a esta temperatura se incubó durante 40 ( $\pm$ 1) minutos. Transcurrido este tiempo se retiró el coplin con las laminillas y el recuperador antigénico del baño maría y se dejó enfriar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se decantó la solución de recuperador antigénico y las laminillas se lavaron con PBS 0.15 M pH 7.3 tres veces por 5 minutos cada lavado.

### ***Paso 3. Anticuerpo primario***

Para el anticuerpo primario se utilizó: un panel con anticuerpos monoclonales específicos contra cada citocina en diluciones (Antibody Diluent with Background Reducing Components, Dako, USA) de 1:100.

Se elimino el exceso de buffer secando alrededor del tejido con un papel cuidando de no tocarlo y de que no quedara seco, se le pusieron 40 $\mu$ l del la dilución del anticuerpo monoclonal o a cubrir el tejido. Las secciones se incubaron con el anticuerpo monoclonal específico contra IL2 (Anti-Human IL-2 Purified, eBioscience,

California), IL4 (Anti-Human IL-4 Purifid, eBioscience, California), IL10 (Anti-Human IL-10 Purifid, eBioscience, California), TGF- $\beta$  (Mause Anti-Human TGF Beta, AbD Serotec, UK), toda la noche en cámara húmeda a 4° C. Posteriormente, se lavaron 3 veces en PBS 0.15 M pH 7.3 por 5 minutos cada lavado. Como control positivo para TGF- $\beta$  se utilizó un tejido histológico de carcinoma de mama como lo indica el fabricante (AbD Serotec).

#### ***Paso 4. Revelado de la reacción***

Para el revelado de la reacción antígeno anticuerpo se utilizó un anticuerpo secundario IgG policlonal de cabra acoplado a peroxidasa (Polyclonal Goat, Anti-Mouse Immunoglobulins, DakoCytomation Denmark A/S, Dinamarca) anti-IgG de ratón en una dilución de 1:100.

Se eliminó el exceso de buffer secando alrededor del tejido con un papel cuidando de no tocarlo y de que no quedara seco, se le pusieron 40 $\mu$ l de la dilución del anticuerpo secundario o a cubrir el tejido. Las secciones se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda, se lavaron 3 veces en PBS 0.15 M pH 7.3 por 5 minutos cada lavado.

#### ***Paso 4. Solución Sustrato-Cromógeno (DAB)***

La diaminobencidina DAB se preparó de la siguiente manera:

Se puso 2.5 mg de DAB en 5 ml de Tris-HCL a 0.2 M pH 7.4, cuando se va a utilizar el cromógeno se tiene que activar la solución con una gota de agua oxigenada (Omnichen sac, México).

Se limpiaron las laminillas como los pasos anteriores y se cubrieron los cortes con DAB activada y se incubaron en cámara húmeda por 15 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces en con agua corriente por 5 minutos cada lavado.

#### ***Paso 4. Contratación***

Se sumergieron las laminillas en un baño de hematoxilina por 30 segundos y posteriormente se lavaron con agua corriente, hasta asegurarse que todos los residuos de hematoxilina se eliminaron.

#### ***Paso 5. Deshidratar y aclarar***

Las laminillas se sumergieron en etanol al 70% por 5 ( $\pm 1$ ) minutos, se cambio de baño y se repitió nuevamente este paso pero ahora con etanol al 80% luego con etanol al 96%, con etanol al 100%, nuevamente con etanol al 100%, para aclarar las laminillas se sumergieron en xilol durante 5 ( $\pm 1$ ) minutos, se cambio de baño y se repitió nuevamente este paso.

Etanol 70%	5 minutos
Etanol 80%	5 minutos
Etanol 96%	5 minutos
Etanol I 100%	5 minutos
Etanol II 100%	5 minutos
Xilol I 100%	5 minutos
Xilol II 100%	5 minutos

#### ***Paso 5. Montar***

Se eliminoó el exceso de xilol secando alrededor del tejido con un papel cuidando de no tocarlo y se le puso una gota de resina (Entellan®, Merk, Alemania) y finalmente se le puso un cubreobjeto.

Las laminillas se observaron en un microscopio de luz a 40x (Nikon, eclipse E600) para determinar la presencia de las diferentes citocinas.

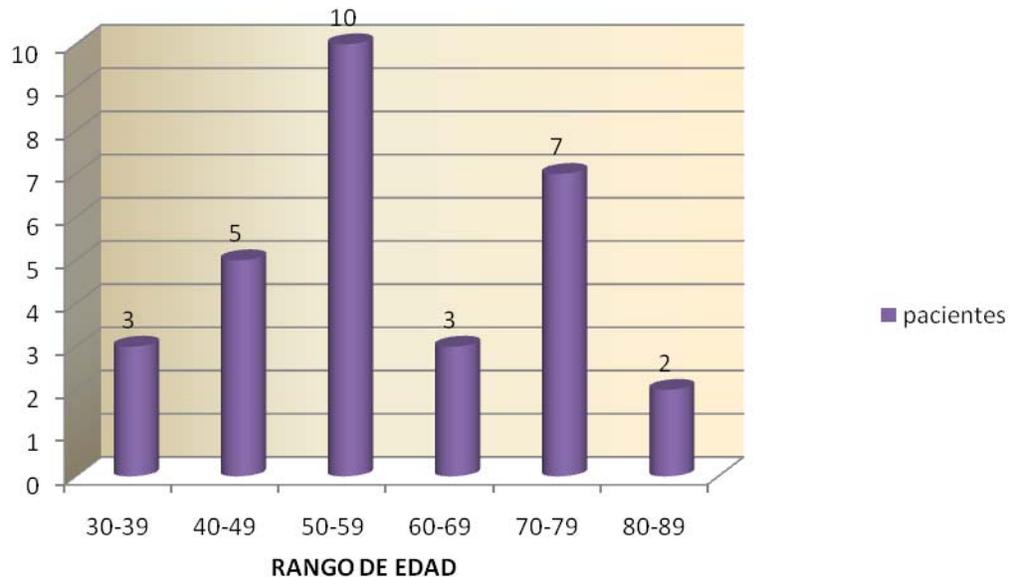
## **6. Análisis de datos**

Se estudiaron 30 biopsias de adenocarcinoma gástrico que se clasificaron como casos negativos/positivos a IL-2, IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$ . A través de análisis estratificados internos se evaluó si la ausencia de IL estaba asociada a la edad, el género, la clasificación histológica, infiltrado inflamatorio y el estadio clínico. Se realizaron análisis estadísticos descriptivos que se presentaron en graficas de pastel y de barras. Se utilizó el programa estadístico SPSS. Las comparaciones de la edad entre IL negativas y positivas se realizaron con t de Student previa comprobación de distribución normal con el estadístico de Kolmogorov-Smirnov; las comparaciones de proporciones (edad, género, tipo histológico, estadio clínico, reacción inflamatoria) se efectuaron con Chi Cuadrada o en su caso test exacto de Fisher. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### Edad:

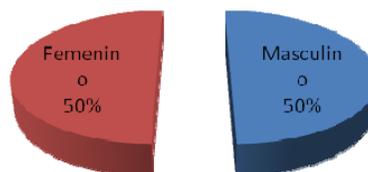
Se analizaron 30 biopsias de pacientes con adenocarcinoma gástrico las cuales correspondieron a pacientes con un promedio de edad de 58.34 años, con intervalo de 31 a 88 años, una mediana de 55 años y una desviación estándar de 14.7 años. La edad tuvo una distribución semejante a la normal (Kolmogorov-Smirnov 0.83,  $p = 0.49$ ) (Gráfica 1).



**Gráfica 1.** Distribución de pacientes por edad.

### Género:

De las 30 biopsias de pacientes con adenocarcinoma gástrico estudiadas, el 50% correspondieron al género femenino (15 casos) y el 50% al género masculino (15 casos) (Gráfica 2).



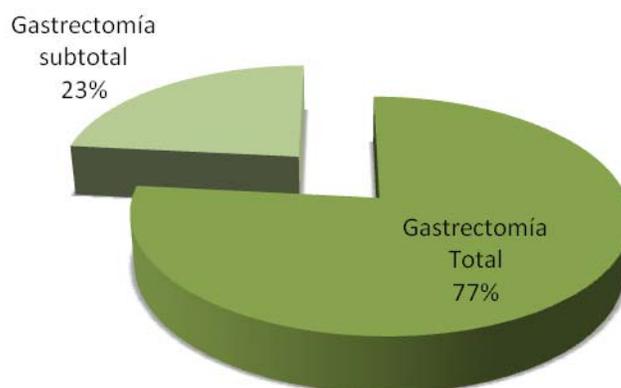
**Gráfica 2.** Distribución de pacientes por género.

De acuerdo al género y edad, las mujeres tuvieron 10.4 menos años de edad promedio que los hombres con 53.0 +/- 14.4 años vs 63.4 +/- 13.9 años, respectivamente (p = 0.05) (Tabla 1).

Tabla 1			
Edad promedio de los pacientes (total y de acuerdo a sexos)			
	Total n=30	Mujeres n=15	Hombres n=15
EDAD PROMEDIO±DS(años)	58.34 ±14.7 (rango en años)	53±14.4 (14-73)	63.4±13.9 (14-67)

### PROCEDIMIENTO QUIRURGÍCO:

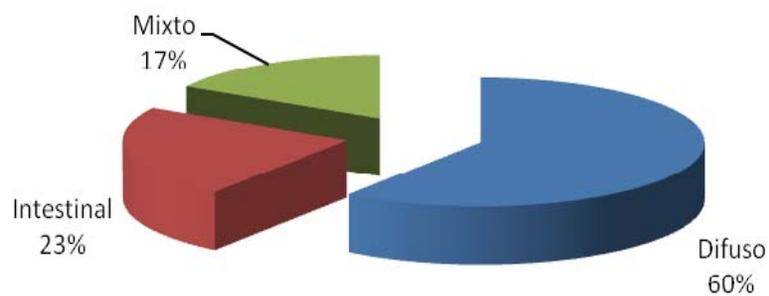
Al 76.7 % (23 casos) se les realizó gastrectomía total y sólo al 23.3 % (7 casos) gastrectomía subtotal. El tipo de operación está en relación con la localización del tumor, la gastrectomía total (GT) es utilizada para lesiones proximales gástricas y se incluye la resección en bloque del bazo, la gastrectomía subtotal distal (GST distal) para lesiones del antro (Gráfica 3).



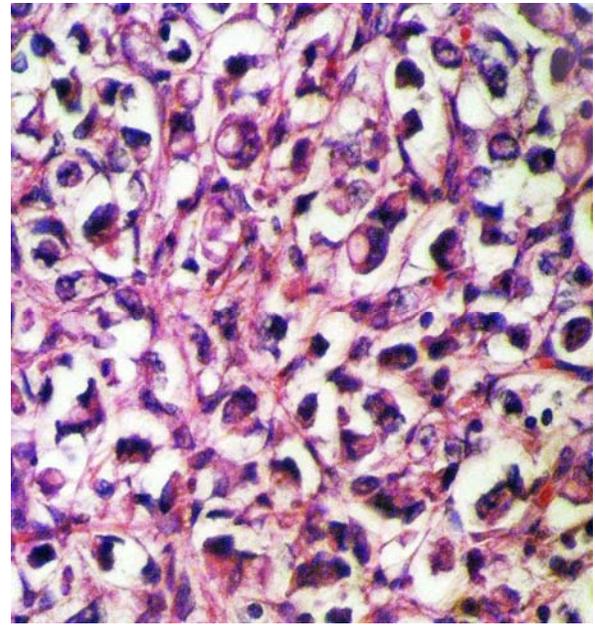
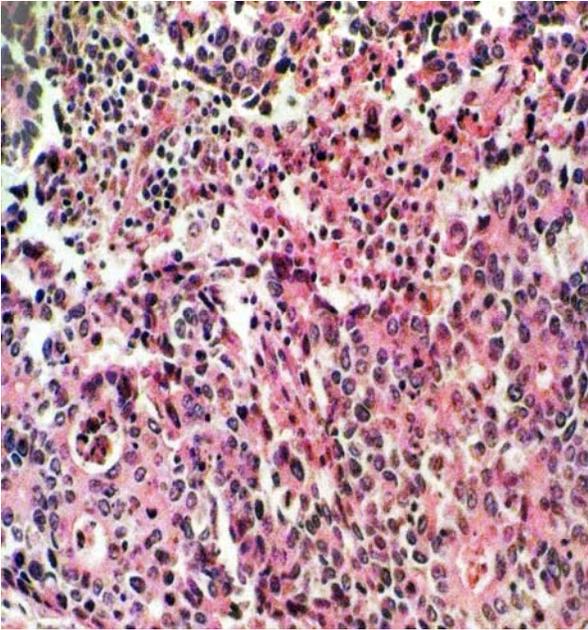
**Gráfica 3.** Distribución de pacientes por procedimiento quirúrgico.

### Clasificación histológica del cáncer gástrico:

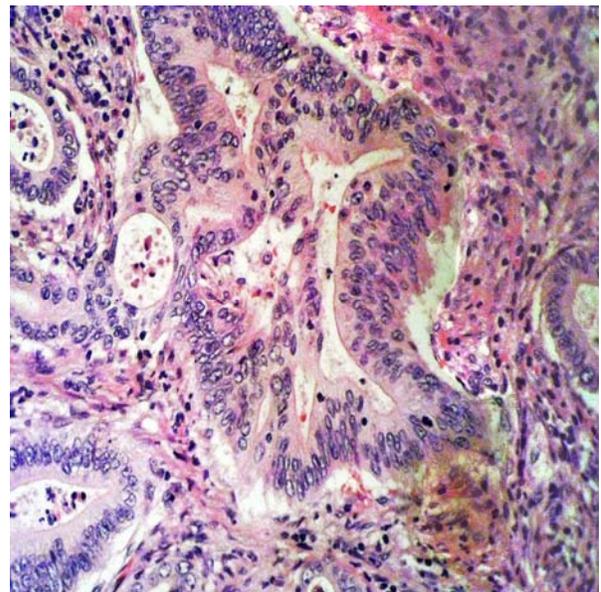
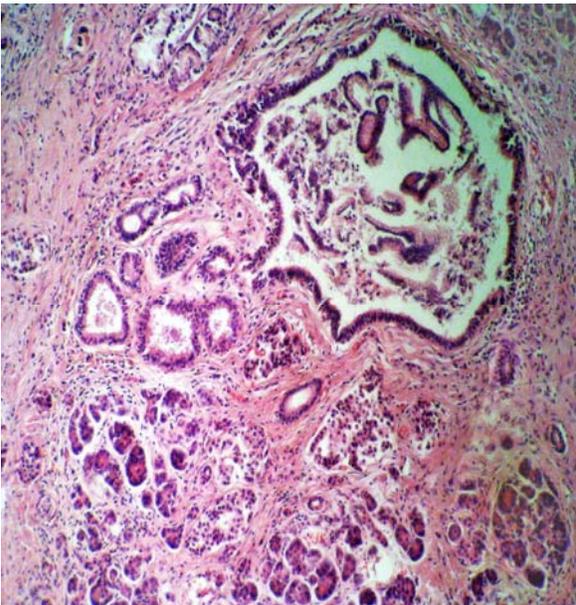
Se realizó tinción de hematoxilina y eosina y bajo la visualización con microscopio de luz a 10x y 40x se evaluaron las laminillas en base a la clasificación de Lauren, predominando el adenocarcinoma difuso 60% (18 casos) (Figura 10), seguido del intestinal 20% (7 casos) (Figura 11) y finalmente el mixto 20% (5 casos) (Figura 12), (Gráfica 4).



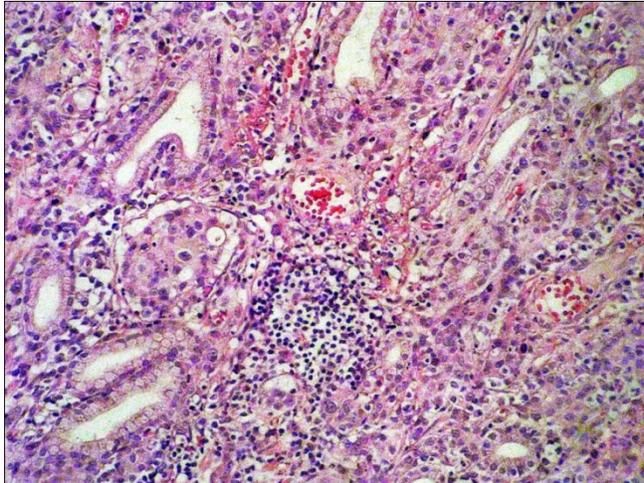
**Gráfica 4.** Distribución de pacientes por tipo histológico.



**Figura 11.** Adenocarcinoma Tipo Difuso. No tienen un patrón específico, hay células dispersas que invaden en forma individual o en pequeños grupos y se puede apreciar claramente las células “en anillo de sello”, no son cohesivas e infiltran ampliamente a través de la pared del estómago.



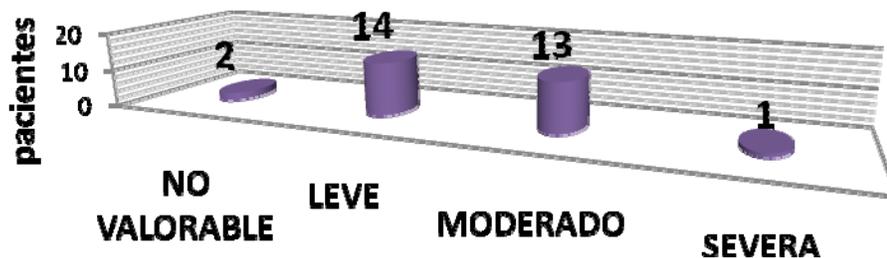
**Figura 12.** Adenocarcinoma Tipo Intestinal. Se encuentra formando glándulas y células epiteliales que se asemejan a células del intestino grueso y delgado.



**Figura 13.** Adenocarcinoma Tipo Mixto. Es una variante, en donde observamos una combinación de adenocarcinoma de tipo intestinal y de adenocarcinoma de tipo difuso.

### Reacción inflamatoria

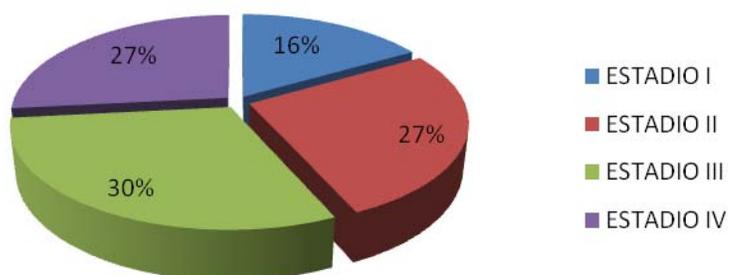
Para evaluar la reacción inflamatoria en el adenocarcinoma gástrico se evaluó bajo microscopia de luz a 10x y 40x, utilizando la Clasificación de Sidney, con evaluación de cuatro niveles en base al número de macrófagos y linfocitos por campo, con hallazgos de reacción inflamatoria no valorable 2 casos, leve en 14 casos, moderada en 13 casos y severa.



**Grafica 5.** Reacción inflamatoria.

## Etapa clínica

Las 30 biopsias de pacientes con adenocarcinoma gástrico se estudiaron por estadio clínico de acuerdo a la clasificación de TNM, de las cuales el 16.6% correspondieron al estadio I (5 biopsias), 26.6% para el estadio II (8 casos), 30% para el estadio III (9 casos) y 26.6% pacientes para estadio IV (8 casos). Predominando el estadio III, en este estudio. (Grafica 5).

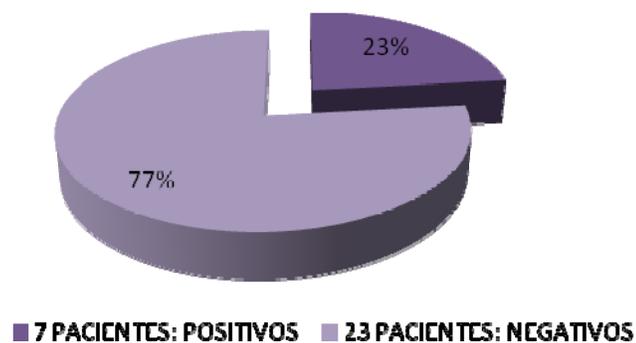


**Gráfica 6.** Distribución de pacientes por estadios de acuerdo a la clasificación TNM

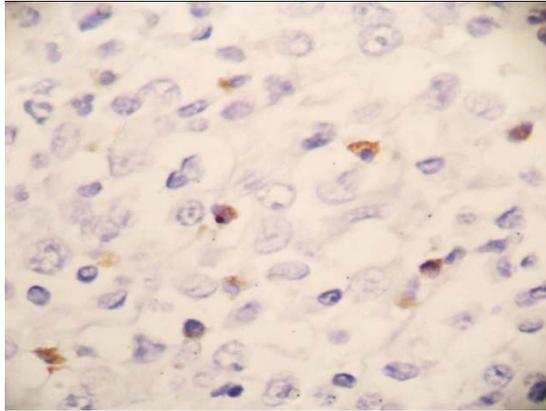
## Expresión de interleucinas en pacientes con adenocarcinoma gástrico.

En las laminillas a las que se les realizó inmunohistoquímica, se observó la expresión de las interleucinas IL-2, IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  de manera cualitativa, bajo la visualización de un microscopio de luz a 40x y 100x.

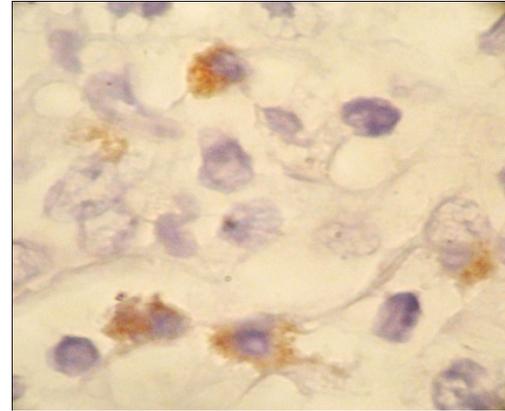
El 23% correspondieron a la IL-2 positivas (7 casos) y el 77% a IL-2 negativas (23 casos) (Grafica 6, Figura 13). De la IL-4 el 26.7% (8 casos) resultaron positivos y el 73.3 % (22 pacientes) resultaron negativos (Grafica 7, Figura 14). De la IL-10 el 16.6% (5 casos) resultaron positivos y el 83.3 % (25 pacientes) fueron negativas (Grafica 8, Figura 15). En ningún caso se detectó TGF- $\beta$  positivo (Figura 16). En total, 63.3 % (19 pacientes) resultaron con IL negativas IL-2, IL-4 e IL-10 y sólo 36.7 % (11 pacientes) tuvieron alguna IL positiva (gráfica 9).



**Grafica 7.** Expresión de IL-2 por inmunohistoquímica en biopsias de pacientes con adenocarcinoma gástrico.



40X

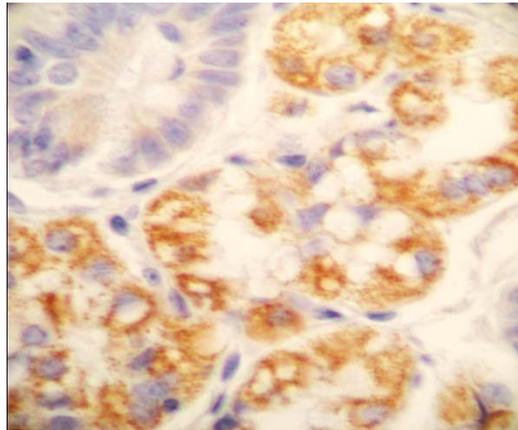


100X

**Figura 13.** Expresión de IL-2 por inmunohistoquímica en biopsias de pacientes con adenocarcinoma gástrico. Se observa abundantes linfocitos negativos al anticuerpo y positividad en citoplasma de leucocitos polimorfonucleares.

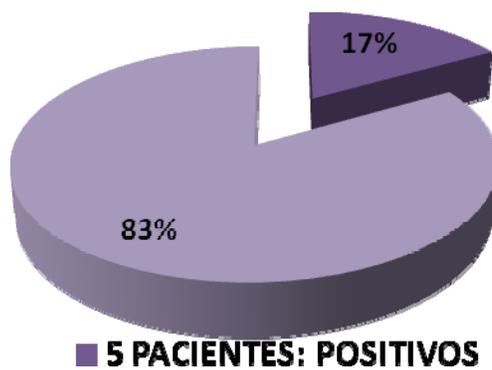


**Grafica 8.** Expresión de IL-4 por inmunohistoquímica en biopsias de pacientes con Adenocarcinoma gástrico.

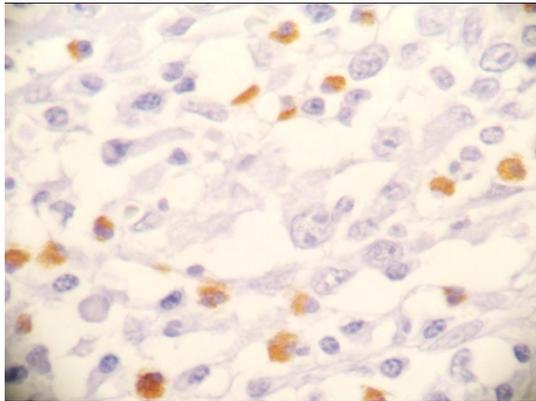


40X

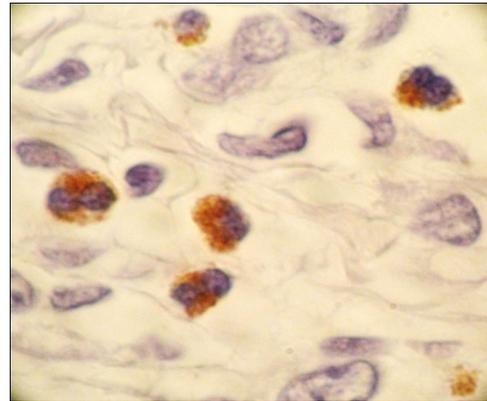
**Figura 15.** Expresión de IL-4 por inmunohistoquímica en biopsias de pacientes con Adenocarcinoma gástrico. Se observa positividad en el epitelio glandular.



**Grafica 9.** Expresión de IL-10 por inmunohistoquímica en biopsias de pacientes con adenocarcinoma gástrico.

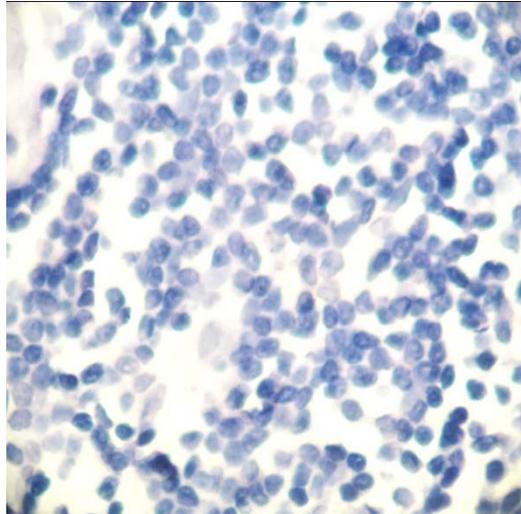


40 X



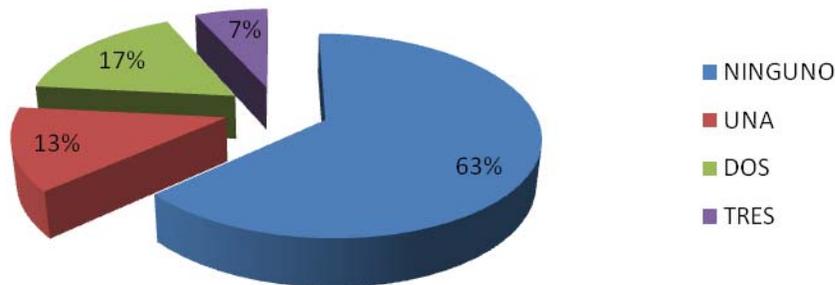
100 X

**Figura 16.** Expresión de IL-10 por inmunohistoquímica en biopsias de pacientes con adenocarcinoma gástrico. Se observa más positividad en citoplasma de leucocitos polimorfonucleares.



40X

**Figura 17.** Expresión de TGF- $\beta$  por inmunohistoquímica en biopsias de pacientes con Adenocarcinoma gástrico. En ningún caso se detectó TGF-B positivo.



**Gráfica 10.** Porcentaje de casos con adenocarcinoma gástrico según número de IL positivas y negativas.

### Citocinas y género

De las IL-2 que fueron positivas 100% (7 casos), el 42.9 % (3 casos) fueron en mujeres y el 57.1 % (4 casos) fueron en hombres y de las que fueron negativas 100% (23 casos) el 52.2% (12 casos) fueron en mujeres y el 47.8% (11 casos) en los hombres ( $p = 0.5$ ) (Tabla 2).

En el caso de IL-4 que fueron positivas 100% (8 casos), el 75% (6 casos) fueron en mujeres y el 25% (2 casos) fueron en hombres y de las que fueron negativas 100% (22 casos) el 40.9% (9 casos) fueron en mujeres y el 59.1% (13 casos) fueron en hombres ( $p = 0.1$ ) (Tabla 3).

Para el caso de la IL-10 que fueron positivas 100% (5 casos), el 60% (3 casos) fueron en mujeres y el 40% (2 casos) fueron en hombres y de las que fueron negativas 100% (25 casos) el 48% (12 casos) fueron en mujeres y el 52% (13 casos) fueron en hombres ( $p = 0.5$ ) (Tabla 4).

Para TGF- $\beta$  resulto negativo en todos los casos.

<b>Tabla 2</b> Asociación entre la IL-2 de los casos de adenocarcinoma gástrico y el género			
Género	<b>IL-2</b>		Totales
	Positivas	Negativas	
	(n = 7)	(n = 23)	
Femenino (15)	3 (42.9%)	12 (52.2%)	15
Masculino (15)	4 (57.1 %)	11 (47.8 %)	15
<b>Totales</b>	<b>7</b>	<b>23</b>	<b>30</b>

<b>Tabla 3</b> Asociación entre la IL-4 de los casos de adenocarcinoma gástrico y el género			
Género	<b>IL-4</b>		Totales
	Positivas	Negativas	
	(n = 8)	(n = 22)	
Femenino (15)	6 (75%)	9 (40.9%)	15
Masculino (15)	2 (25%)	13 (59.1 %)	15
<b>Totales</b>	<b>8</b>	<b>22</b>	<b>30</b>

<b>Tabla 4</b> Asociación entre la IL-10 de los casos de adenocarcinoma gástrico y el género			
Género	<b>IL-10</b>		Totales
	Positivas	Negativas	
	(n = 5)	(n = 25)	
Femenino (15)	3 (60%)	12 (48%)	15
Masculino (15)	2 (40 %)	13 (52%)	15
<b>Totales</b>	<b>5</b>	<b>25</b>	<b>30</b>

### Citocinas y estadio clínico

El 100.0 % (7 casos) de las IL-2 positivas se observaron en los estadios I-II; El 87.5 % de las IL-4 positivas se observaron en los estadios I-II y 100.0 % de las positivas IL-10 se observaron en los estadios I-II. Exceptuando un caso de IL-4 positivo en los estadio III-IV en los casos restantes con estadios III-IV no existieron casos positivos ni de IL-2 ni de IL-10 . Para TGF-B resulto negativo en todos los casos (Tabla 5, p = 0.009), Tabla 6, p = 0.005 , Tabla 7 p = 0.009).

<b>Tabla 5</b> Asociación entre la IL-2 de los casos de adenocarcinoma gástrico y el estadio clínico			
Estadio clínico	IL-2		Totales
	Positivas	Negativas	
	(n = 7)	(n = 23)	
I-II	7 (100%)	6 (26.1%)	13
III-IV	0 (0.0 %)	17 (73.9 %)	17
<b>Totales</b>	<b>7</b>	<b>23</b>	<b>30</b>

<b>Tabla 6</b> Asociación entre la IL-4 de los casos de adenocarcinoma gástrico y el estadio clínico			
Estadio clínico	IL-4		Totales
	Positivas	Negativas	
	(n = 8)	(n = 22)	
I-II	7 (87.5%)	6 (26.7%)	13
III-IV	1 (12.5%)	16 (72.2 %)	17
<b>Totales</b>	<b>8</b>	<b>22</b>	<b>30</b>

<b>Tabla 7</b> Asociación entre la IL-10 de los casos de adenocarcinoma gástrico y el estadio clínico			
Estadio clínico	IL-10		Total
	Positivas	Negativas	
	(n = 5)	(n = 25)	
I-II	5 (100%)	8 (32%)	13
III-IV	0 (0.0 %)	17 (68%)	17
Totales	5	25	<b>30</b>

### Citocinas e infiltrado inflamatorio

De las IL-2 que fueron positivas 100% (7 casos), el 71.4 % (5 casos) tuvieron un infiltrado leve, el 28.6 % (2 casos) tuvieron un infiltrado moderado y no se presentó ningún caso con infiltrado severo ni tampoco ningún caso de no valorable. Y de las IL-2 que fueron negativas 100% (23 casos), el 39.1% (9 casos) no presentaron infiltrado leve, el 47.8 % (11 casos) no presentaron infiltrado moderado, el 4.3% (1 caso) no presentó infiltrado severo y el 8.7% (2 casos) no se presentaron infiltrado no valorable ( $p = 0.3$ ) (Tabla 8).

De las IL-4 que fueron positivas 100% (7 casos), el 50 % (4 casos) tuvieron un infiltrado leve, el 50 % (4 casos) tuvieron un infiltrado moderado y no se presentó ningún caso con infiltrado severo ni tampoco ningún caso de no valorable.

Y de las IL-4 que fueron negativas 100% (22 casos), el 45.5% (10 casos) no presentaron infiltrado leve, el 40.9% (9 casos) no presentaron infiltrado moderado,

el 4.6% (1 casos) no presentó infiltrado severo y el 9% (2 casos) no presentaron infiltrado no valorable ( $p = 0.5$ ) (Tabla 9).

De las IL-10 que fueron positivas 100% (5 casos), el 60 % (3 casos) tuvieron un infiltrado leve, el 40 % (2 casos) tuvieron un infiltrado moderado y no se presentó ningún caso con infiltrado severo ni tampoco ningún caso de no valorable.

Y de las IL-10 que fueron negativas 100% (25 casos), el 44% (11 casos) no presentaron infiltrado leve, el 44% (11 casos) no presentaron infiltrado moderado, el 4% (1 casos) no presentaron infiltrado severo y el 8% (2 casos) no presentaron infiltrado no valorable ( $p = 0.7$ ) (Tabla 10).

<b>Tabla 8</b> Asociación entre la IL-2 de los casos de adenocarcinoma gástrico y el infiltrado inflamatorio			
Infiltrado inflamatorio	IL-2		Totales
	Positivas	Negativas	
	(n = 7)	(n = 23)	
Leve (14)	5 (71.4%)	9 (39.1%)	14
Moderado (13)	2 (28.6%)	11 (47.8%)	13
severo (1)	0 (0.0 %)	1 (4.3%)	1
No valorable (2)	0 (0.0 %)	2 (8.7%)	2
<b>Totales</b>	<b>7</b>	<b>23</b>	<b>30</b>

<b>Tabla 9</b>			
Asociación entre la IL-4 de los casos de adenocarcinoma gástrico y el infiltrado inflamatorio			
Infiltrado inflamatorio	IL-4		Totales
	Positivas	Negativas	
	(n = 8)	(n = 22)	
Leve (14)	4 (50%)	10 (45.5%)	14
Moderado (13)	4 (50 %)	9 (40.9 %)	13
severo (1)	0 (0.0 %)	1 (4.6%)	1
No valorable (2)	0 (0.0 %)	2 (9%)	2
<b>Totales</b>	<b>8</b>	<b>22</b>	<b>30</b>

<b>Tabla 10</b>			
Asociación entre la IL-10 de los casos de adenocarcinoma gástrico y el infiltrado inflamatorio			
Infiltrado inflamatorio	IL-10		Totales
	Positivas	Negativas	
	(n = 5)	(n = 25)	
Leve (14)	3 (60%)	11 (44%)	14
Moderado (13)	2 (40 %)	11 (44%)	13
severo (1)	0 (0.0 %)	1 (4%)	1
No valorable (2)	0 (0.0 %)	2 (8%)	2
<b>Totales</b>	<b>5</b>	<b>25</b>	<b>30</b>

## Citocinas y clasificación histológica

El 57.1% (4 casos) de las IL-2 positivas se observaron en el tipo difuso y el 42.9% (3 casos) en el de tipo intestinal; El 87.5 % (7 casos) de las IL-4 positivas se observaron en el tipo difuso y el 12.5% (1 caso) se observó en el de tipo mixto; 80% (4 casos) de las IL-10 positivas se observaron en el tipo difuso y el 20% (1 caso) en el de tipo mixto, en los casos restantes no existieron casos positivos. Para TGF-B resultado negativo en todos los casos (Tabla 11 (p = 0.07), Tabla 12 (p = 0.07), Tabla 13 (p = 0.2)).

<b>Tabla 11</b>			
Asociación entre la IL-2 de los casos de adenocarcinoma gástrico y clasificación histológica			
Clasificación histológica	IL-2		Totales
	Positivas (n = 7)	Negativas (n = 23)	
Difuso (18)	4 (57.1%)	14 (60.9%)	18
Intestinal (7)	3 (42.9 %)	4 (17.4%)	7
Mixto (5)	0 (0.0 %)	5 (21.7 %)	5
<b>Totales</b>	<b>7</b>	<b>23</b>	<b>30</b>

<b>Tabla 12</b> Asociación entre la IL-4 de los casos de adenocarcinoma gástrico y clasificación histológica			
Clasificación	<b>IL-4</b>		Totales
	Positivas	Negativas	
	(n = 8)	(n = 22)	
Difuso (18)	7 (87.5%)	11 (50%)	18
Intestinal (7)	0 (0 %)	7 (31.8 %)	7
Mixto (5)	1 (12.5)	4 (18.2)	5
<b>Totales</b>	<b>8</b>	<b>22</b>	<b>30</b>

<b>Tabla 13</b> Asociación entre la IL-10 de los casos de adenocarcinoma gástrico y clasificación histológica			
Clasificación	<b>IL-10</b>		Total
	Positivas	Negativas	
	(n = 5)	(n = 25)	
Difuso (18)	4 (80%)	14 (56%)	18
Intestinal (7)	0 (0.0 %)	7 (28%)	7
Mixto (5)	1 (20%)	4 (16)	5
<b>Totales</b>	<b>5</b>	<b>25</b>	<b>30</b>

## **8. Discusión de resultados.**

El cáncer gástrico sigue siendo una patología frecuente en los países en vías de desarrollo, en México es una neoplasia prevalente (6).

Como se ha visto en este trabajo el adenocarcinoma gástrico se presenta en la población adulta (mayores de 30 años) tanto en hombres como en mujeres principalmente entre las edades de 50 a 59 años. Aunque en las mujeres se presentó a una edad menor (10.4 menos años de edad promedio que los hombres  $p = 0.05$ ).

El carcinoma gástrico es extremadamente raro en pacientes con edad menor a los 30 años, a partir de entonces se incrementa más rápidamente y de manera constante hasta los grupos de edad más avanzada, tanto en hombres como en mujeres. Después de los 50 años aumenta bruscamente la incidencia del cáncer de estómago (13).

Históricamente se han desarrollado numerosos sistemas para tipificar al adenocarcinoma gástrico, la Organización Mundial de la Salud (OMS) introdujo un sistema de clasificación que era relativamente simple y reproducible, en relación a los sistemas convencionales y tradicionales. Sin embargo, esta propuesta no tenía significancia pronóstica o terapéutica. Posteriormente en la siguiente edición de la Clasificación Histológica Internacional de la OMS, otras dos clasificaciones fueron incluidas una de ellas la de Lauren, predominantemente utilizada en el Centro y Norte de Europa (64).

Con la finalidad de mejorar la correlación clínico patológica, Lauren dividió el cáncer gástrico en los tipos intestinal y difuso (60) lo cual ha demostrado tener significancia pronostica (176,177) y por ello es utilizada para propósitos epidemiológicos. Esta clasificación tiene su equivalencia con la OMS (Cuadro N.º5).

CUADRO N.º 5 EQUIVALENCIA ENTRE CLASIFICACIONES HISTOLÓGICAS		
AUTOR O GRUPO	TIPO	
LAUREN	Tipo intestinal	Tipo difuso
O.M.S.*	Tubular-papilar	Células en anillo indiferenciado
*O.M.S.: Organización Mundial de la Salud		

En nuestra población, al aplicar los criterios de Lauren hemos encontrado un predominio del tipo difuso 60% sobre el intestinal 23%, lo cual difiere con lo reportado por otros estudios (60).

En estudios epidemiológicos e histogenéticos, la clasificación de Lauren debe estar basada de acuerdo a la estructura predominante. Así, mientras la gran mayoría de cánceres gástricos deben ser incluidos en cualquiera de los dos tipos intestinal o difuso; una minoría puede no ser clasificada (64).

En nuestro caso en lo que respecta a este tercer grupo llamado no determinado por algunos (64) y mixto/no clasificados por otros (178), tuvimos 7 casos, que representan un 17% del, total; cifra que es similar a la reportada por otros estudios (179) y que refleja la utilidad de esta clasificación para discriminar adecuadamente entre los tipos histológicos de cáncer gástrico.

La clasificación TNM es el método más fiable para determinar la extensión de la enfermedad y el pronóstico del enfermo con adenocarcinoma gástrico, debido a que la afección ganglionar y la profundidad de invasión tumoral son los 2 principales factores pronósticos en esta neoplasia, en ausencia de enfermedad a distancia (180,181).

El tratamiento quirúrgico en nuestros casos fue la Gastrectomía Total, seguido por la Gastrectomía Subtotal, basado en las recomendaciones de la Asociación Japonesa de cáncer gástrico (182).

El porcentaje de gastrectomías totales de nuestra población (77%) influyó de forma significativa en el número de ganglios analizados, coincidiendo con otros autores (183).

El adenocarcinoma gástrico en este estudio se presentó en la mayoría de los estadios clínicos avanzados, en estadios III 27% y estadios IV 30%, comparado con los casos de cáncer precoz, que representa el 16% y 27% de estadios I y II respectivamente de todos los adenocarcinomas gástricos a los que se les realizó una estadificación adecuada clínico patológica.

La serie que reporta el INEN (Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas) de cáncer gástrico precoz es de 5,37% desde el año 1952 al 2000, y en la última década de estudio es de 7,58% a diferencia de Japón que tiene cáncer gástrico precoz alrededor de 50%, debido a que se realizan estudios de tamizaje en su población e incluso identifican zonas de alto riesgo para cáncer gástrico (184).

Aunque muchas investigaciones señalan la importancia de la inflamación en el desarrollo del cáncer gástrico, no están claros los mecanismos moleculares y celulares que conducen el proceso. La intensidad de la gastritis es proporcional al riesgo de cáncer. La multifocal tiene un mayor grado de inflamación y por ello mayor potencial maligno.

En cambio en nuestro estudio pacientes con diagnóstico de cáncer a pesar de que en nuestra población tuvimos más casos con estadios avanzados el proceso inflamatorio en la mayoría de los casos presentó un infiltrado inflamatorio leve (14 casos) seguidos del moderado (13 casos) y por último severo (1 caso).

En base a esto podemos considerar que los estadios tempranos tienen una inflamación crónica severa, sin embargo cuando se presentan los estadios avanzados, este proceso inflamatorio puede desaparecer debido posiblemente al agotamiento de las células inmunológicas involucradas (macrófagos) o tal vez a un enmascaramiento de los antígenos tumorales.

Esto nos lleva a pensar que una inflamación crónica severa nos conduce a tener riesgo de cáncer gástrico y cuando ya se tiene el diagnóstico de cáncer gástrico el infiltrado inflamatorio cede (185).

En virtud de que las citocinas tienen funciones pleiotrópicas, es difícil determinar la participación de una citocina en particular en la progresión del cáncer. Esto se debe a la relación con otras citocinas, factores de crecimiento y hormonas, que actúan simultáneamente en el sitio del tumor, así como con el blanco celular sobre el que actúan (117).

Un factor que puede influir entre la respuesta inmunológica y el género son las hormonas, pues en nuestro estudio en mujeres predominó una respuesta

inmunológica Th2 y en los hombres una respuesta Th1, las células inmunológicas tienen receptores para los estrógenos, lo que lleva a inducir una respuesta Th2. Pues las citocinas y las hormonas constituyen un lenguaje químico común para la comunicación entre los sistemas inmune y neuroendocrino. Los esteroides sexuales, como los andrógenos y los estrógenos, podrían operar suprimiendo o activando la función celular con base en un estímulo diferente y en el tejido blanco, proporcionando, en parte, una explicación a las diferentes susceptibilidades, entre hombres y mujeres, hacia algunas enfermedades. En conjunto estas evidencias sugieren que el efecto de los esteroides sexuales no pueden generalizarse y afirmar que un esteroide en particular tiene un efecto específico potenciador o inhibidor de respuestas Th1 o Th2.

En nuestro estudio en el infiltrado inflamatorio leve y moderado se presentó una respuesta Th1 en menor proporción que la Th2. Pero en los infiltrados severos ya no hubo ningún tipo de respuesta, ni celular ni humoral. La inflamación, como parte de la reacción inmunitaria innata contra microorganismos luminales, puede dañar el DNA, inducir proliferación celular y modular la apoptosis, mecanismos todos ellos importantes en la aparición y progresión del proceso tumoral, regulados por citocinas y quimiocinas (185).

Aunque varios estudios señalan la participación de algunas citoquinas en el desarrollo del cáncer gástrico, existe controversia debido a los diferentes resultados obtenidos en las investigaciones (100,186-190, 39,40,62-65). Es posible que en algunos grupos étnicos, la participación de las citoquinas en el proceso de esta enfermedad tenga más peso que en otros (190,191). Pocas

investigaciones se han efectuado en Latinoamérica para estudiar la asociación entre citoquinas y cáncer gástrico (192-196).

En nuestro estudio se presentó una respuesta celular leve en estadios tempranos, predominando una respuesta humoral en los estadios tempranos del cáncer gástrico. En los estadios avanzados la respuesta inmunológica fue casi nula.

No se presentó una respuesta celular en los adenocarcinomas mixtos y solo una respuesta celular leve en los de tipo intestinal, predominando una respuesta humoral en los adenocarcinomas tipo difusos, sin embargo la respuesta humoral fue leve en los de tipo mixto y nula en los de tipo intestinal.

También son pocas las investigaciones que han estudiado la expresión, cualitativa o cuantitativa, de citoquinas en tejido gástrico (197-199). Con excepción de un estudio para IL-8, se desconocen otras investigaciones sobre la expresión de citoquinas y el subtipo histológico de tumor, su localización anatómica o su estadio, entre otras variables (200). Cabe mencionar que estos estudios fueron realizados en otros países y que esta interleucina es un factor quimiotáctico para neutrófilos.

## **9. Conclusiones**

Una vez expuestos y analizados los resultados, concluimos que en la población estudiada:

Las mujeres a menor edad que los hombres son más propensas de tener adenocarcinoma gástrico.

En el cáncer gástrico hay una respuesta Th1 en la mayoría de hombres, aunque también presentan una respuesta Th2 pero en menos casos y en mujeres sucede lo contrario.

El cáncer gástrico se presenta en mayor proporción en estadios clínicos avanzados.

En los estadios clínicos tempranos predomina una respuesta inmunológica Th2 y en los estadios más avanzados de adenocarcinoma gástrico la respuesta inmunológica es casi nula.

## **Recomendaciones**

Es necesario introducir programas de tamizaje en nuestro país, para la detección temprana del cáncer gástrico y así el tratamiento quirúrgico puede ofrecer un mejor tiempo libre de enfermedad y sobrevida.

El mejor entendimiento entre el vínculo entre inflamación y cáncer permitirá tomar medidas preventivas y terapéuticas adecuadas y oportunas, en beneficio de los pacientes.

El mejor entendimiento entre el vínculo entre inflamación y cáncer permitirá tomar medidas preventivas y terapéuticas adecuadas y oportunas, en beneficio de los pacientes.

Debido a la compleja mezcla étnica propia de las poblaciones latinoamericanas, los estudios en países de alto riesgo de cáncer gástrico en esta región geográfica podrían arrojar nueva luz en cuanto al papel de las citoquinas en el desarrollo del cáncer gástrico.

Un entendimiento más claro de esta red de interacciones inmunoendocrinas podría favorecer profundamente el tratamiento de esta patología.

Es necesario realizar estudios sobre la expresión de dichas proteínas en la adenocarcinoma gástrica.

Además también es necesario realizar estudios inmunogenéticos para detectar antígenos de histocompatibilidad protectores o favorecedores, ya que cada población es diferente y en la bibliografía la mayoría de los estudios han sido realizados en población americana o europea.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Rosai J, Ackerman. Surgical pathology. 9° Ed. NY: Mosby Press 2004. pp. 549-691.
2. Halmiton SR, Aaltonen LA. Pathology and genetics of tumours of the digestive system. World Health organization classification of tumors. IARC Press; 2000. pp. 39-51.
3. Roukos DH. Current status and future perspectives in gastric cancer management. *Cancer Treat Rev* 2000;26:243-255.
4. Zinner MJ, Schwartz SI, Ellis H. Operaciones Abdominales decima ed. Tumores gástricos. Ed. Interamericana. pp 927-954.
5. Rivera F, Nago A, Bussalleu A, Medina R, Lizama O, Loayza G. Cáncer gástrico en pacientes menores de 40 años en el Hospital A. Loayza entre 1991 - 1998. *Gastroenterología del Perú* 2000; 20(3)138-139.
6. Registro Histopatológico de Neoplasias en México. Compendio Mortalidad/Morbilidad SSA. 2003.
7. Barber M, Fitzgerald RC, Caldas C. Familial gastric cancer: aetiology and pathogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2006;20: 721–734.
8. Firth VF, Hurst JA, Hall JG. Oxford Desk Reference: Clinical genetics. New York: Oxford University Press. 2005;450–451.
9. Varley JM, McGown G, Thorncroft M, Tricker KJ, Teare MD, Santibanez KM, Martin J, Birch JM, Evans DG An extended Li-Fraumeni kindred with gastric carcinoma and a codon 175 mutation in TP53. *J Med Genet* 1995;32: 942-945.

10. Horio Y, Suzuki H, Ueda R, Koshikawa T, Sugiura T, Ariyoshi Y, Shimokata K, Takahashi T. Predominantly tumorlimited expression of a mutant allele in a Japanese family carrying a germline p53 mutation. *Oncogene* 1994;9:1231-1235.
11. Sameshima Y, Tsunematsu Y, Watanabe S, Tsukamoto T, Kawa hK, Hirata Y, Mizoguchi H, Sugimura T, Terada M, Yokota J. Detection of novel germline p53 mutations in diverse-cancer-prone families identified by selecting patients with childhood adrenocortical carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:703-707.
12. Thorlacius S, Olafsdottir G, Tryggvadottir L, Neuhausen S, Jonasson JG, Tavtigian SV, Tulinius H, Ogmundsdottir HM, Eyfjord JE. A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes. *Nat Genet* 1996;13:117-119.
13. Shiao YH, Bovo D, Guido M, Capella C, Cassaro M, Busatto G, Russo V, Sidoni A, Parenti AR, Rugge M (1999). Microsatellite instability and/or loss of heterozygosity in young gastric cancer patients in Italy. *Cancer* 1999;82:59-62.
14. Rugge M, Busatto G, Cassaro M, Shiao YH, Russo V, Leandro G, Avellini C, Fabiano A, Sidoni A, Covacci A. Patients younger than 40 years with gastric carcinoma. *Helicobacter pylori* genotype and associated gastritis phenotype. *Cancer* 1999;85:2506-2511.

15. Hye Won Chung, Sung Hoon Noh, Jong-Baeck Lim. Analysis of demographic characteristics in 3242 young age gastric cancer patients in Korea. *World J Gastroenterol* 2010;16(2): 256-263.
16. Wang X, Terry DP, Hong Y. Word review of SALT consumption and stomach cancer risk: Epidemiological and biological evidence. *J Gastroenterol* 2009;15(18):2204-2213.
17. Carneiro F, Amado M, Lago P, Taveira GA, Amil M, Barreira R, Soares J, Pinho C. *Helicobacter pylori* infection and blood groups. *Am J Gastroenterology* 1996;91:2646-2647.
18. Van Loon AJ, Botterweck AA, Goldbohm RA, Brants HA, van Klaveren JD. Intake of nitrate and nitrite and the risk of gastric cancer: a prospective cohorte study. *Br J Cancer* 1998;78:129–135.
19. Forman D. Are nitrates a significant risk factor in human cancer? *Cancer Surv* 1989; 8: 443-458.
20. Palli D. Gastric carcinogenesis dietary factors. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994;6:1076-7082.
21. González CA, Pera G, Agudo A. Fruit and vegetable intake and the risk of stomach and oesophagus adenocarcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST). *Int J Cancer* 2006; 118:2559–2566.

22. Jenab M, Riboli E, Ferrari P. Plasma and dietary vitamin C levels and risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST). *Carcinogenesis* 2006;27:2250–2257.
23. Shimazu T, Tsuji I, Inoue M, Wakai K, Nagata C, Mizoue T. Alcohol Drinking and Gastric Cancer Risk: An Evaluation Based on a Systematic Review of Epidemiologic Evidence among the Japanese Population. *Jpn J Clin Oncol* 2008;38(1):8–25.
24. Nishino Y, Inoue M, Tsuji I, Wakai K, Nagata C, Mizoue T, et al. Tobacco smoking and gastric cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese population. *Jpn J Clin Oncol* 2006;36:800–807.
25. Run-Yue Huang and George G. Chen. Cigarette smoking, cyclooxygenase-2 pathway and cancer. *Reviews on Cancer* 2011; 1815(2):158-169.
26. Forman D, Burley VJ. Gastric cancer: global pattern of the disease and an overview of environmental risk factors. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20:633–649.
27. Burstein M, Monge E, Leon-Barua R, Lozano R, Berendson R, Gilman RH et al. Low peptic ulcer and high gastric cancer prevalence in a developing country with a high prevalence of infection by *Helicobacter pylori*. *J Clin Gastroenterol* 1991;13:154-156.
28. Correa P, Cuello C, Duque E, Burbano L, García F, Bolaños O, et al. Gastric cancer in Colombia. III Natural History of precursor lesions. *Journal of the National Cancer Institute* 1976;57:1027.

29. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Zavala D, Fontham E, Zarama G, Tannenbaum S, et al. Gastric precancerous process in a highrisk population: Cohort Follow-up. *Cancer Research* 1990;50:4737.
30. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Zavala D, Fontham E, Zarama G, Tannenbaum S, Collazos T, Ruiz B. Gastric precancerous process in a high risk population: Cross-sectional studies. *Cancer Research* 1990;50:4731.
31. Brenner H, Arndt V, Sturmer T, Stegnaier Ch, Zeigler H, Dhom G. Individual and joint contribution of family history and *Helicobacter pylori* infection to the risk of gastric carcinoma. *Cancer* 2000; 88: 274-9.
32. Jiménez, Piñon F, Paniagua, M. Cáncer Gástrico: factores de riesgo. *Rev Cubana de Oncología*. 1998;14(3):171-179.
33. Khitin L, Roses RE, Birkett DH. Cancer in the gastric remnant after gastric bypass: a case report. *Current Surgery* 2003;60(5):521-3.
34. Parsonnet JG, Friedman DP, Vandersteen Y, Chang JH, Vogelman N.. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 1991;325:1127–1131.
35. Danesh J. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: systematic review of the epidemiological studies. *Aliment Pharmacol.* 1999;13:851–856.
36. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int. J. Cancer* 1999;80:827–841.

37. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997;349:1498–504.
38. Malfertheiner, P et al. Role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer pathogenesis: A change for prevention. *J Dig Dis* 2010;11:2-11.
39. Tierney L. Diagnóstico Clínico y tratamiento: Tumores malignos de estómago Ed. Manual Moderno. 35° Edición; 2000. pp. 585-586.
40. Devita V, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer. Principles and practice of oncology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven 1997.
41. Horie Y, Miura K, Matsui K, Yukimasa A, Ohi S, Hamamoto T. Marked elevation of plasma carcinoembryonic antigen and stomach carcinoma. *Cancer* 1996;77:1991-1997.
42. Webb A, Scott-Mackie P, Cunningham D, Norman A, Andreyev J, O'Brien M. The prognostic value of serum and immunohistochemical tumour markers in advanced gastric cancer. *Eur J Cancer* 1996;32A:63-68.
43. Nakata B, Chung KH, Muguruma K, Yamashita Y, Inoue T, Matsuoka T. Changes in tumor marker levels as a predictor of chemotherapeutic effect in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 1998;83:19-24.
44. Marrelli D, Roviello F, De Stefano A, Farnetani M, Garosi L, Messano. Prognostic significance of CEA, CA 19-9 and CA 72-4 preoperative serum levels in gastric carcinoma. *Oncology* 1999;57:55-62.
45. Hosokova O, Tsuda S, Kidani E, Watanabe K, Tanigawa Y, Shirazaki S, Hayashi H, Hinoshita T. Diagnosis of gastric cancer up to three years after negative upper GI endoscopy. *Endoscopy* 1998;30: 669-674.

46. Noguchi T, Takeno S, Takahashi Y, Sato T, Uchida Y, Yokoyama S. Primary adenocarcinoma of the cervical esophagus arising from heterotopic gastric mucosa. J gastroenterol. 2001;36(10):704-9.
47. Caroline DF, Kendzierski RM. The stomach. In: Adam A, Dixon AK, eds. Grainger & Allison's Diagnostic Radiology. 5th ed. Philadelphia, Pa: Churchill Livingstone Elsevier 2008;31.
48. Pickhardt PJ. Diagnostic imaging procedures in gastroenterology. In: Goldman L, Ausiello D, eds. Cecil Medicine. 23rd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2007;135.
49. Arana Reyes J.C. Corona Bautista A. Cancer gástrico. Revista de la Facultad de medicina UMAN 2004;47(5):204-209.
50. Roder JD, Bottcher K, Busch R, Wittekind C, Hermanek P, Siewert JR. Classification of regional lymph node metastasis from gastric carcinoma. German Gastric Cancer Study Group. Cancer 1998;82:621-631.
51. Espejo RH, Navarrete SJ. Clasificación de los Adenocarcinomas de estómago. REV. GASTROENTEROL. PERÚ. 2003;23:199-212.
52. O'Toole KM, Slonim D, et al. Increasing incidence and excellent survival of patients with early gastric cancer: experience in a United States medical center. American Journal of Medicine 1988;85(5):658-661.
53. Brennan MF, Karpeh MS. Surgery for gastric cancer: the American view. Seminars in Oncology 1996;23(3):352-359.

54. Bozzetti F, Marubini E, Bonfanti G, et al. Subtotal versus total gastrectomy for gastric cancer: five-year survival rates in multicenter randomized Italian trial. *Annals of Surgery* 1999;230(2):170-178.
55. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese Classification of Gastric Carcinoma, 2nd English Edition. *Gastric Cancer*. 1998;1(1):10-24.
56. Borrmann R. Geschwulste des magens und duodenums. En: Henke F, Lanbarsch O, editors. *Handbuch der speziellen pathologischen anatomie and histologie*. 1st ed. Berlin: Press, 1926.
57. Adachi Y, Mori M, Maehara Y, Sugimachi K. Dukes's classification: a valid prognostic indicator for gastric cancer. *Gut* 1994;35:1368-1371.
58. Santiago JM, Sasako M, Osorio J. TNM-7th edition 2009 (UICC/AJCC) and Japanese Classification 2010 in Gastric Cancer. Towards simplicity and standardisation in the management of gastric cancer. *Cir Esp*. 2011;89(5):275-81.
59. Fine G, Chan K. Alimentary tract. In: Kissane JM, ed. *Anderson's Pathology*. Saint Louis, CV Mosby, Vol 2, 8th ed, 1985. pp.1055-1095.
60. Lauren P. The Two Histological main types of gastric carcinoma. Diffuse and so-called Intestinal type carcinoma: an attempt at histoclinical classification. *Acta Patho Microbiol Scand* 1965;64:31 – 49.
61. MING SC Adenocarcinoma and other Malignant Epithelial Tumors of the Stomach: PATHOLOGY OF THE GATROINTESTINAL TRACT Editorial: In Ming and Goldman. W. B Saunders Company Philadelphia 1992;584 –617.

62. Gong C, Mera R, Bravo JC, Ruiz B, Diaz-Escamilla R, Fontham ET. KRAS mutations predict progression of preneoplastic gastric lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:167-171.
63. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process-First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992;52:6735-6740.
64. Hermanek P, Wittekind C. Histological typing and grading of gastric carcinomas. *Gastric Cancer* 1993: 40-52.
65. Setälä LP, Kosma VM, Marin S, Lipponen PK, Eskelinen MJ, Syrjänen KJ. Prognostic factors in gastric cancer: the value of vascular invasion, mitotic rate and lymphoplasmacytic infiltration. *Br J Cancer* 1996;74:766-772.
66. El-Omar EM, Chow WH, Rabkin CS. Gastric cancer and H. pylori: Host genetics open the way. *Gastroenterology* 2001; 121:1002-1004.
67. Yamaoka Y, Kodama T, Kita M, Imanishi J, Kashima K, Graham DY. Relation between cytokines and Helicobacter pylori in gastric cancer. *Helicobacter* 2001; 6:116-124.
68. Wilson KT, Crabtree JE. Immunology of Helicobacter pylori: Insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. *Gastroenterology* 2007; 133:288-308.
69. 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):1161-81

70. Grossman Z, Herberman RB. 'Immune surveillance' without immunogenicity. *Immunol Today* 1986;7:128-131.
71. Boon T. Teaching the immune system to fight cancer. *Sci. Am.* 1983; 266(3):32-39.
72. Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self?. *Annu Rev Immunol* 2003;21:807-839.
73. Sadelain M, Riviere I, Brentjens R. Targeting tumours with genetically enhanced T lymphocytes. *Natl Re Cancer* 2003;3:35-45.
74. Klein J, ed. Natural history of the major histocompatibility complex. Wiley-Interscience Publications. 1986:775.
75. Bjorjman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominyer JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 1987; 329:506-518.
76. Pardoll DM, Topaltan SL. The role of CD4+ T-cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol* 1998;10:588-594.
77. Toes RE, Ossendorp F, Offringa R, Mellef CJM. CD4T cells and their antitumor immune responses. *J Exp Med* 1999;189:753-756.
78. Fuentes PE, Carmolinga PM, Maldonado BC. Infection, inflammation and Cancer Gastric. *Salud Publica Mex.* 2009;51(5):427-433.
79. Ikeguchi M, Cai J, Yamane N, Maeta M, Kaibara N. Clinical significance of spontaneous apoptosis in advanced gastric adenocarcinoma. *Cancer* 1999; 85: 2329-2335.

80. Shackelford. Cirugía del Aparato Digestivo. ed. Panamericana, Argentina; 2005. pp143-144.
81. Paul WE. Pleiotropy and redundancy: T cell-derived lymphokines in the immune response. Cell 1989; 57:521-534.
82. Schiepers OJ, Wicher MC, Maes M. Cytokines and major depression. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2005;29:201-217.
83. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. Chest 2000;118:503-508.
84. Oettgen HF. Cytokines in clinical cancer therapy. Curr Opin Immunol 1991; 3(5):699-705.
85. Indrova M, Bubenik J, Mikyskova R, Vonka R, Smahel M, Zark, et al. Tumor-inhibitory and antimetastatic effects of IL-2 in mice carrying MHC class I tumours of HPV16 origin. In J Oncol 2002;20:643-646.
86. Sayi A, Kohler E, Hitzler I, Arnold I, Schwendener R, Rehrauer H, Müller A. The CD4+ T Cell-Mediated INF- $\gamma$  response to Helicobacter infection is essential for clearance and determines gastric cancer risk. J Immunol. 2009;182:7085-7101.
87. Whittington R, Faunds D. Interleukin-2. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in patients with cancer. Drugs 1993;46:446-514.
88. Fearon ER, Pardoll DM, Itaya T, Golumbek P, Levitsky HI, Simons JW. Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. Cell 1990; 60(3):397-403.

89. Gansbacher B, Zier K, Daniels B, Cronin K, Bannerji R, Gilboa E. Interleukin 2 gene transfer into tumor cells abrogates tumorigenicity and induces protective immunity. *J Exp Med* 1990; 172(4):1217-1224.
90. Hauch M, Gazzola MV, Small T, Bordignon C, Barnett L, Cunningham I y cols. Anti-leukemic potential of interleukin-2 activated natural killer cells after bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1990; 75(11):2250-2262.
91. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AF, Ettinghausen SE y cols. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1985; 313(239):1485-1492.
92. Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST y cols. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 1988;319(25):1676-1680.
93. Salinas CM. *inmunología Medica Mc Graw Hill*. 2007;10:88-89.
94. Tepper RI, Pattengale PK, Leder P. Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity in vivo. *Cell* 1989;57:503-512.
95. Crawford RM, Finbloom DS, Ohara J, Paul WE, Meltzer MS. B cell stimulatory factor-1 (interleukin-4) activates macrophages for increased tumoricidal activity and expression of Ia antigens. *J Immunol* 1987; 139:135-141.
96. K. W. Moore, R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman, and A. O'Garra, "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor," *Annual Review of Immunology*, vol. 19, pp. 683–765, 2001.

97. L. Mege, S. Meghari, A. Honstetter, C. Capo, and D. Raoult, "The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases," *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 6, no. 9, pp. 557–569, 2006.
98. Crawley E, Kay R, Sillibourne J, Patel P, Hutchinson I, Woo, et al. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42:1101-1108.
99. Eskdale J, Kube D, Tesch H, Gallagher G, et al. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics* 1997; 46:120-128.
100. El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, Vaughan T L, Risch HA, Schoenberg JB, Stanford JL, Mayne ST, Goedert J, Blot WJ, et al. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology* 2003;124:1193–1201.
101. Lu W, Pan K, Zhang L, Lin D, Miao X, You W. Genetic polymorphisms of interleukin (IL)-1B, IL-1RN, IL-8, IL-10 and tumor necrosis factor {alpha} and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Carcinogenesis* 2005; 26:631-636. 57.
102. Wu MS, Wu CY, Chen CJ, Lin MT, Shun CT, Lin JT. Interleukin-10 genotypes associate with the risk of gastric carcinoma in Taiwanese Chinese. *Int J Cancer* 2003; 104:617-623.
103. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy *Nature Rev* 2004;4:11-22.

104. Indrova M, Bubenik J, Mikyskova R, Vonka R, Smahel M, Zark, et al. Tumor-inhibitory and antimetastatic effects of IL-2 in mice carrying MHC class I tumours of HPV16 origin. In *J Oncol* 2002;20:643-646.
105. Oscar Peralta ZO, Lagunas MA, Madrid MV. Transforming growth factor beta-1: Structure, function and regulation mechanisms in cancer. *Salud Publica Mex* 2001;43:340-351.
106. Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor-beta: Recent progress and new challenges. *J Cell Biol* 1992;119:1017-1021.
107. Barnard JA, Lyons RM, Moses HL. The cell biology of transforming growth factor  $\beta$ . *Biochem Biophys Acta* 1990;1032:79-87.
108. Cheifetz S, Hernández H, Laiho M, Ten-Dijke P, Iwata KK, Massagué J. Distinct transforming growth factor beta receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms. *J Biol Chem* 1990;265:20533-20538.
109. Sporn MB, Roberts AB. Transforming growth factor-beta: Recent progress and new challenges. *J Cell Biol* 1992;119:1017-1021.
110. Palladino MA, Morris RE, Starnes HF, Levinson AD. The transforming growth factor-betas. A new family of immunoregulatory molecules. *Ann NY Acad Sci* 1990;593:181-187.
111. Okadome T, Yamashiya H, Franzen P, Moren A, Sheldin CH, Miyazono K. Distinct roles of the intracellular domains of transforming growth factor- $\beta$  type I and type II receptors in signal transduction. *J Biol Chem* 1994;269:30753-30756.

112. Ohtsuki M, Massagué J. Evidences for the involvement of protein kinase activity in transforming growth factor-beta signal transduction. *Mol Cell Biol* 1992;12:261-265.
113. Rizzino A. Transforming growth factor- $\beta$ : Multiple effects on cell differentiation and extracellular matrices. *Dev Biol* 1988;130:411-422.
114. Kimberly H, Morris L, Braun L, Biron CA. A role for transforming growth factor- $\beta$ 1 in regulating natural killer cell and T lymphocyte proliferative responses during acute infection with lymphocytic choriomeningitis virus. *J Immunol* 1991;147:2717-2727.
115. Fontana A, Frei K, Bodmer S, Hofer E, Schreier MH, Palladino MA et al. Transforming growth factor- $\beta$  inhibit the generation of cytotoxic T cell in virus infected mice. *J Immunol* 1989;143:3230-3234.
116. Polyak K, Kato JY, Solomon MJ et al. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* 1994;8(1):9-22.
117. Nash MA, Ferrandina G, Loercher A, Freedman RS. The role of cytokines in both the normal and malignant ovary. *Endocrine-Related Cancer* 1999; 6:93-107.
118. Rad R, Dossumbekova A, Neu B, Lang R, Bauer S, Saur D, Gerhard M, Prinz C. Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 2004;53:1082–1089.
119. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, et al. Interleukin-1

- polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000;404:398–402.
120. Giannini SL, Al-Saleh W, Piron H, Jacobs N, Doyen J, Bonier J. et al. Cytokine expresión in squamous intraepitelia lesion of the uterine cervix: Implications for generation of local immunosuppression. *Clin Exp Immunol* 1998;113:183-189.
  121. Matsuda M, Salazar F, Petersson M, Masucci G, Hanssonj, Pisa P, et al. Interleukin 10 preteated protects target cells from tumor and allospecific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expresión. *J Exp Med* 1994;180:2371-2376.
  122. Reichert TE, Rabinowich H, Johnson JT, Whiteside TL. Immune cells in the tumor microenviroment: mechanisms responsable for significant and funcional defects. *J Immunother* 1998;21:295-306.
  123. Pisa P, Halapi E, Pisa EK, Gerdin E, Hising C, Bucht A, et al. Selective expression of interleukin 10, interferon gamma and granulocytes-macrophages colony-stimulating factor in ovarian cancer. *Pro Nati Acad Sci USA* 1992;89:7708-7712.
  124. Bor-Ching S, Rong-Hwa L, Huang-Chun I, Hong-Nerng Ho, Su-Ming H, Su-Cheng H. Predominant Th<sup>1</sup>/Tc<sup>1</sup> polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *J Immunol* 2001; 167:2972-2978.
  125. Sheu BC, Lin RH, Lien HC, Ho HN, Hsu SM, Huang SC. Predominant Th<sup>2</sup>/Tc<sup>2</sup> polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *J Immunol*. 2001;167(5):2972-8.

126. Ritz U, Momburg F, Pilch H, Huber C, Maeurer MJ, Seliger B. Deficient expression of components of the MHC class I antigen processing machinery in human cervical carcinoma. *Int J Oncol.* 2001 Dec;19(6):1211-20.
127. Ellis JR, Keating PJ, Baird J, Hounsell EF, Renouf DV, Rowe M, Hopkins D, Duggan-Keen MF, Bartholomew JS, Young LS, et al . The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nat Med.* 1995;1(5):464-70.
128. Sheu BC, Lin RH, Ho HN, Huang SC. Down-regulation of CD25 expression on the surface of activated tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical carcinoma. *Hum Immunol.* 1997;56(1-2):39-48.
129. De Gruijl TD, Bontkes HJ, Peccatori F, Gallee MP, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, Aarbiou J, Mulder WM, Walboomers JM, Meijer CJ, van de Vange N, Scheper RJ. Expression of CD3-zeta on T-cells in primary cervical carcinoma and in metastasis-positive and -negative pelvic lymph nodes. *Br J Cancer.* 1999;79(7-8):1127-32.
130. Kono K, Rensing ME, Brandt RM, Melief CJ, Potkul RK, Andersson B, Petersson M, Kast WM, Kiessling R. Decreased expression of signal-transducing zeta chain in peripheral T cells and natural killer cells in patients with cervical cancer. *Clin Cancer Res.* 1996;2(11):1825-8.
131. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy *Nature Rev* 2004;4:11-22.
132. Casana PH, Hernández H, Arana MJ. Interleukin-2 inhibits proliferaci3n of HPV-associated tumor cells and halts tumor growth in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;299:818-824.

133. Ströhlein MA, Siegel R, Jäger M, Lindhofer H, Jauch KW. Induction of antitumor immunity by trifunctional antibodies in patients with peritoneal carcinomatosis. *J Exp Clin Cancer Research* 2009;1: 28-18
134. Sugai H, Kono K, Takahashi A, Ichihara F, Kawaida H, Fujii H, et al. Characteristic alteration of monocytes with increased intracellular IL-10 and IL-12 in patients with advanced-stage gastric cancer. *J Surg Res* 2004;116:277–87.
135. Morisaki T, Katano M, Ikubo A, Anan K, Nakamura M, Nakamura K, et al. Immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF-beta) genes expression in human gastric carcinoma tissues. *J Surg Oncol* 1996;63:234–9.
136. Sakamoto T, Saito H, Tatebe S, Tsujitani S, Ozaki M, Ito H, et al. Interleukin-10 expression significantly correlates with minor CD8 T-cell infiltration and high microvessel density in patients with gastric cancer. *Int J Cancer* 2006;118:1909–14.
137. De Vita F, Orditura M, Galizia G, Romano C, Infusino S, Auriemma A, et al. Serum interleukin-10 levels in patients with advanced gastrointestinal malignancies. *Cancer* 1999;86:1936–43.
138. Majima T, Ichikura T, Seki S, Takayama E, Hiraide H, Mochizuki H. Interleukin 10 and interferon-gamma levels within the peritoneal cavity of patients with gastric cancer. *J Surg Oncol* 2001;78:124–30.
139. Szaflarska A, Szczepanik A, Siedlar M, Czupryna A, Sierzega M, Popiela T, et al. Preoperative plasma level of IL-10 but not of proinflammatory cytokines is an independent prognostic factor in patients with gastric cancer. *Anticancer Res* 2009;29:5005–12.

140. Majima T, Ichikura T, Seki S, Takayama E, Matsumoto A, Kawabata T, et al. The influence of interleukin-10 and interleukin-18 on interferon-gamma production by peritoneal exudate cells in patients with gastric carcinoma. *Anticancer Res* 2002;22:1193–9.
141. Fortis C, Foppoli M, Gianotti L, Galli L, Citterio G, Consogno G, et al. Increased interleukin-10 serum levels in patients with solid tumours. *Cancer Lett* 1996;104:1–5.
142. Hatanaka H, Abe Y, Naruke M, Tokunaga T, Oshika Y, Kawakami T, et al. Significant correlation between interleukin 10 expression and vascularization through angiopoietin/TIE2 networks in nonsmall cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:1287–92.
143. Jennings MT, Kaariainen BA, Gold LI, Maciunas RJ, Commers BA. TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 are potential growth regulators for medulloblastomas, primitive neuroectodermal tumors and ependymomas: Evidence in support of an autocrine hypothesis. *Hum Pathol* 1994;25:464-475.
144. Gold L, Korc M. Expression of TGF- $\beta$ 1, 2 and 3 mRNA and protein in human cancers. *Dig Surg* 1994; 11:150-156.
145. Naef M, Ishiwata T, Friess H, Buchler M, Gold LI, Korc M. Differential localization of transforming growth factor-B isoforms in human gastric mucosa and over-expression in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1997;71: 131-137.
146. Filmus J, Kerbel RS. Development of resistance mechanisms to the growth inhibitory effects of transforming growth factor- $\beta$  during tumor progression. *Curr Opin Oncol* 1993;5:123-129.

147. Friess H, Yamanka Y, Buchler M, Ebert M, Beger HG, Gold LI et al. Enhanced expression of transforming growth factor- $\beta$  isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival. *Gastroenterology* 1993;105:1846-1856.
148. Gold LI, Saxena B, Zagzag D, Miller DC, Koslow M, Brandeis L et al. Increased expression of TGF-  $\beta$  isoforms by malignant gliomas. *J Cell Biol* 1992;16B:122.
149. Hsu S, Huang F, Hafez M, Winawer S, Friedman E. Colon carcinoma cell switch their response to transforming growth factor- $\beta$ 1 with tumor progression. *Cell Growth Differ* 1994;5:267-275.
150. Jennings MT, Maciunas RJ, Carver R, Bascom CC, Juneau P, Misulis K *et al.* TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 are potential growth regulators for low-grade and malignant gliomas *in vitro*: Evidence in support of an autocrine hypothesis. *Int J Cancer* 1991;49:129-139.
151. Yang EY, Moses HL. Transforming growth factor- $\beta$ 1 induced changes on cell migration, proliferation and angiogenesis in the chicken allantoic membrane. *J Cell Biol* 1990;111:731-741.
152. Wallick SC, Figari IS, Morris RE, Levinson AD, Palladino MA. Immunoregulatory role of transforming growth factor- $\beta$  in development of killer cells: Comparison of active and latent TGF- $\beta$ 1. *J Exp Med* 1990;172:1777-1784.
153. Shackelford. *Cirugía del Aparato Digestivo*. ed. Panamericana, Argentina; 2005. pp143-144.
154. Myeroff LL, Parson R, Kim SJ, Hedrick L, Cho KR, Orth K et al. A transforming growth factor-  $\beta$  receptor type II gene mutation common in colon

- and gastric rare in endometrial cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1995;55:5545-5547.
155. Akiyama Y, Iwanaga R, Seitoh K, Shiba K, Ushio K, Ikeda E et al. Transforming growth factor- $\beta$  type receptor II gene mutations in adenomas from hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 1997;112:33-39.
  156. Fynan TM, Reiss M. Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-  $\beta$  and its role in oncogenesis. *Crit Rev Oncog* 1993;4:493-540.
  157. Garrigue AL, Muñoz ASJ, Antonia SJ, Gesmonde J, Velucci VF, Reiss M. Missense mutations of transforming growth factor- $\beta$  type II receptor in human head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer Res* 1995;55:3982-3987.
  158. Hahn SA, Schutte M, Shamsul HATM, Moskaluk CA, Da Costa LT, Roxenblum E et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996;271:350-356.
  159. Saito H, Osaki T, Murakami D, Sakamoto T, Kanaji S, Ohro S, et al. Prediction of sites of recurrence in gastric carcinoma using immunohistochemical parameters. *J Surg Oncol* 2007;95:123–8.
  160. Inoue T, Chung YS, Yashiro M, Nishimura S, Hasuma T, Otani S, et al. Transforming growth factor-beta and hepatocyte growth factor produced by gastric fibroblasts stimulate the invasiveness of scirrhous gastric cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 1997;88:152–9.
  161. Komuro A, Yashiro M, Iwata C, Morishita Y, Johansson E, Matsumoto Y, et al. Diffuse-type gastric carcinoma: progression, angiogenesis, and transforming growth factor beta signaling. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:592–604.

162. Maehara Y, Kakeji Y, Kabashima A, Emi Y, Watanabe A, Akazawa K, et al. Role of transforming growth factor-beta 1 in invasion and metastasis in gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 1999;17:607–14. 69.
163. Vagenas K, Spyropoulos C, Gavala V, Tsamandas AC. TGFbeta1, TGFbeta2, and TGFbeta3 protein expression in gastric carcinomas: correlation with prognostic factors and patient survival. *J Surg Res* 2007;139:182–8.
164. Saito H, Tsujitani S, Oka S, Kondo A, Ikeguchi M, Maeta M, et al. The expression of transforming growth factor-beta1 is significantly correlated with the expression of vascular endothelial growth factor and poor prognosis of patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer* 1999;86:1455–62.
165. Chen W, Wahl SM. TGF-beta: the missing link in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:85–9.
166. Kawaida H, Kono K, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, et al. Distribution of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T-cells in tumor-draining lymph nodes in patients with gastric cancer. *J Surg Res* 2005;124:151–7.
167. Kono K, Kawaida H, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55:1064–71.
168. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003;9:606–12.

169. Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res* 2003;9:4404–8.
170. Andrzej Szkaradkiewicz, Tomasz M. Karpiński, Michał Drews, Maciej Borejsza-Wysocki, Przemysław Majewski, and Ewa Andrzejewska. Natural Killer Cell Cytotoxicity and Immunosuppressive Cytokines (IL-10, TGF- $\beta$ 1) in Patients with Gastric Cancer Hindawi Publishing Corporation *J of Biomedicine and Biotechnology*. 2010:1- 7.
171. Kakinuma T, Hwang ST. Chemokines, chemokine receptors, and cancer metastasis. *J Leukoc Biol* 2006;79:639–51.
172. Zlotnik A. Chemokines and cancer. *Int J Cancer* 2006;119: 2026–9.
173. Wang JM, Deng X, Gong W, Su S. Chemokines and their role in tumor growth and metastasis. *J Immunol Methods* 1998;220:1–17.
174. Mazla D, Schatten G, Sale W. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. *J Cell Biol* 1975:166-1975.
175. *Manual of Histologic staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*, 3<sup>rd</sup> ed. LG Luna, Editor, McGraw-Hill, New York 1968;28.
176. Moutinho M. Sarmiento J. Sobrinho M. et al. Prognostic Significance of Lauren and Ming Classifications and other Pathologic Parameters in Gastric Carcinoma. *Cancer* 1981; 47: 780-784.
177. Cady B. Rossi R, Silverman M, et al. Gastric adenocarcinoma: A disease in transition . *Arch Surg* 1989: 124; 303-308.

178. Amorosi A, Bianchi S, Buiatti E, et al. Gastric Cancer in a High-Risk Area in Italy. Histopathologic Patterris According to Lauren's Classification, *Cancer* 1988; 62: 2191-2196.
179. Sánchez J. Los dos principales tipos histológicos de carcinoma gástrico: Intestinal y Difuso *Acta Cancerológica* 1988; Vol XIX N.º 1: 13-17.
180. Mullaney PJ, Wadley MS, Hyde C, Lawrence G, Hallissey MT, Fielding JW. Appraisal of compliance with the UICC/AJCC staging system in the staging of gastric cancer. *Br J Surg*. 2002;89:1405-8.
181. Kim TH, Han SU, Cho YK, Kim MW. Perigastric lymph node status can be a simple prognostic parameter in patients with gastric cancer. *Hepato-Gastroenterology*. 2000;47:1475-8.
182. Japanese Gastric Cáncer Association (1998) Japanese Classification of Gastric Cáncer- 2nd English edition. *Gastric Cancer* 1998; 1:10-24.
183. Klein Kranenbarg E, Hermans J, Van Krieken JHJ.M, Van de Velde CJH. Evaluation of the 5th edition of the TNM classification for gastric cancer: improved prognostic value. *Br J Cancer*. 2001;84:64-71.
184. MIKI K. Gastric cancer screening using the serum pepsinogen test method. *Gastric Cancer*. 2006;9(4):245-53.
185. Fuentes-Pananá E, Camorlinga-Ponce M, Maldonado-Bernal C. Infection, Inflammation and gastric cancer. *Salud Publica Mex*. 2009;51(5):427-33.
186. Machado JC, Figueiredo C, Canedo P, Pharoah P, Carvalho R, Nabais S, et al. A proinflammatory genetic profile increases the risk for chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2003; 125:364-371.

187. Kamangar F, Cheng C, Abnet CC, Rabkin CS. Interleukin-1B polymorphisms and gastric cancer risk--a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15:1920-1928.
188. Kato S, Onda M, Yamada S, Matsuda N, Tokunaga A, Matsukura. Association of the interleukin-1 beta genetic polymorphism and gastric cancer risk in Japanese. *J Gastroenterol* 2001; 36:696-699.
189. Wang P, Xia HHX, Zhang JY, Dai LP, Xu XQ, Wang KJ. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with gastric cancer: a metaanalysis. *Int J Cancer* 2007; 120:552-562.
190. Camargo MC, Mera R, Correa P, Peek RM, Fontham ETH, Goodman KJ, et al. Interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms and gastric cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15:1674-1687.
191. Zeng ZR, Hu PJ, Hu S, Pang RP, Chen MH, Ng M, et al. Association of interleukin 1B gene polymorphism and gastric cancers in high and low prevalence regions in China. *Gut* 2003; 52:1684-1689.
192. Garza-González E, Bosques-Padilla FJ, Mendoza-Ibarra SI, Flores- Gutierrez JP, Maldonado-Garza HJ, Pérez-Pérez G. Assesment of the toll-like receptor 4 Asp299Gly, Tyr399Ile and interleukin-8-251 polymorphisms in the risk for development of distal gastric cancer. *BMC cancer* 2007; 7:70-75.
193. Serrano C, Diaz MI, Valdivia A, Godoy A, Peña A, Rollan A, et al. Relationship between *Helicobacter pylori* virulence factors and regulatory cytokines as predictors of clinical outcome. *Microbes Infect* 2007; 9:428-434.

194. Sicinschi LA, Lopez-Carrillo L, Camargo MC, Correa P, Sierra RA, Henry RR, et al. Gastric cancer risk in a Mexican population: role of *Helicobacter pylori* CagA positive infection and polymorphisms in interleukin-1 and -10 genes. *Int J Cancer* 2006; 118:649-657.
195. Lobo Gatti L, Rodríguez Burbano R, Pimentel de Assumpcao P, Cardoso Smith M, Marques Payao SL. Interleukin-1beta polymorphisms, *Helicobacter pylori* infection in individuals from Northern Brazil with gastric adenocarcinoma. *Clin Exp Med* 2004; 4:93-98.
196. Kato I, Canzian F, Franceschi S, Plummer M, van Doorn LY, Lu Y, et al. Genetic polymorphisms in anti-inflammatory cytokine signaling and the prevalence of gastric precancerous lesions in Venezuela. *Cancer Causes Control* 2006; 17:1183-119
197. Eck M, Schmaußer B, Scheller K, Brändlein S, Müller-Hermelink HK. Pleiotropic effects of CXC chemokines in gastric carcinoma: differences in CXCL8 and CXCL1 expression between diffuse and intestinal types of gastric carcinoma. *Clin Exp Immunol* 2003; 134:508-515.
198. wang IR, Kodama T, Kikuchi S, Sakai K, Peterson LE, Graham DY, et al. Effect of interleukin 1 polymorphisms on gastric mucosal interleukin 1beta production in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 2002; 123:1793-1803.
199. Rad R, Dosumbekova A, Neu B, Lang R, Bauer S, Saur D, et al. Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 2004; 53:1082-1089.

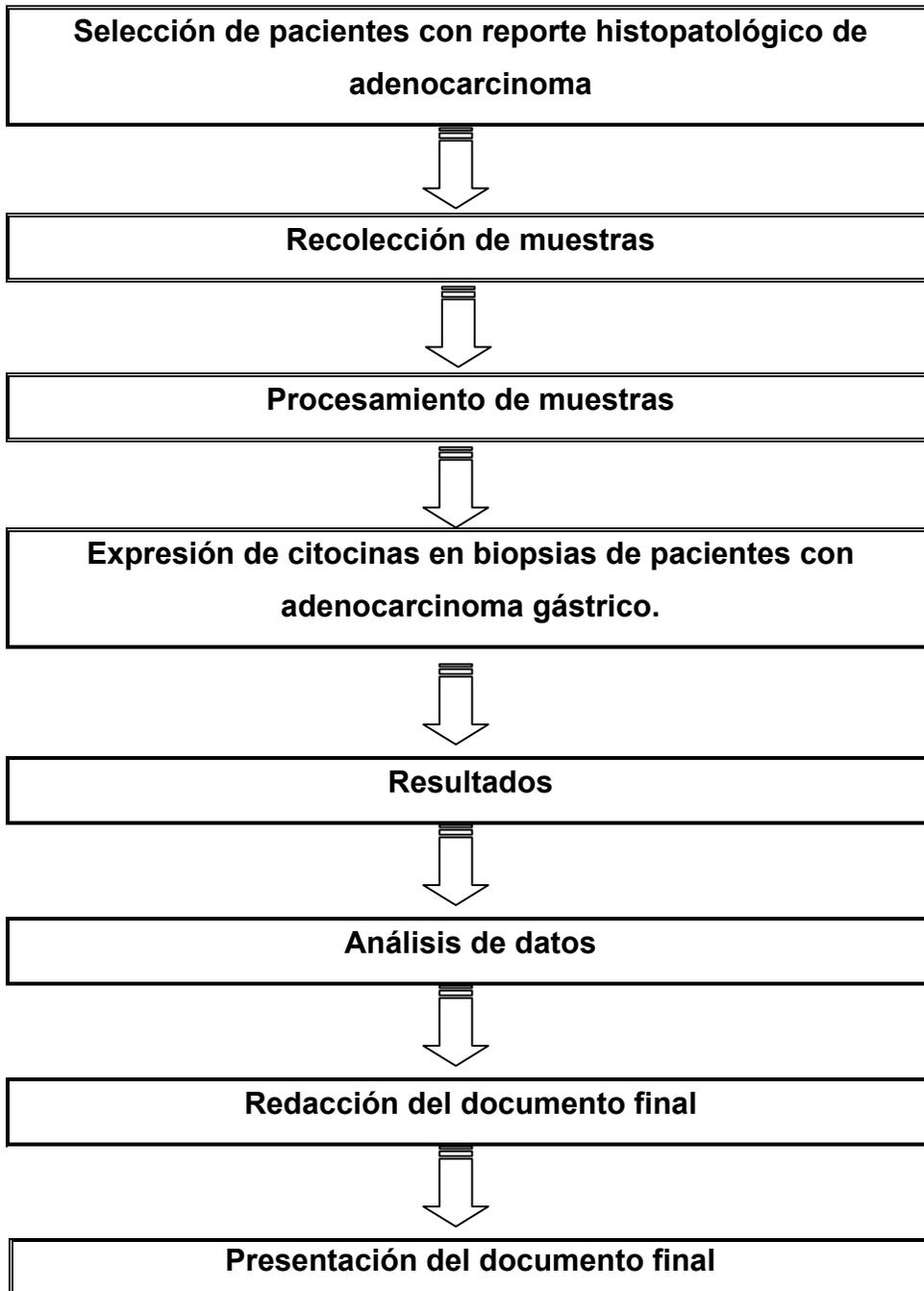
200. Eck M, Schmaußer B, Scheller K, Brändlein S, Müller-Hermelink HK. Pleiotropic effects of CXC chemokines in gastric carcinoma: differences in CXCL8 and CXCL1 expression between diffuse and intestinal types of gastric carcinoma. Clin Exp Immunol 2003; 134:508-515.

## ANEXOS

### Cronograma de Actividades.

Actividad	Enero Febrero 2010	Marzo Abril 2010	Mayo Junio 2010	Julio 2010 Enero 2011	Febrero Marzo 2011	Abril mayo 2011	Junio 2011
Recopilación de la bibliografía	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
Elaboración del protocolo	*****						
Recopilación de biopsias		*****					
Revisión de expedientes			*****				
Desarrollo de la investigación				*****			
Captura de la información				*****			
Análisis de datos					*****		
Redacción del documento final						*****	
Presentación de la tesis							*****

**Diagrama de Flujo.**



## HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Afiliación:

Nombre del paciente:

Género:

Edad:

Procedimiento quirúrgico:

Folio de patología:

Fecha de reporte de patología:

Diagnóstico histopatológico:

Clasificación histológica:

Estadio clínico:

Citocinas	Expresión	
	POSITIVO	NEGATIVO
IL-2		
IL-4		
IL-10		
TGF $\beta$		

OBSERVACIONES:

---

---

---

---

---

CAPTURÓ:

---

---