

00544

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN
DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGIA Y REUMATOLOGIA

**"MARCADORES INMUNOGENETICOS DE NEOPLASIA GASTRICA
EN PACIENTES CON GASTRITIS CRONICA"**

T E S I S
QUE PARA OBTENER LA ESPECIALIDAD EN
BIOQUIMICA CLINICA
P R E S E N T A
Q. F. B. NORMA OSNAYA BRIZUELA

27/05/09

TUTOR PRINCIPAL: DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA

COTUTOR: DR. JOAQUIN ZUÑIGA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PENSAMIENTO.

“Deseo Llevar a cabo una tarea grande y noble, pero mi primer compromiso es: hacer lo pequeño como si fuera extraordinario”

Hellen Keller.

*A mi esposo Antonio por su amor, apoyo
Y paciencia para lograr una meta más en mi vida.*

A mi hijo Antonio que es parte de mi existencia.

*A mis padres que me dieron la vida y a la memoria de
mis Tíos que me enseñaron a valorar los triunfos.*

*A mis hermanos y mis sobrinos por sus consejos y su
cariño.*

*Y sobre todo a ti como te llames Señor que de
cualquier modo sigue siendo el mismo y
siempre has guiado mis pasos.*

Agradezco el apoyo incondicional de:

Dra. Lilián Calderón Garcidueñas.
Jefe del Lab. Patología Experimental.
Instituto Nacional de Pediatría.

Dr. Roberto Herrera Goepfert.
Departamento de Patología
Instituto Nacional de Cancerología.

Dr. Julio Granados Arriola
Departamento de Inmunología.
Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán.

Con cariño y gratitud a mi compañero y amigo:

Dr. Joaquín A. Zúñiga Ramos
Departamento de Inmunología
Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán

INDICE

Complejo Principal de Histocompatibilidad.....	1
Desequilibrio genetico.....	12
Mecanismos de asociación entre HLA y enfermedad	16
Asociaciones del HLA con enfermedades autoinmunes e infecciosas	18
Hipótesis y Objetivo	22
Métodos	23
Análisis Estadístico.....	25
Resultados	26
Pacientes con gastritis crónica.....	28
Pacientes con neoplasia gástrica.....	29
Discusión y Conclusiones.....	30
Apéndice	32
Referencias bibliográficas.....	42

INTRODUCCION.

Complejo Principal de Histocompatibilidad.

El complejo principal de histocompatibilidad (CPH), está conformado por un grupo de genes localizados en el brazo corto del cromosoma seis humano dentro de la banda 6p21.3 y ocupan aproximadamente unas 4 megabases (4000 Kb) de DNA (1, 2) (ver figura 1).

La frecuencia de recombinación genética dentro del CPH es muy baja (menos de 2%) debido a que este conjunto de genes ocupan solamente unas 4000 Kb de DNA y están físicamente muy cerca unos de otros.

Los alelos de los loci del CPH de un cromosoma en particular constituyen un haplotipo (el genotipo de un individuo está dado por dos haplotipos, uno de origen materno y otro paterno).

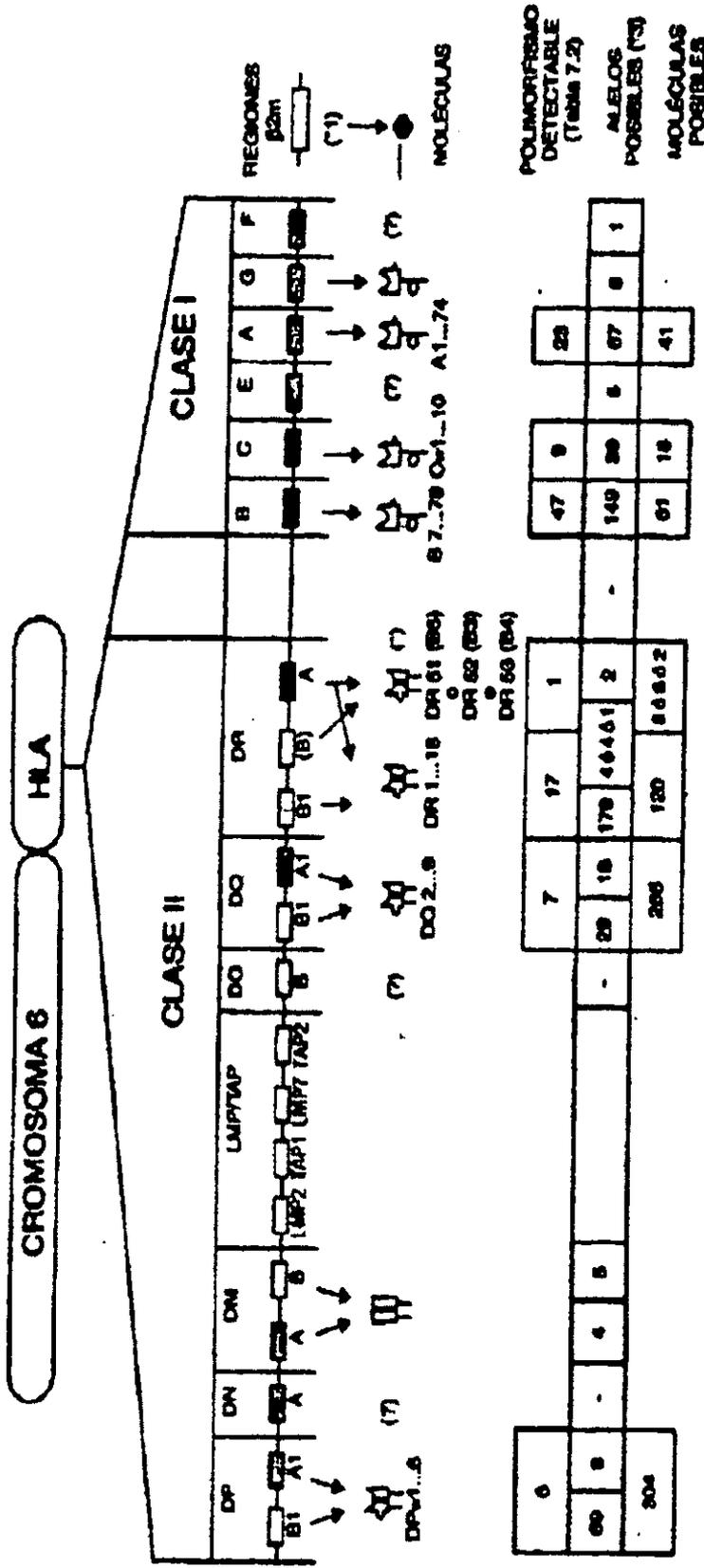
Hacia el telómero se encuentra la región clase I del CPH que tiene por lo menos 50 genes relacionados entre sí y que incluye los loci HLA-A, -B y -C (3). Hacia el centrómero está la región clase II, que se puede dividir en cuatro subregiones (DP, DO/DZ, DQ y DR), cada una por lo menos con un par de genes alfa y beta (4).

Entre las regiones clase I y clase II se encuentra la región clase III cuyos genes codifican para los componentes del complemento C2, factor B, C4A y C4B, así como los genes estructurales de la 21-hidroxilasa A y B (21-OHA y 21-OHB). Dentro de esta región se

encuentran el gen de la glioxalasa I (enzima que hidroxila el carbono 21 en la síntesis del cortisol), los genes del factor de necrosis tumoral alfa y beta (TNF- α y TNF- β) así como los genes de la familia de las proteínas de choque térmico de 70 kD (5, 6) entre otros.

Recientemente se han encontrado cinco genes asociados al locus HLA-B, llamados "transcritos asociados a B", que son BAT-1, -2, -3, -4 y -5, así como el gen denominado B-144 que es homólogo al gen del ratón.

Figura 1. Mapa Genético del CPH, en el cromosoma seis.



El complejo principal de histocompatibilidad del hombre (sistema HLA y sus productos. Diagrama simplificado (*).

(*) No todos los cromosomas contienen genes para la cadena β de estas proteínas. Cuando existen, se trata de genes distintos (DRB3, DRB4 y DRB5) y no de alelos de un mismo gen.

(*)1 La cadena β de las moléculas de la clase I es monomórfica y se codifica en otro cromosoma (β2 microglobulina).

(*)2 Se han sombreado los genes que codifican cadenas α.

(?) Las proteínas codificadas por los genes DN y DO no se han caracterizado aún completamente.

(*)3 Los alelos de clase I sí reflejan el polimorfismo real posible, ya que sólo a es polimórfica. En las moléculas de clase II el polimorfismo posible es mucho mayor que el alélico, por ser ambas cadenas polimórficas. Por ejemplo, existirán 69 x 8 = 552 moléculas HLA-DP posibles, de las que un individuo podría tener cuatro distintas por asociación al azar de cadenas α y β paternas y maternas. El polimorfismo detectable (siete millones de combinaciones de moléculas) es muy inferior al posible (50 billones de combinaciones de alelos). No todos los alelos, sin embargo, codifican cadenas diferentes.

Los genes clase I, II y III se heredan en un bloque denominado haplotipo y se expresan en forma codominante en un individuo. Las moléculas HLA (Human leukocyte antigens) de clase I, se expresan en la membrana de todas las células nucleadas, excepto en neuronas y trofoblastos maduros y difícilmente se detectan en eritrocitos. Las moléculas HLA de clase II se expresan solo en células inmunocompetentes como macrófagos, linfocitos B, células endoteliales, células dendríticas, células de Langerhans y en linfocitos T activados (7).

Moléculas de clase I.

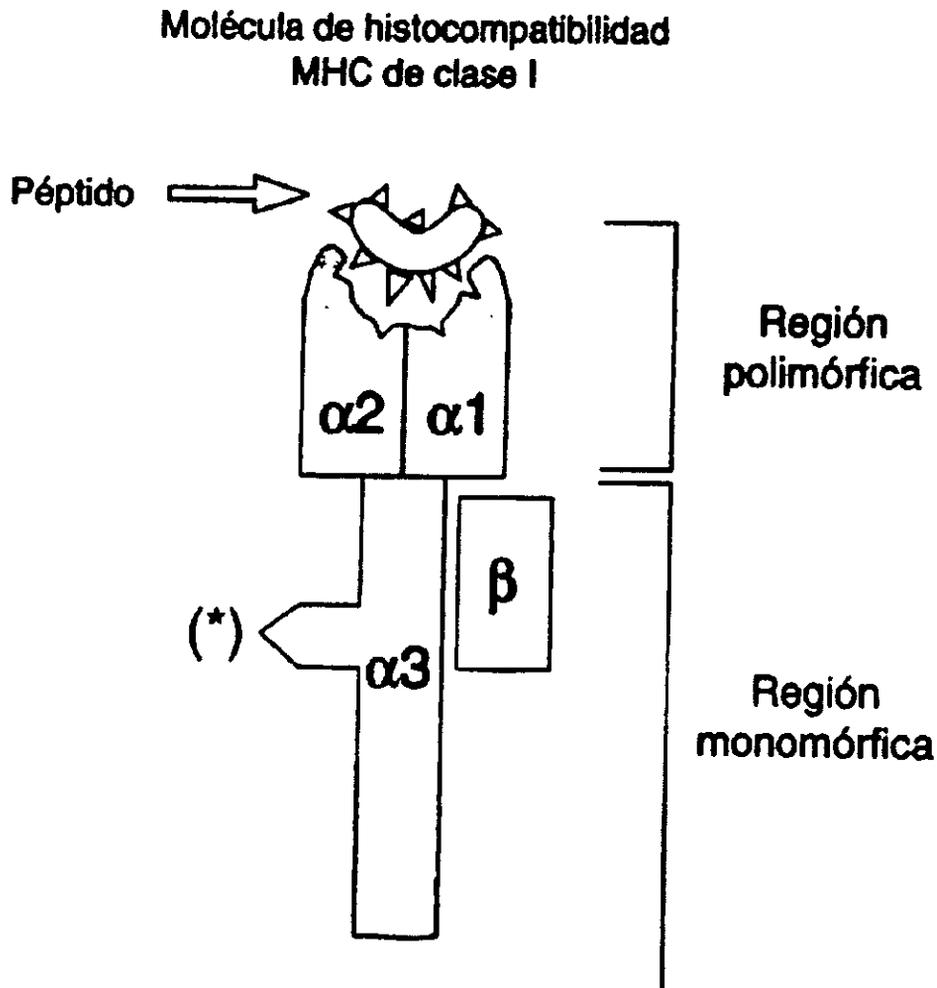
La región clase I consta de cuando menos 50 genes distribuidos en 1800 Kb de DNA localizados en el extremo telomérico del complejo. Seis de estos genes se han asociado a productos de transcripción y los 11 restantes se han considerado pseudogenes. Los genes clase I (A, B y C) codifican los antígenos clásicos de transplante HLA-A, -B y -C. Los genes E, F y G (identificados solo por técnicas de Biología Molecular) se han asociado con los antígenos no clásicos HLA-E, -F y -G que se expresan en algunas células inmaduras y en la interfase materno-fetal. Los genes H, J, K y L no codifican para moléculas HLA funcionales (8).

Los genes clase I presentan una organización similar, un exón que codifica un péptido líder, tres exones que corresponden a los dominios alfa-1, alfa-2, alfa-3 además de un exón que codifica los péptidos de la región transmembranal y parte de la cola citoplásmica (9).

Cada una de las moléculas clase I está compuesta por una cadena pesada y una cadena ligera llamada β 2-microglobulina. La cadena pesada está codificada por los genes clase I del cromosoma 6 mientras que la β 2-microglobulina esta codificada por un gen situado en el cromosoma 15 (14).

Estas moléculas son heterodímeros la cadena pesada es una glicoproteína de 45 Kd, mientras que la β 2-microglobulina pesa alrededor de 13 Kd. Las moléculas de clase I están conformadas de 5 distintas regiones o dominios, tres de ellos son: α -1, α -2 y α -3, cada uno de ellos contienen 90 residuos de aminoácidos y están en la parte exterior de la célula. Los dominios alfa-2 y alfa-3, tienen puentes disulfuro dispuestos de manera similar a la molécula de inmunoglobulina. El cuarto dominio tiene 40 residuos de longitud y está incrustado dentro de la membrana celular ya que estos residuos son hidrofóbicos. El quinto dominio, contiene 30 residuos de longitud y esta proyectado dentro del citoplasma (15). (ver figura 2).

figura2. Representación de una molécula HLA clase I .



En esta figura se observan las regiones que contribuyen una molécula de Clase I. El polimorfismo se concentra en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$, específicamente es la región captadora del péptido.

(*) Interacciona con el correceptor $CD8^+$

Los dominios están doblados de tal forma que el α -1 y el α -2 se unen por fuerzas no covalentes; de igual manera están unidos el α -3 y la β 2-microglobulina. Los dominios α -1 y α -2 forman la porción superior de la molécula; estas alfa-helices crean una fosa o hendidura que sirve como sitio de unión al antígeno o fragmento peptídico procesado en forma apropiada a partir de uno más grande. La mayoría del polimorfismo de éstas moléculas se localizan en estas dos alfa-helices y la porción de la plataforma de la hoja plegada llamada β que forma el piso de esta hendidura. Así el sitio de captación varía de una molécula clase I a otra, y una molécula clase I dada, solo puede aceptar un número limitado de fragmentos peptídicos. La principal función de estas moléculas, es la de presentar péptidos a los linfocitos T CD8+, a este fenómeno se le denomina restricción HLA. Una vez que ocurre el reconocimiento, el linfocito T citotóxico mata a la célula en diana que lleva el antígeno ya sea viral o de cualquier origen que sea extraño al organismo (15, 17).

Moléculas clase II.

La molécula de clase II posee al menos 30 genes, que se localizan en el extremo centromérico de la región HLA, abarca 1000 Kb y codifica los antígenos HLA-DR, -DQ y -DP, los transportadores de los péptidos TAP1 y TAP2 y los genes de proteosomas LMP2 y LMP7, los productos de estos genes son muy importantes en el transporte intracelular de péptidos y en el proceso de presentación antigénica.

La región de clase II consta de cinco subregiones:

La primera subregión DP contiene los genes DPA y DPB, las moléculas HLA-DP son codificadas por el gen polimórfico DPB1 y por el gen no polimórfico DPA1, mientras que DPA2 y DPB2 son pseudogenes.

La segunda subregión DN contiene un solo gen el cual codifica para una cadena alfa.

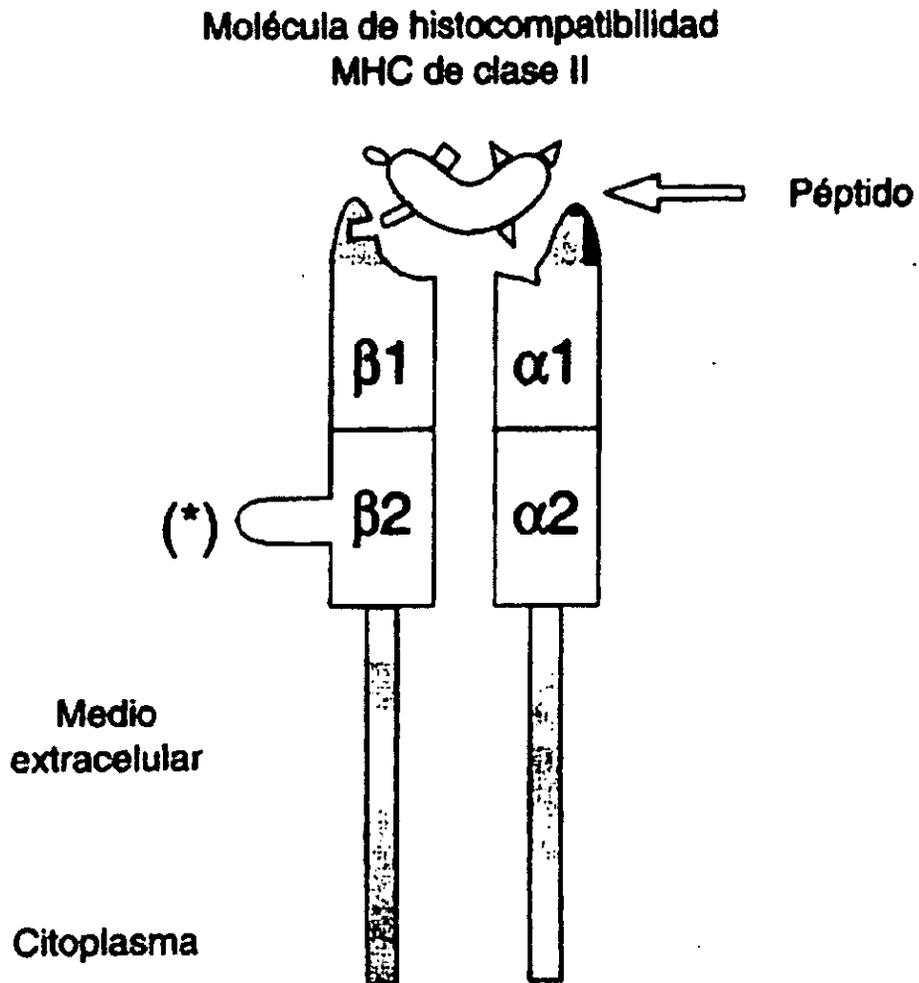
La tercera subregión DO, contiene el gen DOB, el más divergente de los genes para cadena β , dos genes adicionales DMA y DMB se localizan entre HLA-DNA y HLA-DOB .

La cuarta subregión DQ contiene los genes polimórficos DQA1 y DQB1. Ambos están expresados en una molécula DQ heterodimérica. De los genes DQA2, DQB2 y DQB3 no se han identificado sus productos, aún cuando estos puedan ser transcritos.

En la quinta subregión HLA DR, se han indentificado 10 genes, de los cuales al menos cinco expresan un DR α (DRA) y cuatro DR β (DRB, DRB3, DRB4 y DRB5). Cinco son pseudogenes (DRB2, DRB6, DRB7, DRB8 y DRB9). La cadena α , no polimórfica, codificada por DRA se asocia con la cadena polimórfica β codificada por DRB1, DRB3, DRB4 y DRB5 para formar las moléculas de la subregión HLA-DR (9).

La molécula clase II es un heterodímero que consiste de dos cadenas de glicoproteína, una α de 34 Kd y una β de 29 Kd. Estas se encuentran unidas en forma no covalente (16, 17, 18) (ver figura 3). Las cadenas α y β consisten cada una de tres regiones, una región extracelular hidrofílica, una transmembranal hidrofóbica y una intracelular hidrofílica. Las dos últimas anclan a la molécula en la membrana celular. La región hidrofílica de la cadena alfa tiene dos dominios (residuos 1-84 y 185-178), denominado respectivamente α -1 y α -2. La región extracelular de la cadena β también contiene dos dominios β 1 y β 2 (residuos 1-91 y 92-192 respectivamente). Los dominios α 1 y β 1, forman la porción superior de la molécula y la interacción de estos dominios da como resultado una estructura muy parecida a la formada por los dominios alfa-1 y alfa-2 de la molécula clase I, es decir, una hendidura (15, 16, 17).

Figura 3 . Representación de una molécula HLA clase II.



La molécula de clase II esta formada por una cadena α (derecha) y una cadena β (izquierda), esta a su vez tienen distintos dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$; $\beta 1$ y $\beta 2$ respectivamente.

(*) interacciona con el correceptor CD4+

Moléculas clase III.

Los genes clase III del CPH se ubican entre las regiones I y II, después del HLA, son el conjunto de marcadores genéticos más polimórfico del humano conformado por lo menos de 26 genes, los cuales abarcan unas 1200 Kb de DNA. Diversas proteínas de gran importancia son codificadas por dichos genes como lo son componentes del complemento C2, C4A, C4B y factor B, el factor de necrosis tumoral alfa y beta (TNF- α y TNF- β), las proteínas de choque térmico (HSP-70 y GP), la enzima 21-hidroxilasa, 9 transcritos asociados a HLA-B (genes BAT) y 1 locus S1 (12, 13).

Desequilibrio genético, diferencias en las poblaciones y haplotipos extendidos .

La frecuencia de los alelos del CPH varían en el mundo según el grupo étnico estudiado; por ejemplo en caucásicos, americanos ó europeos el HLA-DR3 (DR18 ó DRB1*0301) se presenta con una frecuencia del 25 % mientras que es extraordinariamente raro en japoneses. Más aún, el otro subtipo del HLA-DR3 (DR18 ó DRB1*0302) es casi exclusivo de la población de origen negro-africano. Otro ejemplo es el HLA-DR4 que en caucásicos está marcado por los subtipos DRB1*0401 (DR4) y DRB1*0404, mientras que en los japoneses el subtipo más común es el DRB1*0405 y en los judíos de Israel es el DRB1*0402. Por lo anterior es obvio que en los estudios de asociación con enfermedades se requiere que los individuos sanos sean étnicamente parecidos a los pacientes.

Otro fenómeno es el desequilibrio genético (la ocurrencia de dos alelos en un mismo haplotipo, con una frecuencia mayor a lo esperado de acuerdo a las frecuencias génicas individuales).

Cuando los haplotipos muestran desequilibrio genético se les conoce como “haplotipos extendidos”, lo que señala que sus alelos no se combinaron de manera aleatoria y que el fenómeno que los mantiene unidos se extiende desde el telómero hasta el centrómero del brazo corto del cromosoma 6. Se ha hipotetizado que los haplotipos extendidos son el resultado de cambios selectivos en respuesta a ciertos agentes infecciosos como virus, bacterias o parásitos, es decir, parecen tener ventajas evolutivas. En caucásicos, el haplotipo extendido más conocido es el

reaccionan en forma cruzada con el antígeno HLA-B27 produciendo una reacción autoinmune mediada por anticuerpos específicos (25).

Mecanismos de Asociación entre HLA y Enfermedad.

Se han propuesto varias hipótesis para explicar el papel de los alelos del CPH, en el establecimiento de la susceptibilidad a las enfermedades (26). Entre estas hipótesis se encuentran:

1. **Mimetismo molecular:** la cual explica la susceptibilidad mediante reacción cruzada entre organismos infecciosos y un determinado antígeno del sistema HLA.
2. **Receptor:** establece que ciertos antígenos HLA pueden actuar como receptores específicos para agentes infecciosos y este evento está directamente relacionado con el desarrollo de la enfermedad.
3. **Antígeno HLA modificado:** sugiere que los antígenos HLA pueden ser modificados por antígenos extraños o por agentes químicos, entonces el sistema inmunitario los reconoce como no propios, respondiendo por lo tanto con la producción del anticuerpo correspondiente, generándose así el estado de enfermedad.

4. **Genes de respuesta inmune:** intenta explicar que la asociación ocurre como resultado de respuesta versus no respuesta a un determinante crítico que es propio del agente patógeno (recordar el concepto de punto ciego de las células T).

Desde luego, ninguna hipótesis en forma aislada explica todas las relaciones que se han registrado y bien pudiera ser que cada uno de estos mecanismos esté involucrado ya sea en uno o varios de los procesos de enfermedad asociados con el CPH.

Asociaciones del HLA con enfermedades autoinmunes e infecciosas.

Muchas enfermedades se han asociado con alelos del HLA, sobre todo aquellas donde se piensa que los trastornos inmunológicos son de primera importancia en su fisiopatogenia.

Las correlaciones con una enfermedad pueden ser positivas o negativas, las positivas implica que un alelo predispone a una enfermedad, mientras que una negativa sugiere que el alelo HLA puede ser “protector”, especialmente si tiene un efecto “dominante” y no se encuentra en individuos afectados en estado heterocigoto con un alelo putativo promotor de enfermedad.

Varias asociaciones con el CPH se han estudiado a nivel molecular, por ejemplo:

- i) **Artritis Reumatoide (AR):** Se ha asociado con la misma secuencia de aminoácidos en varios grupos étnicos y en todos los casos la secuencia se ha ubicado en la tercera región hipervariable de varios alelos DRB1 incluyendo al DR4, DR1, DR10 y DR6. Por lo anterior se ha propuesto que existe un “epítotope compartido” entre varios alelos HLA y que este promueve el establecimiento de la enfermedad (37).

- ii) **Espondilitis Anquilosante (EA):** Se ha asociado en forma importante con el HLA-B27, que a su vez se ha relacionado con: el síndrome de Reiter, uveítis anterior aguda, artritis reactiva, artropatía psoriática y sacroileítis (38).

HIPÓTESIS.

Existe asociación entre los alelos HLA de clase II, principalmente del loci DQ y el desarrollo de neoplasias gástricas, en pacientes con gastritis crónica, en mestizos mexicanos.

OBJETIVO GENERAL .

Determinar cuales son los alelos de HLA-DQ más frecuentes en pacientes con diagnóstico de gastritis crónica y neoplasias gástricas.

PACIENTES Y MÉTODOS.

Se estudiaron 36 pacientes adultos mestizo mexicanos con gastritis crónica y 6 pacientes con neoplasia gástrica, los cuales fueron atendidos clínicamente en el Instituto Nacional de Cancerología en la ciudad de México.

Para su comparación se estudió también un grupo control de 99 mestizos mexicanos sanos, sin ninguna evidencia clínica de gastritis crónica, úlcera péptica o historia familiar de patología de HLA-asociada a enfermedades infecciosas.

Ellos y sus últimas 2 generaciones nacidas en la república Mexicana.

El diagnóstico de gastritis crónica y neoplasia gástrica en el grupo de pacientes fue realizada por endoscopia y biopsia.

El DNA genómico fue extraído de sangre venosa por técnicas estandarizadas (ver apéndice).

La tipificación de los alelos clase II (HLA-DQ y HLA-DQ) se realizó por medio de la técnica de PCR-SSP. Dicha técnica incluye una serie de mezclas de iniciadores específicos de alelo que por medio de la reacción en cadena de la polimerasa son capaces de amplificar los diferentes alelos de forma específica..

La presencia o ausencia de los productos son visualizados por electroforésis en geles de

Análisis Estadístico.

Las diferencias entre los grupos estudiados fueron evaluadas por la prueba de chi-cuadrada de Mantel-Haenszel; la cual combina tablas de contingencia 2X2 usando en el programa estadístico EPIINFO. Si el número en cualquier celda fuera <5 , se usó la prueba exacta de Fisher's. El valor p fue corregido usando el método de Yate's. Valores de p ó menores que 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. Riesgo relativo (RR) con el intervalo de confianza del 95%(IC 95%) fue estimado como un radio de probabilidades.

RESULTADOS.

Los alelos HLA-DQA y DQB más frecuentes en la población sana mestiza mexicana y en los pacientes con gastritis crónica, fueron el HLA-DQA1*0301 (0.257 y 0.277, respectivamente) y HLA-DQA1*0401 (0.166 y 0.166, respectivamente).

Por otro lado los alelos de HLA-DQB1 más frecuentes fueron HLA-DQB1*0301 y HLA-DQB1*0302, no se observaron diferencias significativas entre las frecuencias de los alelos entre ambos grupos.

Se observó una disminución significativa en la frecuencia del alelo HLA-DQA1*0201 en los pacientes con gastritis crónica con respecto al grupo control (0.014 y 0.111) respectivamente, $p:0.02$, $OR=0.11$, $IC\ 95\% 0.01 - 0.81$) Tabla 1.

Se observó un incremento en la frecuencia del alelo HLA-DQB1*0501 en los pacientes con gastritis crónica (pts, fg = 0.16 vs ctl, fg= 0.060 , $p: 0.01$, $OR=3.10$, $IC\ 95\% 1.23-7.85$) Tabla 1. Dentro del grupo de pacientes con gastritis crónica encontramos un subgrupo de pacientes que desarrollaron neoplasia gástrica. Al analizar en este subgrupo se encontró que el HLA-DQB1*0501 tuvo una frecuencia incrementada en los individuos con neoplasia gástrica en relación a la población control (fg. ctl: 0.060 vs fg..pts: 0.333 , $p= 0.007$. $OR= 7.75$ y $IC\ 95\% = 1.67 - 34.63$) tabla2.

Es importante resaltar que no se encontraron diferencias importantes en las frecuencias de los alelos HLA-DQA en los pacientes con neoplasia gástrica, por lo que en la tabla 2, estas se omiten.

Tabla 1 Grupo General de Pacientes con Gastritis Crónica y Sujetos Sanos.

<i>HLA-DQ</i>	PACIENTES		CONTROLES		<i>p</i>	<i>OR</i>	<i>I.C. 95%</i>
	<i>n</i>	<i>fg</i>	<i>n</i>	<i>fg</i>			
DQA1*0301	20	0.277	51	0.257			
DQA1*0401	12	0.166	33	0.166			
DQA1*0103	5	0.069	5	0.025	NS		
DQA1*0101	4	0.055	20	0.101	NS		
DQA1*0102	3	0.042	17	0.085	NS		
DQA1*0201	1	0.014	22	0.111	0.02	0.11	0.01-0.81
DQB1*0301	18	0.250	35	0.176			
DQB1*0302	18	0.250	47	0.237			
DQB1*0501	12	0.166	12	0.060	0.01	3.10	1.23-7.85
DQB1*0201	5	0.069	33	0.166	NS		
DQB1*0602	4	0.055	15	0.075			
DQB1*0604	1	0.014	3	0.015			

n= número de muestra
fg= frecuencia génica
p= valor de significancia
OR= razón de momios
I.C.95%= Intervalo de confianza al 95%
NS= No significativo

Tabla 2 Pacientes con Neoplasia Gástrica y Sujetos Sanos.

<i>HLA-DQ</i>	PACIENTES		CONTROLES		<i>p</i>	<i>OR</i>	<i>I.C. 95%</i>
	<i>n</i>	<i>fg</i>	<i>n</i>	<i>fg</i>			
DQB1*0301	4	0.333	35	0.176	NS		
DQB1*0501	4	0.333	12	0.060	0.007	7.75	1.67-34.63
DQB1*0302	3	0.250	47	0.237			
DQB1*0602	1	0.083	15	0.075			

n= número de muestra
fg= frecuencia génica
p= valor de significancia
OR= razón de momios
I.C.95%= Intervalo de confianza al 95%
NS= No significativo

Discusión y Conclusiones.

El complejo principal de histocompatibilidad (CPH) tiene un papel fundamental en la homeostasis de la respuesta inmune; por lo que existen diversos estudios referentes a los marcadores genéticos involucrados en la susceptibilidad a ciertas enfermedades. Hasta el momento se han descrito muchas enfermedades asociadas con los genes del CPH, entre ellas podemos mencionar al lupus eritematoso generalizado, la artritis reumatoide y la diabetes tipo 1(2). Sin embargo, hay un grupo de enfermedades como las úlceras gástricas y metaplasias, las cuales se han asociado con los genes clase II del CPH, principalmente en relación con el locus HLA-DQ en poblaciones caucásicas (34).

Azuma y cols. encontraron un incremento, en la frecuencia del gen HLA-DQA1*0301, en pacientes con úlceras gástricas (33).

Otros trabajos señalan, que el gen HLA-DQ5 se encuentra presente en aquellos pacientes que desarrollan metaplasias gástricas comparada con controles sanos.

Un estudio realizado por Jeffrey Lee en 1996, refiere que el HLA-DQB1*0301 esta relacionado con adenocarcinoma gástrica , en pacientes no infectados con *H. pylori* (35).

En este trabajo, se encontró una asociación significativa, en cuanto a la presencia de alelos clase II, así como a subtipos de las moléculas HLA-DQA y HLA-DQB en pacientes mestizos mexicanos con gastritis crónica, en comparación con controles sanos. Se encontró que el alelo HLA-DQB1*0501, está presente en un número significativo de pacientes con gastritis crónica. En el subgrupo de pacientes que desarrollaron neoplasia gástrica, de manera interesante, este alelo

APENDICE

1. Extracción de DNA genómico:

1.2.Preparación de reactivos.

Para la extracción de DNA genómico, se requieren las siguientes soluciones:

Buffer de lisis I

0.32 M sacarosa

10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

5. mM MgCL

1% Triton X-100 (MW 0 646.87 g/mol)

Almacenar a 4°C

Buffer de lisis II

0.375 M NaCl

0.12 M Na-EDTA

Ajustar el pH a 8.0 con NaOH 4 M y almacenar a temp. amb.

SDS al 20 % (w/v)

almacenar a temperatura ambiente.

Proteinasa K.(10 mg/ml)

almacenar a temperatura de -70° C

6 M NaCl (saturado)

almacenar a temperatura ambiente.

1.3 Colectar 10 ml de sangre con anticoagulante EDTA o de $20 - 50 \times 10^6$ células mononucleares aisladas.

Se transfiere la muestra de sangre o células a un tubo de 50 ml. y se agrega el reactivo 1 para un volumen final de 50 ml. Se mezcla y centrifuga por 5 min a 2400 g. Cuidadosamente se retira el sobrenadante y resuspende el botón en:

160 μ l. Buffer de lisis II	(reactivo 2)
40 μ l SDS al 20%	(reactivo 3)
40 μ l Proteinasa K	(reactivo 4)
300 μ l de H ₂ O dd.	

Agitar vigorosamente por 10 seg. a temperatura ambiente.

Incubar a 37° C durante toda la noche o incubar a 55° C por dos horas. Después de una hora agregar 20 μ l de proteinasa K y siga incubando hasta completar el período de dos horas.

- a) Para la extracción de proteínas, adicionar 2 ml. NaCl 6M (reactivo 5) y agitar vigorosamente por 15 segundos. (método de "Salting-out", Miller y cols (36)). Centrifugar por 5 min a 1500 g a temperatura ambiente.
- b) Cuidadosamente, pasar el sobrenadante a un tubo limpio de 50 ml. y adicionar 7 ml. de isopropanol absoluto, mezclar suavemente hasta la precipitación del DNA.
- c) Remover el precipitado del DNA con una pipeta Pasteur a un tubo de microcentrifuga de 1.7 ml. para eliminar el exceso de isopropanol.
- d) Lavar el DNA dos veces con 1 ml. de etanol al 70% y resuspender en 100 - 300 μ l de H₂O, incubando a 55°C por 10 - 20 minutos.

- e) Diluir 5 μl de la solución de DNA en 495 μl de dH_2O y medir su densidad óptica a 260 nm por espectrofotometría de luz UV. La concentración de DNA (en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) es 5 veces el valor de la D.O. (e.g. 0.2 D.O corresponde a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de DNA).
- f) Si se requiere, se ajusta la concentración DNA a 0.3 - 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ con dH_2O .

Identificación de Haplotipos.

2. Fundamento de la prueba.

La tipificación de HLA-DQB + DQA SSP es un método de biología molecular basado en la tipificación de HLA-DQ mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

Solamente los iniciadores con secuencia complementarias a la secuencia genómica del DNA-ADN problema se unirán y amplificarán como un producto de PCR, la presencia o ausencia de los productos de amplificación son visualizados por electroforesis en geles de agarosa. Una reacción positiva de PCR aumentará un fragmento de DNA bien definido a la luz UV por la tinción de bromuro de etidio; una reacción negativa esta banda estará ausente.

Los iniciadores para HLA-DQB + DQA SSP son diseñados específicamente para los alelos específicos para HLA-DQB1*05, HLA-DQB1*04, HLA-DQA1*0101, y HLA-DQA1*0601.

2.1 Equipo comercial empleado.

La tipificación de HLA DQB + DQA para cada individuo consta de 22 reacciones de PCR y consisten en:

9 reacciones para asignar DQB1*05 - DQB1*04

12 reacciones para asignar DQA1*0101 - DQA1*0601

1 reacción como control negativo para contaminación.

Equipo que se requiere para la prueba.

Micropipetas o multipipetas

Microcentrifuga

Espectrofotometro de luz

Termociclador PE 9600, Perkin Elmer

Cámara de electroforesis horizontal para geles de agarosa

Fuente de poder con intervalo

Transiluminador de luz UV (312 nm)

Cámara Polaroid con filtro de luz UV

3. Fundamento de la técnica.

La reacción de cadena de la polimerasa es un método altamente sensible para amplificar cantidades diminutas de DNA. La contaminación de DNA extraño en la muestra pueden ser amplificadas, dando en los resultados falsos positivos que no pueden ser interpretados.

3.1 Preparación de la muestra.

Preparación de mezcla de iniciadores para SSP.

El equipo comercial de Biotest HLA-DQB + DQA SSP contiene la mezcla suficiente y lista para usarse en las reacciones de PCR.

3.2 Procedimiento.

En un tubo de microcentrifuga de 0.5 ml, poner la cantidad de 50 μ l de DNA a una concentración de 0.2 μ g/ μ l con 3 μ l de taq DNA polimerasa. Adicionar 2 μ l de esta dilución a cada tubo de reacción excepto el control negativo.

- a) Cierre la secuencia de tubos de reacción, asegurándose que estén bien tapadas.
- b) Pase las muestras al termociclador inmediatamente.

c) Las condiciones de PCR en el termociclador son las siguientes:

1 ciclo a 94°C, 30 seg.

1 ciclo a 55°C, 1 min.

1 ciclo a 72°C, 1 min.

30 ciclos.

4. Electroforesis, geles de agarosa.

4.1 Preparación de reactivos

Reactivo 1: Agarosa ultra pura.(e.g. Gibco-BRL, Cat No. 5510 UA)

Reactivo 2: TBE solución amortiguadora 5X

0.45 M tris base

0.45 M ácido bórico.

10 mM Na-EDTA, pH 8.0

Reactivo 3: Bromuro de etidio (10 mg/ml)

Reactivo 4: Solución amortiguadora para electroforesis: 200ml. de buffer TBE 5X (reactivo 2).

Aforar a 1 L. con d H₂ O.

- a) Añadir 4 g de agarosa (reactivo 1) y 60 ml. de buffer TBE 5X (reactivo 2) a 240 ml. dH₂O
- b) Disolver la agarosa llevando a ebullición.
- c) Enfriar a 60° C y adicionar 12.5 µl de bromuro de etidio (reactivo 3), mezcle para teñir con el gel .Vacíe en el soporte de la cámara de electroforesis de 20x20 cm para colocar los 4 peines con 24 pozos respectivamente. Deje enfriar de 15 a 20 min a temperatura ambiente o a 4°C.

4.2 Electroforesis.

- a) Cuando la PCR haya terminado, remueva los viales del termociclador.
- b) Remueva los peines y coloque el gel dentro de la cámara de electroforésis. El nivel de la solución de corrimiento (reactivo 4) deberá estar de 2 a 3 mm. sobre la superficie del gel.

c) Colocar 10 μ l de cada mezcla de PCR dentro de cada pozo del gel. El orden fue:

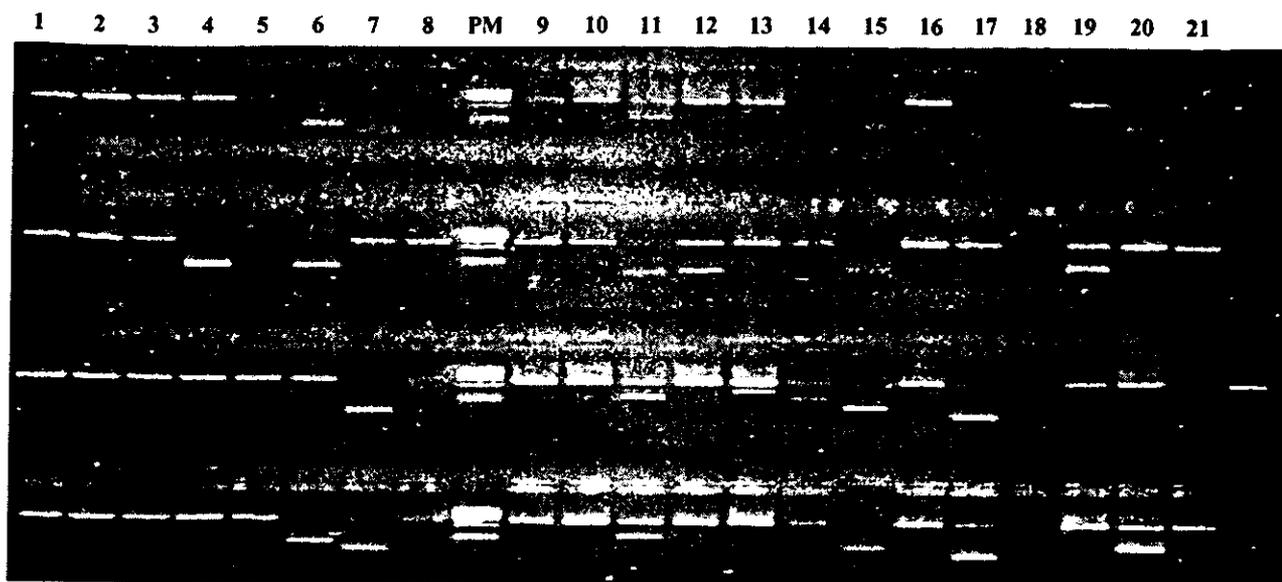
1	DQB5	8	DQB9	15	DQAAE4
2	DQB6.1	9	DQB4	16	DQA2.1
3	DQB6.2	10	DQA1.1	17	DQA4.1
4	DQB6.3	11	DQA1.3	18	DQA5.3
5	DQB2	12	DQA1.4	19	DQA5.4
6	DQB7	13	DQA1.5	20	DQA6.1
7	DQB8	14	DQA1.6	21	CONTROL

d) El tiempo de corrimiento electroforético fue de 15 a 25 min a 160 V. (8 V/cm).

e) Cuando la electroforesis es completa, el gel se coloca en un transiluminador (312 nm) y se toma una fotografía instantánea para la interpretación y documentación. (figura 4).

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA
BIBLIOTECA**

Figura 4. Electroforesis de agarosa.



Carril	Gel	Carril	Gel	Carril	Gel
1	DQB5	8	DQB9	15	DQA AE4
2	DQB6.1	9	DQB4	16	DQA2.1
3	DQB6.2	10	DQA1.1	17	DQA4.1
4	DQB6.3	11	DQA1.3	18	DQA5.3
5	DQB2	12	DQA1.4	19	DQA5.4
6	DQB7	13	DQA1.5	20	DQA6.1
7	DQB8	14	DQA1.6	21	CONTROL

5. Interpretación de los resultados.

En cada hilera de iniciadores contiene un par de iniciadores controles los cuales amplifican en el tercer intrón del gen DRB1. Este par de iniciadores tiene una concentración de 5 veces menor a la concentración de cada iniciador específico. Podrá producir un producto de amplificación de 796 bp en cada tubo en el cual un alelo o grupo específico de HLA-DQB o DQA, deberá estar presente.

6. Tabla comparativa.

<i>Pozo</i>	<i>Mezcla</i>	<i>Alelos amplificados</i>	<i>Correlación Serológica</i>	<i>Tamaño del producto de PCR</i>
1	B 5	DQB1*0501-0504	DQ5(1)	218 pb
2	B 6.1	DQB1*0601	DQ6(1)	218 pb
3	B 6.2	DQB1*0602,*0603,*0607,*0608,*0611	DQ6(1)	151 pb
4	B 6.3	DQB1*0604-0606	DQ6(1)	212 pb
5	B 2	DQB1*0201,*0202,*0203	DQ2	199 pb
6	B 7	DQB1*0301,*0304	DQ7(3)	206 pb
7	B 8	DQB1*0302	DQ8(3)	124 pb
8	B 9	DQB1*0303*0306,*0203	DQ9(3), DQ2	128 pb
9	B 4	DQB1*0401,*0402	DQ4	204 pb
10	A 1.1	DQA1*0101,*0104,*0105	-	150 pb
11	A 1.3	DQA1*0102,*0103	-	145 pb
12	A 1.4	DQA1*0101,*0102,*0104,*0105	-	169 pb
13	A 1.5	DQA1*0103	-	169 pb
14	A 1.6	DQA1*0104,*0105	-	193 pb
15	AAE4	Todas excepto: DQA1*0104,*0105	-	192 pb
16	A 2.1	DQA1*0201	-	172 pb
17	A 3B	DQA1*0301,*0302,*0303	-	108 pb
18	A 4.1	DQA1*0401	-	167 pb
19	A 5.3	DQA1*05011,*0503	-	228 pb
20	A 5.4	DQA1*05012,*05013	-	229 pb
21	A 6.1	DQA1*0601	-	167 pb

REFERENCIAS.

1. Herrero-Beaumont, Mola Martín Manual de enfermedades Reumáticas de la Sociedad Española de Reumatología.1992 pp : 33.
2. Terasaki PI., Jawahar . **HLA and Disease Associations**, 1985 pp: 12-16 y 5-7.
3. Koller BH., Geragty DE., Shimizu Y., De Mars R. , Orr HT. A novel HLA class Y gene expressed in resting T lymphocytes. **J Immunol**. 1988, 141: 897 - 904.
4. Trowsdea J. Genetic and polymorphism class II antigens. **Brit Med Bull** 1987, 43:15-36.
5. Bodmer JG., Kenedy LJ., Lindsay J., Wasik AM. Application of serology and the ethnic distribution of three locus HLA haplotypes. **Brit Med Bull** 1987, 43: 94 - 121.
6. Sargent CA., Dunham I., Trowsdale J., Campbell RD. Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP 70 **Proc Natl Acad Sci USA** 1989; 1968-70
7. Cavelli S., Bodmer F. AP11. Segregation and linkage analysis in human pedigrees and estimation of gene frequencies. *The genetic of human population* 1980; pp: 851.
8. Bodmer JG., Marsh SG., Albert DE., Bodmer WF., Dupont B., Ehrlich HA., Mach B., Mayo WR., Perham P., Sasazuki T. Nomenclature for factors of the HLA system **Hum Immunol** 1994; 41: 1-20.
9. So A. Genetics polymorphism and regulation of expression of HLA region genes. In *HLA and disease*. Lechler R. **Academic Press**; pp: 1-34.
10. Monaco JJ. Structure and function of genes in the MHC class II region. **Curr OpinImmunol** 1993; 5: 17-20.

11. Duquesnoy RJ. Immunogenetics of the human major histocompatibility complex. **Clin Lab Med** 1991; 11: 509- 536.
12. Alper CA., Raum DD., Karp S., Awwdeh ZL., Yunis EJ. Serum complement.. "supergenes" of the major histocompatibility complex in man (complotypes). **Vox Sang**; 45: 62-67.
13. Spies T., Blanck G., Bresnaham M. A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. **Science** 1989; 243:214 - 217.
14. Alper CA. Inherited structural polymorphism in human C2: evidence for genetic linkage between C2 and Bf. **J. Exp Med** 1996; 144: 1111-1115.
15. Stites DP., Abba IT., Benjamin DS. **Inmunología Básica y Clínica** 7º Edición 1993; pp: 47-63.
16. Mc Devitt HO. The molecular basis of autoimmunity. **Clin Res** 1986; 34(2): 163 -75.
17. Wake CT. Molecular biology of the HLA class II genes. **Mol Biol Med** 1986; 3(1): 1-11.
18. Guizar V., Lisker R., Armendares S., Ruiz Arguelles A., Granados J. **Temas Selectos en Biomedicina** 1991; pp: 155-175.
19. Granados J., Yamamoto Furusho JK., Zúñiga Joaquín., Ramírez SE., Salgado Norma. Las bases genéticas de las enfermedades reumáticas. **Rev Mex Reumat** 1996; 11(2): pp 72-78.
20. Lechler R. Mechanisms of HLA and disease associations. **Academic Press**; pp: 83-92.
21. Vargas-Alarcón G., y Granados J. El sistema principal de histocompatibilidad. **Rev Mex Reum** 1993; 8: 251-256.

22. Basset ML., Halliday JW., Powell LW. HLA typing in hemochromatosis. Distinction between homozygotes and heterozygotes with biochemical expression. **Hepatology** 1981; 1: 120-6.
23. Morimoto C., Halfer DA., Weiner HL., Letoin NL., Hogan M., Daley J., Soholossman. SF. Selective loss of the suppressor induce T-cell subset in progressive multiple sclerosis. Analysis with anti-2H4 monoclonal antibody. **N Engl J Med** 1987; 316: 67-72.
24. Geczy AF., Alexander K., Bashir HV., Edmonds JP. Characterization of a factor present in *Klebsiella* culture filtrates that specifically modifies in HLA-B27 associated cell surface component. **J Exp Med** 1980; 152: 331-40.
25. Schwimmbeck PL., Yu DT., Oldstone MB. Autoantibodies to HLA-B27 patients with ankylosing spondylitis and Reiter's syndrome. Molecular mimicry with *Klebsiella pneumoniae* as a potential mechanism of autoimmune disease. **J Exp Med** 1987; 166: 173-81.
26. Yunis EJ., Awdeh Z., Raum D., Alper CA. The MHC in human bone marrowallo transplantation. **Clin Haematol** 1983; 12(3): 641-80.
27. Velasco-Castrejón O, González Ochoa A. Primary pulmonary epidemic histoplasmosis in an abandoned mine. **Mykosen** 1977; 20: 393-399.
28. Taylor ML., Granados J., Toriello C. Biological and sociocultural approaches of histoplasmosis, in the State of Guerrero, Mexico. **Mycoses** 1996; 39: 375-379.
29. Catanzaro A. Fungal pneumonia's. **Curr Opin Pulm Med** 1997; 3: 146-150.
30. Myskowski PL., White MH., Ahkami R. Fungal disease in the immunocompromised host. **Dermatol Clin** 1997; 15: 295-305.
31. Joaquín Zúñiga R., Betina Hernández M., Tatiana Rodríguez R., Julio Granados A.

- Inmunogenética de la histoplasmosis. **Rev Inst Nal Enf Resp Mex** 1998; 11(3): pp 226-228.
32. McConnell RB. Peptic ulcer: early genetic evidence families Twins, and markers In: Rotter JI., Samloff IM., Rimoin DL eds. The genetics and heterogeneity of common gastrointestinal disorders. **New York Academic** 1980: 31 - 41.
33. Azuma T., Konishi J., Tanaka Y., Hirai M., Ito S., Kato T., Kohli Y. Contribution of HLA-DQA gene to host's response against *Helicobacter pylori*. **Lancet** 1994; 343: 542-543.
34. Beales ILP., Davey NJ., Pusey CD., Leechler RI., Calam J. Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis. **Lancet** 1995; 346: 381-382.
35. Lee JE., Lowy AM., Thompson WA., Lu M., Loflin PT., Skibber JM., Evans DB., Curley SA., Mansfield PF., Reveille JD. Association of gastric adenocarcinoma with the HLA class II gene DQB1*0301. **Gastroenterology** 1996, 111:426 - 432.
36. Miller SA., Dykes KK., Plesky HF. A single salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res** 1988; 16: 1215.
37. Young A., Jaraquemada D., Awad J. Association of HLA-DR4/DW4 and DR/DW2 with radiological changes in a prospective study of patients with RA. **Arthritis Rheum** 1984; 24: 20-25.
38. Granados J., Yamamoto Furusho JK., Zúñiga J., Ramírez SE., Salgado Norma. Las bases genéticas de las enfermedades reumáticas. **Rev Mex Reumat** 1996; 11(2): 72-78.
39. Herrea- Goepfert R, Mundo Gallardo F. Gastritis Crónica en individuos asintómicos. **Patología** 1989., 27: S- 15.
40. Herrera Goepfert R, Julián Arista-Nasr, Alejandra de Alba-Campomanes. Pathologic

Features of the Gastric Mucosa Adejacent to Primary MALT-lymphomas. **J. Clin.**

Gastroenterol. 1999 p-p 1-3