

Asociación del polimorfismo del codon 72 del gen *p53* con el riesgo de cáncer gástrico en una población de alto riesgo de Costa Rica

Warner Alpízar-Alpízar^{1*}, Rafaela Sierra¹, Patricia Cuenca¹, Clas Une¹, Fernando Mena² & Guillermo Ignacio Pérez-Pérez³

1 Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

2 Sección de Patología, Hospital Dr. Max Peralta, Cartago, Costa Rica.

3 Division of Infectious Diseases, New York University School of Medicine, New York, New York, United States of America.

Correos electrónicos: (R. Sierra) rsierra@cariari.ucr.ac.cr; (P. Cuenca) pcuenca@cariari.ucr.ac.cr;

(C. Une) cune@cariari.ucr.ac.cr; (F. Mena) fmenau@hmp.sa.cr; (G. Pérez-Pérez) perezg02@endeavor.med.nyu.edu

* Correspondencia: awarnercr@yahoo.com; warnera@cariari.ucr.ac.cr; Tel.: (506)207-3294; Fax.: (506)207-5130

Recibido 18-III-2005. Corregido 04-VII-2005. Aceptado 20-VII-2005.

Abstract: Association of the *p53* codon 72 polymorphism to gastric cancer risk in a high risk population of Costa Rica. Gastric cancer is the second most common cancer associated death cause worldwide. Several factors have been associated with higher risk to develop gastric cancer, among them genetic predisposition. The *p53* gene has a polymorphism located at codon 72, which has been associated with higher risk of several types of cancer, including gastric cancer. The aim of this study was to determine the association of *p53*, codon 72 polymorphism, with the risk of gastric cancer and pre-malignant lesions in a high-risk population from Costa Rica. The genotyping was carried out by PCR-RFLP in 58 gastric cancer patients, 99 controls and 41 individuals classified as group I or II, according to the Japanese histological classification. No association was found for *p53*, codon 72 polymorphism with neither the risk of gastric cancer nor the risk of less severe gastric lesions in the studied population. Based on this study and taking into account other studies carried out with *p53*, codon 72 polymorphism, the role of this polymorphism in the development of gastric cancer remains unclear. *De novo* mutations on *p53* gene produced during neoplastic development of this disease might play a greater role than germinal polymorphisms of the gene. Other polymorphic genes have been associated with higher risk to develop gastric cancer. Rev. Biol. Trop. 53(3-4): 317-324. Epub 2005 Oct 3.

Key words: Gastric cancer, *p53* polymorphism, codon 72, *Helicobacter pylori*, tumor suppressor gene.

El cáncer gástrico es la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo, solo superado por el cáncer de pulmón (Parkin *et al.* 2001). Varios factores están asociados con el riesgo de desarrollar cáncer gástrico, entre ellos el bajo consumo de frutas y verduras frescas, la infección por *Helicobacter pylori* y la predisposición genética (Correa 1992, Kuipers 1999, Yasui *et al.* 2001, Correa 2003).

Uno de los genes que ha sido ampliamente asociado con cáncer es el gen que codifica la proteína supresora de tumores *p53*. Algunos estudios señalan que en más del 50% de todos los cánceres humanos, la proteína *p53* no es

funcional como resultado de mutaciones en el gen (Levine 1997, Vogelstein *et al.* 2000). El gen *p53* está localizado en el brazo corto del cromosoma 17 y codifica una fosfoproteína de 393 aminoácidos (Levine 1992, Walker y Levine 1996). Esta proteína ejerce su función como supresor de tumores mediante dos mecanismos, regulando de forma negativa el ciclo celular en la fase de transición de G1 a S, o regulando de manera positiva la transcripción de genes relacionados con la regulación del ciclo celular. Además, desempeña un papel determinante en el proceso de apoptosis (Levine 1997).

El gen *p53* presenta algunas variantes polimórficas de línea germinal. Uno de dichos polimorfismos está localizado en el exón número cuatro, codón 72 del gen (Shepherd *et al.* 2000). Este consiste en una transversión de G por C, lo cual da como resultado el cambio de un aminoácido en la secuencia de la proteína (arginina por prolina). Dicho cambio tiene efectos bioquímicos y biológicos importantes en cuanto a la acción de la proteína (Thomas *et al.* 1999). Este polimorfismo ha sido asociado con algunos tipos de cáncer entre ellos cáncer gástrico (Wang *et al.* 1999, Fan *et al.* 2000, Shepherd *et al.* 2000, Hiyama *et al.* 2002). Recientemente, este polimorfismo también ha sido asociado con la sobrevivencia de pacientes con cáncer gástrico (Zhang *et al.* 2003, Zhang *et al.* 2004).

Costa Rica es uno de los países con una de las más altas tasas de incidencia y mortalidad por cáncer gástrico a nivel mundial (Parkin *et al.* 2001). Se desconocen las causas de este fenómeno. La infección por *H. pylori* ha sido considerada como uno de los principales factores de riesgo de cáncer gástrico en el mundo, sin embargo en Costa Rica, la prevalencia de la infección por *H. pylori* es alta desde etapas tempranas de la vida, tanto en regiones de alto como de bajo riesgo del país (Sierra *et al.* 1992, Sierra *et al.* 1998). La infección por *H. pylori*, por sí sola, no puede explicar las altas tasas de cáncer gástrico en Costa Rica, por lo que otros factores pueden estar involucrados, entre ellos factores relacionados con la dieta, el tipo de cepa de *H. pylori*, la respuesta del hospedero ante la infección por dicha bacteria y la susceptibilidad genética. En el presente estudio se investigó la asociación del polimorfismo del codón 72, exón 4 del gen *p53* con el riesgo de cáncer gástrico y lesiones gástricas en una población de alto riesgo de Costa Rica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

El presente estudio es parte de un estudio más amplio (n=1300 personas) sobre

“Marcadores para identificar sujetos en alto riesgo de cáncer gástrico” que se llevó a cabo en el Centro de Detección Temprana de Cáncer Gástrico de Costa Rica, entre los años 1999 y 2000. A partir de este proyecto, se utilizó la información epidemiológica y clínica de todos los pacientes con cáncer gástrico y de un grupo de pacientes con lesiones gástricas leves. Como grupo control se tomaron personas sin sospechas de cáncer por rayos X (serie gastroduodenal de doble contraste). Se formaron y compararon los siguientes grupos. A) 58 pacientes diagnosticados con cáncer gástrico mediante diagnóstico histopatológico (28 de tipo intestinal, 18 de tipo difuso y en 12 sin especificar); B) 58 personas sin sospecha de cáncer gástrico según el examen de rayos X (serie gastroduodenal de doble contraste) pareados por edad (± 5 años) y sexo con respecto a los casos de cáncer; C) 41 personas con diagnóstico histopatológico de grupos I y II según la clasificación histológica Japonesa (Japanese Research Society for Gastric Cancer 1995); D) 41 personas no sospechosas de cáncer gástrico según el examen de rayos X (serie gastroduodenal de doble contraste), pareados por edad (± 5 años) y sexo con respecto al grupo de lesiones gástricas leves (grupo C). El estudio fue aprobado por el comité Ético-Científico de la Universidad de Costa Rica. Todas las personas participantes habían firmado previamente una fórmula de consentimiento informado. A todos los individuos se les había tomado una muestra de sangre en el proyecto original, la cual estuvo almacenada a -70°C hasta el momento de este estudio. Para el presente estudio se llevaron a cabo extracciones de ADN a partir de 0.5 ml de dichas muestras de sangre mediante el protocolo de extracción con proteinasa-k y fenol/cloroformo.

Determinación de los polimorfismos de *p53*

La determinación de los polimorfismos del gen *p53* se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa para polimorfismos de restricción de diversos tamaños (PCR-RFLP). Los iniciadores y las condiciones de PCR

fueron similares a las previamente descritas (Fan *et al.* 2000). El tamaño del producto final de amplificación fue de 199 pb. Volúmenes de 10 µl de cada producto de amplificación fueron tratados con la enzima de restricción BstUI (60°C por 12 horas), posteriormente sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio. El alelo que presenta la secuencia CGC en el exón 4 codón 72, la cual codifica el aminoácido Arginina (Arg), era digerido produciendo dos bandas de 133 y 86 pb, mientras que el alelo cuya secuencia es CCC, que codifica el aminoácido prolina (Pro), no era digerido por lo que se observaba una única banda de 199 pb. Los genotipos fueron los siguientes: CGC/CGC (Arg/Arg), dos bandas de 133 y 86 pb; CGC/CCC (Arg/Pro), tres bandas de 199, 133 y 86 pb; CCC/CCC (Pro/Pro), una única banda de 199 pb (Fan *et al.* 2000).

Prevalencia de *H. pylori*

La presencia de anticuerpos séricos contra *H. pylori* había sido determinada para cada uno de los pacientes del estudio original y estos resultados se utilizaron en el presente estudio. Dicha determinación se llevó a cabo mediante una prueba de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) desarrollada en nuestro laboratorio basado en un método descrito previamente (Pérez-Pérez *et al.* 1988, C. Une, no publicado). El antígeno fue preparado a partir de cinco cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes de Costa Rica. 100 l del antígeno a una concentración de 10 g/ml fueron colocados en cada uno de los pozos de placas para ELISA e incubados temperatura ambiente por una noche y posteriormente se adicionó 250 l de gelatina 0.1% en PBS y se incubó por tres horas a 37°C para bloquear cualquier adherencia inespecífica. Entre cada paso, las placas fueron lavadas tres veces en PBS + thimerosal 0.01% y Tween 20 0.05 %. Las muestras de suero usadas como controles negativos y positivos fueron diluidas 1:800 (7500 para los controles positivos) en PBS conteniendo gelatina 0.1% y gama-globulina bovina 0.5% (Sigma, USA), se agregaron 100 l de la dilución a

cada uno de los pozos y se incubaron a 37°C durante sesenta minutos. Después del lavado, se agregaron 100 l de IgG humano conjugado con fosfatasa alcalina (Biosource International, USA). Las placas fueron incubadas durante sesenta minutos a 37°C y lavadas cinco veces. Posteriormente, se agregaron 100 l de sustrato (Fast p-Nitrophenyl Phosphate Tablet Sets, Sigma, USA) a las placas y fueron incubadas a 37°C hasta que la absorbancia neta a 405nm excediera OD 0.4 para los controles positivos. La absorbancia fue determinada en un espectrofotómetro Multiscan (Thermo Labsystems, Finland). El punto de corte fue determinado a partir de los controles positivos usando la fórmula calculada a partir de una serie de experimentos con controles positivos y negativos. Los valores predictivos positivos y negativos fueron de 89% y 82% respectivamente.

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de Chi-cuadrado para comparar las frecuencias genotípicas del polimorfismo de *p53* entre los grupos estudiados y para la determinación del equilibrio de Hardy-Weinberg. Se utilizó una prueba *t* para comparar la edad promedio entre los grupos. Se calcularon los valores de Odd Ratio y modelos de regresión logística condicional para determinar posibles asociaciones entre el polimorfismo estudiado y cáncer gástrico utilizando el paquete estadístico STATA versión 8.1 (Stata Corporation, Texas, USA). En todas las pruebas calculadas, las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para valores de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

El cuadro 1 muestra las características generales de la población estudiada. Un alto porcentaje de las muestras estudiadas (87.4%) fueron seropositivas para la prueba de anticuerpos anti-*H. pylori*. No se encontró diferencia en cuanto a la seropositividad para *H. pylori* entre el grupo de casos de cáncer gástrico y su

CUADRO 1
Características de la población de estudio

Diagnóstico	Edad promedio ± DE (años)	Hombres n (%)	Mujeres n (%)	<i>H. pylori</i> + (%)
Con cáncer n= 58	59.8 ±13.8	46 (79.3)	12 (20.7)	48 (82.8)
Controles n=58	61.4 ±9.2	46 (79.3)	12 (20.7)	53 (91.4)
Lesiones leves n=41	64.3 ±8	33 (80.5)	8 (19.5)	37 (90.2)
Controles n=41	65.7 ±5.6	33 (80.5)	8 (19.5)	35 (85.4)
TOTAL	62.3	158 (79.8)	40 (20.2)	173 (87.4)

grupo control ($\chi^2= 2.12$, $p= 0.15$, 2 gl) ni entre el grupo de lesiones gástricas leves y su grupo control ($\chi^2= 1.23$, $p= 0.27$, 2 gl). Tampoco hubo diferencias significativas en la edad promedio al comparar los grupos estudiados. Debido al alto porcentaje de individuos con diagnóstico serológico positivo para *H. pylori*, no se consideró esta variable en los análisis estadísticos llevados a cabo.

El polimorfismo de *p53* se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg en ambos grupos control (grupo control de los casos de cáncer gástrico y grupo control de las lesiones gástricas leves) ($\chi^2= 1.88$, $p= 0.39$ y $\chi^2= 0.25$, $p=0.88$ respectivamente). El cuadro 2 muestra las frecuencias genotípicas y alélicas para el polimorfismo de *p53*. No se observaron diferencias significativas al comparar las frecuencias genotípicas de los pacientes con cáncer versus su grupo control ($\chi^2= 3.02$, $p= 0.22$), ni al comparar las frecuencias genotípicas del grupo de lesiones gástricas leves versus sus respectivos controles ($\chi^2= 0.80$, $p=0.67$). Tampoco se encontraron diferencias

al comparar las frecuencias genotípicas entre el grupo de casos de cáncer gástrico y el grupo de lesiones gástricas leves ($\chi^2=2.00$, $p= 0.37$).

No se encontró asociación entre el polimorfismo del codón 72 de *p53* con el riesgo de cáncer gástrico (cuadro 3). Tampoco se observó asociación del polimorfismo de *p53* con el riesgo de desarrollar algún tipo de lesión gástrica leve. No se encontró asociación entre dicho polimorfismo y el riesgo de cáncer gástrico al utilizar como grupo control al grupo de lesiones leves y compararlos contra el grupo de pacientes con cáncer. No se determinó asociación del polimorfismo de *p53* con el riesgo de desarrollar cáncer gástrico de tipo intestinal, ni cáncer gástrico de tipo difuso (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

En este estudio, un alto porcentaje de las personas estudiadas eran seropositivas para *H. pylori* (87%). Estudios previos encontraron una prevalencia de infección muy alta en

CUADRO 2
Frecuencias genotípicas y alélicas para el polimorfismo de *p53*

Genotipo	Total n= 175	Cáncer n= 47	Controles n= 47	Lesiones leves n= 40	Controles n= 41
Arg/Arg	97 (0.55)	27 (0.57)	26 (0.55)	21 (0.52)	23 (0.56)
Arg/Pro	60 (0.35)	16 (0.34)	17 (0.36)	14 (0.35)	13 (0.32)
Pro/Pro	18 (0.10)	4 (0.09)	4 (0.09)	5 (0.13)	5 (0.12)
Frecuencia alélica Pro	0.27	0.30	0.28	0.26	0.27

CUADRO 3

Valores de Odd Ratios e intervalos de confianza al 95% para el polimorfismo de p53 en cáncer gástrico y lesiones graves

Genotipo	Cáncer gástrico		Lesiones leves		Cáncer gástrico	
	OR (95% IC)	P	OR (95% IC)	P	OR (95% IC)	P
Arg/Arg	1 (referente)		1 (referente)		1 (referente)	
Arg/Pro	0.91 (0.38-2.17)	0.83	1.18 (0.45-3.10)	0.74	1.27 (0.48-3.39)	0.62
Pro/Pro	0.96 (0.22-4.31)	0.96	1.10 (0.27-4.38)	0.90	0.44 (0.07-2.64)	0.36
Portadores de Pro	0.92 (0.40-2.08)	0.84	1.16 (0.48-2.79)	0.75	1.04 (0.42-2.60)	0.93

pacientes dispépticos en la misma área geográfica (Morera-Brenes 1994, Sierra *et al.* 1998). En Costa Rica un alto porcentaje de la población está infectada con dicha bacteria desde edades muy tempranas (Sierra *et al.* 1991). Varios estudios han demostrado que *H. pylori* es uno de los principales factores de riesgo de cáncer gástrico y algunas cepas son más virulentas y han sido asociadas con un riesgo aun mayor de desarrollar cáncer gástrico (Huang *et al.* 2003). En este estudio no fue posible determinar el tipo de cepa de la bacteria presente en cada uno de los individuos de la muestra.

Las frecuencias alélicas del polimorfismo del exón 4 del gen *p53* determinadas en nuestro estudio son similares a las informadas en varios estudios realizados en poblaciones de origen europeo (Fan *et al.* 2000, Zhang *et al.* 2003, Zhang *et al.* 2004). Sin embargo, estas difieren un poco de las frecuencias informadas por estudios llevados a cabo en Taiwán y Japón, donde la frecuencia del alelo asociado con el aumento en el riesgo de desarrollar varios tipos de cáncer (alelo Pro), es mayor a la encontrada en nuestro estudio (Wuang *et al.* 1999, Hiyama *et al.* 2002). Estudios previos han informado la existencia de algún grado de diferencia en cuanto a las frecuencias alélicas entre distintos grupos étnicos respecto al polimorfismo del exón 4 del gen *p53* (Shepherd *et al.* 2000).

No se encontró ninguna asociación entre el polimorfismo del codón 72, exón 4 del gen *p53* y el riesgo a desarrollar cáncer gástrico o lesiones leves en la población estudiada. Muy pocos estudios se han llevado a cabo para investigar la relación del polimorfismo del codón 72, exón 4 de *p53* con el cáncer

gástrico, sin embargo algunos de ellos han informado una asociación de dicho polimorfismo con aumento en el riesgo de desarrollar cáncer gástrico, tanto de tipo difuso como de tipo intestinal (Hiyama *et al.* 2002, Shen *et al.* 2004, Xi *et al.* 2004). Asimismo, se ha sugerido que la presencia del alelo Arg en este polimorfismo podría tener relación con el aumento en la sobrevivencia de pacientes con cáncer gástrico (Zhang *et al.* 2003, Zhang *et al.* 2004). Sin embargo, otros estudios no han encontrado asociación de dicho polimorfismo con el riesgo desarrollar esta enfermedad (Shepherd *et al.* 2000, Wu *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2004). Por lo tanto, no está claro el papel que podría estar jugando el polimorfismo del codón 72, exón 4 del gen *p53* en el desarrollo de cáncer gástrico.

Se sabe que el cambio de arginina (Arg) por prolina (Pro) en el codón 72 de la proteína *p53* tiene efecto sobre la inducción de apoptosis y la activación de la transcripción (Thomas *et al.* 1999), sin embargo existen también otros polimorfismos en este gen, los cuales podrían estar relacionados con el aumento en el riesgo de cáncer gástrico (Shepherd *et al.* 2000). Asimismo, en el tejido transformado del cáncer gástrico se han encontrado una serie de mutaciones *de novo* en el gen *p53* (Hsieh *et al.* 1996, Tolbert *et al.* 1999, Shepherd *et al.* 2000). Muchas de estas mutaciones ocurren en las diferentes etapas del proceso neoplásico, por lo que algunas podrían tener un mayor efecto en el desarrollo tumoral que los polimorfismos de línea germinal existentes.

El cáncer gástrico es una enfermedad de etiología compleja y multifactorial. Muchos

son los factores que han sido involucrados con aumento en el riesgo de desarrollar la enfermedad, desconocemos el peso que puede tener cada uno de ellos sobre el desarrollo de la enfermedad y sus efectos sobre los diferentes grupos étnicos y regiones geográficas. Existen otros genes polimórficos que han sido asociados con el riesgo de desarrollar cáncer gástrico, como por ejemplo genes que codifican interleucinas proinflamatorias y antiinflamatorias involucradas en la respuesta del hospedero ante la infección por *H. pylori*, (El-Omar *et al.* 2000, El-Omar *et al.* 2003). Asimismo, polimorfismos de genes relacionados con el metabolismo de sustancias carcinogénicas podrían estar relacionados con el desarrollo del cáncer gástrico (González *et al.* 2004).

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue realizada con ayuda económica de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (N° proyecto: 742-A2-142), el Ministerio de Ciencia y Tecnología de Costa Rica, el Consejo Nacional para Investigaciones Científicas Tecnológicas (CONICIT) y la Organización Panamericana de la Salud, y el Centro de Cooperación Científica de la Embajada de Francia. Agradecemos al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) y al Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) por la donación de equipo de laboratorio.

RESUMEN

El cáncer gástrico es la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo. Varios factores han sido asociados con el riesgo de llegar a desarrollarlo, entre ellos la predisposición genética. El gen *p53* presenta un polimorfismo en el codón 72, el cual ha sido asociado con un mayor riesgo de desarrollar varios tipos de cáncer entre ellos el gástrico. El objetivo de este estudio fue determinar la asociación del polimorfismo localizado en el codón 72 del gen *p53* con el riesgo de cáncer gástrico y lesiones gástricas leves en una población de alto riesgo de Costa Rica. El análisis del

polimorfismo se llevó a cabo mediante PCR-RFLP, en una muestra de 58 pacientes de cáncer gástrico, 99 personas controles y 41 individuos clasificados como grupos I y II de acuerdo con la clasificación histológica japonesa. No se determinó asociación del polimorfismo del codón 72 de *p53* con el riesgo de cáncer gástrico, ni de lesiones gástricas leves en la muestra estudiada. Con base en este estudio y otros que han investigado el polimorfismo del codón 72 del gen *p53*, no está claro el papel que podría estar jugando dicho polimorfismo en el desarrollo de cáncer gástrico. Mutaciones *de novo* en el gen *p53* producidas durante el desarrollo neoplásico de la enfermedad podrían tener un mayor efecto que polimorfismos de línea germinal de este mismo gen. Existen otros genes polimórficos que también se han asociado con el riesgo de desarrollar cáncer gástrico.

REFERENCIAS

- Correa, P. 1992. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process First American Cancer Society Award Lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Res.* 52: 6735-6740.
- Correa, P. 2003. Bacterial infections as a cause of cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 95: E3.
- El-Omar, E., M. Carrington, W. Chow, K. McColl, J. Bream, H. Young, J. Herrera, J. Lissouska, C. Yuan, N. Rothman, G. Lanyon, M. Martin, J. Fraumeni & C. Rabkin. 2000. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 404: 398-406 (corrección publicada en *Nature* 2001; 412: 99).
- El-Omar, E., C. Rabkin, M. Gammon, T. Vaughan, H. Risch, J. Schroenberg, J. Stanford, S. Mayne, J. Goedert, W. Blot, J. Fraumeni Jr & W. Chow. 2003. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with pro-inflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology* 124: 1193-1201.
- Fan, R., M. Wu, D. Miller, J. Wain, K. Kelsey, J. Weincke & D. Chistiani. 2000. The *p53* codon 72 polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9: 1037-1042.
- González, A., V. Ramírez, P. Cuenca & R. Sierra. 2004. Polimorfismos en los genes de desintoxicación CYP1A1, CYP2E1, GSTT1 y GSTM1 en la susceptibilidad al cáncer gástrico. *Rev. Biol. Trop.* 52: 591-600.
- Hiyama, T., S. Tanaka, Y. Kitadai, M. Ito, M. Sumii, M. Yoshihara, F. Shimamoto, K. Haruma & K. Chayama. 2002. *p53* codon polymorphism in gastric

- cancer susceptibility in patients with *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis. *Int. J. Cancer* 100: 304-308.
- Hsieh, L.L., J.T. Hsieh, L.Y. Wang, C.Y. Fang, S.H. Chang & T.C. Chen. 1996. p53 mutations in gastric cancer from Taiwan. *Cancer Lett.* 100: 107-113.
- Huang, J.Q., G.F. Zheng, K. Sumanac, E.J. Irvine & R. Hunt. 2003. Meta-analysis of the relationship between *cagA* seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology* 125: 1636-1644.
- Japanese Research Society for Gastric Cancer. 1995. Japanese classification of gastric carcinoma. Tokyo, Japan. 103 p.
- Kuipers, E.J. 1999. Review article: exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 13: 3-11.
- Levine, A. 1992. The p53 tumor-suppressor gene. *N. Engl. J. Med.* 326: 1350-1352.
- Levine, A. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331.
- Morera-Brenes, B., R. Sierra, R. Barrantes, J. Jonasson & C. Nord. 1994. *Helicobacter pylori* in a Costa Rican dyspeptic patient population. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13: 253-257.
- Parkin, M., F. Bray & S. Devesa. 2001. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Europ. J. Cancer* 37: S4-S66.
- Pérez-Pérez, G.I., B.M. Dworkin, J.E. Chodos & M.J. Blaser. 1998. *Campylobacter pylori* antibodies in humans. *Ann. Intern. Med.* 109: 11-17.
- Shepherd, T., D. Tolbert, J. Benedetti, J. MacDonald, G. Stemmermann, J. Wiest, G. DeVoe, M. Miller, J. Wang, A. Noffsinger & C. Fenoglio-Preiser. 2000. Alterations in exon 4 of the p53 gene in gastric carcinoma. *Gastroenterology* 118: 1039-1044.
- Shen, H., A. Solari, X. Wang, Z. Zhang, Y. Xu, L. Wang, X. Hu, J. Guo & Q. Wei. 2004. P53 codon 72 polymorphism and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Oncol. Rep.* 11: 1115-1120.
- Sierra, R., D. Maxwell & G. Muñoz. 1989. Cancer in Costa Rica. *Cancer Res.* 49: 717-724.
- Sierra, R., N. Muñoz, A.S. Peña, I. Biemond, W. van Duijn, C.B.H.U. Lamers, S. Teuchmann, S. Hernandez & P. Correa. 1992. Antibodies to *Helicobacter pylori* and pepsinogen levels in children from Costa Rica: comparison of two areas with different risks for stomach cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1: 449-454.
- Sierra, R., P. Salas, F. Mora-Zuñiga, M. Sanabria, A. Chinnock, S. Peña, E. Quirós, W. Mora, F. Mena, R. Altman & N. Muñoz. 1998. Erradicación de *Helicobacter pylori* en una población de alto riesgo de cáncer gástrico. *Acta Med. Costarric.* 40: 30-35.
- Sierra, R., H. Ohshima, N. Muñoz, N. Teuchmann, A.S. Peña, C. Malaveille, B. Pignatelli, A. Chinnock, F. El Ghissassi, C. Chen, A. Hautefeuille, C. Gamboa & H. Bartsch. 1991. Exposure to N-nitrosamines and other risk factors for gastric cancer in Costa Rican children. *In* Relevance to human cancer of N-nitroso compounds, tobacco smoke and mycotoxins. L.K. O'Neill, J. Chen & H. Bartsch (eds.). International Agency for Research on Cancer (IARC). Lyon, France.
- Thomas, M., A. Kalita, S. Labrecque, D. Pim, L. Banks & G. Matlasewski. 1999. Two polymorphic variants of wild type p53 differ biochemically and biologically. *Mol. Cell. Biol.* 19: 1092-1100.
- Tolbert, D., C. Fenoglio-Preiser, A. Noffsinger, G. De Voe & J. MacDonald. 1999. The relation of p53 gene mutations to gastric cancer subsite and phenotype. *Cancer Causes Control* 10: 227-231.
- Vogelstein, B., D. Lane & A. Levine. 2000. Surfing the p53 network. *Nature* 408: 307-310.
- Walker, K. & A. Levine. 1996. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 15335-15340.
- Wang, Y.C., C.Y. Chen, S.K. Chen, Y.Y. Chang & P. Lin. 1999. p53 codon 72 polymorphism in Taiwanese lung cancer patients: Association with lung cancer susceptibility and prognosis. *Clin. Cancer Res.* 5: 129-134.
- Xi, Y.G., K.Y. Ding, X.L. Su, D.F. Chen, W.C. You, Y. Shen & Y. Ke. 2004. p53 polymorphism and p21^{WAF1/CIP1} haplotype in the intestinal gastric cancer and precancerous lesions. *Carcinogenesis* 25: 2201-2206.
- Yasui, W., N. Oue, H. Kuniyasu, R. Ito, R. Tahara & H. Yokozaki. 2001. Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. *Gastric Cancer* 4: 113-121.
- Zhang, Z.W., N. Laurence, A. Hollowood, P. Newcomb, M. Moorghen, J. Gupta, R. Feakins, M. Farthing, D. Alderson & J. Holly. 2004. Prognostic value of TP53 codon 72 polymorphism in advanced gastric adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 10: 131-135.

Zhang, Z.W., P. Newcomb, A. Hollowood, R. Feakins, M. Moorghen, A. Storey, M. Farthing, D. Alderson & J. Holly. 2003. Age-associated increase of codon 72 arginine p53 frequency in gastric cardia and non-cardia adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* 9: 2151-2156.

Zhang, Z.W., P. Newcomb, A. Hollowood, Moganaden, J. Gupta, R. Feakins, A. Storey, M. Farthing, D. Alderson & J. Holly. 2004. A comparison study of gastric cancer risk in patients with duodenal and gastric ulcer: roles of gastric mucosal histology and p53 codon 72 polymorphism. *Dig. Dis. Sci.* 49: 254-259.