

ESTUDIO DE LA BASE GENÉTICA DEL ESÓFAGO DE BARRETT

Julio Pérez de la Serna M.D., Ph.D.¹, Antonio Ruiz de León M.D., Ph.D.¹,
Concepción Núñez Ph.D.², Ana G. Vigo Ph.D.²

¹ Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Clínico San Carlos, Madrid.

² Servicio de Inmunología Clínica, Hospital Clínico San Carlos,
Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos, Madrid.

ABSTRACT

Barrett's esophagus (BE) is a premalignant condition characterized by the replacement of stratified squamous epithelium with columnar intestinal metaplasia in esophagus. The clinical relevance of BE comes from the fact that it represents a well-defined precursor lesion of esophageal adenocarcinoma. Several lines of evidence support the existence of genetic determinants involved in BE etiology and it has been postulated that genetic factors controlling the mucosal inflammatory response could affect the individual susceptibility for the development of BE.

Recent studies has been described the association of several polymorphisms of genes related to immune response with BE risk and its progression to adenocarcinoma. However, most of these associations have not been validated in an independent group of patients and controls.

The aim of this study was to provide new information to BE genetic susceptibility. We analyzed genetic polymorphisms previously associated with BE (IL1 Ra +2018, IL10 +1082, IL12B +1188 e IL23R R381Q) and common susceptibility polymorphisms to other inflammatory and autoimmune diseases (PTGER4 rs11957406 y rs17234657, PTPN22 rs4476601, PTPN22 rs2542151 y STAT3 rs1026916). We perform a case-control study including 138 BE patients and 241 healthy subjects. Our results confirm the association of IL23R R381Q (OR=1.95, 95% CI=1.12-3.39, p=0.01) and IL12B 1188 (OR=1.53, 95% CI=1.04-2.25, p=0.02) with BE susceptibility and suggest a possible association of PTGER4 rs17234657 (OR=0.60, 95% CI=0.34-1.06, p=0.06).

RESUMEN

El esófago de Barrett (EB) es una condición premaligna en la cual el epitelio escamoso estratificado del esófago distal es reemplazado por metaplasia columnar intestinal. La importancia clínica del EB deriva de su capacidad para evolucionar a adenocarcinoma de esófago (ACE). Diversas evidencias apoyan la existencia de determinantes genéticos implicados en la etiología del EB y se ha postulado que los factores genéticos que controlan la respuesta inflamatoria de las mucosas podrían afectar a la susceptibilidad de un individuo a desarrollar EB.

En los últimos años se ha descrito la asociación de diversas variantes genéticas relacionadas con la respuesta inmune con la aparición del EB

y su progresión a ACE. Sin embargo, la mayoría de estas asociaciones no han sido validadas en un grupo independiente de pacientes y controles. El objetivo de nuestro estudio fue aportar nuevos datos a la genética del EB. Para ello analizamos polimorfismos genéticos previamente asociados a EB (IL1 Ra +2018, IL10 +1082, IL12B +1188 e IL23R R381Q) y polimorfismos de susceptibilidad comunes a diversas patologías con componente inflamatorio y/o autoinmune (PTGER4 rs11957406 y rs17234657, PTPN22 rs4476601, PTPN22 rs2542151 y STAT3 rs1026916), mediante un estudio de asociación caso-control con 138 pacientes con EB y 241 controles sanos.

Nuestros resultados confirman la asociación de los polimorfismos IL23R R381Q (OR=1,95, 95% IC=1,12-3,39, p=0,01) e IL12B 1188 (OR=1,53, 95% IC=1,04-2,25, p=0,02) con la susceptibilidad a desarrollar EB y sugieren la posible asociación del polimorfismo PTGER4 rs17234657 (OR=0,60, 95% IC=0,34-1,06, p=0,06).

PALABRAS CLAVE

Esófago de Barrett, estudios de asociación, polimorfismo.

INTRODUCCIÓN

El esófago de Barrett (EB) es una condición premaligna en la cual el epitelio escamoso estratificado del esófago distal es reemplazado por metaplasia columnar intestinal. Su diagnóstico se basa en la sospecha endoscópica y la confirmación histológica de la metaplasia intestinal⁽¹⁾.

Aunque la prevalencia real del EB es muy difícil de precisar, en los últimos años se ha constatado un marcado aumento del número de casos detectados en endoscopias de rutina en los países occidentales. La prevalencia estimada de EB en pacientes con síntomas de reflujo gastroesofágico (RGE) es de 3-8%, mientras que la de pacientes sometidos a endoscopia por cualquier motivo es del 1%⁽²⁾ y en nuestro medio es del 0.68%⁽³⁾.

La importancia clínica del EB deriva de su capacidad para evolucionar a adenocarcinoma de esófago (ACE). El ACE generalmente se desarrolla a partir del EB siguiendo la secuencia metaplasia-displasia-adenocarcinoma⁽⁴⁾. A pesar de los programas de vigilancia endoscópica la incidencia del ACE también ha aumentado considerablemente durante los últimos 30 años en Nor-

CORRESPONDENCIA: Ana González Vigo

Servicio de Inmunología Clínica, Hospital Clínico San Carlos
c/ Profesor Martín Lago s/n 28040 Madrid
Correo electrónico: anaglezvigo@gmail.com

teamérica y Europa⁽⁵⁾. Se estima que el riesgo de desarrollar ACE en pacientes con EB conocido se sitúa entre el 0,5-1% anual.

El EB se han considerado tradicionalmente una enfermedad adquirida; sin embargo, el hecho de que el aumento de la incidencia del adenocarcinoma de esófago se haya observado especialmente en hombres de un determinado grupo racial y la observación de cierta agregación familiar apoyan actualmente la existencia de determinantes genéticos implicados en la etiología de la enfermedad⁽⁶⁾. El RGE es el factor de riesgo más fuertemente asociado con el desarrollo tanto del EB como del ACE, pero se desconoce la causa por la cual solamente un pequeño grupo de individuos con RGE acaba desarrollando las citadas patologías.

Estudios epidemiológicos y experimentales han puesto de manifiesto el importante papel de la inflamación crónica en la carcinogénesis⁽⁷⁾. Un estudio reciente ha demostrado como la activación de la vía IL6-STAT3 en líneas celulares epiteliales transformadas con el fenotipo de EB les hace ser más resistentes a la apoptosis, apoyando la relevancia de la inflamación en la carcinogénesis del EB⁽⁸⁾. En modelos animales se ha observado una asociación entre la gravedad de la inflamación de la mucosa y el desarrollo de EB. Por otro lado, los análisis de expresión génica llevados a cabo en muestras de esófago con metaplasia y de epitelio escamoso de pacientes con EB han mostrado diferencias en la expresión de un grupo de genes funcionalmente relacionados con la respuesta inflamatoria entre los que se encuentran STAT3, IL22R, IL12A e IL6R^(9,10). Por todo ello, se ha postulado que aquellas personas con una predisposición genética a tener respuestas inflamatorias más intensas desarrollarán EB con más facilidad.

Se puede considerar al EB como una condición multifactorial, en la que interactúan diversos factores genéticos y ambientales. Además del RGE, se conocen otros factores que favorecen el desarrollo del EB como son la obesidad, el tabaco, el alcohol, la presencia de hernia de hiato y la ausencia de infección por *Helicobacter pylori*; sin embargo se sabe bastante poco de los factores genéticos que afectan al desarrollo del EB. Al igual que la mayoría de las enfermedades comunes, el EB posee una herencia compleja, en la que existe un número indeterminado de genes que contribuyen con efectos pequeños a la susceptibilidad. La estrategia más común para el estudio de los factores de susceptibilidad en enfermedades con este tipo de herencia es la realización de estudios de asociación caso-control. Dichos estudios buscan relacionar factores genéticos con la enfermedad a través de la comparación de sus frecuencias entre los individuos afectados y los no afectados de una población. Este tipo de estudios ha permitido describir numerosos loci de susceptibilidad a un gran número de enfermedades en los últimos 15 años. Los factores genéticos más utili-

zados son los denominados polimorfismos de un solo nucleótido (SNP del inglés Single Nucleotide Polymorphism). Los SNPs son variaciones de una sola base en la secuencia de ADN que aparecen al menos en el 1% de los individuos de una población. Son la forma más sencilla y más común de variación genética del genoma y se calcula que hay 1,42 millones de SNPs, lo que representa el 0,3% de todo el genoma.

En los últimos años se han descrito varios polimorfismos genéticos asociados a la aparición del EB y su progresión a ACE. Varios de estos polimorfismos se encuentran en genes relacionados con la respuesta inmune y los procesos inflamatorios (IL1-Ra, IL10, IL12B e IL23R)^(11,13). Sin embargo, la mayoría de las asociaciones descritas no han sido validadas en un grupo independiente de pacientes y controles.

OBJETIVO

En este contexto el objetivo general de nuestro estudio fue aportar nuevos datos a la genética del EB por medio de dos estrategias. En primer lugar, intentar replicar algunas de las asociaciones genéticas publicadas previamente en EB, puesto que la replicación de estudios caso-control es fundamental para confirmar la asociación encontrada. En segundo lugar, identificar nuevas asociaciones estudiando polimorfismos funcionales en genes relacionados con la respuesta inmune e inflamatoria, que están asociados a otras patologías con componente inflamatorio, alguno de los cuales había mostrado una expresión modificada en biopsias extraídas de individuos con EB.

MATERIAL Y MÉTODOS

El grupo de estudio consistió en 138 pacientes diagnosticados de EB en el servicio de Aparato Digestivo del Hospital Clínico San Carlos de Madrid entre el año 2000 y el 2011. El diagnóstico se realizó en todos los casos después del examen histopatológico de las biopsias obtenidas mediante endoscopia. El grupo control estuvo formado por 241 voluntarios sin ninguna enfermedad de base inmunológica ni esofágica, no relacionados entre sí y pareados por edad y sexo con el grupo de pacientes. Todos los participantes fueron españoles de etnia caucásica y firmaron un consentimiento informado antes de ser incluidos en el estudio. Las principales características epidemiológicas y clínicas de los pacientes analizados se muestran en la **Tabla I**.

El ADN se obtuvo a partir de sangre periférica mediante precipitación fraccionada tras digestión con proteinasa K. Posteriormente se valoró su concentración y pureza y se elaboraron las diluciones de trabajo a 10 ng/ μ l.

El genotipado de los SNPs, se llevó a cabo mediante tecnología TaqMan (Applied Biosystems) en el aparato de PCR cuantitativa HT7900. Los polimorfismos previa-

TABLA I.-

PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON ESÓFAGO DE BARRETT INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

PACIENTES CON EB n= 138	
Edad media (años)	55
Sexo (hombres)	107 (77%)
Adenocarcinoma	12 (9%)
Displasia de alto grado	26 (19%)
Displasia de bajo grado	17 (12%)
Hernial hiatal	88 (64%)

mente asociados a EB que fueron analizados en nuestras muestras fueron: IL1 Ra +2018 (rs419598), IL10 +1082 (rs1800896), IL12B +1188 (rs3212227) e IL23R R381Q (rs11209026). Todos estos SNPs son polimorfismos funcionales, es decir, se sabe que afectan directamente a la expresión o a la funcionalidad de la proteína codificada por cada uno de los genes. Todos ellos se asocian a una o varias enfermedades con un importante componente inflamatorio y al EB, pero no han sido replicadas en otras poblaciones.

Adicionalmente se analizaron los polimorfismos rs11957406 y rs17234657 de la región 5p13, cercana al gen que codifica uno de los 4 receptores de la prostaglandina E2 (PTGER4); los rs4476601 y rs2542151 de los genes PTPN22 y PTPN2 respectivamente, que codifican proteínas tirosina fosfatasa implicadas en vías de señalización de los linfocitos T; y el rs1026916 del gen STAT3, que codifica un factor de transcripción que induce la expresión de varios genes y tiene un papel fundamental en la regulación de los diferentes subtipos de linfocitos.

Para cada uno de los marcadores estudiados se verificó que la distribución de genotipos se ajustaba a las proporciones del equilibrio Hardy-Weinberg. Todos los datos obtenidos en los estudios genéticos se recogieron en una base de datos Access de Microsoft a la que se incorporaron todas las variables clínicas relevantes. Los análisis estadísticos necesarios se realizaron volcando los datos en el programa estadístico SPSS v.15. Para el análisis de los SNPs se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas, tanto en el grupo de enfermos como en el grupo control de referencia. La comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas se llevó a cabo mediante el test chi-cuadrado.

RESULTADOS

Las frecuencias genotípicas de todos los polimorfismos analizados no se desviaron significativamente de

las proporciones esperadas según el equilibrio Hardy-Weinberg en los individuos control.

Las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos analizados se muestran en las Tablas II y III. Dentro del estudio de las variantes previamente asocia-

TABLA II.-

FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS EN PACIENTES Y CONTROLES DE LOS POLIMORFISMOS ESTUDIADOS DENTRO DEL ANÁLISIS DE REPLICACIÓN

	ESÓFAGO DE BARRETT		CONTROLES	
	N	%	N	%
IL23R rs11209026				
Genotipos				
GG	108	78	208	87
GA	28	20	30	13
AA	2	1	0	0
Alelos				
G	244	88	446	94
A	32	12	30	6
IL10 rs1800896				
Genotipos				
GG	45	33	81	37
GA	68	49	108	49
AA	25	18	31	14
Alelos				
G	158	57	270	61
A	118	43	170	39
IL12B rs3212227				
AA	75	57	149	67
CA	49	37	71	32
CC	8	6	4	2
Alelos				
A	199	75	369	82
C	65	25	75	18
IL1Ra rs419598				
TT	59	43	109	52
TC	58	45	82	39
CC	15	12	18	9
Alelos				
T	170	66	300	72
C	88	34	118	28

TABLA III.-

**FRECUENCIAS GENOTÍPICAS Y ALÉLICAS
EN PACIENTES Y CONTROLES DE
LOS POLIMORFISMOS ANALIZADOS
EN GENES CANDIDATOS**

	ESÓFAGO DE BARRETT		CONTROLES	
	N	%	N	%
PTGER4				
rs17234657				
Genotipos				
TT	115	83	180	75
TG	20	14	58	24
GG	3	2	2	1
Alelos				
T	250	91	418	87
G	26	9	62	13
STAT3				
rs10226916				
Genotipos				
GG	54	43	75	37
GA	53	42	102	50
AA	20	16	27	13
Alelos				
G	161	63	252	62
A	93	37	156	38
PTPN22				
rs2476601				
Genotipos				
GG	93	84	146	88
GA	18	16	19	11
AA	0	0	1	1
Alelos				
G	204	92	311	94
A	18	8	21	6
PTPN2				
rs2542151				
Genotipos				
TT	91	80	126	74
TG	21	18	40	23
GG	2	2	5	3
Alelos				
T	203	89	292	85
G	25	11	50	15

das a que quisimos replicar, observamos diferencias significativas entre el grupo de pacientes y controles en las

frecuencias alélicas de los polimorfismos de los genes IL23R e IL12B. El alelo A del polimorfismo R381Q del gen IL23R se encontró significativamente aumentado en los pacientes respecto a los controles (OR=1,95, 95% IC=1,12-3,39, p=0,01); al igual que se observó con el alelo A del polimorfismo 1188 del gen IL12B (OR=1,53, 95% IC=1,04-2,25, p=0,02).

Con respecto a los polimorfismos estudiados por primera vez en relación a su posible asociación con el riesgo de EB, ninguna comparación de las frecuencias genotípicas y alélicas superó el umbral de significación estadística. Sin embargo, observamos una tendencia a la asociación (es decir, una importante diferencia, pero no estadísticamente significativa), al analizar el rs17234657 cercano al gen PTGER4. La frecuencia de los portadores del alelo G fue superior en los pacientes que en los controles (OR=0,60, 95% IC=0,34-1,06, p=0,06).

DISCUSIÓN

Estudios publicados anteriormente han sugerido la posible asociación de varios genes relacionados con la respuesta inmune e inflamatoria con la susceptibilidad a desarrollar EB y ACE⁽¹¹⁻¹³⁾. Nuestros resultados validan la asociación entre los polimorfismos IL23R R381Q e IL12B 1188 y el riesgo de desarrollar esófago de Barrett.

La IL-12 y la IL-23 son citoquinas heterodiméricas que presentan una subunidad común, p40, codificada por el gen IL12B. Además, los receptores de ambas citoquinas presentan también una subunidad específica y una común a ambos. El gen IL23R codifica la subunidad específica del receptor de IL-23. Tanto la IL-12 como la IL-23 fundamentales en la regulación de la respuesta inmune. Se ha demostrado que la IL-23 tiene un papel crítico en el desarrollo de un gran número de enfermedades inflamatorias crónicas fundamentalmente a través de la activación y proliferación de los linfocitos Th17 (14, 15). Por el contrario, la IL-12 induce la diferenciación de células Th1 las cuales a través del INF α activan respuestas inmunes anti-tumorales al mismo tiempo que inhiben procesos inflamatorios. Las asociaciones descritas sugieren que la alteración de la expresión de receptor IL-23R y de las IL-23 y/o IL-12 podrían tener un papel importante en el mantenimiento de la inflamación que subyace al desarrollo del EB.

Adicionalmente, nuestros resultados sugieren una posible asociación entre el esófago de Barrett y el polimorfismo rs17234657 situado en la región 5' del gen PTGER4. Esta posible asociación debe ser confirmada en una muestra independiente. Sin embargo, es interesante mencionar que el gen PTGER4 codifica uno de los 4 subtipos de receptores de la prostaglandina E2, el receptor EP4. La PGE2 producida durante los procesos inflamatorios está directamente relacionada con la producción de IL-23 por las células dendríticas, así como con el proceso de diferenciación de los linfocitos Th17 mediado

por la IL-23 y la diferenciación de los linfocitos Th1 promovida por la IL-12 (16).

Estos resultados sugieren que puesto que el EB comparte factores genéticos de susceptibilidad con otras enfermedades de carácter inflamatorio, es posible que la etiopatogenia del EB comparta también vías moleculares comunes con dichas enfermedades. Finalmente, es importante mencionar que los estudios de asociación, especialmente los estudios de barrido genómico a gran escala, han permitido en los últimos años identificar decenas de genes asociados a diferentes enfermedades complejas. Este mejor conocimiento de la base genética de las enfermedades ha permitido avanzar también en el conocimiento de su etiopatogenia y ha impulsado en algunos casos el desarrollo de fármacos más específicos. En el futuro, la genética podría contribuir al diagnóstico del EB y a la identificación de grupos de riesgo, mejorando así las estrategias de seguimiento y tratamiento, algo que es de vital importancia en los pacientes con EB.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wang KK, Sampliner RE. Updated guidelines 2008 for the diagnosis, surveillance and therapy of Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2008; 103 (3):788-97.
2. Cameron AJ, Lomboy CT. Barrett's esophagus: age, prevalence, and extent of columnar epithelium. *Gastroenterology* 1992; 103:1241-5
3. Ruiz de León A, Fernández Díez S, García Sanchez R et al. Changing incidence of GERD complications in the period. *Gut* 2007; 56 (Suppl III) A :220.
4. El-Serag HB. The epidemic of esophageal adenocarcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 2002; 31 (2): 421-40.
5. Murray L, Watson P, Johnston B, Sloan J, Mainie IM, Gavin A. Risk of adenocarcinoma in Barrett's oesophagus population based study. *BMJ* 2003; 327 (7414):534-5.
6. Juhasz A, Mittal SK, Lee TH, Deng C, Chak A, Lynch HT. Prevalence of Barrett esophagus in first-degree relatives of patients with esophageal adenocarcinoma. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45 (10):867-71.
7. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer related inflammation. *Nature* 2008; 454 (7203):436-44.
8. Zhang HY, Zhang Q, Zhang X, Yu C, Cheng E, Wang DH et al. Cancer-related inflammation and Barrett's carcinogenesis: interleukin-6 and STAT3 mediate apoptotic resistance in transformed Barrett's cells. *Am J Gastrointest Liver Physiol* 2001; 300(3):G454-60.
9. Wang J, Qin R, Ma Y, Wu H, Peters H, Tyska M, Shaheen NJ, Chen X. Differential gene expression in normal esophagus and Barrett's esophagus. *J Gastroenterol* 2009; 44 (9): 897-911
10. Ostrowski J, Mikula M, Karczmarski J, Rubel T, Wyrwicz LS, Bragoszewski P, Gaj P, Dadlez M, Butruk E, Regula J. Molecular defense mechanisms of Barrett's metaplasia estimated by an integrative genomics. *J Mol Med* 2007; 85(7):733-43.
11. Moons LM, Kusters JG, van Delft JH et al. A proinflammatory genotype predisposes to Barrett's esophagus. *Carcinogenesis* 2008; 29:926-31.
12. Gough MB, Ackroyd R, Majeed A, Bird N. Prediction of malignant potencial in reflux disease: are cytokine polymorphisms important? *Am J Gastroenterol* 2005; 100:1012-8.
13. Moons LM, Kuipers EJ, Rygiel AM et al. COX-2 CA-haplotype is a risk factor for the development of esophageal adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 2007; 102 (11):2373-9.
14. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441:235-8.
15. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007; 8: 950-7.
16. Chizzolini C, Brembilla N. Prostaglandin E2: igniting the fire. *Immunology and Cell Biology* 2009; 87:510-1.