

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio genético del Complejo Principal de Histocompatibilidad en la evolución de las lesiones gástricas asociadas a

Helicobacter pylori

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

OSWALDO PARTIDA RODRÍGUEZ

DIRECTORA DE TESIS: **DR.A. MARTHA ESTELA PÉREZ RODRÍGUEZ**

MÉXICO, D.F.



SEPTIEMBRE 2005

COORDINACIÓN

m349109



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.

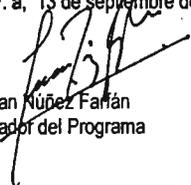
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 27 de junio del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) Partida Rodríguez Oswaldo con número de cuenta 93155968 con la tesis titulada: "Estudio genético del polimorfismo del complejo principal de histocompatibilidad en la evolución de las lesiones gástricas asociadas a *H. pylori*", bajo la dirección del(a) Dra. Martha E. Pérez Rodríguez.

Presidente:	Dra. Yolanda López Vidal
Vocal:	Dr. Julio Granados Arriola
Secretario:	Dra. Martha E. Pérez Rodríguez
Suplente:	Dr. Gilberto Vargas Alarcón
Suplente:	Dr. Carlos A. Eslava Campos

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 13 de septiembre del 2005



Dr. Juan Núñez Farián
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

DURANTE LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE PROYECTO SE
CONTARON CON LOS SIGUIENTES APOYOS:

BECA DE MAESTRÍA DEL CONACYT: SEPTIEMBRE 2002 A
JUNIO 2004, NO. DE BECARIO: 172452

BECA DE LA COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
DEL IMSS: FEBRERO 2003 A FEBRERO 2005, MATRÍCULA
99091237

APOYOS AL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: CONACYT 6957,
FOFOI IMSS 2001/007 Y 2002/110.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:

Dra. MARTHA E. PÉREZ RODRÍGUEZ

Dr. JULIO GRANADOS ARRIOLA

Dr. CARLOS A. ESLAVA CAMPOS

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. MARTHA E. PÉREZ RODRÍGUEZ EN EL LABORATORIO DE HLA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN INMUNOLOGÍA CMN S-XXI IMSS A CARGO DEL DR. ROBERTO R. KRETSCHMER SCHMID, EN COLABORACIÓN CON LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y PARASITARIAS CMN S-XXI IMSS Y DEL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA SSA.

A Miriam...

...porque sólo tú sabes las cosas que hemos pasado y lo que esto nos ha costado. Espero que sigas a mi lado por siempre.

ÍNDICE

1.0 Resumen	1
1.1 Abstract	2
1.2 Abreviaturas	3
2.0 Introducción	4
2.1 <i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>)	4
2.1.1 Coevolución con el <i>Homo sapiens</i>	5
2.1.2 Epidemiología	6
2.1.3 <i>H. pylori</i> y cáncer gástrico	9
2.1.4 Cáncer gástrico en México	9
2.1.5 Factores de riesgo en cáncer gástrico	10
2.1.6 Factores genéticos del hospedero	12
2.2 Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC)	13
2.2.1 Organización genética del MHC	13
2.2.2 Efecto biológico del MHC	15
2.2.3 Moléculas de HLA	15
2.2.4 Polimorfismo de HLA	16
2.2.5 Polimorfismo de HLA y enfermedad	16
2.2.6 HLA-DQ y enfermedades gástricas asociadas a <i>H. pylori</i>	17
3.0 Planteamiento del problema	19
4.0 Objetivos	20
4.1 Objetivo general	20
4.2 Objetivos particulares	20
5.0 Hipótesis	21
6.0 Material y Métodos	22
6.1 Controles	22
6.2 Pacientes	22
6.3 Material Biológico	22
6.4 Determinación de anticuerpos contra <i>H. pylori</i>	23
6.5 Extracción de DNA	23

6.6 Reacción de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)	24
6.6.1 HLA-DQA1	24
6.6.2 HLA-DQB1	25
6.7 Tipificación de HLA-DQA1 y HLA-DQB1	26
6.7.1 RSCA	26
6.7.2 Preparación de FLRs	28
6.7.3 Hibridación	28
6.7.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida	28
6.7.5 Controles de DNA internos para RSCA (<i>Ladders</i>)	29
6.7.6 Análisis de resultados en gel de poliacrilamida	29
6.8 Análisis estadístico	30
6.9 Diagrama de flujo de la metodología	31
7.0 Resultados	32
7.1 Controles	32
7.2 Pacientes	33
7.3 Anticuerpos IgG contra <i>H. pylori</i>	34
7.4 Frecuencias génicas de HLA-DQA1	34
7.5 Frecuencias génicas de HLA-DQB1	37
7.6 Frecuencias de haplotipos DQA1-DQB1	40
7.7 Frecuencias génicas de HLA-DQ en controles seropositivos y seronegativos a <i>H. pylori</i>	42
7.8 Frecuencias génicas de HLA-DQ de pacientes contra controles seropositivos y seronegativos a <i>H. pylori</i>	42
8.0 Discusión de Resultados	45
9.0 Conclusiones	52
10.0 Bibliografía	54

1.0 RESUMEN

A pesar de los numerosos reportes sobre factores de virulencia en la patogénesis de la infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), hay pocos estudios sobre factores inmunogenéticos relacionados con la susceptibilidad del hospedero a la infección por esta bacteria y al desarrollo del cáncer gástrico y sus lesiones preneoplásicas. Al respecto, en población japonesa, los alelos DQA1*0102 y DQB1*0401 se han asociado de forma negativa y positiva respectivamente, con la infección por *H. pylori* y el padecimiento de gastritis crónica atrófica y úlcera duodenal. En estudios realizados con población mestiza mexicana se ha observado la asociación del alelo DQB1*050101 con cáncer gástrico. En este estudio se analizó el polimorfismo de los loci *HLA-DQA1* y *HLA-DQB1* en pacientes mestizos mexicanos con gastritis superficial, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia gástrica, cáncer gástrico y úlcera duodenal. El exón 2 de *HLA-DQA1* y *HLA-DQB1* se analizó mediante una técnica conformacional de DNA. *HLA-DQA1* se estudió en 147 muestras de controles sin lesiones gástricas y en 417 pacientes diagnosticados mediante endoscopia e histología, agrupados en las diferentes patologías arriba mencionadas; *HLA-DQB1* se analizó en 133 muestras de controles y en 423 pacientes; y finalmente se estudió el haplotipo DQA1-DQB1 en 117 controles y en 385 pacientes. Las frecuencias de los diferentes grupos de enfermedades fueron comparadas estadísticamente contra el grupo control y el grupo de gastritis superficial, mediante la prueba de χ^2 y la prueba exacta de Fisher, y el valor de p fue corregido por el número de especificidades estudiadas ($p < 0.05$). Al comparar contra los controles, se encontraron asociaciones positivas del alelo DQB1*050101 (RM 2.65, IC 95% 1.3-5.45) y del haplotipo DQA1*040101-DQB1*050101 (RM 13.19, IC 95% 1.55-294.36) con cáncer gástrico y del alelo DQB1*0604 (RM 6.09, IC 95% 2.63-14.47) con metaplasia intestinal. Mientras que se encontró una asociación negativa del haplotipo DQA1*030101-DQB1*0302 (RM 0.55, IC 95% 0.36-0.84) con gastritis superficial. Cuando la metaplasia intestinal se compara contra gastritis superficial, se observó un aumento de la frecuencia del alelo DQB1*0604 (RM 3.59, IC 95% 1.79-7.32) y una disminución de DQA1*0201 (RM 0.07, IC 95% 0.00-0.44). Estos resultados indican que los genotipos de *HLA-DQ* son marcadores de susceptibilidad o resistencia en los padecimientos gástricos asociados a la infección por *H. pylori*, en población mestiza mexicana.

1.1 ABSTRACT

In spite of the several reports about virulence factors in *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) pathogenesis, there are few studies concerning the relationship between immunogenetic factors and host susceptibility to development of gastric cancer and preneoplastic lesions. In that respect, in Japanese population, DQA1*0102 and DQB1*0401 have been associated, in a negatively and positively way respectively, with *H. pylori* infection, atrophic chronic gastritis and duodenal ulcer. In Mexican mestizo population an association between DQB1*050101 and gastric cancer has been reported. We studied the *HLA-DQA1* y *HLA-DQB1* loci polymorphism in Mexican mestizo patients with superficial gastritis, chronic atrophic gastritis, intestinal metaplasia, gastric dysplasia, gastric cancer and duodenal ulcer, diagnosed by endoscopy and histology. Using a DNA conformational technique, *HLA-DQA1* was analyzed in 147 control samples without gastric lesions and in 417 patient samples. Whereas *HLA-DQB1* was studied in 133 control and 423 patient samples. Finally, the haplotype DQA1-DQB1 was determined in 117 controls and 385 patients. The genetic frequencies in the patient groups were statistically compared with the control and superficial gastritis groups. using χ^2 test and Fisher exact test, then the p value was corrected multiplying by the number of specificities studied ($p < 0.05$). When compared with the control group, there were positive associations of DQB1*050101 (OR 2.65, CI 95% 1.3-5.45) and the haplotype DQA1*040101-DQB1*050101 (OR 13.19, CI 95% 1.55-294.36) with gastric cancer, and DQB1*0604 (OR 6.09, CI 95% 2.63-14.47) with intestinal metaplasia. And there was a negative association between the haplotype DQA1*030101-DQB1*0302 (OR 0.55, CI 95% 0.36-0.84) and superficial gastritis. When intestinal metaplasia was compared with superficial gastritis, we observed an increase in DQB1*0604 (OR 3.59, CI 95% 1.79-7.32) and a decrease in DQA1*0201 (OR 0.07, CI 95% 0.00-0.44) frequencies. These results suggest that the *HLA-DQ* genotypes are susceptibility markers in gastric diseases associated with *H. pylori* infection in Mexican Mestizo population.

1.2 ABREVIATURAS

CG	Cáncer gástrico
Cy5	Carbocianina 5
DG	Displasia gástrica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FLR	<i>Fluorescence Labelled Reference</i> (Referencia marcada con fluorescencia)
GCA	Gastritis crónica atrófica
GS	Gastritis superficial
HLA	<i>Human Leucocyte Antigens</i> (Antígenos Leucocitarios Humanos)
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complejo Principal de Histocompatibilidad)
MI	Metaplasia intestinal
PAI <i>cag</i>	(<i>cag Pathogenicity Island</i>) Isla de patogenicidad <i>cag</i>
<i>p</i>_c	<i>p</i> corregida, valor de <i>p</i> multiplicado por el número de especificidades (alelos) estudiados
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
RM	Razón de momios
RSCA	<i>Reference Strand Conformational Analysis</i> (Análisis conformacional usando una cadena sencilla de DNA como referencia)
UD	Úlcera duodenal

2.0 INTRODUCCIÓN

2.1 *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)

El género *Helicobacter* fue formalmente propuesto en 1989 (Goodwin *et al.*, 1989) y actualmente existe un total de veinte especies registradas (*i. e.* *H. canis*, *H. felis*, *H. acinonyx*, etc). Las especies del género *Helicobacter* se han agrupado como organismos gástricos o entéricos (enterohepáticos) dependiendo del sitio de colonización (Achtman y Suerbaum, 2001). Los organismos gástricos en humanos han sido descritos por más de 100 años (Jaworski, 1889) antes de que en 1982 los médicos australianos Robin Warren y Barry Marshall identificaran al bacilo curvo flagelado, ahora nombrado *H. pylori*, adyacente al epitelio gástrico de pacientes con gastritis crónica (Marshall y Warren, 1984). *H. pylori* ocupa un nicho único, coloniza el estómago humano en condiciones de microaerofilia y en un ambiente extremadamente ácido. *H. pylori* es un bacilo gram-negativo no invasivo en forma de coma de 3 x 0.5µm, con 5 a 6 flagelos en un polo. Esta bacteria produce ureasa la cual cataliza la hidrólisis de urea en amoníaco y dióxido de carbono incrementando el pH localmente, lo que le permite colonizar la mucosa gástrica. Esta bacteria posee una isla de patogenicidad llamada PAI-*cag* con un tamaño aproximado de 40 kb, con alrededor de 40 genes relacionados al complejo de secreción tipo IV y genes de virulencia. La PAI-*cag* de *H. pylori*, tiene características similares a las de otras islas de patogenicidad encontradas en *E. coli*, *Salmonella* y *Yersinia*. (Atherton, 1997). Una característica particular de *H. pylori* es que posee un gene fuera de la PAI-*cag* que codifica una citotoxina vacuolizante conocida como VacA la cual interiere en el tráfico vesicular de las células epiteliales, impidiendo la vía de presentación de antígenos del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) clase II (Papini *et al.*, 1994; Massari *et al.*, 1998).

Como algunas otras bacterias de este género, *H. pylori* posee actividades de catalasa, oxidasa, γ -glutamyl-transpeptidasa y reductoras de nitrógeno. Además puede utilizar el hidrógeno molecular como fuente de energía, de manera que su crecimiento depende en cierta medida del hidrógeno excretado por bacterias intestinales difundido hasta el estómago (Olson y Maier, 2002). Otra enzima, la endonucleasa III (esencial para la reparación de bases

pirimídicas oxidadas), es requerida para una exitosa colonización de la bacteria, quizá mediante un efecto de protección contra el estrés oxidativo en la reacción inflamatoria contra *H. pylori* (O'Rourke *et al.* 2003).

2.1.1 Coevolución con el *Homo sapiens*

H. pylori está altamente adaptada al estómago humano donde ha vivido por miles de años, como se demuestra por las asociaciones geográficas de los genotipos de *H. pylori* (Kersulyte *et al.*, 2000). Es encontrada predominantemente en poblaciones humanas actuales que derivan sus cargas genéticas de poblaciones ancestrales que surgieron en África, Asia Central y Oriental, con una subsiguiente dispersión atribuible a los flujos migratorios humanos (Falush *et al.*, 2003). De hecho se estima que *H. pylori* ha infectado a los humanos desde antes de las principales migraciones del *Homo sapiens* fuera de África hace unos 50 000 a 100 000 años (Covacci *et al.*, 1999).

Los aislados de *H. pylori* de individuos no relacionados entre sí tienen huellas genéticas totalmente diferentes, sin embargo el genoma de la bacteria no es tan diverso. La variabilidad se debe a cambios en el tercer nucleótido de los codones, a inversiones y a translocaciones, que modifican el DNA pero no las secuencias de las proteínas (Covacci *et al.*, 1999). Cuando se comparan las huellas genéticas de aislados del mismo paciente a intervalos de varios años se observa que son idénticas (Miehkle *et al.* 1999). A pesar de ello existe un proceso continuo de evolución de la bacteria dentro del estómago, manifestado en mutaciones nucleotídicas, escisión de la PAI-*cag*, transposición de elementos de inserción, recombinación con DNA de cepas que no pudieron establecer una infección crónica y mediante transferencia horizontal de genes (Berg *et al.* 1997; Miehkle *et al.* 1999).

Aproximadamente el 60% de las cepas de *H. pylori* producen proteínas codificadas por genes localizadas en la PAI-*cag* (Atherton, 1997). Esta isla tiene un tamaño aproximado de 40

kb, con alrededor de 40 genes. PAI-*cag* presenta características similares a las de otras islas de patogenicidad encontradas en *E. coli*, *Salmonella* y *Yersinia*. Las características de la isla PAI-*cag* de *H. pylori* son las siguientes: i) su contenido de G+C es de 35% comparado con el 39% del resto del genoma; ii) contiene genes de virulencia y genes que codifican proteínas del sistema de secreción tipo IV; iii) presenta una o dos secuencias de inserción (IS605 e IS606) en algunas cepas; iv) en otras cepas está flanqueada por secuencias repetidas directas que participan en su integración en el genoma bacteriano (Ge y Taylor, 1999). La PAI-*cag* puede estar organizada de forma diferente dependiendo de la cepa que se estudie. La isla puede estar continua en una misma región o estar dividida en dos regiones *cag* I y *cag* II por una secuencia de inserción o por secuencias del genoma bacteriano (Kerulyte *et al.*, 2000).

2.1.2 Epidemiología

H. pylori produce la infección bacteriana crónica más común en humanos (Moss y Sood, 2003). La seroprevalencia mundial de *H. pylori* fluctúa entre 20-80% (Torres *et al.* 1998a). Esta bacteria coloniza el estómago por años, décadas, o de por vida, no por días o semanas como es usualmente el caso de bacterias patógenas. La infección está asociada fuertemente con las condiciones socioeconómicas, con una prevalencia promedio de 80% en países en desarrollo comparada con un 20-50% en el mundo industrializado (Suerbaum y Michetti, 2002). En México la infección por *H. pylori* estimada por serología ocurre en el 80% de los adultos, siendo además de adquisición relativamente temprana (Mitchell, 1993, Torres *et al.*, 2000).

El modo de transmisión no está completamente claro. Las hipótesis más aceptadas son que el organismo se transmite directamente de persona a persona entre la familia durante la infancia (Malaty *et al.* 2002), por heces (fecal-oral), por contenido gástrico (gástrico-oral), a través de fuentes de agua (Brown *et al.* 2002, Mazari-Hiriart *et al.*, 2005) o por equipo de endoscopia mal aseado (Covacci *et al.*, 1999). También se ha documentado que infecta de manera natural a otros mamíferos, como gatos (Fox *et al.*, 1995) y primates no humanos

(Handt *et al.*, 1997), y se ha reportado la infección experimental de ratones de laboratorio (Marchetti *et al.*, 1995). La infección con *H. pylori* puede ser diagnosticada mediante una biopsia por endoscopia (prueba rápida de urea, examen histológico, cultivo o PCR) o mediante métodos no invasivos (serología, prueba de aliento o la detección de antígenos de *H. pylori* en heces) (Monteiro *et al.* 2001).

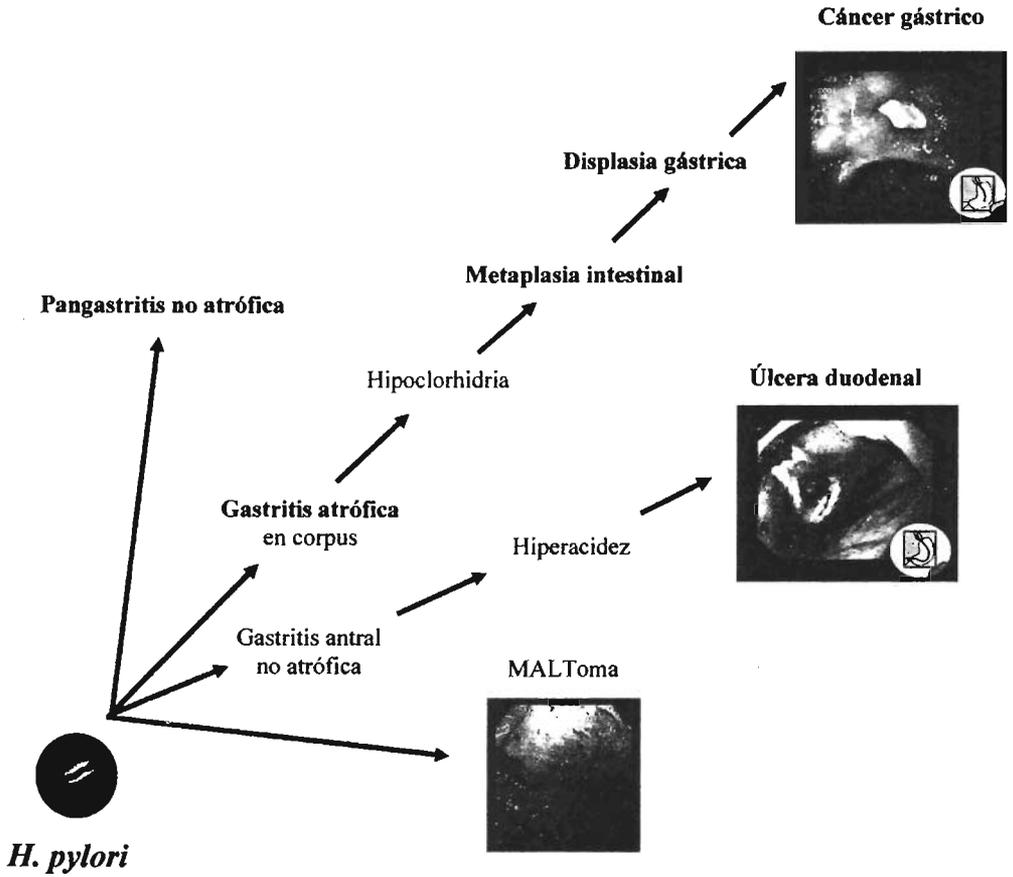
H. pylori causa inflamación aguda y crónica de la mucosa gástrica. A pesar de que la mayoría de los infectados no presentan consecuencias clínicas, el resultado de la infección en el 20% al 30% de individuos conduce a una patología gástrica (Covacci *et al.*, 1999), ya que la bacteria puede causar -o asociarse a- gastritis (activa persistente y atrófica) y úlcera gastroduodenal en niños y adultos, además de metaplasia-displasia y cáncer gástrico (distal) en adultos. Actualmente hay un consenso que establece un fuerte lazo entre *H. pylori* y cuatro enfermedades gastroduodenales: úlcera duodenal, úlcera gástrica, adenocarcinoma gástrico distal y linfoma tipo MALT de estómago (Covacci *et al.*, 1999). Cada año al menos 7 millones de casos de estas enfermedades se presentan mundialmente, resultando en cientos de miles de muertes (Parsonnet, 1998). Además, *H. pylori* se ha asociado (aunque no de forma consistente) con padecimientos no gástricos como arterosclerosis, enfermedades alérgicas de la piel, encefalopatía hepática, anemia infantil y retardo del crecimiento. También se ha reportado que la infección con *H. pylori* puede ser benéfica y proteger contra el reflujo esofágico y el adenocarcinoma del esófago distal y el *cardias* gástrico (Chow *et al.*, 1998).

Se estima que entre 10-20% de las personas infectadas con *H. pylori* desarrollarán úlceras pépticas, (Go, 1997; Cats *et al.*, 1998; Kuipers, 1999; Chan *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2002). Hasta un 50% de todos los individuos infectados con *H. pylori* progresarán hacia algún tipo de cambios histológicos en una secuencia preneoplásica (Correa, 1992), sin embargo menos del 2% desarrollarán cáncer gástrico (Go, 1997; Cats *et al.*, 1998; Kuipers, 1999)

Figura 1.

Figura 1. Historia natural de las enfermedades gástricas asociadas a la infección por *H. pylori*.

Las consecuencias clínicas de la infección por *H. pylori*, además de otros factores, dependen de la zona de la mucosa gástrica donde se ubica la infección e incluyen desde una pangastritis asintomática a una úlcera duodenal, cáncer gástrico (distal, tipo histológico intestinal) o linfoma tipo MALT (Basado en Sipponen *et al.* 1998).



2.1.3 *H. pylori* y cáncer gástrico

Se ha demostrado una asociación entre la infección crónica por *H. pylori* y el cáncer gástrico distal (Guarner *et al.*, 1993; De Koster *et al.*, 1994; Cats *et al.*, 1998; Kuipers, 1998 y 1999; Ley *et al.*, 2001). *H. pylori* interfiere *in vitro* con la maquinaria celular que se encarga de limitar el daño en el DNA mediante la corrección de desapareamientos (Kim *et al.*, 2002). La infección crónica también está asociada con un incremento del intercambio celular gástrico, importante en la transformación celular. El aumento de la proliferación celular (sin incremento de apoptosis) puede estar relacionado a la adhesina *babA2* de *H. pylori* (Yu *et al.*, 2002). También se ha reportado la estimulación de la producción de sintetasa inducible de óxido nítrico de macrófagos por la ureasa (Gobert *et al.* 2002) aumentando el daño inflamatorio. En algunas cepas de *H. pylori*, la PAI-*cag* es antiapoptótica a través de una vía que involucra el factor nuclear *kappa* B (Maeda *et al.*, 2002) lo que indica que al modular el ciclo celular de las células epiteliales, *H. pylori* puede originar la aparición células epiteliales neoplásicas y preneoplásicas. En algunos estudios se ha reportado que los individuos infectados con *H. pylori* tienen un riesgo entre dos y seis veces mayor de desarrollar cáncer gástrico y linfomas tipo MALT (*mucosal associated lymphoid tissue*) si se les compara con individuos libres de este microorganismo (De Koster *et al.*, 1994; Kuipers, 1999; Taupin *et al.*, 1999).

2.1.4 Cáncer gástrico en México

En México hay zonas que difieren en riesgo de cáncer gástrico. En el Estado de México el riesgo es de 2.5/100,000 habitantes (bajo), en el D. F.: 4.5/100,000 habitantes (medio) y en Chiapas: 6.4/100,000 habitantes (alto) (Torres *et al.*, 1998b) El cáncer gástrico es la decimocuarta causa de muerte a escala mundial (Murray y López, 1997) y se estima que se convierta en la número 8 para el año 2010 (Covacci *et al.*, 1999). En nuestro país el cáncer es la segunda causa de muerte, y el gástrico ocupa el quinto lugar entre las neoplasias malignas (Salud S, 1999). En Latinoamérica y Asia, el cáncer gástrico es el cáncer más común en los

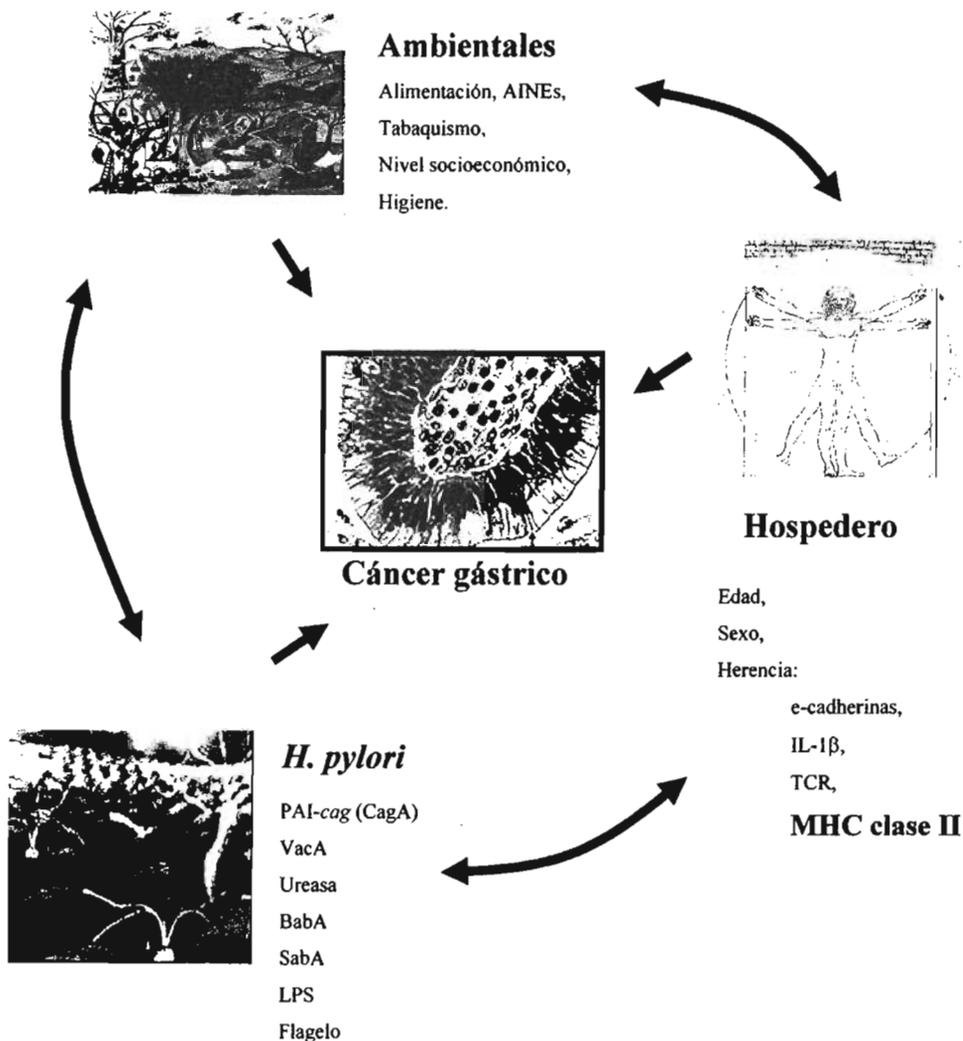
hombres y ocupa el segundo lugar entre las mujeres, con una incidencia de 80 por 100,000 habitantes en Colombia lo que contrasta con la incidencia de 10 por 100,000 habitantes en E. U. y en Europa (Guarner *et al.*, 1993; Mitchell *et al.*, 1993; De Koster *et al.*, 1994).

2.1.5 Factores de riesgo en cáncer gástrico

El cáncer gástrico es una enfermedad multifactorial **Figura 2**. Se ha relacionado con factores ambientales y factores del hospedero. Entre los factores ambientales se cuentan el nivel socioeconómico, los hábitos higiénicos y alimenticios, pero sobre todo la infección por *H. pylori* con la participación de sus factores CagA, VacA y ureasa (Parsonnet *et al.*, 1997, Torres *et al.*, 1998b, Vaucher *et al.*, 2000, Castillo-Rojas *et al.*, 2004). La mayoría de los estudios de asociación entre cáncer gástrico y *H. pylori* se han orientado más hacia los factores bacterianos (Kuipers, 1999). Se han encontrado varios genes de virulencia en *H. pylori* en poblaciones occidentales que están asociados con un incremento en el riesgo de cáncer gástrico y lesiones pre-cancerosas, no obstante estas relaciones varían ampliamente entre poblaciones. En nuestro país las cepas CagA+ son un factor de riesgo adicional en el desarrollo del carcinoma gástrico, lo que contrasta con lo observado en otros países (Torres *et al.*, 1998b).

Figura 2. Factores de riesgo asociados al cáncer gástrico.

El cáncer gástrico y sus lesiones precursoras tienen una etiología multifactorial, en la que factores de virulencia de *H. pylori*, factores ambientales como la alimentación y nivel socioeconómico, así como factores del hospedero tales como la edad, el sexo y carga genética, en conjunto determinan su evolución.



2.1.6 Factores genéticos del hospedero

Las relaciones ecológicas que resultan de la co-evolución entre el epitelio intestinal humano y ciertas bacterias abarcan desde comensalismo y simbiosis hasta enfermedad (Hooper y Gordon, 2001). Ahora es posible establecer algunas bases moleculares y genéticas de estos fenómenos en la transición co-evolutiva asociada a *H. pylori*, que va de población abierta (100%), infección (con asociaciones comensales y simbióticas) (~80%), enfermedad ácido-péptica (~20%), úlcera gástrica antral (~10%), atrofia-metaplasia (~8%) y cáncer gástrico distal (~1%) (Asaka *et al.*, 1998; Sipponen *et al.*, 1998), y saber si ocurre paralelamente un proceso de selección de ciertos rasgos genéticos de posible propensión y/o resistencia a este proceso.

La variabilidad de los factores del hospedero tales como el origen étnico, antígenos de grupos sanguíneos, edad de infección contribuyen a los diferentes resultados clínicos (Covacci *et al.*, 1999). Un punto importante en la patogénesis de *H. pylori* es la demostración de que la respuesta epitelial e inmune en el estómago depende en cierto grado de los polimorfismos de genes de IL-1 β , y TCR (El-Omar *et al.*, 2000; Kuntsman *et al.*, 2000; Furuta *et al.*, 2002a; Furuta *et al.*, 2002b; González *et al.*, 2002; Macarthur *et al.*, 2004; Garza-González *et al.*, 2005). Otros factores inmunogenéticos asociados son algunos genes *HLA* (*Human Leucocyte Antigens*) de clase II en poblaciones caucásicas y orientales (Azuma *et al.*, 1994, 1995 1998; Morris *et al.*, 1994; Go, 1997; Yoshitake *et al.*, 1999).

2.2 Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC)

La generación de una respuesta inmunológica adaptativa depende de la participación de las moléculas de *HLA* (Antígenos Leucocitarios Humanos). El *HLA* comprende un grupo de genes relacionados entre sí localizados en el MHC humano, que codifican moléculas de membrana con la función principal de presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T (Stern y Wiley, 1994).

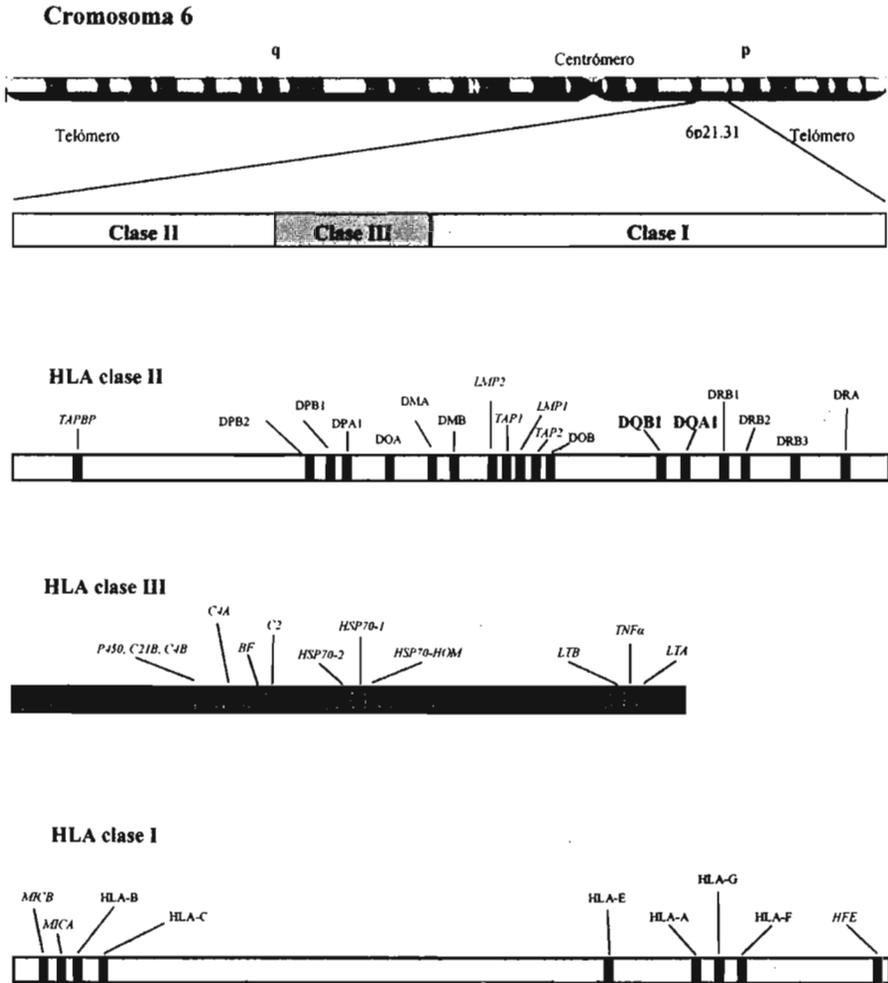
2.2.1 Organización genética del MHC

El MHC humano, en la región cromosómica 6p21, se extiende a lo largo de 3.6 Mb donde se encuentran seis genes *HLA* clásicos y muchos otros con funciones importantes en la regulación del sistema inmunológico (*i. e. TNF, HSP70, TAP, etc.*) y otros procesos celulares fundamentales. El MHC contiene un total de 239 *loci*, de entre los cuales 130 son genes expresados, 17 son posibles genes, 4 son genes no codificantes y 88 son pseudogenes (Shiina *et al.*, 2004). Convencionalmente, el MHC se divide en tres regiones, Clase II, Clase III y Clase I de centrómero a telómero.

La región de clase II se extiende en aproximadamente 0.9 Mb y contiene los genes clásicos de clase II, cadenas α y β de *HLA-DP*, *HLA-DQ* y *HLA-DR*, que son expresados principalmente en la superficie de las células presentadoras de antígenos. En la región de clase III, a lo largo de 0.9Mb, no se han encontrado genes parecidos a los genes *HLA* clase I ni II, pero contiene genes para factores del complemento *C2*, *C4* y *Bf*, genes de citocinas *TNF- α* , *LTA* y *LTB*, genes de proteínas de choque térmico *HSP70-1*, *-2*, *-HOM*, y otros genes sin una función inmunológica obvia. La región de clase I comprende 1.8 Mb y alberga a los genes clásicos de clase I, cadenas α de *HLA-A*, *HLA-B* y *HLA-C*, expresados en la membrana de células nucleadas (Shiina *et al.*, 2004) **Figura 3**.

Figura 3. Mapa genético del Complejo Principal de Histocompatibilidad Humano

En el cromosoma 6 humano, a lo largo de 3.6Mb, se localizan 239 loci que componen las regiones de *HLA* clase I, clase III y clase II. Los productos de los genes de clase I y II se encargan de la presentación de antígenos peptídicos a linfocitos T CD8+ y CD4+ respectivamente. El polimorfismo en estas moléculas determina la magnitud de la respuesta inmune adaptativa (Modificado de Shiina *et al.*, 2004).



Existen 55 *loci* identificados dentro de la región de clase II con 31 genes expresados, tres posibles genes, un gene no expresado y 20 pseudogenes. Diecinueve de los *loci* son secuencias tipo *HLA* clase II, incluyendo 15 *loci HLA* clase II clásicos y 4 *loci HLA* clase II no clásicos (Shiina *et al.*, 2004). La región de clase III contiene 62 *loci* con 58 genes expresados, dos posibles genes y dos pseudogenes, esta es una región con una densidad genética muy alta con aproximadamente un gene por cada 14,516 pb. En la región de clase I se encuentran 122 *loci* con 41 genes expresados, 12 posibles genes, 3 genes no codificantes y 66 pseudogenes. Entre éstos, al menos 18 genes son genes tipo *HLA* clase I, que incluyen tres *loci HLA* clase I clásicos, tres *loci HLA* clase I no clásicos y 12 genes no codificantes o que son pseudogenes (Shiina *et al.*, 2004). También se encuentran siete genes parecidos a *HLA* clase I, conocidos como *MIC* (*MHC class I chain related genes*) implicados en la respuesta inmune innata (Bahram, 2001).

2.2.2 Efecto biológico del MHC

Existen cuatro categorías funcionales de los genes localizados en el MHC: i) procesamiento y presentación de antígenos mediante *HLA* clase I y II, *LMPs* y *TAP*; ii) inmunidad innata, inflamación y regulación de la respuesta inmunológica mediante genes de clase III, iii) interacciones intercelulares a través de receptores de MHC y sus ligandos y iv) funciones no relacionadas a la inmunidad (Bart, 1998; Kulski *et al.*, 2002).

2.2.3 Moléculas de HLA

Las moléculas *HLA* clase I son heterodímeros compuestos por una glucoproteína transmembranal de 44 kDa codificada en el MHC conocida como cadena pesada o cadena α y una proteína no polimórfica de 12 kDa conocida como β 2m codificada en el cromosoma 15, que se une no covalentemente con la porción extracelular de la cadena pesada. Estas moléculas se expresan en prácticamente todas las células nucleadas y restringen el reconocimiento de péptidos antigénicos por las células T $CD8^+$ (Karr, 1998).

Los productos de HLA clase II son heterodímeros compuestos por una cadena α de ~32 kDa y una cadena β de ~28 kDa codificadas en el MHC y forman parte de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Estas glucoproteínas transmembranales se encuentran en células presentadoras de antígenos (*i.e.* células dendríticas, macrófagos, linfocitos B) y restringen el reconocimiento de péptidos antigénicos principalmente extracelulares a linfocitos T CD4⁺ (Karr, 1998).

2.2.4 Polimorfismo de *HLA*

Entre los genes que codifican las moléculas de HLA clase I y II, se incluyen varios que son altamente polimórficos. Hasta diciembre de 2004 los números de variantes alélicas reportadas son los siguientes: 349 *HLA-A*; 627 *HLA-B*; 182 *HLA-C*; 394 *HLA-DRB1*; 28 *HLA-DQA1*; 61 *HLA-DQB1*; 22 *HLA-DPA1* y 116 *HLA-DPB1* (Marsh *et al.*, 2005).

2.2.5 Polimorfismo de *HLA* y enfermedad

Existen evidencias de que el polimorfismo en *HLA* se mantiene por selección positiva relacionada a su función inmunológica. Esta selección puede mantener linajes alélicos por periodos de tiempo más largos de lo que se espera y ciertas variedades pueden asociarse a enfermedades. Los genes de *HLA* clase I y II han sido asociados con más de 100 distintas enfermedades (Shiina *et al.*, 2004) y algunas se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Ejemplos de enfermedades inflamatorias, infecciosas y oncológicas asociadas al HLA.

Las moléculas de HLA se han asociado con más de 100 diferentes enfermedades inflamatorias, autoinmunes, oncológicas e infecciosas.

Enfermedad	Tipo de enfermedad	Gene en HLA
Uveítis anterior aguda	Inmune/ocular	<i>HLA-B, MICA</i>
Enfermedad de Alzheimer	Neurodegenerativa	<i>HLA-A, -DRB1</i>
Asma	Inmune/respiratoria	<i>HLA-DRB1, -DQB1, -DPB1</i>
Enfermedad de Behçet	Inmune/ocular	<i>HLA-B, MICA</i>
Neoplasia intraepitelial cervical	Infección/ginecológica	<i>HLA-DQB1</i>
Tuberculosis	Infección/respiratoria	<i>HLA-DQB1</i>
Melanoma cutáneo	Cáncer de piel	<i>HLA-DQB1</i>
Alergia al látex	Inmune	<i>HLA-DR</i>
Cáncer de próstata	Cáncer	<i>HLA-A</i>
Carcinoma de tiroides	Cáncer/endocrino	<i>HLA-DR</i>

(Modificado de Shiina *et al.*, 2004).

Convencionalmente se considera que hay una asociación con una enfermedad o una infección si la frecuencia de uno o más alelos está incrementada (asociación positiva) o disminuida (asociación negativa) de forma significativa cuando se compara un grupo de pacientes contra un grupo de control apropiado.

2.2.6 HLA-DQ y enfermedades gástricas asociadas a *H. pylori*

La mayoría de estudios de asociación entre alelos del sistema HLA y cáncer gástrico, relacionado con la infección crónica de *H. pylori*, se han realizado en poblaciones japonesas y caucásicas (Lee *et al.*, 1996; Azuma *et al.*, 1998; Karhukorpi *et al.*, 1999). Se han encontrado asociaciones de los loci HLA-DQ con la infección y las enfermedades. En Japón el alelo DQA1*0102 es menos frecuente en pacientes con gastritis atrófica y úlcera duodenal cuando

se les compara con pacientes de gastritis superficial y con testigos *H. pylori* negativo (Azuma *et al.*, 1995, 1998; Yoshitake *et al.*, 1999). Por lo tanto, puede considerarse que la ausencia de dicho alelo podría constituir un factor de riesgo genético para la asociación de gastritis atrófica causada por *H. pylori* y el cáncer gástrico (distal) de tipo histológico intestinal (Azuma *et al.*, 1998) en contraste con el tipo histológico difuso (López-Carrillo *et al.*, 1997). Otros estudios, también en población japonesa han relacionado positivamente el alelo DQB1*0401 con gastritis atrófica y úlcera duodenal (Sakai *et al.*, 1999; Yoshitake *et al.*, 1999). Sin embargo, en la población caucásica no se encontró asociación alguna con *HLA-DQ* (Caselli *et al.*, 1999; Karhukorpi *et al.*, 1999; Kuntsmann *et al.*, 2002; Perri *et al.*, 2002), aunque algún estudio aislado reportó el aumento de DQB1*0301 en pacientes con cáncer gástrico (Lee *et al.*, 1996).

En población mexicana, al estudiar las frecuencias de *HLA-DQA1* y *HLA-DQB1* entre un grupo de 20 pacientes mestizos mexicanos con cáncer gástrico y 99 controles sanos, se reportó una susceptibilidad por parte del alelo DQB1*050101 con una razón de momios de 4.5 (Herrera-Goepfert *et al.*, 2004).

También se han realizado estudios de inducción de apoptosis por la ureasa en células epiteliales gástricas que expresan moléculas HLA clase II, lo que apunta a un posible mecanismo en el cual la bacteria y la(s) respuesta(s) del hospedero se integran y participan en la patogénesis del daño en las células epiteliales (Chiba *et al.*, 1995; Fan *et al.*, 1998, 2000).

3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer gástrico es una de las neoplasias malignas más frecuentes en nuestro país (Salud S., 1999), motivo por el cual resulta de interés estudiar los factores de riesgo que pueden influir en su desarrollo. Ya que *H. pylori* se adhiere al epitelio de la mucosa gástrica y en virtud de que una de las características del tejido infectado es el daño superficial que sufren las células epiteliales, se considera posible que el cáncer gástrico emerge después de una metaplasia-displasia, la que a su vez sigue a una atrofia o a una gastritis crónica asociadas a esta bacteria (Kuipers, 1999). Se desconoce por qué algunos pacientes infectados ~20% tienen síntomas, en tanto que el resto se mantiene asintomático (Sipponen, *et al.* 1998, Torres *et al.* 2000). La mayoría de los estudios se han enfocado a los factores bacterianos y al daño epitelial que causan los mismos mientras que los factores del hospedero han sido menos estudiados. Es necesario conocer los mecanismos del hospedero con el fin de entender mejor los factores que desencadenan los distintos estadios de la enfermedad gastroduodenal (úlceras y cáncer) en individuos infectados por *H. pylori* (Solcia *et al.*, 2000). Es concebible que la naturaleza de la respuesta inmuno-inflamatoria local interfiera o contribuya en forma importante a este proceso y ya se ha señalado la relación del polimorfismo de *IL-1 β* con sus consecuencias inmuno-inflamatorias con la infección y patología de *H. pylori* (El-Omar *et al.* 2000). Tal es el caso del polimorfismo de los genes *HLA-DQA1* y *HLA-DQB1* que son marcadores de susceptibilidad, de resistencia o de manifestaciones clínicas específicas en la infección por *H. pylori* y, en forma independiente o en haplotipo en población japonesa (Azuma *et al.*, 1995, 1998; Lee *et al.*, 1996; Karhukorpi *et al.*, 1999; Sakai *et al.*, 1999; Yoshitake *et al.*, 1999). Los alelos de asociación *HLA*-cáncer reportados en otras etnias no son extrapolables a nuestra población, por lo que resulta atractivo estudiar estos genes *HLA-DQ* con el fin de establecer una región genética (o marcador) en las enfermedades gástricas asociadas con *H. pylori* en la población mestiza mexicana.

4.0 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Conocer si existe asociación del polimorfismo de los genes *HLA-DQA1* y *HLA-DQB1* con lesiones gástricas asociadas a *H. pylori* en pacientes mestizos mexicanos.

4.2 Objetivos particulares

- Estudiar las frecuencias génicas y haplotípicas de los loci *HLA-DQA1* y *HLA-DQB1* en un grupo de individuos mestizos mexicanos diagnosticados con lesiones gástricas ocasionadas por la infección con *H. pylori*.
- Analizar las frecuencias génicas y haplotípicas de los loci *HLA-DQA1* y *HLA-DQB1* en un grupo de individuos mestizos mexicanos sin diagnóstico de lesiones gástricas.
- Comparar las frecuencias génicas entre los pacientes y los individuos sin lesiones gástricas para determinar la posible asociación entre el polimorfismo de los genes *HLA-DQA1* y *HLA-DQB1*, en forma individual y/o en haplotipo, con las lesiones gástricas en pacientes adultos mestizos mexicanos infectados con *H. pylori*.

5.0. HIPÓTESIS

Existe una asociación genética de los polimorfismos en los genes *HLA-DQA1* y *HLA-DQB1* -independiente y/o en haplotipo- con las lesiones gástricas ocasionadas por la infección crónica por *H. pylori* en población mestiza mexicana.

6.0 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Controles

Se estudiaron 147 muestras de donadores adultos, mestizos, mexicanos de los Bancos de Sangre del Hospital General Regional No. 25 y del Centro Médico Nacional S-XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Ningún individuo reportó algún diagnóstico de enfermedades gástricas, autoinmunes, diabetes, cáncer o cualquier enfermedad asociada con el MHC.

6.2 Pacientes

Se estudiaron en ciego 474 muestras de pacientes adultos, mestizos, mexicanos con padecimientos gástricos asociados a *H. pylori*, que presentaban síntomas y fueron diagnosticados mediante serología, endoscopia e histología, provenientes del Hospital General de México SSA y del Hospital de Oncología del IMSS. De acuerdo al diagnóstico de la histología (clasificación de Sydney) , se clasificaron los pacientes en los siguientes seis grupos: 175 pacientes con gastritis superficial (GS), 60 con gastritis crónica atrófica (GCA), 79 con metaplasia intestinal (MI), 27 con displasia gástrica (DG), 72 con cáncer gástrico (CG) y 61 con úlcera duodenal (UD). (Tanto los pacientes como los controles fueron incluidos previo consentimiento informado).

6.3 Material Biológico

Se emplearon de 3-5ml de sangre periférica. Las muestras control fueron anticoaguladas con EDTA y las muestras de pacientes con heparina. Mediante centrifugación se separó el *buffy coat* (anillo leucocitario) para la extracción de DNA y el plasma para la determinación de anticuerpos IgG contra *H. pylori*.

6.4 Determinación de anticuerpos contra *H. pylori*

En la determinación de anticuerpos IgG contra *H. pylori* se aplicó la técnica de ELISA (Camorlinga *et al.*, 1998). Las placas se sensibilizaron con un extracto completo de la bacteria que actúa como antígeno concentrado y se incubó por 12 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, el bloqueo de uniones inespecíficas se realizó con gelatina en PBS incubándolo por 12 horas a 4⁰C. Después de 3 lavados con PBS se procedió a la unión del anticuerpo primario (sueros a evaluar en dilución 1:1000 en PBS con gelatina y gammaglobulina bovina) y se dejó incubar a 4⁰C por 12 horas. Se realizaron tres lavados con PBS, se añadió el anticuerpo secundario (anti-IgG conjugado con fosfatasa alcalina) y se incubó 1 hora a 37⁰C. El sustrato p-NPP se agregó en buffer de dietanolamina para el desarrollo de color y después de 30 min se leyó a 405 nm. Los ensayos se realizaron por duplicado. En cada placa se incluyeron controles seronegativos y seropositivos y los valores mayores a 1 unidad de ELISA fueron considerados como seropositivos.

6.5 Extracción de DNA

En la extracción de DNA se partió de *buffy coat* y se utilizó una técnica de *salting out*. (Miller *et al.*, 1988) El *buffy coat* se resuspendió en un buffer con sacarosa para lisar los eritrocitos, mientras que los leucocitos se lisaron con un buffer de NaCl y EDTA. El DNA se separó de las proteínas con SDS, NaClO₄ y NaCl y se precipitó con isopropanol a -20⁰C. Después de 12 horas a -20⁰C se lavó con etanol al 70% a la misma temperatura y se disolvió el DNA en agua bidestilada. El DNA fue cuantificado por espectrofotometría y se evaluó su integridad mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%, con TBE 0.5X.

6.6 Reacción de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa de DNA).

La tipificación de los *loci* de *HLA* clase II convencionalmente se realiza en el exón 2 ya que en esta región se encuentra el mayor polimorfismo y se puede resolver la mayor parte de los alelos. Los iniciadores específicos para el exón 2 de los genes *HLA-DQA1* y *HLA-DQB1* fueron tomados del *12th Internacional Histocompatibility Workshop and Conference*, (1996).

6.6.1 *HLA-DQA1*

Controles

Se amplificó el exón 2 usando 0.076 mM de dNTP's, 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.5 pmol de cada iniciador, 0.05 U de *Taq*-polimerasa y 20ng/ μ l de DNA. Las condiciones de amplificación consistieron en la desnaturalización a 95°C por 4min, seguido por 33 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30s, alineamiento de iniciadores a 54°C por 50s, extensión a 72°C por 30s, y finalmente un paso de extensión a 72°C por 8min. El tamaño del producto de *HLA-DQA1* fue de 366 bp.

Pacientes

Debido al uso de heparina como anticoagulante en estas muestras, se hicieron modificaciones a la reacción y condiciones de PCR: La reacción de PCR se llevó a cabo de la misma forma que en los controles, con la excepción de que se utilizaron 3mM de $MgCl_2$ y 16 ng/ μ l de DNA. Las condiciones de amplificación consistieron en un paso de desnaturalización a 94°C por 7min, seguido por 34 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1min, alineamiento a 50°C por 1min y extensión a 72°C por 2min y se concluyó con un paso de extensión a 72°C por 10min.

6.6.2 *HLA-DQB1*

Controles

El exón 2 se amplificó con 0.2 mM de dNTP's, 2.0 mM de MgCl₂, 0.5 pmol de cada iniciador, 0.03 U de *Taq*-polimerasa y 20ng/μl de DNA. Las condiciones de PCR empleadas comenzaron con un paso de desnaturalización a 94⁰C por 4min, 36 ciclos de desnaturalización a 94⁰C por 1min, alineamiento a 69⁰C por 1:30min y extensión a 72⁰C por 2min y finalmente un paso de extensión a 72⁰C por 10min. El producto obtenido fue de 316 bp.

Pacientes

La reacción de PCR fue la misma usada para los controles, excepto que se emplearon 16 ng/μl de DNA. Se aplicaron las mismas condiciones de amplificación descritas para *HLA-DQA1* en pacientes.

6.7 Tipificación de *HLA-DQA1* y *HLA-DQB1*

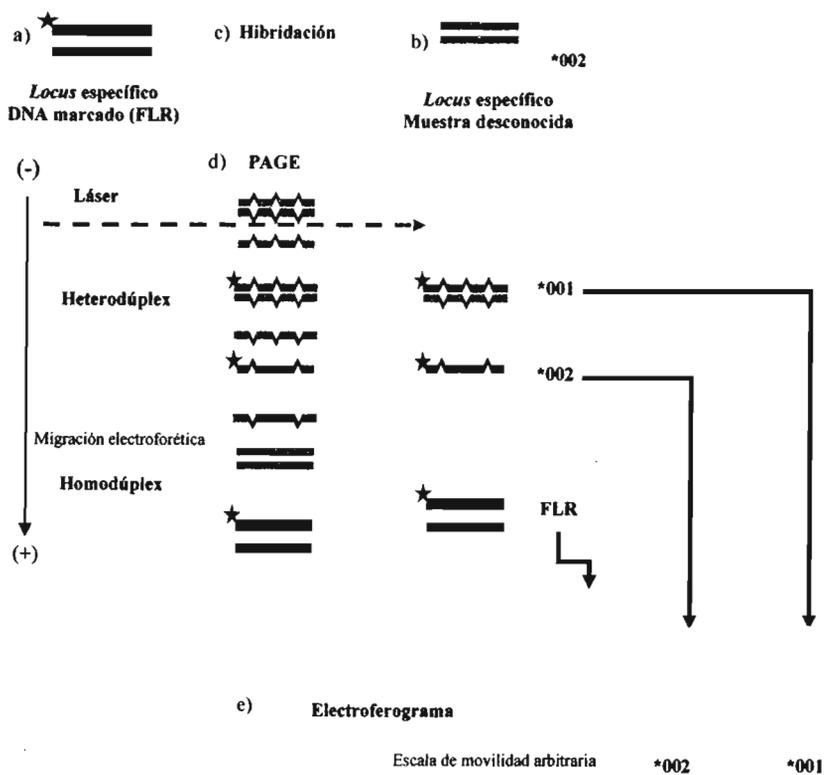
La tipificación del polimorfismo de *HLA-DQA1* y *HLA-DQB1* se realizó con la aplicación de una técnica conformacional de DNA llamada RSCA (*Reference Strand Conformational Analysis*) (Argüello *et al.*, 1998).

6.7.1 RSCA

El primer paso de RSCA es la amplificación por PCR del *locus* específico que se desea estudiar (*HLA-DQA1* o *HLA-DQB1*) usando un iniciador marcado, sentido o antisentido, con el fluorocromo carbocianina 5 (Cy5) en la posición 5' del iniciador, de tal forma que sólo una de las cadenas del producto de PCR se encuentre marcada. A este producto se le conoce como FLR (*Fluorescence Labelled Reference*) **Figura 4a**. En forma independiente, se realiza una amplificación de la muestra a estudiar usando los mismos iniciadores pero sin marcar **Figura 4b**. Posteriormente se lleva a cabo la desnaturalización e hibridación de ambas muestras **Figura 4c**, formándose homodúplex y heterodúplex **Figura 4d**. La conformación molecular de los dúplex es única, reflejándose en la movilidad electroforética. La movilidad del DNA de doble cadena en un gel de acrilamida no desnaturalizante PAGE depende únicamente de las condiciones electroforéticas, del peso molecular y de la conformación. Cuando se mantienen constantes las condiciones electroforéticas, la migración de los dúplex dependerá de las diferencias en la conformación molecular. El peso molecular será el mismo en todos los alelos, excepto en aquellos donde hallan inserciones o deleciones. Finalmente los alelos de las muestras fueron determinados mediante la asignación de valores a los picos generados y su comparación con controles internos que consisten en productos de PCR ya tipificados (*ladders*) **Figura 4e**.

Figura 4. Técnica de RSCA.

La determinación de polimorfismo por RSCA se fundamenta en las diferentes conformaciones que adquieren los heterodúplex formados entre una referencia marcada con un fluorocromo y el DNA de estudio a causa de la falta de complementariedad de sus secuencias. Estas conformaciones tienen patrones de migración diferentes en electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE), de forma que pueden ser identificados al modificar la escala de tiempo a una escala de movilidad, usando controles internos con alelos de movilidad conocida.



6.7.2 Preparación de FLRs

Las FLRs se prepararon a partir de DNA de muestras homocigotas para *HLA-DQ*. Se aplicaron las mismas reacciones y condiciones de PCR usadas para los controles (ya sea para *HLA-DQA1* o *-DQB1*), con excepción de que se utilizaron iniciadores marcados con el fluorocromo Cy5. En *HLA-DQA1* se marcó el iniciador 3' y en *HLA-DQB1* el iniciador 5'. A los productos de PCR de las FLRs se les agregó 4µl de EDTA 0.5mM por cada 100µl de FLR para inactivar la polimerasa de DNA (Argüello *et al.*, 1998). En *HLA-DQA1* se emplearon los alelos DQA1*030101 y DQA1*050101, y en *HLA-DQB1* los alelos DQB1*0603 y DQB1*0604 como FLRs.

6.7.3 Hibridación

La hibridación se realizó con 3µl de producto de PCR y 1µl de FLR, esta mezcla se desnaturizó a 95°C por 4min, enseguida fue llevada a 55°C por 5min para permitir la hibridación de las cadenas y después se mantuvo a 15°C por 7min. Finalmente se agregó 1 µl de buffer de carga de RSCA (Argüello *et al.*, 1998).

6.7.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las hibridaciones fueron cargadas en un gel de poliacrilamida SequaGel MD 0.5X (*National diagnostics*) a 40°C, 647V, 46mAmp, y 30W por 300 minutos en condiciones no desnaturizantes y analizadas en un secuenciador automatizado ALFexpress II (*Amersham Pharmacia Biotech*) (Argüello *et al.*, 1998).

6.7.5 Controles de DNA internos para RSCA (*Ladders*)

HLA-DQA1

En la FLR DQA1*030101 las *ladders* usadas fueron los alelos DQA1*0101, *0102, *0103, *0201, *040101 y *050101. En la FLR DQA1*050101 se emplearon los alelos DQA1*0101, *0102, *0103, *0201, *030101, y *040101.

HLA-DQB1

En la FLR DQB1*0603 se utilizaron los alelos DQB1*0201, *030101, *0302, *030302, *0402, *050101, *0502, *050301, *0601, *0602 y *0604. En la FLR DQB1*0604 los alelos ocupados fueron DQB1*0201, *030101, *0302, *030302, *0402, *050101, *0502, *050301, *0601, *0602 y *0603.

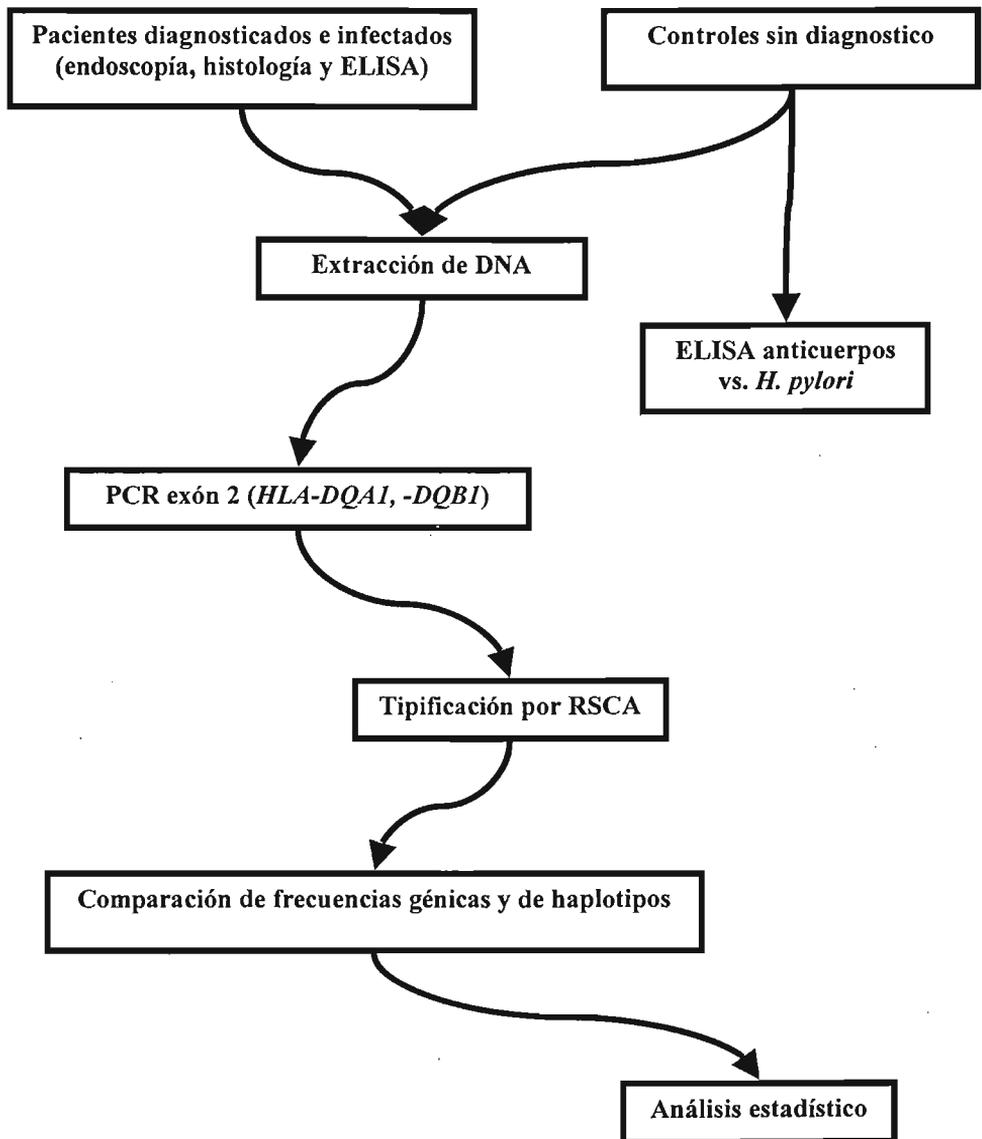
6.7.6 Análisis de los resultados en el gel de poliacrilamida

Las movilidades de los diferentes dúplex fueron analizadas con el software Allelelocator 1.03 (*Amersham Pharmacia Biotech*). Posteriormente se compararon con las movilidades de las *ladders* y de esta manera se asignaron los alelos. Se determinó la frecuencia génica en casos y controles mediante el conteo directo de de cada uno de los alelos.

6.8 Análisis estadístico

Las frecuencias génicas de los diferentes grupos se compararon con el grupo control y con el grupo de gastritis superficial. Las diferencias fueron evaluadas estadísticamente mediante la prueba de χ^2 y si el número en cualquier celdilla de las tablas de contingencia de 2x2 era menor a 5 se aplicó la prueba exacta de Fisher. De esta manera se determinó el valor de la (p) y se corrigió por el número de especificidades estudiadas (pc) y se obtuvo la razón de momios (RM) de cada evento tomando en cuenta un índice de confianza del 95% para estimar el riesgo (Matthews y Farewell, 1985).

6.9 Diagrama de flujo de la metodología

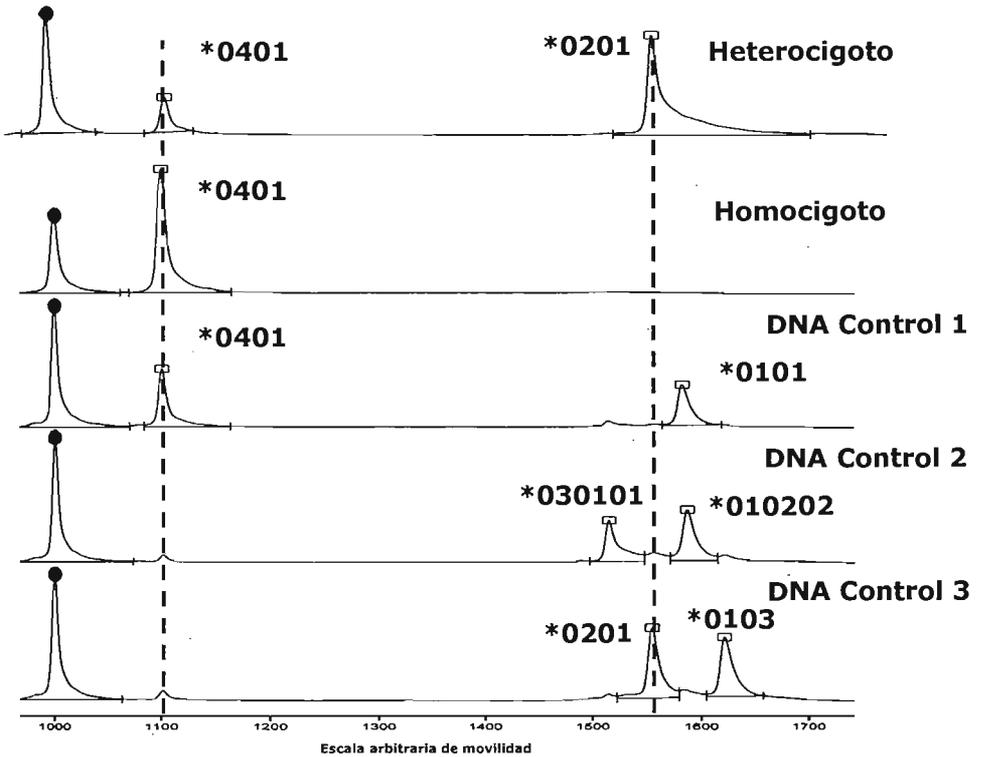


7.0 RESULTADOS

7.1 Controles

De los 147 individuos seleccionados como controles libres de padecimientos gástricos asociados con *H. pylori*, se tipificó el locus *HLA-DQA1* en 147, el *HLA-DQB1* en 133 y se determinó el haplotipo DQA1-DQB1 en 117 **Tabla 2**. En la **Figura 5** se muestra un ejemplo que indica la forma de asignación de los alelos en el electroferograma.

Figura 5. Electroferograma de la FLR DQB1*050101. La asignación de alelos con cada FLR se realiza comparando la movilidad de la muestra contra la movilidad del DNA control (*ladders*), que consisten en productos de PCR, ya tipificados, hibridados con la misma FLR, con movilidad conocida. La altura de los picos muestran la intensidad de la amplificación del producto de PCR.



7.2 Pacientes

A partir de las 474 muestras de pacientes analizadas se tipificaron 417 para *HLA-DQA1*, 423 para *HLA-DQB1* y 385 muestras en el haplotipo *DQA1-DQB1* **Tabla 2**. Es necesario aclarar que no se logró tipificar el 100% de las muestras, por un lado debido a problemas de amplificación originados por el uso de heparina en la toma de muestras y por otro a causa de patrones nuevos en algunas muestras que requieren ser secuenciadas.

Tabla 2. Se presentan los números de muestras tipificadas para los polimorfismos de *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* y el número de muestras en las que fue posible inferir el haplotipo *DQA1-DQB1* en los diferentes grupos estudiados.

De un total de 621 muestras analizadas se logró la tipificación de 564 para el locus *HLA-DQA1* y 556 para el locus *HLA-DQB1* por problemas de amplificación principalmente en los grupos de pacientes a causa del uso de heparina como anticoagulante. A partir de estas muestras tipificadas, se lograron inferir los haplotipos *DQA1-DQB1* en 502 muestras.

	Controles n=147	GS n=175	GCA n=60	MI n=79	DG n=27	CG n=72	UD n=61	Total n=621
DQA1	147	156	49	69	25	61	57	564
DQB1	133	152	53	74	25	65	54	556
DQA1-DQB1	117	143	46	65	23	56	52	502

GS=gastritis superficial, GCA=gastritis crónica atrófica, MI=metaplasia intestinal, DG=displasia gástrica, CG=cáncer gástrico y UD=úlceras duodenales

7.3 Anticuerpos IgG contra *H. pylori*.

Se analizaron 133 controles para conocer su condición de seroprevalencia a la infección por *H. pylori*. En 14 controles, no se pudo disponer del plasma. Los resultados de ELISA determinaron un 80.5% (107 de 133) individuos controles como seropositivos. El 100% (474) de los pacientes estudiados fue positivo por la serología realizada en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias CMN S-XXI, IMSS.

7.4 Frecuencias génicas de *HLA-DQA1*

Las frecuencias génicas de los seis grupos de pacientes fueron comparadas contra las de los controles. Además, debido a que la gastritis superficial se considera el primer evento en la evolución de las enfermedades gástricas asociadas a *H. pylori*, también se compararon las frecuencias de los otros cinco grupos de pacientes contra el grupo de gastritis superficial.

Se encontraron un total de siete alelos de *HLA-DQA1* **Tabla 3, Figura 6**. Cuando se compararon sus frecuencias en los pacientes contra el grupo control, no se encontraron diferencias significativas. Al comparar contra gastritis superficial, se presentó una reducción significativa de la frecuencia de **DQA1*0201 en metaplasia intestinal (pc<0.05 RM 0.07, IC 95% 0.00-0.44)**.

Tabla 3. Distribución de frecuencias por tipo de alelo *HLA-DQA1* por tipo de lesión gástrica.

Se muestran las frecuencias génicas de los siete alelos de *HLA-DQA1* encontrados en los diferentes grupos de muestras. Al comparar las frecuencias de los pacientes contra el grupo control y el grupo de gastritis superficial, se observó una disminución significativa del alelo *DQA1*0201* en el grupo de metaplasia intestinal en comparación con la gastritis superficial.

Alelo <i>DQA1</i>	Controles n=294(%)	GS n=312(%)	GCA n=98(%)	MI n=138(%)	DG n=50(%)	CG n=122(%)	UD n=114(%)
*0101/0104/0105	16 (5.4)	19 (6.1)	6 (6.1)	8 (5.8)	3 (6.0)	8 (6.6)	5 (4.4)
*0102	8 (2.7)	16 (5.1)	4 (4.1)	5 (3.6)	3 (6.0)	3 (2.5)	5 (4.4)
*0103	7 (2.4)	6 (2.0)	0 (0.0)	6 (4.3)	0 (0.0)	1 (0.8)	2 (1.7)
*0201	19 (6.5)	29 (9.3)	9 (9.2)	1 (0.7)^a	5 (10.0)	5 (4.1)	10 (8.8)
*030101/0302/0303	132 (44.9)	114 (36.5)	35 (35.7)	51 (37.0)	20 (40.0)	47 (38.5)	44 (38.6)
*040101/0402	49 (16.6)	56 (18.0)	16 (16.3)	38(27.5)	6 (12.0)	35(28.7)	21 (18.4)
*050101/0503/0505	63 (21.4)	72 (23.0)	28 (28.6)	29 (21.0)	13 (26.0)	23 (18.8)	27 (23.7)

n= número de alelos

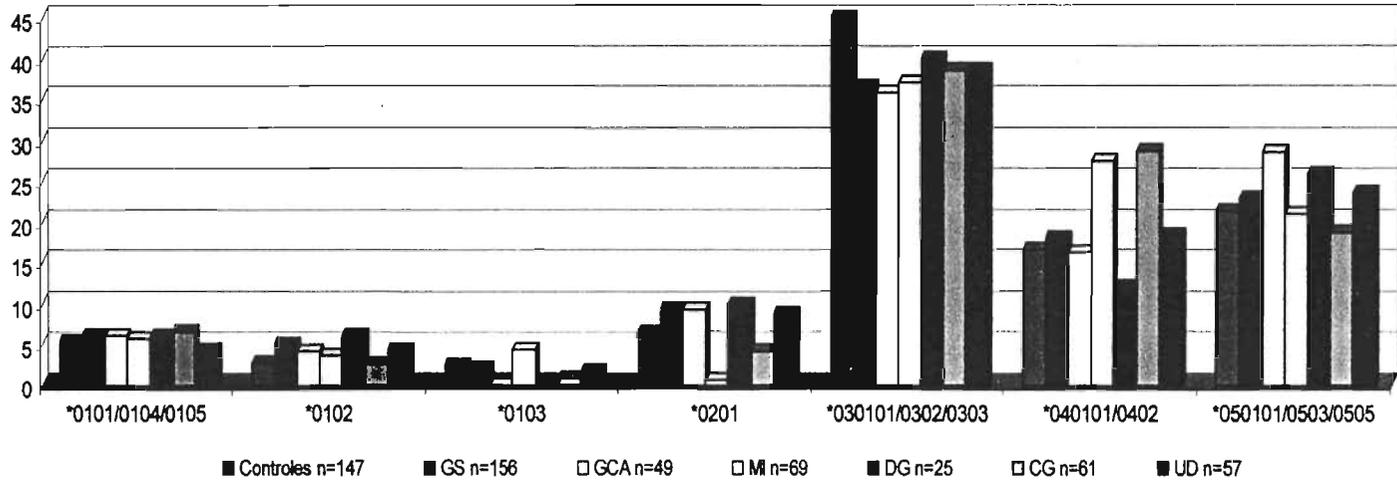
%= frecuencias génicas

Pacientes vs. GS

0201 MI $p < 0.05^a$ RM 0.07 (IC 95% 0.00-0.44)

^aPrueba exacta de Fisher vs. GS

Figura 6. Comparación de frecuencias génicas (%) de *HLA-DQA1* en controles y grupos de pacientes.



Pacientes vs. GS
 0201 MI $p < 0.05^*$ RM 0.07 (IC 95% 0.00-0.44)
 *Prueba exacta de Fisher vs. GS

7.5 Frecuencias génicas de *HLA-DQB1*

Doce alelos de *HLA-DQB1* fueron registrados **Tabla 4, Figura 7**. Si se comparan las frecuencias de los grupos de pacientes contra las del grupo control se observan diferencias significativas en dos alelos. Se presentó un aumento de las frecuencias de **DQB1*050101 en cáncer gástrico** ($pc < 0.05$ RM 2.65, IC 95% 1.3-5.45) y **DQB1*0604 en metaplasia intestinal** ($pc < 0.05$ RM 6.09, IC 95% 2.63-14.47).

Tabla 4. Distribución de frecuencias por tipo de alelo *HLA-DQB1* por tipo de lesión gástrica.

Al analizar las frecuencias génicas (%) de *HLA-DQB1* en los diferentes grupos, se encontraron aumentos significativos en dos alelos. El alelo DQB1*050101 aumentó su frecuencia en cáncer gástrico al compararse con el grupo control, mientras que el alelo DQB1*0604 se incrementó en el grupo de metaplasia intestinal al compararlo contra el grupo control y el grupo de gastritis superficial.

Alelo DQB1	Controles n=266(%)	GS n=304(%)	GCA n=106(%)	MI n=148(%)	DG n=50(%)	CG n=130(%)	UD n=108(%)
*0201/0202	31 (11.7)	44 (14.5)	20 (18.9)	12 (8.1)	5 (10.0)	9 (6.9)	21 (19.4)
*030101	70 (26.3)	64 (21.0)	21 (19.8)	26 (17.6)	4 (8.0)	29 (22.3)	18 (16.7)
*0302	78 (29.3)	60 (19.7)	19 (18.0)	32 (21.6)	14 (28.0)	23(17.7)	20 (18.5)
*030302	1 (0.4)	2 (0.7)	1 (0.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
*0402	40 (15.0)	31 (10.2)	8 (7.5)	17 (11.5)	8 (16.0)	24 (18.5)	11 (10.2)
*050101	18 (6.8)	34 (11.2)	13 (12.3)	13 (8.8)	4 (8.0)	21 (16.1)^a	15 (13.9)
*0502	1 (0.4)	1 (0.3)	0 (0.0)	3 (2.0)	1 (2.0)	1 (0.8)	4 (3.7)
*050301	3 (1.1)	9 (3.0)	1 (0.9)	0 (0.0) ^a	1 (2.0)	0 (0.0)	2 (1.8)
*0601	0 (0.0)	6 (2.0)	0 (0.0)	6 (4.0)	1 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
*0602	11 (4.1)	24 (7.9)	9 (8.5)	3 (2.0)	3 (6.0)	6 (4.6)	5 (4.6)
*0603/0607	4 (1.5)	12 (3.9)	4 (3.8)	10 (6.8)	4 (8.0)	7 (5.4)	7 (6.5)
*0604	9 (3.4)	17 (5.6)	10 (9.4)	26 (17.6)^{a,b}	5 (10.0)	10 (7.7)	5 (4.6)

n= número de alelos

Pacientes vs. Controles

050101 CG $pc < 0.05^a$ RM 2.65 (IC 95% 1.3-5.45)

0604 MI $pc < 0.05^a$ RM 6.09 (IC 95% 2.63-14.47)

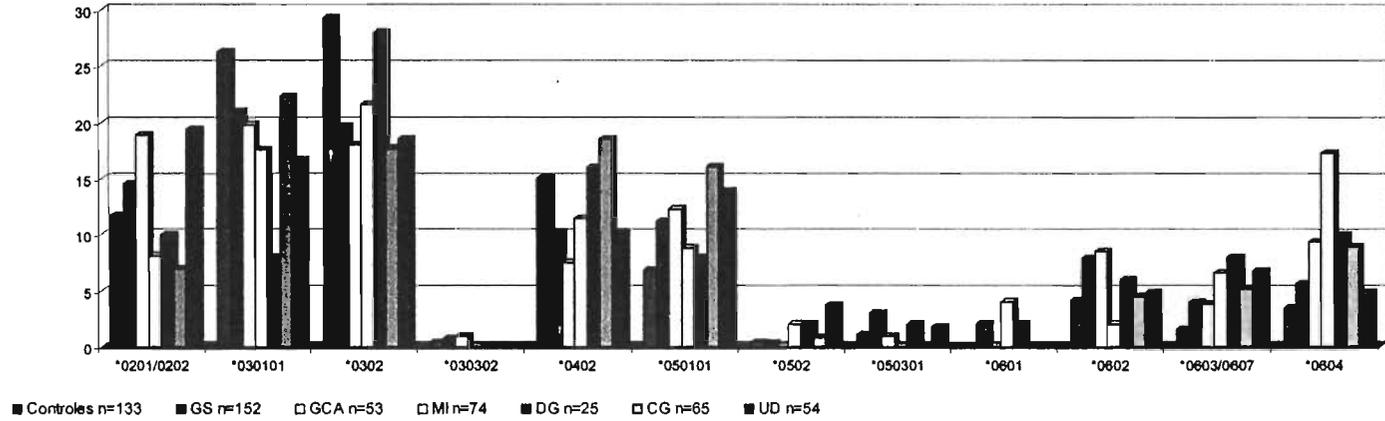
^aPrueba de χ^2 vs. Controles

Pacientes vs. GS

0604 MI $pc < 0.05^b$ RM 3.59 (IC 95% 1.79-7.32)

^bPrueba de χ^2 vs. GS

Figura 7. Comparación de frecuencias génicas (%) de *HLA-DQB1* en controles y grupos de pacientes.



Pacientes vs. Controles

050101 CG $p < 0.05^a$ RM 2.65 (IC 95% 1.3-5.45)

0604 MI $p < 0.05^a$ RM 6.09 (IC 95% 2.63-14.47)

Prueba de χ^2 vs. Controles

Pacientes vs. GS

0604 MI $p < 0.05^b$ RM 3.59 (IC 95% 1.79-7.32)

^bPrueba de χ^2 vs. GS

Cuando se compararon las frecuencias de *HLA-DQB1* de los demás grupos de pacientes contra el grupo de gastritis superficial **Tabla 4, Figura 7**, se encontró un incremento significativo de **DQB1*0604 en metaplasia intestinal** ($p < 0.05$ RM 3.59, IC 95% 1.79-7.32).

7.6 Frecuencias de haplotipos DQA1-DQB1

Con la finalidad de conocer si los haplotipos DQA1-DQB1 tienen alguna influencia en el padecimiento de estas enfermedades, se obtuvieron los haplotipos inferidos y se analizaron sus frecuencias en cada grupo. Se encontraron 52 haplotipos DQA1-DQB1 diferentes en toda la población estudiada. En la **Tabla 5** y **Figura 8** se presentan 23 más relevantes.

Tabla 5. Distribución de las frecuencias de haplotipos DQA1-DQB1 por tipo de lesión gástrica.

Las frecuencias de los haplotipos inferidos DQA1-DQB1 de pacientes fueron comparadas contra el grupo de gastritis superficial y el grupo control. El haplotipo 030101-0302 disminuyó de forma significativa en el grupo de gastritis superficial mientras que el haplotipo 040101-050101 aumentó en cáncer gástrico con respecto a los controles.

Haplotipo DQA1-DQB1	Controles n=117(%)	GS n=143(%)	GCA n=46(%)	MI n=65(%)	DG n=23(%)	CG n=56(%)	UD n=52(%)
0101-050101	12 (5.1)	14 (5.8)	6 (7.1)	6 (5.2)	2 (4.9)	8 (7.5)	3 (3.2)
0102-0602	5 (2.1)	11 (4.5)	1 (1.2)	2 (1.7)	1 (2.4)	2 (1.9)	3 (3.2)
0201-0201	8 (3.4)	18 (7.4)	5 (5.9)	1 (0.9)	4 (9.8)	4 (3.8)	9 (9.6)
0201-0604	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (2.4)	0 (0.0)	0 (0.0)
030101-0201	5 (2.1)	11 (4.5)	6 (7.1)	2 (1.7)	0 (0.0)	2 (1.9)	2 (2.1)
030101-030101	15 (6.4)	10 (4.1)	1 (1.2)	2 (1.7)	0 (0.0)	4 (3.8)	2 (2.1)
030101-0302	70 (29.9)	54 (22.3)^a	17 (20.2)	27 (23.5)	13 (31.7)	22 (20.7)	19 (20.2)
030101-0402	6 (2.6)	3 (1.2)	1 (1.2)	2 (1.7)	4 (9.8)	2 (1.9)	1 (1.1)
030101-050101	3 (1.3)	7 (2.9)	2 (2.4)	2 (1.7)	0 (0.0)	4 (3.8)	7 (7.4)
030101-0602	2 (0.9)	7 (2.9)	3 (3.6)	0 (0.0)	2 (4.9)	1 (0.9)	1 (1.1)
030101-0603	0 (0.0)	2 (0.8)	0 (0.0)	4 (3.5)	0 (0.0)	2 (1.9)	1 (1.1)
030101-0604	5 (2.1)	8 (3.3)	4 (4.8)	9 (7.8)	1 (2.4)	0 (0.0)	4 (4.3)
040101-0201	1 (0.4)	1 (0.4)	2 (2.4)	1 (0.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (4.3)
040101-030101	4 (1.7)	8 (3.3)	1 (1.2)	5 (4.3)	0 (0.0)	5 (4.7)	2 (2.1)
040101-0402	28 (12)	25 (10.0)	7 (8.3)	15 (13.0)	4 (9.8)	19(17.9)	10 (10.6)
040101-050101	0 (0.0)	2 (0.8)	1 (1.2)	1 (0.9)	1 (2.4)	6 (5.7)^b	1 (1.1)
040101-0603	0 (0.0)	2 (0.8)	0 (0.0)	1 (0.9)	0 (0.0)	3 (2.8)	1 (1.1)
040101-0604	2 (0.9)	4 (1.6)	3 (3.6)	8 (7.0)	0 (0.0)	2 (1.9)	0 (0.0)
050101-0202	9 (3.8)	8 (3.3)	6 (7.1)	4 (3.5)	1 (2.4)	0 (0.0)	6 (6.4)
050101-030101	37 (15.8)	41 (16.9)	14 (16.7)	15 (13.0)	4 (9.8)	17 (16.0)	14 (14.9)
050101-0302	2 (0.9)	1 (0.4)	1 (1.2)	3 (2.6)	1 (2.4)	0 (0.0)	0 (0.0)
050101-0402	0 (0.0)	3 (1.2)	2 (2.4)	1 (0.9)	1 (2.4)	0 (0.0)	4 (4.3)
050101-0604	1 (0.4)	2 (0.8)	1 (1.2)	4 (3.5)	1 (2.4)	3 (2.8)	0 (0.0)

Pacientes vs. Controles

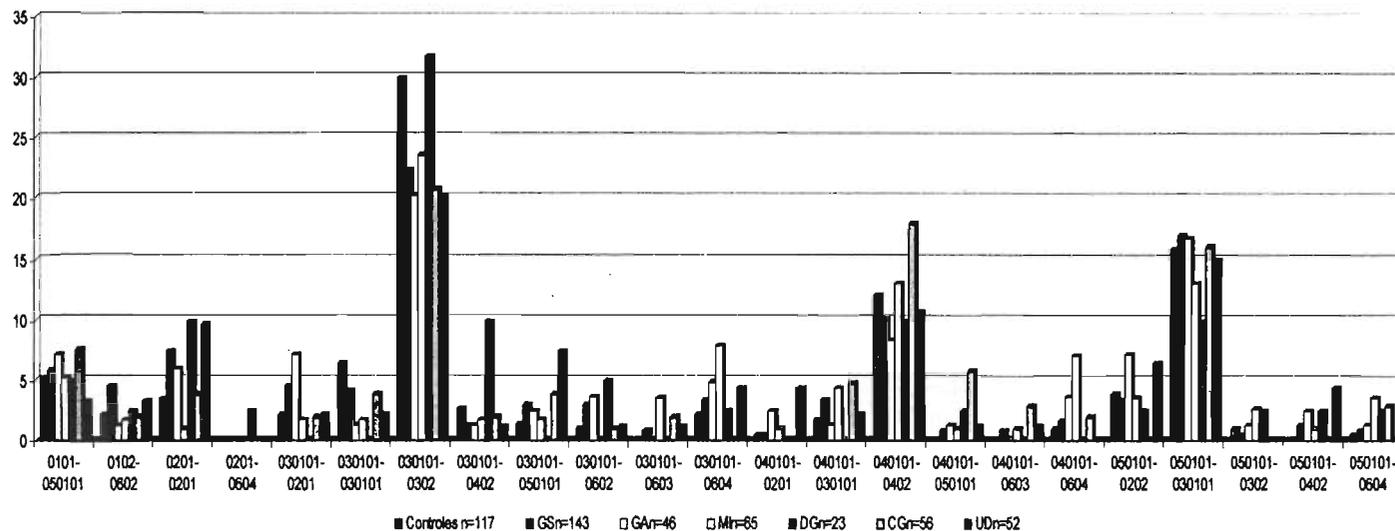
030101-0302 GS $pc < 0.05^a$ RM 0.55 (IC 95% 0.36-0.84)

040101-050101 CG $pc < 0.05^b$ RM 13.19 (IC 95% 1.55-294.36)

^aPrueba de χ^2 vs. Controles

^bPrueba exacta de Fisher vs. Controles

Figura 8. Comparación de frecuencias (%) de haplotipos DQA1-DQB1 en controles y grupos de pacientes.



Pacientes vs. Controles

030101-0302 GS $pc < 0.05^a$ RM 0.55 (IC 95% 0.36-0.84)

040101-050101 CG $pc < 0.05^b$ RM 13.19 (IC 95% 1.55-294.36)

^aPrueba de χ^2 vs. Controles

^bPrueba exacta de Fisher vs. Controles

En comparación con los controles, la frecuencia del haplotipo **DQA1*030101-DQB1*0302** disminuyó significativamente en **gastritis superficial** ($p < 0.05$ RM 0.55, IC 95% 0.36-0.84). Por el contrario se presentó un incremento significativo del haplotipo **DQA1*040101-DQB1*050101 en cáncer gástrico** ($p < 0.05$ RM 13.19, IC 95% 1.55-294.36). Al compararlos con gastritis superficial, ningún haplotipo resultó con diferencias significativas después de corregir el valor de p .

7.7 Frecuencias génicas de *HLA-DQ* en controles seropositivos y seronegativos a *H. pylori*

Para conocer la participación de los alelos de *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* y los haplotipos DQA1-DQB1 en la infección por *H. pylori*, se compararon las frecuencias de éstos en controles positivos y negativos por serología.

La determinación de anticuerpos IgG en el grupo de control resultó positiva en 107 individuos de 133 analizados. En *HLA-DQA1*, 93 controles seropositivos y 23 seronegativos fueron tipificados; en *HLA-DQB1*, 88 controles seropositivos y 16 seronegativos, y en haplotipos DQA1-DQB1, 75 controles seropositivos y 14 seronegativos.

Cuando se comparan las frecuencias génicas entre controles seropositivos y seronegativos se observa una **disminución significativa del alelo DQA1*0101 en los seropositivos** ($p < 0.05$ RM 0.15, IC 95% 0.04-0.58), mientras que en el resto de alelos de *HLA-DQA1* y en todos los de *HLA-DQB1* no se observaron diferencias.

7.8 Frecuencias génicas de *HLA-DQ* de pacientes contra controles seropositivos y seronegativos.

Para averiguar si en las asociaciones observadas de *HLA-DQ* hay dependencia de la presencia de la bacteria, se compararon las frecuencias génicas los grupos de enfermedades de contra las de controles seropositivos y seronegativos por separado. En la **Tabla 6** se muestran

los alelos y haplotipos, y los grupos de enfermedades en los que se presentaron diferencias significativas después de corregir el valor de *p*.

Se compararon las frecuencias génicas de *HLA-DQA1* de los grupos de pacientes contra los controles positivos por serología. Se presentó un aumento significativo del alelo **DQA1*040101 en cáncer gástrico** (*pc*<0.05 RM 2.18, IC 95% 1.20-3.95).

Al hacer la comparación de las frecuencias génicas de *HLA-DQA1* de los grupos de pacientes contra los controles seronegativos, en **metaplasia intestinal** se presentó una disminución significativa del alelo **DQA1*0201** (*pc*<0.05 RM 0.04, IC 95% 0.00-0.36) y un aumento significativo del alelo **DQA1*040101** (*pc*<0.05 RM 5.45, IC 95% 1.50-23.43) y en **cáncer gástrico** también se incrementó la frecuencia de **DQA1*040101** (*pc*<0.05 RM 5.77, IC 95% 1.57-24.97).

Tabla 6. Alelos con diferencias significativas (*pc*<0.05), al comparar las frecuencias de los grupos de pacientes contra controles positivos y negativos a la serología.

Con la finalidad de averiguar si la seroprevalencia a *H. pylori* está asociada con las patologías y si hay relación con el polimorfismo de *HLA-DQ*, se compararon las frecuencias génicas y de haplotipos en los diferentes grupos contra los controles seropositivos y seronegativos. Se encontraron asociaciones de el alelo DQB1*0604 con metaplasia intestinal, DQB1*030101 con displasia gástrica y de los alelos DQA1*040101 y DQB1*050101 con cáncer gástrico, de forma independiente de la seroprevalencia de la bacteria. Mientras que se presentó asociación del alelo DQA1*0201 con metaplasia intestinal y del alelo DQA1*040101 con metaplasia intestinal dependiente de la bacteria. Un hallazgo interesante es que se encontró que la asociación del alelo DQA1*040101 con cáncer gástrico, a pesar de ser independiente de la asociación con la bacteria, al estar presente *H. pylori*, la asociación con el cáncer gástrico se vuelve más vigorosa.

	<i>HLA</i>	Pacientes		
		Metaplasia intestinal	Displasia gástrica	Cáncer gástrico
Controles seropositivos	<i>DQA1</i>			*040101/0402 ¹
	<i>DQB1</i>	*0604 ²	*030101 ³	*050101 ⁴
Controles seronegativos	<i>DQA1</i>	*0201 ⁵ *040101/0402 ⁶		*040101/0402 ⁷
	<i>DQB1</i>			

¹ *pc*<0.05^a RM 2.18 (IC 95% 1.20-3.95)

² *pc*<0.05^a RM 5.15 (IC 95% 2.04-13.49)

³ *pc*<0.05^b RM 0.23 (IC 95% 0.07-0.70)

⁴ *pc*<0.05^a RM 3.57 (IC 95% 1.49-8.78)

⁵ *pc*<0.05^b RM 0.04 (IC 95% 0.00-0.36)

⁶ *pc*<0.05^b RM 5.45 (IC 95% 1.50-23.43)

⁷ *pc*<0.05^b RM 5.77 (IC 95% 1.57-24.97)

^aPrueba de χ^2

^bPrueba exacta de Fisher

Cuando se comparan las frecuencias de *HLA-DQB1*, sólo se presentaron diferencias significativas al hacer la comparación contra los controles seropositivos. Se observó un aumento de los alelos **DQB1*050101 en cáncer gástrico** ($p < 0.05$ RM 3.57, IC 95% 1.49-8.78) y de **DQB1*0604 en metaplasia intestinal** ($p < 0.05$ RM 5.15, IC 95% 2.04-13.49) y una disminución de la frecuencia **DQB1*030101 en displasia gástrica** ($p < 0.05$ RM 0.23, IC 95% 0.07-0.70). En los haplotipos DQA1-DQB1 no se encontraron diferencias significativas al comparar los pacientes contra los controles seronegativos y seropositivos.

8.0 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En todo el mundo se han hecho esfuerzos para identificar los factores de riesgo asociados al cáncer gástrico y a sus lesiones precursoras. El factor asociado con más fuerza es la infección crónica por la bacteria *H. pylori* (Forman, 1991, Asaka *et al.*, 1998, Kuipers, 1998, Blanchard y Czinn, 1998, Eslick *et al.*, 1999, Hua-Xiang y Talley, 2001, Stoicov *et al.*, 2004) y sus factores de virulencia. Sin embargo existen otra serie de factores que inducen estas lesiones gástricas. Estos abarcan desde factores alimenticios como el consumo de capsaicina en México (López-Carrillo *et al.*, 2003), hasta evidencias epidemiológicas y estudios de análisis mutacionales sobre factores genéticos involucrados en estas enfermedades (Gayther *et al.*, 1998, Caldas *et al.*, 1999). Debido a que la evolución de estos padecimientos está estrechamente relacionada con inflamación crónica, algunos factores inmunogenéticos contribuyen a este fenómeno.

El primer polimorfismo inmunogenético asociado con estas lesiones fueron polimorfismos de un solo nucleótido en el gene de *IL-1 β* , en el que los genotipos causantes de una alta expresión de este gene incrementan el riesgo de desarrollar atrofia y cáncer gástrico secundarios a la infección por *H. pylori* (El-Omar *et al.*, 2000). Se han ido asociando poco a poco más polimorfismos de genes como *TNF- β* e *IL-10* con el riesgo de padecer cáncer gástrico (El-Omar *et al.*, 2003, Macarthur *et al.*, 2004).

Debido a su función clave en la regulación de la respuesta inmune adaptativa, a su capacidad de presentar antígenos peptídicos extracelulares a las células TCD4⁺ y a su polimorfismo, las moléculas de *HLA* clase II son candidatas ideales para el análisis de susceptibilidad genética en las lesiones gástricas asociadas a *H. pylori*. Se han realizado varios estudios al respecto en poblaciones japonesas y caucásicas, en los que han establecido asociaciones específicas de determinados alelos, principalmente de los loci de *HLA-DQ*, con estas lesiones (ver punto 1.2.6).

En este estudio en población mestiza mexicana, los alelos DQA1*030101 y DQB1*0302 y el haplotipo DQA1*030101-DQB1*0302, de origen amerindio, presentaron las más altas frecuencias, tanto en controles, como en pacientes, tal como ha sido reportado en esta población mestiza mexicana (Gorodezky *et al.*, 2001).

Los resultados de seroprevalencia a la infección por *H. pylori* en el grupo control en este estudio son consistentes con los datos reportados para la población mexicana en los que mencionan una seroprevalencia del 80% en mayores de 18 años (Torres *et al.*, 1998a). Algunos estudios reportan un papel de protección del alelo DQA1*0102 contra la infección por *H. pylori* (Azuma *et al.*, 1998, Magnusson *et al.*, 2001). Cuando comparamos las frecuencias génicas de los controles seropositivos contra los seronegativos, en nuestro estudio encontramos que un alelo del mismo grupo, DQA1*0101, se encontró menos representado en seropositivos, posiblemente como protector contra la infección. A pesar de la ampliamente aceptada contribución de la infección de *H. pylori* como el factor principal para el desarrollo del cáncer gástrico y lesiones precursoras, la evidencia de que un porcentaje alto de controles sea seropositivo para la infección por la bacteria implica que otros factores están contribuyendo para la evolución de estas lesiones.

El alelo DQA1*0201 resultó tener una asociación de protección contra el padecimiento de metaplasia intestinal cuando se compara los grupos de pacientes contra el grupo de gastritis superficial. Este dato no ha sido reportado en ninguna otra población con enfermedades relacionadas a *H. pylori*, pero sí se ha encontrado una disminución de este alelo en pacientes italianos con carcinoma de colon (Perri *et al.*, 2002), lo que podría indicar cierta influencia en contra de la transformación de tejido normal a neoplásico por parte del alelo DQA1*0201.

A pesar de que algunos estudios en otras poblaciones asocian fuertemente al alelo DQA1*030101 con susceptibilidad al padecimiento de úlcera duodenal y cáncer gástrico en infectados por *H. pylori* (Azuma *et al.*, 1994 y 1995), en esta población estudiada no se presentó dicha asociación y de hecho DQA1*030101 fue el alelo más frecuente en controles y en pacientes.

Para establecer si las asociaciones de *HLA-DQ* con las enfermedades tienen relación con la seropositividad a *H. pylori*, las frecuencias génicas y haplotípicas de pacientes se compararon contra las de los controles seropositivos y seronegativos. El alelo DQA1*040101 en cáncer gástrico produce susceptibilidad cuando se compara con los controles seropositivos, esto sugiere que este alelo es capaz de generar una susceptibilidad a padecer cáncer gástrico por sí sólo, sin que exista una asociación con la bacteria. Cuando se consideraron los controles seronegativos, se observó que la protección que brinda el alelo DQA1*0201 y la predisposición de DQA1*040101 para generar metaplasia intestinal dependen de la seropositividad a *H. pylori*, puesto que sus frecuencias se vieron modificadas en estos grupos, mientras que la probabilidad de padecer cáncer gástrico si se tiene el alelo DQA1*040101 aumenta a más de cinco veces si se presenta la infección con la bacteria.

Otros estudios han encontrado una fuerte asociación entre el alelo DQB1*030101 con el cáncer gástrico y otras neoplasias como el cáncer de cérvix o el melanoma (Lee *et al.*, 1994, 1996). En nuestra población este alelo es muy frecuente; en los controles tuvo una frecuencia cercana al 30%, y no presentó ninguna relación con alguno de los padecimientos estudiados.

A pesar de ello, el locus *HLA-DQB1* mostró un mayor número de asociaciones. El alelo DQB1*050101 aumenta en más de dos veces la predisposición al padecimiento de cáncer gástrico, cuando se compara contra los controles. Este resultado confirma lo reportado por Herrera-Goepfert *et al.* (2003) y ubica al alelo DQB1*050101 como un marcador genético para el padecimiento de cáncer gástrico en nuestra población. En la población italiana, se ha reportado el incremento de DQB1*050101 en pacientes con gastritis pero no en cáncer gástrico (Caselli *et al.*, 1996).

Un resultado interesante de nuestro estudio fue que el alelo DQB1*0604 aumenta el riesgo de 4 a 6 veces en la predisposición de metaplasia intestinal, en comparación con los controles y con gastritis superficial. Este dato no se ha registrado en ningún otro estudio ni población y la fuerza de la asociación indica que es un factor importante en la patogénesis de esta enfermedad.

En el locus *HLA-DQB1*, cuando se compara las frecuencias de los grupos de pacientes contra los controles seropositivos, se observa una disminución del alelo DQB1*030101 en displasia gástrica y un aumento de los alelos DQB1*050101 y DQB1*0604 en cáncer gástrico y metaplasia intestinal respectivamente. Esto puede indicar que la asociaciones de estos alelos con estas lesiones no están relacionadas con la presencia de *H. pylori*

Al analizar los haplotipos DQA1-DQB1 se observó que la frecuencia de DQA1*030101-DQB1*0302 en gastritis superficial fue menor significativamente en comparación con el grupo control. Una posible explicación a esta diferencia es que los pacientes con gastritis superficial llegaron a los servicios de Gastroenterología debido a la manifestación de síntomas, mientras que en el grupo de control se tomó la precaución de elegir individuos sin ningún tipo de sintomatología gástrica aunque estuvieran infectados por la bacteria. La disminución de este haplotipo se venía observando con la disminución de los alelos DQA1*030101 y DQB1*0302 por separado (diferencias que perdieron sus significancia al establecer la *pc*) pero que se manifestó finalmente en el haplotipo y podría suponer un función protectora de este haplotipo en el agravamiento de los síntomas en la gastritis generada por la infección por *H. pylori*.

Otra asociación encontrada exclusivamente en nuestro estudio fue la susceptibilidad que produce el haplotipo DQA1*040101-DQB1*050101 en cáncer gástrico aumentando el riesgo en más de trece veces comparado con el grupo control.

Al observar que los alelos asociados a las patologías no se asocian con la seroprevalencia de la infección, se puede pensar que la adquisición de la infección por *H. pylori* y el desarrollo de la enfermedad son procesos independientes desde el punto de vista del polimorfismo de *HLA-DQ*.

Si se toma en cuenta que la historia natural de las enfermedades gástricas asociadas a *H. pylori* se ha establecido de la siguiente forma: gastritis superficial - gastritis crónica atrófica - metaplasia intestinal - displasia gástrica - cáncer gástrico y por otra parte úlcera duodenal

(Sipponen *et al.*, 1998, Kuipers, 1999, Fox y Wang, 2001), nuestros resultados indican que a pesar de las asociaciones de alelos específicos con algunas de estas patologías, no hay asociación fuerte entre el polimorfismo de *HLA-DQ* y la evolución de estos padecimientos gástricos, sino que más probablemente sea una contribución de *HLA-DQ* relacionada con el padecimiento específico. Aunque cabe mencionar que el alelo *DQB1*0402* aumentara su frecuencia (sin ser significativa) de manera gradual conforme se avanzaba en el grado de lesión (*i.e.* Controles seronegativos=3.1%, Controles seropositivos=14.8%, GS=10.2%, GCA=7.5, MI=11.5%, DG=16.0%, CG=18.5% y UD=10.2%) e incluso refleja el fenómeno de la dicotomía entre las lesiones de cáncer gástrico y úlcera duodenal, que se consideran excluyentes entre ellas. Lo anterior indica que además de que los factores bacterianos y ambientales están relacionados con este proceso fisiopatológico, los polimorfismos de *HLA-DQ* tienen algún grado de contribución en la evolución de los padecimientos gástricos asociados a la infección por *H. pylori*.

Nuestros resultados indican que existe una contribución del polimorfismo de los genes *HLA-DQA1* y *HLA-DQB1* en el padecimiento de enfermedades gástricas asociadas a *H. pylori* en población mestiza mexicana. Las diferencias de los resultados en los diferentes reportes son el reflejo de la amplia diversidad de polimorfismos de las diferentes poblaciones humanas, así como de la variedad de procesos de selección a los que se ven sometidos estos individuos.

Los mecanismos moleculares para la mayoría de las asociaciones de *HLA* con enfermedades no se entienden claramente o no se conocen, aunque existen diferentes hipótesis al respecto. La identificación de los genes que tienen una asociación real primaria o secundaria es complicada debido al fuerte desequilibrio de enlace que existe entre los genes de *HLA* y también por los factores ambientales, tales como los agentes infecciosos. Las enfermedades asociadas al *HLA*, podrían ser resultado de combinaciones de moléculas de *HLA* (clase I y/o clase II) o incluso deberse en parte a genes no *HLA* que contribuyen en el procesamiento de antígenos (Shiina *et al.*, 2004).

Existen varios mecanismos potencialmente responsables de la asociación entre estos alelos y haplotipos con las enfermedades gástricas relacionadas con *H. pylori* (Lechler, 1994, Thorsby, 1997, Jameson, 1998):

Primero, que el nicho de unión del péptido antigénico de la molécula de *HLA-DQ* asociada a la enfermedad únicamente se una a un péptido causante de la enfermedad.

Segundo, que un receptor TCR específico, que reconozca al complejo que forman la molécula *HLA-DQ* asociada a la enfermedad más el péptido antigénico, sea realmente el responsable de la patología. Estas primeras dos hipótesis pueden actuar a nivel de activación de la respuesta inmune o en la selección de linfocitos T en el timo.

Tercero, que la molécula de *HLA-DQ* asociada a la enfermedad sea similar estructuralmente a un antígeno de *H. pylori* (mimetismo molecular) y que la molécula de *HLA* se vuelva blanco de las células T en el curso normal de la respuesta inmune contra la bacteria.

Cuarto, en el desarrollo de estas patologías sobresale el hecho de que la ureasa de *H. pylori* es capaz de unirse a las moléculas de *HLA* clase II en la membrana de las células presentadoras de antígenos y células epiteliales para inducir apoptosis (Fan *et al.*, 2000). Es probable que las variaciones de aminoácidos en la molécula de *HLA-DQ* intervengan en la unión de la ureasa, lo que implicaría un efecto más directo de las moléculas de *HLA* clase II en el daño en el epitelio gástrico.

Quinto, que debido al desequilibrio de enlace que se presenta en la región del *HLA*, estas asociaciones podrían deberse a algún gene localizado en la vecindad de *HLA-DQ*, como el loci *TAP2* u otro gene aun sin caracterizar, que tenga un papel etiológico directo en las enfermedades.

Incluso estos mecanismos podrían estar operando de manera simultánea, ya que no existen evidencias de que sean excluyentes entre ellos. Además no hay que perder de vista que el origen de estas patologías es multifactorial, y otros factores genéticos, ambientales e

infecciosos deben estar operando en conjunto con el *HLA-DQ*, ya que una asociación estadística entre un gene y una enfermedad no necesariamente prueban que hay una relación causal.

9.0 CONCLUSIONES

- i. La seroprevalencia de la infección por *H. pylori* en el grupo control fue del 80.5%; resultado similar a la reportada en adultos mestizos mexicanos.
- ii. El alelo DQA1*0101 tiene una asociación negativa con la seropositividad por *H. pylori*.
- iii. El alelo DQA1*0201 es menos frecuente en pacientes con metaplasia intestinal.
- iv. De forma contraria a lo reportado en población japonesa, el alelo DQA1*030101 no tiene ninguna influencia en el padecimiento de cáncer gástrico y úlcera duodenal en población mestiza mexicana.
- v. La posible protección que brinda el alelo DQA1*0201 y la predisposición de DQA1*040101 para desarrollar metaplasia intestinal tienen relación con la seropositividad a *H. pylori*.
- vi. El alelo DQA1*040101 se relaciona positivamente cáncer gástrico de forma independiente a la asociación con la bacteria A pesar de que ello, cuando se es seropositivo a la infección por *H. pylori*, el riesgo aumenta a más de cinco veces.
- vii. El alelo DQB1*030101 se asocia negativamente con el padecimiento de displasia gástrica sin tener una relación con la presencia de *H. pylori*.
- viii. El alelo DQB1*050101 es un marcador de riesgo de padecer cáncer gástrico en población mestiza mexicana.
- ix. El alelo DQB1*0604 produce una alta susceptibilidad para el desarrollo de metaplasia intestinal.

- x. La susceptibilidad que producen los alelos DQB1*050101 y DQB1*0604, para padecer cáncer gástrico metaplasia intestinal respectivamente, es independiente de la presencia de la bacteria.
- xi. El haplotipo DQA1*030101-DQB1*0302 parece tener una relación negativa con la generación de síntomas en gastritis superficial.
- xii. El haplotipo DQA1*040101-DQB1*050101 genera susceptibilidad al padecimiento de cáncer gástrico en nuestra población mestiza.
- xiii. La infección por *H. pylori* y el desarrollo de la enfermedad son procesos independientes desde el punto de vista del polimorfismo de *HLA-DQ*.
- xiv. Existe una clara asociación de los polimorfismos de *HLA-DQ* y el padecimiento de las enfermedades gástricas asociadas a *H. pylori* en población mestiza mexicana. Sin embargo la relación entre el alelo DQB1*0402 y la evolución de estas lesiones, aunque existe, no es estadísticamente significativa; por lo que otros factores deben contribuir en mayor medida con el proceso fisiopatológico de los padecimientos gástricos asociados a la infección por *H. pylori*.

10.0 BIBLIOGRAFÍA

Achtman M and S Suerbaum. 2001. *Helicobacter pylori*: Molecular and Cellular Biology. Horizon Scientific Press. Wymondham, UK. p15.

Argüello, J. R., A. M. Little, A. L. Pay, D. Gallardo, I. Rojas, S. G. Marsh, J. M. Goldman, and J. A. Madrigal. 1998. Mutation detection and typing of polymorphic loci through double-strand conformation analysis. *Nat Genet* 18:192.

Asaka, M., M. Kudo, M. Kato, T. Sugiyama, and H. Takeda 1998. Review article: Long-term *Helicobacter pylori* infection--from gastritis to gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 12 Suppl 1:9.

Atherton JC. 1997. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. *Gut*. 40(6):701.

Azuma T, J Konishi, Y Tanaka, M Hirai, S Ito, T Kato and Y Kohli. 1994. Contribution of HLA-DQA gene to host's response against *Helicobacter pylori*. *Lancet*. 343:542.

Azuma T, Y Ito, H Miyaji, M Dojyo, Y Tanaka, M Irfá S Ito, T Kato and Y Kohli. 1995. Immunogenetic análisis of the human leucocyte antigen DQA1 locus in patients with duodenal ulcer or chronic atrophic gastritis harbouring *Helicobacter pylori*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 7(Suppl. 1)71.

Azuma, T., S. Ito, F. Sato, Y. Yamazaki, H. Miyaji, Y. Ito, H. Suto, M. Kuriyama, T. Kato, and Y. Kohli. 1998. The role of the HLA-DQA1 gene in resistance to atrophic gastritis and gastric adenocarcinoma induced by *Helicobacter pylori* infection. *Cancer* 82: 1013.

Bahram S. 2001. MIC genes: from genetics to biology. *Adv Immunol* 76:1-60.

Bart S. 1998. What sharks can tell us about the evolution of the MHC genes. *Immunol Rev.* 166:317.

Berg D, P Hoffman, B Appelmek and J Kusters. 1997. The *Helicobacter pylori* genome sequence: Genetic factors for long life in the gastric mucosa. *Trends Microbiol.* 5:468.

Blanchard TG, SJ Czinn. 1998. Review article: immunological determinants that may affect the *Helicobacter pylori* cancer risk. *Aliment. Pharmacol Ther.* 12(Suppl 1):83.

Brown, L.M., T.L. Thomas, J.L. Ma. 2002. *Helicobacter pylori* infection in rural China: demographic, lifestyle and environmental factors. *Int J Epidemiol* 31:638.

Caldas C, F Carneiro, HT Lynch, J Yokota, GL Wiesner, SM Powell, FR Lewis, DG Huntsman, PD Pharoah, JA Jankowski, P MacLeod, H Vogelsang, G Keller, KG Park, FM Richards, ER Maher, SA Gayther, C Oliveira, N Grehan, D Wight, R Seruca, F Roviello, BA Ponder and CE Jackson. 1999. Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. *J Med Genet.* 36:873.

Camorlinga M, J Torres, G Perez-Perez, Y Leal-Herrera, B Gonzalez-Ortiz, A Madrazo de la Garza, A Gómez and O Muñoz. 1998. Validation of a serologic test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and the immune response to urease and CagA in children. *The American Journal of Gastroenterology.* 93(8):1264.

Caselli M, A Balboni, CM Chiamenti, A D'Ambrosi, V Alvisi and E Gandini. 1999. *Helicobacter pylori* and Human Leucocyte Antigens. *Scand J Gastroenterol.* 34:943.

Caselli M, A Balboni, E Guizzardi, P Gaudenzi, L Gallerani, V Alvisi and E Gandini. 1996. Role of HLA-DR and HLA-DQ antigens in the patogenesis of chronic superficial gastritis and in the *H. pylori* infection. *Gut.* 39 (Suppl. 2) A46.

- Castillo-Rojas G, M Mazari-Hiriart and Y López-Vidal. 2004. *Helicobacter pylori*: focus on CagA and VacA major virulence factors. *Salud Pública Mex.* 46(6):538.**
- Cats, A., S. G. Meuwissen, D. Forman, M. E. Craanen, and E. J. Kuipers. 1998. *Helicobacter pylori*: a true carcinogen? *Eur J Gastroenterol HepatoI* 10:447.**
- Chan, FK, KF. To, JC. Wu. 2002. Eradication of *Helicobacter pylori* and risk of peptic ulcers in patients starting long-term treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs: a randomized trial. *Lancet.* 359:9.**
- Chiba, M., N. Ishii, T. Ishioka, M. Murata, O. Masamune, T. Sugiyama, and A. Yachi. 1995. Topographic study of *Helicobacter pylori* and HLA-DR antigen expression on gastric epithelium. *Journal of Gastroenterology* 30:149.**
- Chow WH, MJ Blaser, WJ Blot, MD Gammon, TL Vaughan, HA Risch, GI Perez-Perez, JB Schoenberg, JL Stanford, H Rotterdam, AB West and JF Fraumeni. 1998. 1998 An inverse relation between cagA+ strains of *Helicobacter pylori* infection and risk of esophageal and gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Res.* 58(4):588.**
- Correa, P. 1992. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. 1st American Cancer Society Award lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Res.* 52:6735.**
- Covacci A, JL Telford, G. Del Giudice, J. Parsonnet and R. Rappuoli. 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science.* 284:1328.**
- De Koster, E., M. Buset, E. Fernandes, and M. Deltenre. 1994. *Helicobacter pylori*: the link with gastric cancer. *European Journal of Cancer Prevention* 3: 247.**

El-Omar, E. M., M. Carrington, W. H. Chow, K. E. McColl, J. H. Bream, H. A. Young, J. Herrera, J. Lissowska, C. C. Yuan, N. Rothman, G. Lanyon, M. Martin, J. F. Fraumeni, Jr., and C. S. Rabkin. 2000. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 404:398.

Eslick GD, L Lynette, JE Byles, H Hua-Xiang and N Talley. 1999. Association of *Helicobacter pylori* infection with gastric carcinoma: A meta-analysis. *The American Journal of Gastroenterology*. 94(9):2373

Falush D, T Wirth and B Linz. 2003. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*. 299:1582.

Fan XJ, H Guanasena, Z Cheng, R Espejo, SE Crowe, PB Ernst and VE Reyes. 2000. *Helicobacter pylori* urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis. *J Immunol*. 165:1918.

Fan, X., S. E. Crowe, S. Behar, H. Gunasena, G. Ye, H. Haeberle, N. Van Houten, W. K. Gourley, P. B. Ernst, and V. E. Reyes. 1998. The effect of class II major histocompatibility complex expression on adherence of *Helicobacter pylori* and induction of apoptosis in gastric epithelial cells: a mechanism for T helper cell type I-mediated damage. *J Exp Med* 187:1659.

Forman D. 1991. *Helicobacter pylori* infection: A novel risk factor in the etiology of gastric cancer. *J Natl Cancer Inst*. 83(23):1702.

Fox JG and TC Wang. 2001. *Helicobacter pylori*: Not a good bug after all. *N Engl J Med*. 345(11):829.

Fox, J.G., M Batchelder, RP Marini, L Yan, L Handt, X Li, B Shames, A Hayward, J Campbell, JC Murphy. 1995. *Helicobacter pylori* induced gastritis in the domestic cat. *Infect. Immun*. 63(7):2674.

Furuta, T, EM. El-Omar, F. Xiao. 2002b. Interleukin 1beta polymorphism increase risk of hypochlorhydria and atrophic gastritis and reduce risk of duodenal ulcer recurrence in Japan. *Gastroenterology*. 123:92.

Furuta, T, N. Shirai, M. Takashima. 2002a. Effect of genotypic differences in interleukin-1 beta on gastric acid secretion in Japanese patients infected with *Helicobacter pylori*. *Am J Med*. 112:141.

Garza-Gonzalez E, FJ Bosques-Padilla, E El-Omar, G Hold, R Tijerina-Menchaca, HJ Maldonado-Garza and GI Perez-Perez. 2005. Role of the polymorphic IL-1B, IL-1RN and TNF-A genes in distal gastric cancer in Mexico. *Int J Cancer*. 114(2):237.

Gayther SA, K Gorringe, Ramus SJ D Huntsman, F Roviello, N Grehan, JC Machado, E Pinto, R Seruca, K Halling, P MacLeod, SM Powell, CE Jackson, BA Ponder and C Caldas. 1998. Identification of germ-line E-cadherin mutations in gastric cancer families of European origin. *Cancer Res*. 58:4086.

Ge Z and D Taylor. 1999. Contribution of genome sequencing to understanding the biology of *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Microbiol*. 53:355.

Go, M. F. 1997. What are the host factors that place an individual at risk for *Helicobacter pylori*-associated disease? *Gastroenterology* 113: S15.

Gobert AP, BD Mersey, Y Cheng, DR Blumberg, JC Newton and KT Wilson. 2002. Cutting edge: urease release by *Helicobacter pylori* stimulates macrophage inducible nitric oxide synthase. *J. Immunol*. 168(12):6002.

González CA, N Sala and G Capella. 2002. Genetic susceptibility and gastric cancer risk. *Int J Cancer*. 100:249.

Goodwin CS, JA Armstrong, T Chilvers, M Peters, MD Collins, L Sly, W McConnell and WES Harper. 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter pylori* gen. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol.* 39:397.

Gorodezky C, C Alaez, MN Vázquez-García, G de la Rosa, E Infante, S Balladares, R Toribio, E Pérez-Luque and L Muñoz. 2001. The genetic structure of Mexican Mestizos of different locations: Tracking back their origins through MHC genes, blood group systems, and microsatellites. *Hum Immunol.* 62:979.

Guarner, J., A. Mohar, J. Parsonnet, and D. Halperin. 1993. The association of *Helicobacter pylori* with gastric cancer and preneoplastic gastric lesions in Chiapas, Mexico. *Cancer* 71:297.

Handt LK, JG Fox, L Yan, Z Shen, WJ Pouch, D Ngai, SL Motzel, TE Nolan, HJ Klein. 1997. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in a colony of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *J. Clin. Microbiol.* 35:165.

Herrera-Goepfert R, J Zuñiga, A Hernández-Guerrero, T Rodríguez-Reyna, N Osnalla, J Rufz-Morales, G Vargas-Alarcón, JK Yamamoto-Furusho, A Mohar-Betancourt, R Hernández-Pando y J Granados. 2004. Asociación del alelo HLA-DQB1*0501 del complejo mayor de histocompatibilidad con cáncer gástrico en México. *Gac Med Méx.* 140(3):299.

Hooper, L. V., and J. I. Gordon. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292:1115.

Hua-Xiang H and NJ Talley. 2001. Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: Implications in gastric carcinogenesis. *The American Journal of Gastroenterology.* 96(1):16.

Huang, J.Q, S. Sridhar and R.H. Hunt. 2002. Role of *Helicobacter pylori* infection and non-steroidal anti-inflammatory drugs in peptic-ulcer disease: a meta-analysis. *Lancet*. 359:14.

Jaworski, W. 1889. Podrecznik Chorob zoladka. *Wydawnictwa Dziel Lakarskich Polskich*. 32. en : Achtman M and S Suerbaum. 2001. *Helicobacter pylori*: Molecular and Cellular Biology. *Horizon Scientific Press. Wymondham, UK*. p15.

Karhukorpi, J., I. Ikaheimo, S. Silvennoinen-Kassinen, A. S. Tiilikainen, and R. Karttunen. 1999. HLA-DQA1 alleles and the presence of *Helicobacter pylori* antibodies. *European Journal of Immunogenetics* 26:15.

Karr WR. 1998. The HLA complex. En: Jameson JL. 1998. Principles of molecular medicine. *Humana Press USA*. p273.

Kersulyte D, AK Mukhopadhyay, B Velapatiño, W Su, Z Pan, C García, V Hernández, Y Valdéz, RS Mistry, RH Gilman, Y Yuan, H Gao, T Alarcón, L Brea, BG Nair, A Chowdhury, S Datta, M Shirai, T Nakazawa, R Ally, I Segal, BCY Wong, SK Lam, FO Olfat, T Borén, L Engstrand, O Torres, R Schneider. 2000. Differences in genotypes of *Helicobacter pylori* from different human populations. *J Bacteriology* 182:3210.

Kim, JJ., H. Tao, E. Carloni. 2002. *Helicobacter pylori* impairs DNA mismatch repair in gastric epithelial cells. *Gastroenterology*. 123:542.

Kuipers, E. J. 1998. Review article: Relationship between *Helicobacter pylori*, atrophic gastritis and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 12 Suppl 1:25.

Kuipers, E. J. 1999. Review article: Exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 13 Suppl 1 3.

Kulski JK, T Shiina, T Anzai, S Kohara and H Inoko. 2002. Comparative genomic analysis of the MHC: the evolution of class I duplication blocks, diversity and complexity from shark to man. *Immunol Rev.* 190:95.

Kuntsman E, C Hardt, E Elitok, M Harder, S Suerbaum, U Peitz, W Schmiegel and JT Epplen. 2000. The nonfunctional allele TCRBV6S1B is strongly associated with *Helicobacter pylori* infection. *Infect Immun.* 68:6493.

Knntsmann E, C Hardt, H Treitz, S suerbaum, G Faller, U Peitz, W Scmiegel and JT Epplen. 2002. In the European population HLA-class II genes are not associated with *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 14(1):49.

Lechler. 1994. HLA and disease. *Academic Press Limited. London. UK. P. 83.*

Lee JE, JD Reveille, MI Ross and CD Platsoucas. 1994. HLA-DQB1*0301 association with increased cutaneous melanoma risk. *Int J Cancer*59:510.

Lee, J. E., A. M. Lowy, W. A. Thompson, M. Lu, P. T. Loflin, J. M. Skibber, D. B. Evans, S. A. Curley, P. F. Mansfield, and J. D. Reveille. 1996. Association of gastric adenocarcinoma with the HLA class II gene DQB10301. *Gastroenterology* 111:426.

Ley, C., A. Mohar, J. Guarner, R. Herrera-Goepfert, L. S. Figueroa, D. Halperin, and J. Parsonnet. 2001. Screening markers for chronic atrophic gastritis in Chiapas, Mexico. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:107.

Lopez-Carrillo L, M Lopez-Cervantes, G Robles.Diaz, A Ramirez-Espitia, A Mohar-Betancourt, A Meneses-Garcia, Y Lopez-Vidal and A Blair. 2003. Capsaicin consumption, *Helicobacter pylori* positivity and gastric cancer in Mexico. *Int J Cancer.* 106(2):277.

Macarthur M, GL Hold and EM El-Omar. 2004. Inflammation and cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 286:G515.

Maeda, S, H. Yoshida, Y. Mitsuno. 2002. Analysis of apoptotic and antiapoptotic signaling pathways induced by *Helicobacter pylori*. *Gut.* 50(6):771.

Magnusson PKE, H Enroth, I Eriksson, M Held, O Nyrén, L Engstrand, LE Hansson and UB Gyllensten. 2001. Gastric cancer and Human Leucocyte Antigens: Distinct *DQ* and *DR* alleles are associated with development of gastric cancer and infection by *Helicobacter pylori*. *Cancer Research.* 61:2684.

Malaty, H.M., A. El-Kasabany, D.Y Graham. 2002. Age at acquisition of *Helicobacter Pylori* infection: a follow-up study from infancy to adulthood. *Lancet* 359:931.

Marsh SGE, ED Albert, WF Bodmer, RE Bontrop, B Dupont, HA Erlich, DE Geraghty, JA Hansen, CK Hurley, B Mach, WR Mayr, P Parham, EW Petersdorf, T Sasazuki, GMT Schreuder, JL Strominger, A Svejgaard, PI Terasaki and J Trowsdale. 2005. Nomenclature for factors of the HLA system, 2004. *Tissue Antigens.* 65:301.

Marshall BJ and JR Warren. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastric and peptic ulceration. *Lancet* 16(1):1311.

Massari P, R Manetti, D Burrioni, S Nuti, N Norais, R Rappuoli and J Telford. 1998. Binding of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin to target cells. *Infect Immun.* 66:3981.

Matthews DE and V Farewell. 1985. Using and understanding medical statistics. *S Karger. New York.* p39.

- Mazari-Hiriart M, Y Lopez Vidal, S Ponce-de-Leon, JJ Calva, F Rojo-Callejas and G Castillo-Rojas. 2005.** Longitudinal study of microbial diversity and seasonality in the Mexico city metropolitan area water supply system. *Appl Environ Microbiol.* 71(9):5129.
- Miehke S, R Tomas, O Gutierrez, DY Graham and MF Go. 1999.** DNA fingerprinting of single colonies of *Helicobacter pylori* from gastric cancer patients suggest infection with a single predominant strain. *J Clin Microbiol.* 37:245.
- Miller SA, KK Dykes and HF Plesky. 1988.** A single salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acid Res.* 16:1215.
- Mitchell, H. M. 1993.** The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and its relation to gastric cancer. In *Helicobacter pylori: Biology and clinical practice.*, Vol. 1. CRC Press, Inc., p.96.
- Monteiro L, A de Mascarel, AM Sarrasqueta, B Bergey, C Barberis, P Talby, D Roux, L Shouler, D Goldfain, H Lamouliatte and F Megraud. 2001.** Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Noninvasive methods compared to invasive methods and evaluation of two new tests. *The American Journal of Gastroenterology.* 96:2.
- Morris, A., C. Hewitt, and S. Young. 1994.** The major histocompatibility complex: its genes and their roles in antigen presentation. *Mol Aspects Med* 15:377.
- Moss SF and S Sood. 2003.** *Helicobacter pylori.* *Curr Op Infect Dis.* 16:445.
- Murray, C. J., and A. D. Lopez. 1997.** Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349:1269.
- O'Rourke EJ, C Chevalier, AV Pinto, JM Thiberge, L Ielpi, A Labigne and P Radicella. 2003.** Pathogen DNA as target for host generated oxidative stress: role for repair of bacterial DNA damage in *Helicobacter pylori* colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(5):2789.

Olson JW and RJ Maier. 2002. Molecular hydrogen as an energy source for *Helicobacter pylori*. *Science*. 298:1788.

Papini E, M Bernard, E Milia, A Bugnoli, M Zerial, R Rappuoli and C Montecucco. 1994. Cellular vacuoles induced by *Helicobacter pylori* originate from late endosomal compartments. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:9720.

Parsonnet J. 1998. *Helicobacter pylori*: the size of the problem. *Gut*. 43 (suppl 1) S6.

Parsonnet, J., G. D. Friedman, N. Orentreich, and H. Vogelmann. 1997. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 40: 297.

Perri F, A Pidepolo, M Quitadamo, M Quarticelli, A Merla and M Bisceglia. 2002. HLA-DQAA1 and -DQB1 genes and *Helicobacter pylori* infection in Italian patients with gastric adenocarcinoma. *Tissue Antigens*. 59:55.

Sakai T, N Aoyama, K Satonaka, S Shigeta, H Yoshida, Y Shinoda, D Shirasaka, M Miyamoto, Y Nose and M Kasuga. 1999. HLA-DQB1 locus and the development of atrophic gastritis with *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol*. 34(Suppl. 11):24.

Salud, S. d. 1999. *Compendio del Registro Histopatológico de Neoplasias en México*. Dirección General de Epidemiología., México D.F.

Shiina T, H Inoko and JK Kulski. 2004. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations:2004. *Tissue Antigens*. 64:631.

Sipponen, P., H. Hyvarinen, K. Seppala, and M. J. Blaser. 1998. Review article: Pathogenesis of the transformation from gastritis to malignancy. *Aliment Pharmacol Ther* 12 Suppl 1:61.

Solcia, E., O. Luinetti, L. Villani, P. Quilici, G. Klersy, and R. Fiocca. 2000. Intestinal metaplasia: types, mechanisms of origin, and role in gastric cancer histogenesis. In *Helicobacter pylori Basic Mechanisms to Clinical Cure 2000*, Vol. 1. R. H. Hunt, and G. N. J. Tytgat, eds. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, p. 249.

Stern L J, and D C Wiley. 1994. Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Behring Inst Mitt:1*.

Stoicov C, R Saffari, X Cai, C Hasyagar and JM Houghton. 2004. Molecular biology of gastric cancer: *Helicobacter pylori* infection and gastric adenocarcinoma: bacterial and host factors responsible for altered growth signaling. *Gene. 341:1*

Suerbaum, S, and P. Michetti. 2002. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med 347:1175*.

Taupin, A., A. Occhialini, A. Ruskone-Fourmesttraux, J. C. Delchier, J. C. Rambaud, and F. Megraud. 1999. Serum antibody responses to *Helicobacter pylori* and the cagA marker in patients with mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Clin Diagn Lab Immunol 6:633*.

Thorsby E. 1997. Invited anniversary review: HLA associated diseases. *Human Immunology. 53:1*.

Torres, J., G. I. Perez-Perez, Y. Leal-Herrera, and o. Munoz. 1998b. Infection with CagA+ *Helicobacter pylori* strains as a possible predictor of risk in the development of gastric adenocarcinoma in Mexico. *Int J Cancer 78: 298*.

Torres, J., G. Perez-Perez, K. J. Goodman, J. C. Atherton, B. D. Gold, P. R. Harris, A. M. la Garza, J. Guarner, and O. Munoz. 2000. A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. *Arch Med Res 31:431*.

Torres, J., Y. Leal-Herrera, G. Perez-Perez, A. Gomez, M. Camorlinga-Ponce, R. Cedillo-Rivera, R. Tapia-Conyer, and O. Munoz. 1998a. A community-based seroepidemiologic study . of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J Infect Dis* 178:1089.

Vaucher, C., B. Janvier, J. B. Noursbaum, B. Grignon, L. Pezennec, M. Robaszkiewicz, H. Gouerou, B. Picard, and J. L. Fauchere. 2000. Antibody response of patients with *Helicobacter pylori*-related gastric adenocarcinoma: significance of anti-cagA antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 7:463.

Yoshitake, S., M. Okada, A. Kimura, and T. Sasazuki. 1999. Contribution of major histocompatibility complex genes to susceptibility and resistance in *Helicobacter pylori* related diseases. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 11 :875.

Yu, J., WK. Leung, MY. Go. 2002. Relationship between *Helicobacter pylori* babA2 status with gastric epithelial cell turnover and premalignant gastric lesions. *Gut*. 51:480.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Gloria A. Rodríguez Hernández, mi hermano Eric Partida Rodríguez y a toda mi familia por el apoyo económico y la motivación que me brindan.

A la Dra. Martha E. Pérez Rodríguez por aceptarme en su equipo de trabajo y permitirme realizar mi trabajo de maestría bajo su tutela, disciplina y experiencia.

Al Dr. Roberto R. Kretschmer Schmid, la persona más inteligente y carismática que he conocido, por admitirme en su prestigiosa unidad de investigación.

A mi comité tutorial, Dr. Julio Granados Arriola y Dr. Carlos A. Eslava Campos, por su amplia experiencia, valiosa orientación y atinados consejos.

A mis sinodales Dra. Yolanda López Vidal y Dr. Gilberto Vargas Alarcón por sus apreciables comentarios y sugerencias sobre la tesis.

Al Dr. Benny Palomares Martínez y todo su equipo de trabajadores del Banco de Sangre del Hospital General Regional No. 25 del IMSS por su ayuda y buen ánimo en el trabajo.

A los compañeros y amigos del laboratorio de HLA, Miri (y a su tía Sonia), Eric, Estrellita, Cancino, Ara, Ale, Julio, Óscar, por la ayuda en el trabajo, por el apoyo en momentos complicados y por tantas anécdotas y momentos divertidos.

A la UIMI: Dr. Álvaro, Mony, Lety, Emiliano, Leo, Rafa, Dra. Lupita, Esther, Raúl, Sara, Dra Dolo, Yadira, Criceyra, Dr. Toño, Paty, Dr. Blanco, Lupita, Vicky, Luis, Bere, Ricardo, Óscar, porque siempre están en la mejor disposición de ayudar

Al Dr. Javier Torres López y la Dra. Margarita Camorlinga Ponce de la UIMEIP por su fundamental colaboración en el trabajo.

Al IMSS por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de laboratorio en sus instalaciones.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, por aceptarme en su programa de maestría.

A la UNAM porque sólo gracias a ella pude continuar con mi educación, desde bachillerato hasta posgrado, de manera gratuita y al más alto nivel.

A todos, muchas, muchas gracias...