

Alteraciones genéticas en gastritis crónica: Estudio de inestabilidad microsatelital y pérdida de la heterocigocidad

Juan Carlos Roa S, Miguel Angel Villaseca V, Iván Roa E, Juan Carlos Araya O.

Microsatellite instability and loss of heterozygosity in chronic gastritis

Background: Multifocal chronic gastritis, associated to intestinal metaplasia, is considered a preneoplastic lesion, closely associated to intestinal type gastric cancer. **Aim:** To study the frequency of microsatellite instability (MSI) and loss of heterozygosity (LOH) in areas of chronic gastritis and intestinal metaplasia in gastric biopsies of patients without cancer. **Material and methods:** Gastric biopsy samples from 34 patients without cancer (22 with multifocal atrophic gastritis and 12 with diffuse antral gastritis), were studied. Glands from areas of chronic gastritis and intestinal metaplasia and lymphocytes, were collected using laser microdissection of paraffin embedded samples. The analysis of 15 mono and dinucleotide microsatellites was used to assess LOH and MSI. **Results:** LOH and MSI were found in some of the markers in 55% (12/22) and 59% (13/22) of cases with intestinal metaplasia, respectively. Only one of 12 areas with diffuse atrophic gastritis had MSI and a different area had LOH ($p < 0.05$ or less, when compared with areas of multifocal atrophic gastritis). Three areas of normal epithelium in patients with multifocal atrophic gastritis, also had alterations. Most of these alterations were concordant with adjacent areas with intestinal metaplasia. **Conclusions:** LOH and MSI was found in areas of intestinal metaplasia in more than half of the studied cases and in few areas of atrophic gastritis without intestinal metaplasia. These findings suggest that genotypic alterations may precede phenotypic modifications and that intestinal metaplasia is a preneoplastic lesion (Rev Méd Chile 2003; 131: 1365-74).

(Key Words: Gastritis; Metaplasia; Stomach Neoplasms)

Recibido el 8 de mayo, 2003. Aceptado en versión corregida el 25 de agosto, 2003.
Trabajo financiado parcialmente por proyectos DID UFRO # 2029 y FONDECYT # 1020283.
Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

Correspondencia a: Juan Carlos Roa. Casilla 54-D, Temuco, Chile. Phone: 56-45-296528. Fax: 56-45-216273.
E mail: jcroa@ufro.cl

El cáncer gástrico es la primera causa de muerte por cáncer en la población chilena, con una tasa de mortalidad de 19,5 x 100.000 en la población general y de 25,3 x 100.000 en la de sexo masculino. En la región de la Araucanía (IX) la tasa de mortalidad por esta neoplasia se eleva hasta 24,8 x 100.000 en la población general y 33,7 x 100.000 en la de sexo masculino. Con estas cifras, la probabilidad media que un chileno muera por cáncer de estómago es de alrededor de 3%, transformando a esta enfermedad en un problema de salud pública importante¹.

La gastritis crónica es considerada como una lesión preneoplásica en la secuencia de eventos morfológicos y genéticos de la carcinogénesis gástrica². En este sentido, existe multiplicidad de datos que confirman que la gastritis multifocal atrófica (MAG)³ está íntimamente relacionada con la carcinogénesis del cáncer gástrico de tipo intestinal⁴. Por otro lado, la gastritis difusa antral (DAG) se asocia a úlcera duodenal sin relación aparente con evolución a cáncer gástrico^{5,6}.

La pérdida de la heterocigocidad (LOH) es una lesión frecuente y relevante en la carcinogénesis debido a que se encuentra ligada en forma directa con la inactivación de genes supresores de tumores, favoreciendo de esta forma la proliferación neoplásica⁷. Existen estudios en cáncer gástrico que muestran asociación entre la presencia de LOH en genes específicos y tasas de crecimiento⁸, estado clínico⁹ y nivel de infiltración¹⁰. En neoplasias malignas de estómago se observa LOH en cerca de 30% de los casos informativos en la zona del gen APC¹¹, en 27-35% de los casos informativos en la zona del gen DCC⁹, considerado como un evento tardío dentro de la progresión maligna¹², y de 30% de los casos informativos en la zona del gen retinoblastoma^{9,13}. Además, LOH también es habitual en el cromosoma 5q21, en relación a los genes APC/MCC¹⁴, tanto en cáncer gástrico como en metaplasia intestinal y en lesiones displásicas¹⁵.

La inestabilidad microsatelital (MSI) en *locus* cromosómicos asociados a importantes genes es un evento frecuente de la progresión de los tumores malignos humanos. Un importante grupo de los carcinomas gástricos esporádicos presentan alto índice de inestabilidad microsatelital, que es la expresión de un estado de inestabilidad genéti-

ca, mediada por la inactivación del sistema reparador de ADN (*Mismatch Repair System MMR*), el cual está compuesto por al menos 6 genes, siendo los más importantes MLH1, MSH2 y MSH6^{16,17}. Esta inactivación ocurre tanto por mutación como por hipermetilación del área promotora génica. Aunque la inestabilidad microsatelital en sí no siempre tiene un efecto carcinogénico debido a que la mayoría de los microsatélites se encuentran en áreas no expresables de ADN, este defecto es un buen indicador del estado de estabilidad genética. La MSI puede revestir importancia cuando los microsatélites se encuentran formando parte de genes encargados de funciones celulares específicas, tales como los genes TGFβ RII, BAX, E2F4 y β2 microglobulina. La presencia de MSI en estos genes ocurre en casos con alto índice de MSI y por tanto también son utilizados como test de pesquisa de casos con MSI¹⁸⁻²¹.

En el estudio de la inestabilidad microsatelital existen numerosos marcadores y aun cuando existen criterios específicos para su estudio en el cáncer de colon, éstos no están definidos para otros órganos ni para material fijado en formalina e incluido en parafina. Sin embargo, se considera que la presencia de MSI en más de 30% de los marcadores estudiados corresponde a un grupo especial con alta frecuencia de MSI relacionado con la inactivación MMR²².

Estudios pareados que incluyen áreas tumorales y áreas normales controles, demostraron inestabilidad microsatelital entre 7% y 97% de los marcadores analizados. La MSI ha sido observada en 32% de los carcinomas gástricos y en 20 a 38% de las metaplasias intestinales²³⁻²⁵, con una frecuencia de MSI de alto grado que fluctúa entre 10,5 y 17%. Además, se ha observado una mayor frecuencia de MSI de alto grado en los cánceres de tipo intestinal (25%) que en los carcinomas de tipo difuso (4%)²⁶.

Se ha postulado que las vías de LOH e MSI corresponden probablemente a vías carcinogénicas diferentes. Sin embargo, esta afirmación no es fácil de probar, debido a que en los casos de MSI de alto grado las eventuales pérdidas alélicas no debiesen ser consideradas como tales ya que por la misma inestabilidad ellas no necesariamente corresponden a tal fenómeno²².

El objetivo de este trabajo fue estudiar la frecuencia y distribución de inestabilidad micro-

satelital y pérdida de la heterocigocidad de pacientes portadores de gastritis atrófica multifocal en un grupo de pacientes sin cáncer, pero provenientes de una zona de alto riesgo de desarrollar cáncer gástrico.

MATERIAL Y MÉTODO

Selección de la muestra. Veintidós pacientes sin cáncer gástrico y con áreas de gastritis atrófica multifocal que presentaban metaplasia intestinal de tipo incompleto, identificadas mediante tinción de Azul Alcian y doce pacientes con gastritis antral difusa fueron seleccionados para el estudio. Todos los casos fueron obtenidos del archivo de biopsias endoscópicas gástricas del Departamento de Patología de la Universidad de La Frontera, Temuco, Chile. Secciones seriadas de 6 μm fueron cortadas de las muestras fijadas en formalina buffer e incluidas en parafina usando técnicas de asepsia para evitar contaminación cruzada.

Microdissección y extracción de ADN. La microdissección fue desarrollada utilizando un aparato de microdissección Láser Pixcell I (*Arcturus Engineering Inc.*, Mountainview, CA) equipado con una

fente de bajo poder (50-mW) con un rayo láser^{27,28}. La microdissección por captura láser (LCM) fue utilizada para seleccionar células desde secciones no cubiertas con cubreobjeto y teñidas con hematoxilina. Este procedimiento se realiza mediante la aplicación de un dispositivo plástico de calidad óptica revestido por un polímero en la zona basal de manera que las áreas donde este polímero entra en contacto con el láser se derrite momentáneamente permitiendo la adhesión y captura de grupos celulares o células aisladas en forma selectiva (Figura 1). Se microdisecó zonas de epitelio histológicamente "normal" (sin metaplasia intestinal), áreas de metaplasia intestinal y control interno dado por linfocitos del infiltrado inflamatorio. Una vez disecado el tejido se digirió en 50 a 100 μl de proteinasa K a 52°C por 16-18 h. La proteinasa K fue denaturada a 95°C por 15 min y las soluciones de ADN fueron almacenadas a -20°C.

Microsatélites seleccionados. Para los estudios de MSI y LOH se seleccionaron iniciadores ("primers") que flanquean áreas microsatelitales de tipo mononucleótidos (A)_n y dinucleótidos (CA)_n en regiones altamente polimorfas (Tabla 1). Los marcadores fueron elegidos en base a su proximidad con genes supresores de tumores conocidos, a la posición de

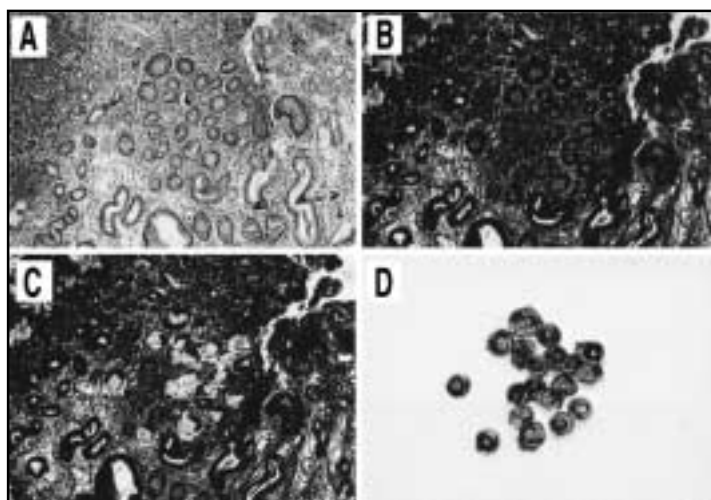


FIGURA 1. Panel de cuatro microfotografías LCM. (A) Metaplasia intestinal incompleta HE X 40. (B) Sección sin cubreobjetos listo para ser colocado en el microdisector LASER. (C) Sección luego de la microdissección, mostrando las áreas faltantes. (D) Microfotografía que muestra material microdisecado en el dispositivo de captura. Obsérvese la buena delimitación de los bordes glandulares disecados.

Tabla 1. Inestabilidad microsateletal y pérdida de la heterocigocidad en áreas de metaplasia intestinal de pacientes con gastritis atrófica multifocal. Los porcentajes de MSI y LOH (expresados en el texto) fueron calculados considerando marcadores efectivamente amplificados

Caso	Microsatelites											
	D2S123	D3S1067	D3S1262	D3S3640	D5S346	P53CA	D17S250	C17S588	D18S55	BAT25	BAT26	BAT40
1	+	+	+	+	+	+	+	+	LOH	+	+	+
2	+	+	+	-	+	MSI	+	+	+	+	+	+
3	-	LOH	+	NI	NI	NI	-	-	-	+	+	MSI
4	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
5	-	MSI	MSI	+	MSI	+	+	+	+	+	+	+
6	LOH	+	MSI	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	LOH	+	MSI	+	-	-	-	+	+	+
8	+	+	MSI	+	+	+	+	+	+	+	+	MSI
9	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
10	LOH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	LOH	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	LOH	LOH	+	LOH	LOH	+	-	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
14	NI	+	MSI	+	LOH	+	LOH	NI	-	+	+	+
15	-	+	MSI	NI	LOH	-	-	NI	-	+	-	+
16	-	LOH	-	-	MSI	-	NI	NI	NI	+	-	+
17	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	MSI
19	-	MSI	LOH	-	+	-	NI	NI	+	+	+	+
20	-	+	-	-	-	NI	NI	+	-	+	+	-
21	-	+	+	-	NI	NI	NI	+	-	+	+	NI
22	+	+	MSI	+	LOH	+	LOH	LOH	+	+	+	NI

LOH: pérdida de la heterocigocidad. MSI: Inestabilidad microsateletal; NI: Caso no informativo. (+): caso informativo (normal); (-): No se obtuvo amplificación.

supuestos genes supresores de tumores o debido a la presencia de un alto porcentaje de heterocigocidad del área microsateletal, siendo de esta manera casos informativos. Otro criterio de selección correspondió a marcadores altamente eficientes en material de archivo^{22,29,30}.

Análisis de PCR - inestabilidad microsateletal: La reacción de polimerasa se hizo en 5 µl de templado en un volumen total de 15 µl e iniciadores en una concentración de 0,5 mmol/L. Uno de los iniciadores fue marcado con fósforo radiactivo α32 (>18x10¹² Bq/mmol) con la utilización de quinasas

T4. La concentración de dinucleótidos fue de 200 mmol/L cada uno y la de magnesio 1,5 mmol/L. Las temperaturas de hibridación fueron optimizadas para cada marcador. Se realizó electroforesis de los productos de PCR en geles denaturantes de formamida-urea. Los geles fueron fijados en una solución de ácido acético metanol al 10% por 12 min y luego lavados por 12 min en agua desionizada. El secado se realizó al vacío a 80°C y la exposición autorradiográfica por 12 a 24 h a temperatura ambiente.

Definición de inestabilidad microsateletal: Cambio de cualquier longitud debido ya sea a inserciones

o deleciones de una unidad repetitiva mono o dinucleótida, en un microsatélite dentro una población celular (es decir tumor o metaplasia intestinal), cuando son comparados con la amplificación de ADN del tejido normal. Los casos fueron caracterizados como inestabilidad microsatelital de alto grado (MSI-H) (>30% de los marcadores analizados alterados), inestabilidad microsatelital de bajo grado (MSI-L) (<30% de los marcadores utilizados) y estabilidad microsatelital (MSS), que correspondió a todos aquellos casos que no presentaron MSI en ninguno de los marcadores²² (Figura 2).

Definición de pérdida de heterocigocidad (LOH): Un caso informativo (heterocigoto) muestra 2 alelos en la resultante autorradiografía de una mucosa no-neoplásica (control normal). La heterocigocidad constitucional fue determinada por el examen de linfocitos microdisecados estromales. La pérdida de uno de los alelos en el tejido tumoral o en la metaplasia intestinal en comparación con el control normal representa la pérdida alélica³¹ (Figura 3).

Análisis estadístico: Para el análisis estadístico se empleó análisis de correlación cruzada entre

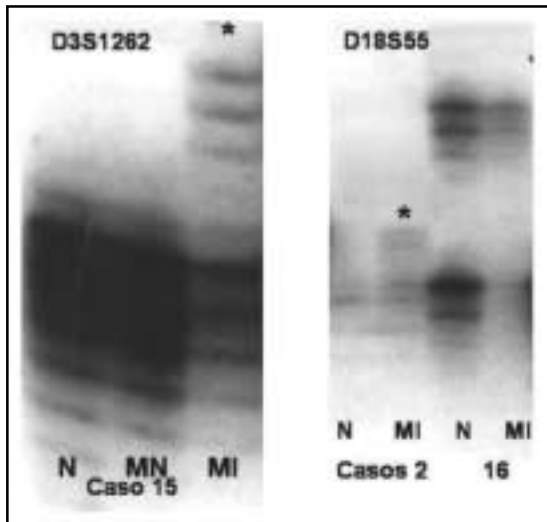
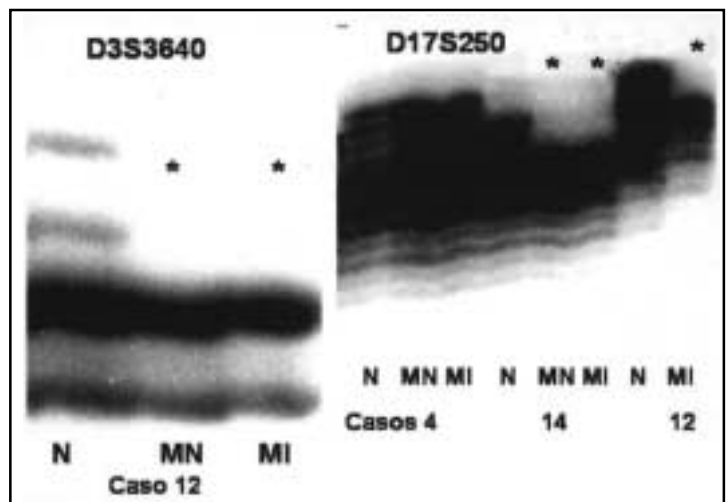


FIGURA 2. Placa autorradiográfica de gel de poliacrilamida mostrando MSI con los marcadores D3S1262 y D18S55. Los casos están ordenados en pares o tríos según corresponda (N=control normal del paciente (linfocitos); MN=mucosa normal; MI=metaplasia intestinal). Los asteriscos muestran las áreas de inestabilidad microsatelital en comparación con los controles internos normales representados por bandas o grupos de bandas extras en las zonas superiores.

FIGURA 3. Placa autorradiográfica de gel de poliacrilamida mostrando LOH con los marcadores D3S3640 y D17S250. Los casos están ordenados en pares o tríos según corresponda (N=control normal del paciente (linfocitos); NM=mucosa normal; MI=metaplasia intestinal). Los asteriscos muestran los alelos o fragmentos de alelos perdidos en áreas de metaplasia intestinal en comparación con el control interno normal. Obsérvese la pérdida alélica idéntica en las áreas de MN y MI en uno de los casos.



la frecuencia de la pérdida de la heterocigocidad en las lesiones premalignas y mucosa histológicamente normal, utilizando el test exacto de Fisher.

RESULTADOS

La microdissección láser permitió la obtención de ADN suficiente para la amplificación en todos los casos estudiados. Sin embargo, en algunos casos en particular no se logró amplificación con la totalidad de los marcadores seleccionados.

Pérdida de la heterocigocidad (LOH). Se encontró LOH en uno de los marcadores (D3S1067) en un paciente con DAG.

Se observó LOH en 12 de 22 áreas de metaplasia intestinal (55%; Tabla 1 y Figura 2). Las regiones más frecuentemente alteradas fueron D5S346, D3S1262 y D17S250. Además, tres de las 22 áreas de metaplasias intestinales estudiadas mostraron dos o más marcadores de ADN alterados (Tabla 1). Cinco pacientes con MAG mostraron LOH en la zona de epitelio de revestimiento

histológicamente normal, tres de ellos con un patrón de LOH igual en sus respectivos epitelios de metaplasia intestinal (Tabla 2).

Inestabilidad microsatelital (MSI). Uno de los doce pacientes con DAG mostró inestabilidad microsatelital en la mucosa gástrica aparentemente normal (D3S1262). Por otro lado, 3 pacientes con MAG mostraron inestabilidad microsatelital en el epitelio histológicamente normal, sin metaplasia intestinal. Dos de estos 3 casos mostraron el mismo tipo de MSI en sus respectivos epitelios con metaplasia intestinal (el otro caso no fue concluyente debido a que no fue posible obtener una amplificación de PCR en la región alterada en la respectiva metaplasia intestinal).

Algún grado de MSI fue observada en 13 de 22 áreas de metaplasia intestinal (59%; Tabla 1 y Figura 3). Las regiones más frecuentemente alteradas fueron el D3S1262, D5S346 y BAT 40. Sin embargo, todos los casos mostraron un fenotipo de inestabilidad de bajo grado (MSI-L). Además, seis de los 12 marcadores estudiados no presentaron inestabilidad microsatelital en los casos estudiados (Tabla 1).

Tabla 2. Inestabilidad microsatelital y pérdida de la heterocigocidad en 5 casos de gastritis atrófica multifocal con LOH en mucosa gástrica histológicamente normal (mucosa sin metaplasia intestinal)

Caso Tejido	2			4			12			14			15		
	N	MN	MI	N	MN	MI	N	MN	MI	NI	MN	MI	NI	MN	MI
D2S123	+	LOH	+	+	+	+	+	+	+	NI	NI	NI	+	+	-
D3S1067	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	MSI	+	+	+	+
D3S1262	+	+	+	+	LOH	-	+	+	LOH	+	MSI	MSI	+	+	MSI
D3S3640	+	+	-	+	+	+	+	LOH	LOH	+	+	+	NI	NI	NI
D5S346	+	+	+	+	LOH	-	+	+	+	+	LOH	LOH	+	LOH	LOH
P53CA	+	+	MSI	+	+	+	+	+	LOH	+	+	+	-	-	-
D17S250	+	+	+	+	+	-	+	+	LOH	+	LOH	LOH	-	-	-
C17S588	+	+	+	+	+	-	+	+	+	NI	NI	NI	NI	NI	NI
D18S55	+	+	MSI	+	+	-	+	LOH	-	-	-	-	-	-	-
BAT25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BAT26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
BAT40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

LOH: pérdida de la heterocigocidad. MSI: Inestabilidad microsatelital; NI: Caso no informativo.

(+): caso informativo (normal); (-): No se obtuvo amplificación.

N: control (Linfocitos); MN: Mucosa histológicamente normal; MI: metaplasia intestinal.

Las diferencias encontradas en la frecuencia de al menos uno de los marcadores de LOH ($p=0,05$) y MSI ($p=0,04$) entre áreas con DAG y MAG fueron significativas (Tabla 3).

DISCUSIÓN

La microdissección por captura láser fue siempre efectiva en la obtención de poblaciones celulares específicas para el análisis por PCR²⁷. El material fijado en formalina e incluido en parafina es proclive a presentar artefactos especialmente en los estudios de LOH, lo cual se relaciona con el nivel de concentración de ADN³². Para evitar una mala interpretación de LOH o de inestabilidad microsatelital, se utilizó un mínimo de 10 ng de ADN por cada ronda de PCR de amplificación (más de 500 células por cada PCR).

La metaplasia intestinal de la mucosa gástrica es un evento clave en los modelos de carcinogénesis gástrica². Si bien existen diferentes tipos de metaplasia intestinal en mucosa gástrica la cual depende del tipo de mucinas que se secreta, que estarían en relación con el grado de intensidad de la metaplasia y de su relación con cáncer^{33,34}. Este aspecto no fue categorizado debido a que una subdivisión en el grupo de estudio impediría la obtención de resultados concluyentes. Un estudio previo de otros autores con pacientes portadores de gastritis crónica y metaplasia intestinal (sin cáncer) mostró casos con inestabilidad microsatelital de alto y bajo grado²⁴. Aun cuando ninguno de nuestros casos exhibió un alto grado de inestabilidad microsatelital, 59% de las metaplasias intestinales (en pacientes sin cáncer) mostraron bajos niveles de MSI en alguno de los marcadores utilizados. Además, 55% de los pacientes con metaplasia intestinal mostró LOH, algunos de ellos presentando múltiples pérdidas alélicas.

Estos datos sostienen que una acumulación progresiva de alteraciones genéticas en áreas de metaplasia intestinal contribuye al desarrollo del cáncer gástrico, representando un importante evento molecular en la carcinogénesis gástrica en múltiples etapas. Además, este bajo nivel de inestabilidad satelital y la frecuencia de LOH se compara favorablemente con la vía carcinogénica gástrica del LOH³⁵ por daños múltiples y no

Tabla 3. Correlación entre la frecuencia de al menos un marcador alterado para los test de LOH y MSI en casos de MAG y DAG

	DAG	MAG	
LOH	1/12	12/22	$p=0,05$
MSI	1/12	13/22	$p < 0,05$

específicos sobre el ADN, provocados por factores ambientales tales como la dieta, la infección por *Helicobacter pylori* y la alta ingesta de sal^{35,36}.

Las regiones más frecuentes del ADN con LOH fueron D5S346, D3S1262 y D17S250. D5S346 se encuentra localizada cerca del gen APC/MCC y D17S250 cerca del gen TP53, ambos comúnmente alterados en el cáncer gástrico de tipo intestinal^{15,37,38}.

El gen APC/MCC (poliposis adenomatosa familiar del colon) ubicado en el cromosoma 5q21 juega un rol importante en la carcinogénesis del cáncer de colon. El locus APC ha sido relacionado a las moléculas de adhesión celular y su alteración puede favorecer la diseminación metastásica³⁹. Además, LOH en la región 5q21 se asocia con un peor pronóstico^{15,40}. En nuestro estudio de pacientes sin cáncer y con metaplasia intestinal demostramos un desbalance alélico (LOH) en la zona APC/MCC en 3 de 18 casos informativos (17%), dos de ellos con lesiones similares en la zona del epitelio gástrico adyacente (no metaplásico).

El 30% de los pacientes con cáncer gástrico tienen LOH en la zona del gen TP53^{13,37,41}. El estudio actual reveló la presencia de LOH en el gen TP53 en 3 de 10 casos informativos (30%), uno de ellos con una lesión genética similar en la mucosa normal adyacente. Estos hallazgos en las zonas normales epiteliales mas los encontrados en APC/MCC y otros marcadores sugieren que las alteraciones genéticas precederían a los cambios fenotípicos de la metaplasia intestinal. Estos datos no han sido previamente descritos en la literatura. Esta disparidad puede ser explicada por el método utilizado para obtener células para los análisis de ADN, con un muy bajo nivel de contaminación del ADN provocado por células estromales tales

como los linfocitos, permitiendo la exposición de lesiones genéticas sutiles en epitelios gástricos histológicamente normales.

La presencia de LOH en el gen DCC fue de 8%, por debajo de los datos descritos en cáncer gástrico avanzado^{42,43}, indicando que estas alteraciones genéticas probablemente aparecen tardíamente durante la progresión del cáncer gástrico³⁸.

Las regiones más frecuentemente alteradas con MSI fueron D3S1262, D5S346 y BAT40. Ninguno de los casos presentó alto grado de inestabilidad microsatelital, lo que fue concordante con los resultados del marcador BAT26 y con lo reportado en la literatura⁴⁴. El microsatélite BAT26 es del tipo mononucleótido Poliadenina (A)_n localizado en el quinto intrón del gen hMSH2 y es altamente sensible (93%) y específico (95%) para detectar casos con alto grado de inestabilidad microsatelital^{30,45-47}.

Se encontró 59% de frecuencia de inestabilidad de bajo grado lo cual es similar a una comunicación de Leung en 2000 que demostró 38% de MSI-L en áreas de metaplasia intestinal de individuos sin cáncer, lo que sugiere que la acumulación de MSI en áreas de metaplasia intestinal puede contribuir al desarrollo de cáncer gástrico, representando un evento molecular importante en el modelo de carcinogénesis gástrica en múltiples etapas²².

Es interesante notar la marcada diferencia que se encontró en la frecuencia de alteraciones genéticas tanto para LOH ($p=0,05$) y MSI ($p < 0,05$) en casos de DAG y MAG (Tabla 3) lo que reafirma, por un lado, la condición de lesión preneoplásica del MAG y, por otro, la condición de lesión no precursora del DAG^{5,6}.

Los carcinomas gástricos en humanos muestran una prevalencia de inestabilidad microsatelital que varía entre 13 y 44%, la cual es mayor que cualquier otro tipo de cáncer esporádico en humanos^{48,49}. Existen datos que indican que la hipermetilación de los islotes del CpG en las regiones promotoras del hMLH1 se encuentran asociadas en forma muy fuerte con MSI en los cánceres gástricos⁵⁰⁻⁵⁴, sugiriendo un mecanismo epigenético en la inactivación del sistema de reparación de ADN en este grupo de cánceres. Además, la hipermetilación de las regiones promotoras de MLH1 están asociadas con una pérdida del producto proteico del gen, que son eventos significativos en el desarrollo de tumores invasivos⁵⁰⁻⁵².

La presencia de alteraciones genéticas en mucosas no neoplásicas ha sido previamente descrita²⁴. Los datos confirman que estos hallazgos están presentes aun en los epitelios histológicamente normales, sin metaplasia intestinal, haciendo presumir que las alteraciones genotípicas anteceden este tipo de alteraciones fenotípicas. La alta frecuencia de alteraciones genéticas genera algunas preguntas sobre el significado e importancia de ellas. Sin embargo, es lógico suponer que la acumulación de eventos favorezca el proceso carcinogénico. Por otro lado, no todas las lesiones genéticas producidas necesariamente tendrían que desencadenar una proliferación neoplásica, ya que el epitelio gástrico tiene una de las más altas tasas de recambio celular, con una continua pérdida de células, que podrían prevenir la perpetuación de los errores y con ello prevenir la aparición de carcinomas gástricos en la mayoría de los individuos que acarrearían estos y otros daños genéticos.

REFERENCIAS

1. MEDINA E, KAEMPFER AM. Cancer mortality in Chile: epidemiological considerations. *Rev Méd Chil* 2001; 129: 1195-202.
2. CORREA P, SHIAO YH. Phenotypic and genotypic events in gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 1941s-3s.
3. CORREA P. Chronic Gastritis: A Clinico-pathological classification. *Am J Gastroenterol* 1988; 83: 504-9.
4. TAHARA E, SEMBA S, TAHARA H. Molecular biological observations in gastric cancer. *Semin Oncol* 1996; 23: 307-15.
5. FEARON E. Tumor suppressor genes. In: Vogelstein Bert KK, editor. *The genetic basis of cancer*. Second Edition. New York: McGraw Hill 2002; 197-206.
6. CHOI SW, PARK SW, LEE KY, KIM KM, CHUNG YJ, RHYU MG. Fractional allelic loss in gastric carcinoma correlates with growth patterns. *Oncogene* 1998; 17: 2655-9.

7. FANG DC, JASS JR, WANG DX. Loss of heterozygosity and loss of expression of the DCC gene in gastric cancer. *J Clin Pathol* 1998; 51: 593-6.
8. NISHIZUKA S, TAMURA G, TERASHIMA M, SATODATE R. Loss of heterozygosity during the development and progression of differentiated adenocarcinoma of the stomach. *J Pathol* 1998; 185: 38-43.
9. ROA JC AJ, VILLASECA M, ROA I, CORREA P. Inestabilidad microsatelital y pérdida de la heterocigocidad en lesiones preneoplásicas y neoplásicas gástricas. *Rev Méd Chile* 2003; 131: 1227-36.
10. UCHINO S, TSUDA H, NOGUCHI M, YOKOTA J, TERADA M, SAITO T ET AL. Frequent loss of heterozygosity at the DCC locus in gastric cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 3099-102.
11. CHO JH, NOGUCHI M, OCHIAI A, HIROHASHI S. Loss of heterozygosity of multiple tumor suppressor genes in human gastric cancers by polymerase chain reaction. *Lab Invest* 1996; 74: 835-41.
12. TAMURA G, MAESAWA C, SUZUKI Y, OGASAWARA S, TERASHIMA M, SAITO K ET AL. Primary gastric carcinoma cells frequently lose heterozygosity at the APC and MCC genetic loci. *Jpn J Cancer Res* 1993; 84: 1015-8.
13. SANZ-ORTEGA J, SANZ-ESPONERA J, CALDES T, GÓMEZ DE LA CONCHA E, SOBEL ME, MERINO MJ. LOH at the APC/MCC gene (5q21) in gastric cancer and preneoplastic lesions. Prognostic implications. *Pathol Res Pract* 1996; 192: 1206-10.
14. BOLAND R. *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer* (HNPCC). New York: MacGraw-Hill; 2002.
15. CAHILL DLC. Basic concepts in genetics. In: Vogelstein B KK, editor. *The genetic basis of human cancer*. New York: McGraw-Hill; 2002; 129-30.
16. CHUNG YJ, PARK SW, SONG JM, LEE KY, SEO EJ, CHOI SW ET AL. Evidence of genetic progression in human gastric carcinomas with microsatellite instability. *Oncogene* 1997; 15: 1719-26.
17. WOO DK, LEE WA, KIM YI, KIM WH. Microsatellite instability and alteration of E2F-4 gene in adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the stomach. *Pathol Int* 2000; 50: 690-5.
18. CARETHERS JM, PHAM TT. Mutations of transforming growth factor beta 1 type II receptor, BAX, and insulin-like growth factor II receptor genes in microsatellite unstable cell lines. *In Vivo* 2000; 14: 13-20.
19. ABE T, OUYANG H, MIGITA T, KATO Y, KIMURA M, SHIIBA K ET AL. The somatic mutation frequency of the transforming growth factor beta receptor type II gene varies widely among different cancers with microsatellite instability. *Eur J Surg Oncol* 1996; 22: 474-7.
20. BOLAND CR, THIBODEAU SN, HAMILTON SR, SIDRANSKY D, ESHLEMAN JR, BURT RW ET AL. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5248-57.
21. SEMBA S, YOKOZAKI H, YAMAMOTO S, YASUI W, TAHARA E. Microsatellite instability in precancerous lesions and adenocarcinomas of the stomach. *Cancer* 1996; 77: 1620-7.
22. LEUNG WK, KIM JJ, KIM JG, GRAHAM DY, SEPULVEDA AR. Microsatellite instability in gastric intestinal metaplasia in patients with and without gastric cancer. *Am J Pathol* 2000; 156: 537-43.
23. KIM SS, BHANG CS, MIN KO, CHAE HS, CHOI SW, LEE CD ET AL. p53 mutations and microsatellite instabilities in the subtype of intestinal metaplasia of the stomach. *J Korean Med Sci* 2002; 17: 490-6.
24. FANG DC, JASS JR, WANG DX, ZHOU XD, LUO YH, YOUNG J. Infrequent loss of heterozygosity of APC/MCC and DCC genes in gastric cancer showing DNA microsatellite instability. *J Clin Pathol* 1999; 52: 504-8.
25. EMMERT-BUCK M, BONNER R, SMITH P, CHUAQUI R, ZHUANG Z, GOLDSTEIN S ET AL. Laser Capture Microdissection. *Science* 1996; 274: 998-1001.
26. SIMONE N, BONNER R, GILLESPIE J, EMMERT-BUCK M, LIOTTA L. Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. *Trend Genet* 1998; 14: 253-94.
27. SCHNEIDER BG, PULTIZER DR, BROWN RD, PRIHODA TJ, BOSTWICK DG, SALDIVAR V ET AL. Allelic imbalance in gastric cancer: an affected site on chromosome arm 3p. *Genes Chromosomes Cancer* 1995; 13: 263-71.
28. SCHNEIDER BG, BRAVO JC, ROA JC, ROA I, KIM MC, LEE KM ET AL. Microsatellite instability, prognosis and metastasis in gastric cancers from a low-risk population. *Int J Cancer* 2000; 89: 444-52.
29. HUNG J, KISHIMOTO Y, SUGIO K, VIRMANI A, MCINTIRE D, MINNA J ET AL. Allele-specific chromosome 3p deletion occur at an early stage in the pathogenesis of lung carcinoma. *JAMA* 1995; 273: 558-63.

30. SIEBEN NL, TER HAAR NT, CORNELISSE CJ, FLEUREN GJ, CLETON-JANSEN AM. PCR artifacts in LOH and MSI analysis of microdissected tumor cells. *Hum Pathol* 2000; 31: 1414-9.
31. FANG DC, YANG SM, ZHOU XD, WANG DX, LUO YH. Telomere erosion is independent of microsatellite instability but related to loss of heterozygosity in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 522-6.
32. BLANCHARD TG, CZINN SJ. Review article: Immunological determinants that may affect the Helicobacter pylori cancer risk. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12 Suppl 1: 83-90.
33. SUD R, TALBOT IC, DELHANTY JD. Infrequent alterations of the APC and MCC genes in gastric cancers from British patients. *Br J Cancer* 1996; 74: 1104-8.
34. WU MS, SHUN CT, WANG HP, SHEU JC, LEE WJ, WANG TH ET AL. Genetic alterations in gastric cancer: relation to histological subtypes, tumor stage, and Helicobacter pylori infection. *Gastroenterology* 1997; 112: 1457-65.
35. FEARNHEAD NS, BRITTON MP, BODMER WF. The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 721-33.
36. FONG KM, ZIMMERMAN PV, SMITH PJ. Tumor progression and loss of heterozygosity at 5q and 18q in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 220-3.
37. KIM CJ, KIM WH, KIM CW, LEE JB, LEE CK, KIM YL. Detection of 17p loss in gastric carcinoma using polymerase chain reaction. *Lab Invest* 1995; 72: 232-6.
38. TAMURA G, SAKATA K, NISHIZUKA S, MAESAWA C, SUZUKI Y, TERASHIMA M ET AL. Allelotype of adenoma and differentiated adenocarcinoma of the stomach. *J Pathol* 1996; 180: 371-7.
39. SATO K, TAMURA G, TSUCHIYA T, ENDOH Y, USUBA O, KIMURA W ET AL. Frequent loss of expression without sequence mutations of the DCC gene in primary gastric cancer. *Br J Cancer* 2001; 85: 199-203.
40. JIN Z, TAMURA G, SATOH M, MEGURO T, MIURA T, HAYASHI M ET AL. Absence of BAT-26 instability in gastric intestinal metaplasia. *Pathol Int* 2001; 51: 473-5.
41. HOANG J, COTTU P, THUILLE B, SALMON R, THOMAS G, HAMELIN R. BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res* 1997; 57: 300-3.
42. ZHOU X, HOANG J, LI Y, SERUCA R, CARNEIRO F, SOBRINHO-SIMÕES M ET AL. Determination of the replication error phenotype in human tumors without the requirement for normal DNA by analysis of mononucleotide repeat microsatellites. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 21: 101-7.
43. DE LA CHAPPELLE A. Testing tumors for microsatellite instability. *Eur J Hum Genet* 1999; 7: 407-8.
44. HALLING KC, HARPER J, MOSKALUK CA, THIBODEAU SN, PETRONI GR, YUSTEIN AS ET AL. Origin of microsatellite instability in gastric cancer. *Am J Pathol* 1999; 155: 205-11.
45. HAYDEN J, MARTIN I, CAWKWELL L, QUIRKE P. The role of microsatellite instability in gastric carcinoma. *Gut* 1998; 42: 300-3.
46. KANG GH, SHIM YH, RO JY. Correlation of methylation of the hMLH1 promoter with lack of expression of hMLH1 in sporadic gastric carcinomas with replication error. *Lab Invest* 1999; 79: 903-9.
47. BEVILACQUA RA, SIMPSON AJ. Methylation of the hMLH1 promoter but no hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. *Int J Cancer* 2000; 87: 200-3.
48. FLEISHER AS, ESTELLER M, TAMURA G, RASHID A, STINE OC, YIN J ET AL. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter is associated with microsatellite instability in early human gastric neoplasia. *Oncogene* 2001; 20: 329-35.
49. SUZUKI H, ITOH F, TOYOTA M, KIKUCHI T, KAKIUCHI H, HINODA Y ET AL. Distinct methylation pattern and microsatellite instability in sporadic gastric cancer. *Int J Cancer* 1999; 83: 309-13.
50. YANAGISAWA Y, AKIYAMA Y, IIDA S, ITO E, NOMIZU T, SUGIHARA K ET AL. Methylation of the hMLH1 promoter in familial gastric cancer with microsatellite instability. *Int J Cancer* 2000; 85: 50-3.
51. FLEISHER AS, ESTELLER M, WANG S, TAMURA G, SUZUKI H, YIN J ET AL. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 1999; 59: 1090-5.
52. LEUNG SY, YUEN ST, CHUNG LP, CHU KM, CHAN AS, HO JC. hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res* 1999; 59: 159-64.