

Estudio de la asociación del polimorfismo de la región 8q24 y el adenocarcinoma gástrico

Luis Labrador, Lakshmi Santiago, Keila Torres
Laboratorio de Genética Molecular “Dr. Jorge Yunis-Turbay”
Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”
luis.labrador@ucla.edu.ve
Venezuela

Elvis Valderrama
Servicio de Anatomía Patológica
Hospital Central “Antonio María Pineda”
Venezuela

Miguel Chiurillo
Laboratorio de Genética Molecular “
Dr. Jorge Yunis-Turbay”
Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”
mchiurillo@ucla.edu.ve
Venezuela

Fecha de recepción: 09 - 09 - 2015 Fecha de aceptación: 22- 10- 2015

Resumen

El adenocarcinoma gástrico es una de las principales causas de muerte en el mundo y en el estado Lara ocupa la segunda causa de muerte por neoplasias malignas. En el transcurso de las últimas décadas, la investigación molecular ha ofrecido detalles sobre anormalidades genéticas y epigenéticas relacionadas con la transformación maligna y progresión en el cáncer gástrico (CG). Recientemente ha sido descrita la asociación entre variantes de la región 8q24 y cáncer de mama, próstata, estómago

y colorrectal. En este proyecto evaluamos la asociación del polimorfismo de nucleótido único rs6983267 (G/T) de la región cromosómica 8q24 con el riesgo a desarrollar CG en individuos del Centro-Occidente del país. Se realizó un estudio caso-control empleando biopsias de archivo incluidas en parafina, 101 muestras de CG y como control 101 muestras de gastritis crónica (GCr). Previamente hubo confirmación del diagnóstico histopatológico. Posterior a la extracción del ADN de las muestras, se procedió al análisis del polimorfismo

por PCRRFLP empleando la enzima de restricción HpyCH4IV. Los genotipos más prevalentes para CG y GCr fueron GG (39,6 %) y GT (46,5%), respectivamente. En ambos grupos de muestras predominó el alelo G con 58,4 % para CG y 61,9 % para GCr. No se encontraron diferencias significativas en las frecuencias genotípicas y alélicas entre ambos grupos.

Palabras clave: cáncer gástrico; polimorfismos genéticos; rs6983267; región 8q24

Study Of The Association Of Polymorphism Of The Region 8Q24 And Gastric Adenocarcinoma

Abstract

Gastric adenocarcinoma is one of the leading causes of death in the world and in the Lara State it is the second leading cause of death from malignant neoplasms. Over the past few decades, molecular research has provided details of genetic and epigenetic abnormalities related to malignant transformation and progression in gastric cancer (GC). Recently, the association between variants of the 8q24 region and breast, prostate, stomach and colorectal cancer

has been described. In this project we evaluated the association of single nucleotide polymorphism rs6983267 (G/T) of the 8q24 chromosome region with the risk of developing CG in individuals from the Center-West of the country. A case-control study was carried out using archival biopsies included in kerosene, 101 GC samples and as control 101 chronic gastritis samples (GCr). Previously there was confirmation of the histopathological diagnosis. After DNA extraction from the samples, PCRFLP polymorphism analysis was

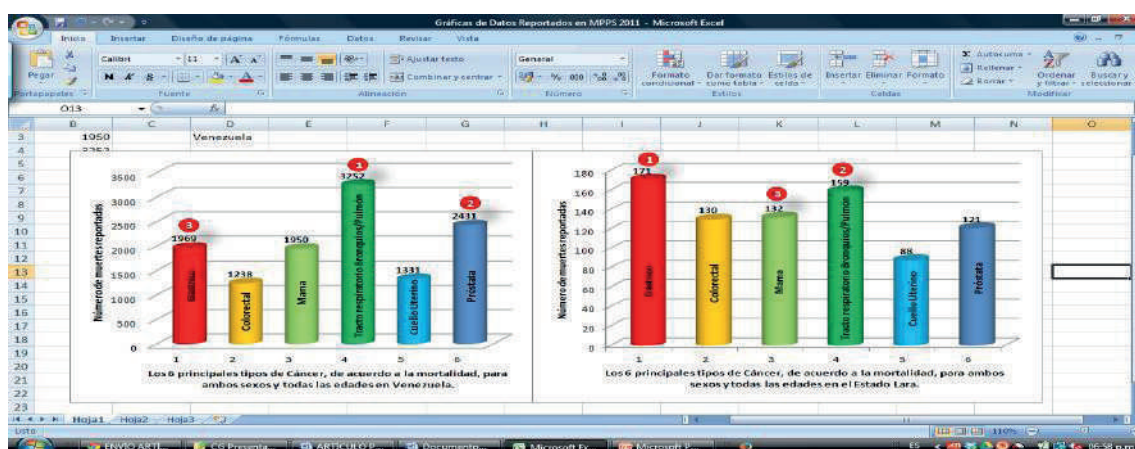
performed using HpyCH4IV restriction enzyme. The most prevalent genotypes for GC and GCr were GG (39.6%) and GT (46.5%), respectively. In both groups of samples the G allele was predominant with 58.4% for GC and 61.9% for GCr. No significant differences in genotypic and allelic frequencies were found between both groups.

Key words: gastric cancer; genetic polymorphisms; rs6983267; 8q24 region

Introducción

El cáncer gástrico (CG) representa un muy importante problema de salud pública, es la segunda neoplasia maligna más fatal en todo el mundo (luego del cáncer de pulmón) y cobra aproximadamente unas 740.000 muertes en el año 2011 (OMS). Su tendencia, sin embargo, es al descenso (Ferrari y Moura, 2013). En Venezuela el CG ocupa el tercer lugar como causa de muerte por neoplasias malignas (MPPS), mientras que en el estado Lara representa la primera causa de muerte por neoplasia (MPPS) (figura 1).

Figura 1. Mortalidad por cáncer gástrico en Venezuela (A) y en el estado Lara (B), reportados en el Anuario de Mortalidad publicado por el Ministerio del Poder Popular para la Salud en el 2011



En la última década, se ha ganado mucho en el descubrimiento de las bases moleculares de la transformación maligna del estómago. La dramática variación en la incidencia del CG en diferentes áreas geográficas y de una generación a la siguiente ha llevado a la hipótesis de que la incidencia del mismo es determinada en forma importante por factores ambientales antes que genéticos.

Más del 70 % de los casos de cáncer de estómago (714 000 casos) ocurren en países en desarrollo, de los cuales 467.000 son hombres y 247.000 mujeres, lo que muestra una correlación del desarrollo y progresión de la enfermedad con el sexo. Las tasas de incidencia

estandarizadas por edad son alrededor de dos veces mayor en hombres que en mujeres (Ferlay *et al.*, 2010).

No obstante, como en la mayoría de las neoplasias malignas, la etiología del CG es multifactorial y probablemente involucra la acción de genes en varios niveles, lo que es común en el proceso de múltiples pasos de la carcinogénesis. Los efectos genéticos consisten de factores heredables que predisponen al CG, incluyendo mutaciones germinales de genes de alta penetración directamente asociados con síndromes de CG hereditarios o familiares, y polimorfismos genéticos que indirectamente afectan la susceptibilidad al CG después de la

exposición a carcinógenos o a la infección por *Helicobacter pylori* (Ferrari y Moura, 2013; Lichtenstein *et al.*, 2000).

El CG es un modelo interesante para estudiar tumorigénesis debido a que representa una condición heterogénea. Histológicamente es dividido en dos tipos de adenocarcinoma, según la clasificación de Laurén (1965): bien diferenciado (intestinal) y pobremente diferenciado (difuso). Según esta clasificación, el tipo intestinal es el CG predominante en las áreas de alto riesgo y está asociado por lo general con lesiones precursoras, tales como gastritis crónica y metaplasia intestinal. Estas afectan las regiones distales

del estómago y en pacientes de mayor edad la dispersión hematogénica puede llevar a lesiones secundarias; la más común es la metástasis hepática (Laurén y Nevalainen, 1993). Por otra parte, el CG de tipo difuso no está asociado usualmente con lesiones precursoras. Los pacientes son más jóvenes y el tumor tiene un patrón inicial de crecimiento local infiltrativo; son detectadas metástasis peritoneales y linfáticas (Laurén y Nevalainen, 1993).

El catálogo de alteraciones genéticas en el CG está en rápido aumento producto de los resultados de estudios de asociación que emplean la información del Proyecto Genoma Humano y de las iniciativas de secuenciación de genomas de individuos de diverso origen étnico. Ejemplos de genes candidatos recientemente involucrados en la patogénesis del CG incluyen algunos participantes en proliferación, diferenciación y supervivencia celular MUC1, PLCE1, PTGER4, PRKAA1, ZBTB20, prostate stem cell antigen (PSCA), genes participantes en rutas de señalización (EGFR y FAS) y rutas de reparación del ADN. De la misma manera, las regiones cromosomales 9p21.3 y 10q23 han sido identificadas como loci de susceptibilidad genética a CG (Chiurillo, 2014). La inestabilidad de microsatélites, por ejemplo, en genes que participan en la reparación de errores en el apareamiento de bases, han sido involucrados con el desarrollo de CG (Jang y Kim, 2011).

Por otra parte, se ha evidenciado que cambios epigenéticos están profundamente implicados en el inicio y desarrollo del CG (Ali *et al.*, 2013). Estas incluyen expresión reducida por

hipermetilación de la región promotora de genes supresores de tumor y oncogenes, desacetilación de histonas y cambios en la expresión de microARNs (Ali *et al.*, 2013; Figueiredo *et al.*, 2013).

En la actualidad, ha sido descrita la asociación entre variantes de 8q24 y cáncer de mama, próstata y colorrectal por varios grupos de investigadores (Terada *et al.*, 2008; Pomerantz *et al.*, 2009; Bertucci *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014). Varios estudios han señalado a los polimorfismos de nucleótido único (SNP) rs6983267 y rs1447295 como factores de riesgo genético independiente para cáncer colorrectal y de próstata, respectivamente (Tomlinson *et al.*, 2007; Zanke *et al.*, 2007; Terada *et al.*, 2008; Pomerantz *et al.*, 2009; Bensen *et al.*, 2013). Sin embargo, existe solo un reporte en el cual se evalúa la asociación entre un polimorfismo de 8q24 (rs6983267) y CG en pacientes chinos (Guo *et al.*, 2011).

El papel funcional de los genes ubicados en región cromosomal 8q24 y de los polimorfismos genéticos descritos aún no ha sido completamente dilucidado. Sin embargo, ha sido reportado, por ejemplo, que el polimorfismo rs6983267 determina un potenciador transcripcional que incrementa la actividad del protooncogen *MYC* en cáncer colorrectal al interactúa con el factor transcripcional TCF7L2 (Pomerantz *et al.*, 2009). Estudios de asociación de polimorfismos de la región cromosomal 8q24 con otros tipos de cáncer lucen pertinentes debido a la fuerte correlación descrita hasta ahora para cáncer de próstata y colorrectal.

Conocer o evaluar algunos de los aspectos moleculares involucrados en la predisposición y oncogénesis del CG en la población del estado Lara, donde esta enfermedad constituye la primera causa de muerte por neoplasia, permitiría aclarar un panorama preliminar de marcadores moleculares potencialmente utilizables para un diagnóstico de susceptibilidad o temprano de CG en esta área del país. Esto ayudaría a establecer diferencias y/o similitudes con otros grupos poblacionales donde el CG presenta también una elevada prevalencia. Recientemente, nuestro laboratorio ha estado involucrado en la evaluación molecular del CG en pacientes de la región Centroccidental de Venezuela, estudiando polimorfismos genéticos humanos (locus de IL-1, y p53) y variantes de factores de virulencia de *H. pylori* (Cañas *et al.*, 2009a y b; Chiurillo *et al.*, 2010; 2011; 2013; Torres *et al.* 2013; Chiurillo *et al.*, 2014).

Dados los pocos estudios realizados entre polimorfismos de la región cromosómica 8q24, su asociación con el CG encontrada en otras poblaciones, la alta incidencia del adenocarcinoma en el estado Lara y al ser Venezuela un país multiétnico, consideramos importante explorar la asociación de variantes alélicas de la región 8q24 con el riesgo a desarrollar cáncer gástrico en pacientes de la región Centroccidental de Venezuela.

Materiales y métodos

Material biológico

Se seleccionaron 202 biopsias de archivo incluidas en parafina del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital

Antonio María Pineda (HAMP) del estado Lara, Venezuela, procedentes de individuos de ambos sexos. De estas, 101 muestras corresponden a pacientes con gastritis crónica (GCr), las cuales fueron empleadas como control, y 101 proceden de pacientes con cáncer gástrico (CG). Ambos grupos fueron pareados por edad.

El diagnóstico histopatológico fue confirmado por un médico especialista en anatomía patológica. Para el caso de las muestras de CG también se clasificaron según al grado de diferenciación del tumor: poco, moderado y bien diferenciado.

Extracción de ADN

El ADN genómico fue extraído a partir de 3-6 cortes (3 µm) por micrótopo de las biopsias empleando el *DNeasyTissue Kit* (QIAGEN) y siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Los cortes fueron desparafinados previamente con Xilol, lavados con etanol 99 % y, por último, secados a 37 °C. La concentración del ADN fue estimada por espectrofotometría a 260/280 nm empleando un equipo GeneQuantpro (Amersham-Pharmacia).

El ADN extraído de las biopsias fue almacenado a -20 °C en el Laboratorio de Genética Molecular “Dr. Jorge Yunis-Turbay” del Decanato de Ciencias de la Salud-UCLA.

Análisis del SNP rs6983267

El análisis del SNP rs6983267 en la región 8q24 se realizó mediante la técnica de PCR-RFLP empleando

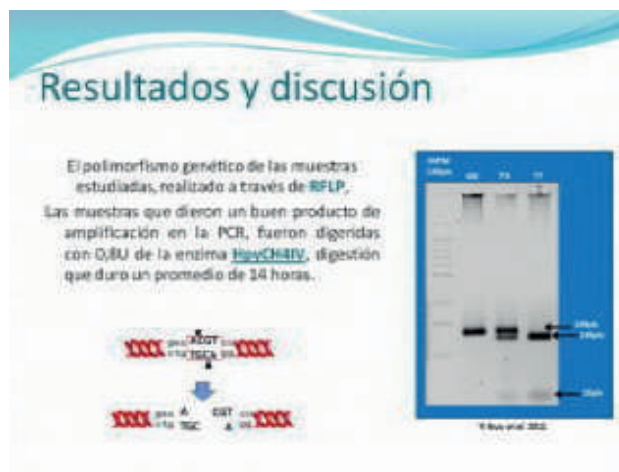
para la reacción de PCR los cebadores reportados por Terada *et al.*, (2008) 267Fw: 5'-CTTTGAGCTCAGCAGA TGAACG-3' y 267Rv: 5'-CCCA ATCCTGAGAACTTGC-3', que permiten la amplificación de un fragmento de 159 pb. La constitución de la mezcla de reacción fue: Buffer 1X, 2 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 1 µM de cada cebador, 10 ng de ADN, 1,25 U de GoTaq® flexi ADN polimerasa (Promega) para un volumen final de 25 µL. El método de amplificación empleado constó de una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación constituidos por repeticiones de 30 segundos de desnaturalización a 95 °C, hibridación a 57b°C y extensión a 72 °C. Finalmente, se realizó una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

Los productos de PCR obtenidos, luego de visualizados en electroforesis en gel de agarosa al 2 %, fueron sometidos a digestión con la enzima de restricción HpyCH4IV (New England Biolabs) para la asignación de los alelos del polimorfismo. Los tres primeros nucleótidos del extremo 3' del cebador sentido generan un

sitio de reconocimiento para la enzima de restricción cuando se presenta el alelo T en el fragmento amplificado. En presencia del alelo T se generan dos bandas luego del corte con la enzima HpyCH4IV: 23 y 136 pb (figura 2) (Terada *et al.*, 2008). La reacción de digestión con la enzima de restricción se llevó a cabo en un volumen final de 15 µL conteniendo 0,8 unidades de HpyCH4IV, 1,5 µL buffer de restricción 1X (50 mM acetato de potasio; 20 mM tris-acetato: 10 mM acetato de magnesio; 100 µg/ml BSA) y entre 5 y 10 µL de producto de PCR. La reacción se incubó a 37 °C durante 16 horas. La separación electroforética de los fragmentos de restricción se realizó en geles de agarosa al 3 %.

Todas las electroforesis se realizaron empleando como buffer de corrida TAE 1X (40 mM de tris- acetato, 1 mM de EDTA). Al finalizar la corrida electroforética, se tiñeron los geles con bromuro de etidio (1 mg/mL) y se visualizaron las bandas de ADN con luz ultravioleta empleando un sistema Gel Logic 200 (Kodak). Las imágenes fueron procesadas y analizadas mediante el programa Molecular Imagen (Kodak).

Figura 2. SNPs detectados de rs6983267 de la región 8q24 mediante RFLP



Técnica de procesamiento y análisis de datos

El análisis estadístico de asociación de los alelos y/o genotipos se realizó a través de la prueba Chi cuadrado para determinar su influencia sobre la variable dependiente (cáncer gástrico o grado histopatológico de la lesión). Para estos análisis se utilizó el paquete estadístico SSPS 11.0. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para valores de $p < 0.05$. Para determinar

si los polimorfismos encontrados en el grupo control se encontraban bajo equilibrio Hardy-Weinberg en la población se empleó el programa Arlequin ver. 2000.

Resultados y discusión

Como se muestra en la tabla 1, la edad promedio de los individuos incluidos en el grupo de CG fue mayor que la del grupo control (63,5 vs 56,2 años); sin embargo, la diferencia no presentó

significancia estadística. Por otra parte, las muestras de CG procedieron predominantemente de individuos de sexo masculino (68,3 %), mientras que en las de gastritis crónica prevaleció el sexo femenino (60,4 %).

Las 101 muestras analizadas para este estudio, procedentes de los pacientes con CG, fueron clasificadas de acuerdo al grado de diferenciación histológica como poco (42,2 %), moderado (47,1 %) y bien diferenciado (10,6 %) de acuerdo al tipo de cáncer (tabla 1).

Tabla 1. Valores de porcentuales de la clasificación histopatológica de las muestras estudiadas y distribución de las mismas según sexo y edad

Histopatológico		
POCO	MODERADO	BIEN
42,3 %	47,1 %	10,6 %

Cáncer gástrico	
Edad promedio=	63,5114,5
% de hombres=	68,3
% de mujeres=	31,7

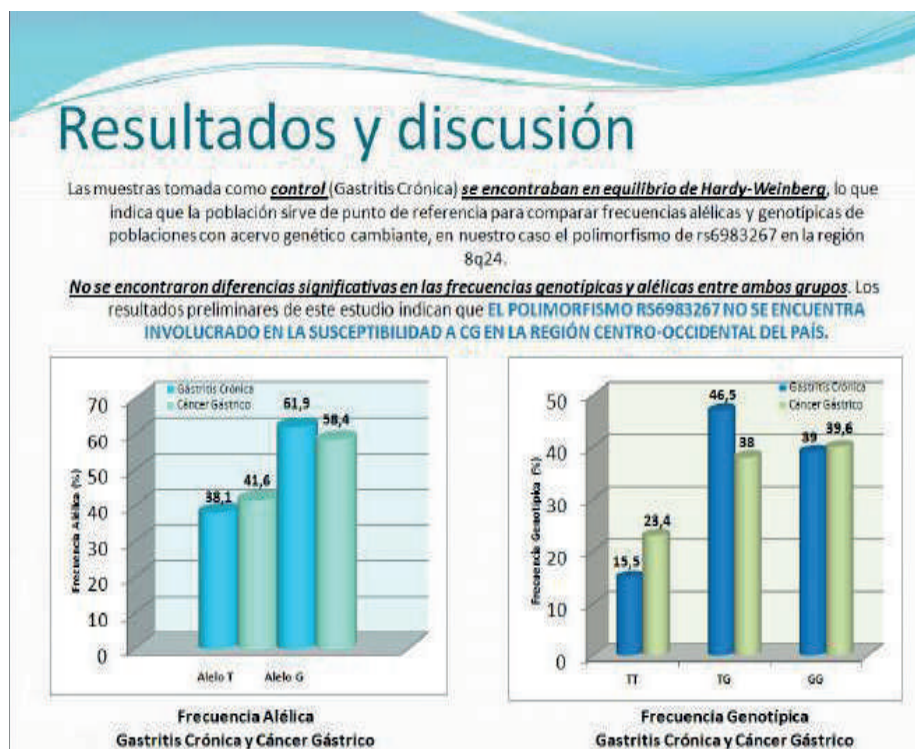
Gastritis Crónica	
Edad promedio=	56,2±9,9
% de hombres=	39,6
% de mujeres=	60,4

La distribución de los genotipos en la muestra fue encontrada bajo equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que indica que la población sirve de punto de referencia para comparar frecuencias alélicas y genotípicas de poblaciones con acervo genético cambiante, en nuestro caso, el polimorfismo de rs6983267 en la región 8q24.

En nuestro estudio en una de las muestras procedentes de la población Centroccidental de Venezuela se observó que los genotipos del SNP rs6983267 más prevalentes para las muestras de CG y GCr fueron GG (39,6 %) y GT (46,5 %), respectivamente. En ambos grupos de muestras predominó el alelo G con 58,4 % y 61,9 % en CG y GCr

(figura 3). No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en las frecuencias genotípicas y alélicas de ambos grupos. Tampoco se evidenciaron diferencias significativas al comparar la distribución de las frecuencias genotípicas o alélicas tomando en cuenta el grado de diferenciación del CG.

Figura 3. Frecuencia alélicas (A) y genotípica (B) para la región rs6983267 de 8q24, en las 101 muestras estudiadas para cada grupo, cáncer gástrico y gastritis crónica



Nuestros resultados contrastan con los reportados por Guo *et al.*, en el año 2011 en una muestra de 568 individuos de una población de China (368 controles y 200 pacientes con CG). En dicho trabajo, los autores encontraron asociación entre la presencia del genotipo GT ($p=0.002$) y del alelo T ($p=0.007$) del polimorfismo rs6983267 con el riesgo a CG. Igualmente, se observa diferencia en cuanto a la distribución de los genotipos; destaca el hecho de que Guo *et al.*, (2011) encontraron, en la población China analizada, el genotipo heterocigoto GT con una frecuencia de 67 %, mientras que en nuestro estudio dicho genotipo presentó una frecuencia de 38 %. La explicación más evidente para este contraste reside en las diferencias en la composición genética de nuestra población con respecto

a la de China. Sin embargo, debido a la naturaleza multifactorial del CG, no pueden descartarse otros factores tanto endógenos como exógenos, entre ellos la dieta y la infección por *H. pylori*.

La región cromosomal 8q24, particularmente los SNPs rs6983267 y rs1447295 presentes en ella, se ha encontrado asociada con la susceptibilidad a varios tipos de cáncer, en especial cáncer colorrectal y cáncer de próstata (Robbins *et al.*, 2007; Terada *et al.*, 2008; Pomerantz *et al.*, 2009; Wokolorczyk *et al.*, 2009 y Bertucci *et al.*, 2012). Los avances en la comprensión de las bases moleculares del cáncer han aportado datos relevantes en cuanto al papel del polimorfismo rs6983267 de la región 8q24. Estas secuencias están próximas

a pseudogenes y a retrotransposones, los cuales se han visto relacionados a la regulación de la proliferación en células madres (Hochedlinger *et al.*, 2005). Entre los pseudogenes, la expresión de *Oct4* se ha asociado a tumores poco diferenciados en humanos (Ben-Porath *et al.*, 2008). Así como también, se ha descrito que rs6983267 está próximo y actúa como un activador (potenciador) de genes como *MYC*, que modulan el crecimiento y la proliferación de las células gástricas normales.

En conclusión, en este trabajo se observó que en la muestra estudiada no hay diferencias significativas en las frecuencias genotípicas y alélicas entre ambos grupos que permitan relacionar al polimorfismo rs6983267

con susceptibilidad a CG en la región Centroccidental del país. Actualmente estamos abocados a incrementar el número de muestras analizadas, así como a añadir al estudio nuevos polimorfismos de la región cromosomal 8q24 para evaluar con mayor profundidad el papel de estas variantes genéticas en las bases moleculares del cáncer gástrico en Venezuela.

Agradecimiento

Este trabajo fue financiado por el proyecto CDCHT-UCLA código: 001-CS-2013.

Referencias bibliográficas

- Ali, Z., Deng, Y., Tang, Y., Zheng, S., Ma, N. y He, N. (2013). Epigenetic deregulations in gastric cancer. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 13(1): 40-51.
- Ben-Porath, I., Thomson, M., Carey, V., Ge, R., Bell, G., Regev, A. y Weinberg, R. (2008). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature Genetics*, 40(5): 499-507.
- Bensen J., Xu, Z., Smith, G., Mohler, J., Fontham, E. y Taylor, J. (2013). Genetic polymorphism and prostate cancer aggressiveness: A case-only study of 1,536 GWAS and candidate SNPs in African-Americans and European-Americans. *Prostate*, 73(1): 11-22.
- Bertucci, F., Lagarde, A., Ferrari, A., Finetti, P., Charafe-Jauffret, E., Van Laere, S., y Olschwang, S. (2012). 8q24 cancer risk allele associated with major metastatic risk in inflammatory breast cancer. *PLoS One*, 7(5): e37943.
- Cañas, M., Morán, Y., Camargo, M., Rivero, M., Bohórquez, A., Villegas, V., Chiurillo, M. (2009). Polimorfismo del codón 72 de TP53 y riesgo de cáncer gástrico: estudio caso-control en individuos de la región centroccidental de Venezuela. *Revista de Investigación Clínica*, 50(2): 153-61.
- Cañas, M., Morán, Y., Rivero, M., Bohórquez, A., Villegas, V., Rendón, Y., Chiurillo, M. (2009). Polimorfismo genético de interleuquina-1: Asociación con cáncer gástrico en la población de alto riesgo del Centroccidente de Venezuela. *Revista Médica de Chile*, 137(1): 63-70.
- Chiurillo, M. (2014). Role of gene polymorphisms in gastric cancer and its precursor lesions: current knowledge and perspectives in Latin American countries. *World Journal of Gastroenterology*, 20(16): 4503-4515.
- Chiurillo, M., Moran, Y., Cañas, M., Valderrama, E., Álvarez, A. y Armanie, E. (2010). Combination of *Helicobacter pylori*-iceA2 and proinflammatory interleukin-1 polymorphisms associated with the severity of histological changes in Venezuelan chronic gastritis patients. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 59(2): 170-6.
- Chiurillo, M., Moran, Y., Cañas, M., Valderrama, E. y Armanie, E. (2011). Infection with specific *Helicobacter pylori*-cag pathogenicity island strains associated with interleukin-1B gene polymorphisms in Venezuelanchronic gastritis patients. *Digestive Diseases and Sciences*, 56(2): 449-56.
- Chiurillo, M., Moran, Y., Cañas, M., Valderrama, E., Granda, N., Sayegh, M. y Ramírez, J. (2013). Genotyping of *Helicobacter pylori* virulence-associated genes shows high diversity of strains infecting patients in western Venezuela. *International Journal of Infectious Diseases*, 17(9): e750-e756.
- Ferlay, J., Shin, H., Freddie, F., David, D., Colin, C. y Maxwell, D. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, 127(12): 2893-2917.
- Ferrari, F. y Moura, M. (2013). Study of risk factors for gastric cancer by populational databases analysis. *World Journal Gastroenterol*, 19(48): 9383-9391.
- Figueiredo, C., García-González, M. y Machado, J. (2013). Molecular pathogenesis of gastric cancer. *Helicobacter Supplement*, 1(18): 28-33.
- Guo, Y., Fang, J., Liu, Y., Sheng, H., Zhang, X., Chai, H., Gao, H. (2011). Association between polymorphism rs6983267 and gastric cancer risk in Chinese population. *World Journal of Gastroenterology*, 17(13): 1759-1765.

- Hochedlinger, K., Yamada, Y., Beard, C. y Jaenisch, R. (2005). Ectopic expression of *Oct-4* blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell*, 121(3): 465-477.
- Jang, B. y Kim, W. (2011). Molecular pathology of gastric carcinoma. *Pathobiology*, 78(6): 302-10.
- Laurén, P. y Nevalainen, T. (1993). Epidemiology of intestinal and diffuse types of gastric carcinoma. A time trend study in Finland, with comparison between studies from high? and low risk areas. *Cancer*, 71(10): 2926-2933.
- Laurén, P. (1965). The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal type carcinoma. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 64: 31-49.
- Lichtenstein, P., Holm, N., Verkasalo, P., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Hemminki, K. (2000). Environmental and heritable factors in the causation of cancer-analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *The New England Journal of Medicine*, 343(2): 78-85.
- Ministerio Del Poder Popular Para La Salud. República Bolivariana de Venezuela. (2012). Anuario de Mortalidad 2011. Recuperado de: <http://www.mpps.gob.ve>
- Organización Mundial De La Salud. (2011). Cáncer. Nota descriptiva N°297. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>.
- Pomerantz, M., Ahmadiyeh, N., Jia, L., Herman, P., Verzi, M., Doddapaneni, H., Freedman, M. (2009). The 8q24 cancer risk variant rs6983267 shows long-range interaction with MYC in colorectal cancer. *Nature Genetics*. 41(8): 882-884.
- Robbins, C., Torres, J., Hooker, S., Bonilla, C., Hernandez, W., Candreva, A., Carpten, J. (2007). Confirmation study of prostate cancer risk variants at 8q24 in African Americans identifies a novel risk locus. *Genome Research*, 17(12): 1717- 1722.
- Terada, N., Tsuchiya, N., Ma, Z., Shimizu, Y., Kobayashi, T., Nakamura, E., Ogawa, O. (2008). Association of genetic polymorphisms at 8q24 with the risk of prostate cancer in a Japanese population. *Prostate*, 68(15): 1689-1695.
- Tomlinson, I., Webb, E., Carvajal-Carmona, L., Broderick, P., Kemp, Z., Spain, S., Houlston, R. (2007). A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. *Nature Genetics*, 39(8): 984-948.
- Torres, K., Moran, Y., Valderrama, E. y Chiurillo, M. (2013). Variantes del motivo EPIYA de la proteína CagA de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas de pacientes con gastritis crónica de la región centroccidental de Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 33(1): 18-23.
- Wokołarczyk, D., Lubiński, J., Narod, S. y Cybulski, C. (2009). Genetic heterogeneity of 8q24 region in susceptibility to cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(4): 278-279.
- Zanke, B., Greenwood, C., Rangrej, J., Kustra, R., Tenesa, A., arrington, S., Dunlop, M. (2007). Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. *Nature Genetics*, 40(5): 631-637.
- Zhang, Y., Yi, P., Chen, W., Ming, J., Zhu, B., Li, Z., Miao, X. (2014). Association between polymorphisms within the susceptibility region 8q24 and breast cancer in a Chinese population. *Tumour Biology*, 35(3): 2649-2654.