

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**EFFECTO DE LA VARIACIÓN GENÉTICA DE LOS RECEPTORES DE  
RECONOCIMIENTO PATRÓN EN EL PROCESO INFLAMATORIO  
INDUCIDO POR *Helicobacter pylori*.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

PRESENTA

M en C. LETICIA ALEJANDRA TREJO DE LA O

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JAVIER TORRES LÓPEZ

MÉXICO, D.F.

2011



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.

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (U.I.M.E.I.P.) en el Hospital de Pediatría (H.P.) del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social. Bajo la dirección del Dr. Javier Torres López en la Facultad de Medicina, Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. El comité tutor estuvo integrado por la Dra. Ingeborg Becker Fauser y la Dra. Gladis Fragoso González.

La sustentante fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de registro 176005 en el período comprendido de agosto del 2005 a diciembre del 2008. El proyecto fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética del H.P. CMNSXXI IMSS y recibió financiamiento del CONACyT con el número de registro 6957 y de la Dirección de Prestaciones Médicas del IMSS, a través de la Coordinación de Investigación en Salud, proyecto: IMSS-2004/086.

***"Somos libres de ir donde queramos y de ser lo que somos"***

Richard Bach.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero antes que nada agradecer a mi familia por todo el apoyo y la alegría que me brindan diariamente, por su comprensión y su inestimable ayuda, sin ellos no hubiese sido posible terminar esta etapa de mi vida con éxito.

Gracias a mis padres, por enseñarme que no existen límites para lo que puedo lograr, pero sobre todo, porque con su ejemplo me obligan a superarme constantemente y me obligan a nunca darme por vencida. Los quiero.

De forma muy especial, quiero dejar constancia de mi agradecimiento a la Dra. Carmen Maldonado por haber confiado en mí, por su participación activa en la dirección de esta tesis, pero principalmente por tantos años de conocimiento y sabiduría empleados en mi formación.

A Vare, Pau y Angie, por brindarme su amistad desde el día en que nos conocimos, por compartir conmigo muchos momentos, por tener siempre tendida su mano amiga.

Al Dr. Javier Torres por aceptarme en su laboratorio y apoyar incondicionalmente la realización de este trabajo, por sus consejos y preguntas que además de enriquecer este proyecto me han permitido crecer académicamente.

A mis compañeros de la UIMEIP porque cada uno de los que la integran han participado en la elaboración de esta investigación.

Quiero agradecer también a la Dra. Gladis Fragosó y a la Dra. Ingeborg Becker, por su colaboración y asesoramiento en el desarrollo de este trabajo, por sus comentarios en todo el proceso de elaboración de la tesis y sus atinadas correcciones.

Gracias a la UNAM por el soporte institucional dado a la elaboración de este trabajo y a mi formación académica, por proporcionarme los conocimientos necesarios para desarrollarme profesionalmente, pero sobre todo por favorecer siempre mi desarrollo académico y profesional.

## ÍNDICE

1. Índice de abreviaturas	i
2. Relación de tablas y figuras	ii
2.1. Relación de tablas	ii
2.2. Relación de figuras	iii
3. Resumen	1
4. Antecedentes	2
4.1. <i>Helicobacter pylori</i>	2
4.2. Receptores tipo toll	6
4.3. Polimorfismo de receptores tipo toll	8
4.4. <i>Helicobacter pylori</i> y receptores tipo toll	10
5. Justificación	16
6. Hipótesis	17
7. Objetivos	17
7.1. Objetivo general	17
7.2. Objetivos específicos	17
8. Materiales y Métodos	18
8.1. Diseño del estudio	18
8.2. Tipo y tamaño de muestra	18
8.3. Población de estudio	18
8.4. Extracción de DNA	19
8.5. Determinación del genotipo de los genes de TLRs	20
8.6. Determinación de la expresión de citocinas y quimiocinas	21
8.7. Análisis estadístico	23
9. Resultados	24
9.1. Características de los pacientes incluidos en el estudio	24
9.2. Determinación del genotipo de TLR4, TLR5 Y TLR9	24
9.3. Efecto de la variación genética de los TLRs sobre el perfil de citocinas y quimiocinas	31
10. Discusión	42
11. Conclusiones	48
12. Perspectivas	49
13. Bibliografía	50

## ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
AP-1	Proteína activadora 1
ENA	Péptido activador de neutrófilos derivado de células epiteliales
GM-CSF	Factor de crecimiento de granulocitos y macrófagos
GRO- $\alpha$	Oncogene alfa regulador de crecimiento
ICAM	Molécula de adhesión intracelular
IKK	Cinasa IKB
IKKi	Cinasa Ikb inducible
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IRAK	Cinasa asociada al receptor de IL-1
IRF	Factor regulador del interferon
JNK	Cinasa N terminal de Jun
LPS	Lipopolisacárido
LRR	Repeticiones ricas en leucina
MALT	Tejido linfoide asociado a la mucosa
MCP	Proteína quimioattractante de monocitos
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos
MyD88	Factor de diferenciación mieloide de 88 KDa
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear kappa B
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PRRs	Receptores de reconocimiento patrón
RIP	Proteína de interacción con el receptor
SNPs	Polimorfismo de una sola base
TAB	Proteína asociada a TAK
TAK	Cinasa asociada al receptor TGF- $\beta$
TBK	Cinasa de union a TANK
TGF	Factor de crecimiento transformante
TIR	Dominio Toll/IL-1R
TIRAP	Proteína adaptadora que contiene el dominio TIR
TLRs	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAF6	Factor 6 asociado al receptor de TNF
TRIF	Proteína adaptadora asociada al dominio TIR inductora de IFN
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular

## RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS

### RELACIÓN DE TABLAS

TABLA	TÍTULO	PÁGINA
1	Polimorfismos de TLRs asociados a la infección con <i>H. pylori</i>	13
2	Criterios de inclusión y no inclusión de los pacientes estudiados	14
3	Lista de iniciadores utilizados para la determinación del genotipo de TLRs	20
4	Sondas TaqMan utilizadas para la determinación del genotipo de TLRs	21
5	Lista de iniciadores utilizados para determinar la expresión de citocinas	22
6	Características y diagnóstico clínico de los pacientes incluidos en el estudio	24
7	Frecuencia del genotipo TLR4 D299G	26
8	Frecuencia del genotipo TLR4 T399I	26
9	Frecuencia del genotipo TLR5 R392*	28
10	Frecuencia del genotipo TLR5 N592S	28
11	Frecuencia del genotipo TLR9 T-1237C	30
12	Frecuencia del genotipo TLR9 G2848A	30



## RELACIÓN DE FIGURAS

FIGURAS	NOMBRE	PÁGINA
1	<i>Helicobacter pylori</i>	2
2	Respuesta inmune inducida por la infección de <i>H. pylori</i>	5
3	Familia de receptores tipo Toll	7
4	TLRs que participan en el reconocimiento de <i>H.pylori</i>	12
5	Efecto del polimorfismo de TLR4 en la expresión de citocinas en la mucosa gástrica	33
6	Efecto del polimorfismo de TLR4 en la expresión de quimiocinas en la mucosa gástrica	34
7	Efecto del polimorfismo de TLR5 en la expresión de IL-4 e INF- $\gamma$ en la mucosa gástrica	36
8	Efecto del polimorfismo de TLR5 en la expresión de citocinas en la mucosa gástrica	37
9	Efecto del polimorfismo de TLR5 en la expresión de quimiocinas en la mucosa gástrica	38
10	Efecto del SNP T-1237C de TLR9 en la expresión de citocinas en la mucosa gástrica	40
11	Efecto del SNP G2848A de TLR9 en la expresión de citocinas en la mucosa gástrica	41

## RESUMEN

*H. pylori* induce una respuesta inflamatoria en la mucosa gástrica, sin embargo, sólo el 30% de la población infectada desarrolla un cuadro patológico. Los receptores tipo toll (TLR) reconocen a *H. pylori* e inducen la síntesis de mediadores inflamatorios, sin embargo, su función puede verse alterada por la presencia de polimorfismos de una sola base (SNPs). Por lo anterior, se consideró importante determinar si los SNPs de TLR4, TLR5 y TLR9 modificaban la expresión de citocinas en la mucosa gástrica y si la presencia de estas variantes génicas se asociaba con las patologías descritas en la infección por *H. pylori*.

Mediante discriminación alélica se determinó el genotipo de las regiones T399I y D299G de TLR4; R392\* y N592S de TLR5 y T-1237C y G2848A de TLR9 en 450 pacientes con enfermedades gastroduodenales. Además, se cuantificaron los niveles de expresión de mRNA de citocinas y quimiocinas en la mucosa gástrica (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, GRO- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , MCP-1, MIP-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) mediante RT-PCR cuantitativa.

La frecuencia de los SNPs de TLRs en pacientes con cáncer y úlcera aumentó, no obstante, la diferencia solo fue estadísticamente significativa en los pacientes con úlcera duodenal que presentaban el alelo 299G del gen *TLR4* y el alelo 2848G del gen *TLR9*. Además, los SNPs en los TLRs modificaron el perfil de expresión de citocinas y quimiocinas de la mucosa gástrica. SNPs de TLR4 se asociaron aun aumento en la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-10, y una disminución de IL-1 $\beta$  e IL-6, mientras que el alelo R392\* en el gen de TLR5 se asocia con una disminución en la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10, conjuntamente, ambos SNPs de TLR9 se asociaron con una menor expresión de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ .

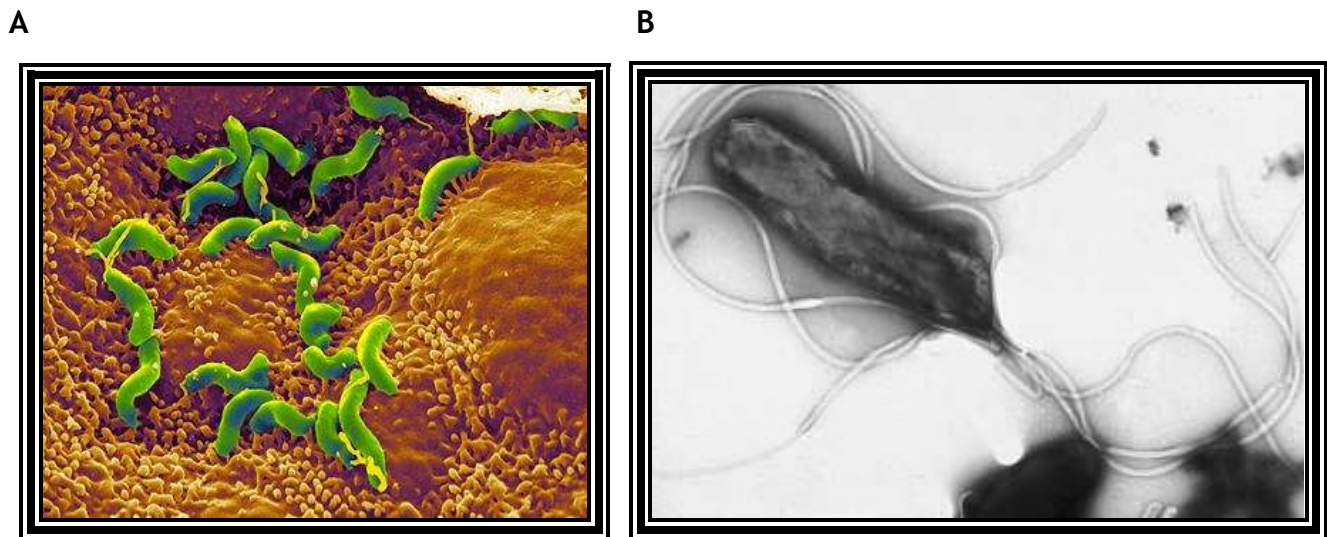
Nuestros resultados muestran que las variaciones genéticas en TLRs modifican la expresión de citocinas y quimiocinas lo que podría modificar la respuesta inflamatoria hacia *H. pylori* y tener como consecuencia que estos polimorfismos se asocien con las diferentes patologías provocadas por la infección.

## ANTECEDENTES

### *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* es una bacteria gramnegativa que coloniza la mucosa gástrica humana como se ilustra en la figura 1A. Esta bacteria es microaerofílica y produce las enzimas ureasa, catalasa y oxidasa para adaptarse al microambiente que infecta.

Como podemos observar en la figura 1B, *H. pylori* es un bacilo curvo de aproximadamente 2.5 x 0.5 micras de tamaño que posee de 4 a 6 flagelos peritricos.<sup>1</sup>



**Fig. 1** *Helicobacter pylori*. **A** Microscopía electrónica de barrido del epitelio gástrico infectado por *H. pylori*. **B** Microscopía electrónica mostrando un bacilo curvo flagelado (*H. pylori*). Tomado de [www.gastroenterologe.de](http://www.gastroenterologe.de)

La infección por *H. pylori* representa una de las infecciones bacterianas más comunes en el mundo. En países en vías de desarrollo, como México, la seroprevalencia fluctúa entre el 80% y el 90%.<sup>2</sup>

*H. pylori* es la única bacteria clasificada como carcinógeno humano por la *International Agency for Research on Cancer* (IARC)<sup>3</sup> y se ha asociado a diversas enfermedades gastroduodenales.<sup>4,12 5</sup> Sin embargo, solo el 30% de las personas infectadas desarrollan

cuadros patológicos y de este porcentaje solo del 1% al 3% llegan a desarrollar cáncer gástrico. La infección generalmente se adquiere en etapas tempranas de la vida y sólo décadas más tarde se presentan las diferentes patologías.<sup>4, 5</sup>

Esta bacteria tiene una gran variabilidad genética, existen diversas cepas de *H. pylori* que tienen diferentes factores de virulencia. La interacción entre los factores de virulencia de la bacteria, los factores ambientales y del hospedero pueden o no conducir al desarrollo de úlcera péptica o carcinoma gástrico.

Diversos estudios histopatológicos demuestran que *H. pylori* provoca una serie de cambios en la mucosa gástrica. Estos cambios pueden ir desde una inflamación crónica, caracterizada por el aumento en el infiltrado celular en la submucosa, hasta carcinoma gástrico. El espectro de la enfermedad comprende gastritis superficial, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia y cáncer gástrico, en orden de incremento de la gravedad.<sup>6, 7, 8</sup>

*H. pylori* causa inflamación crónica en todas las personas infectadas. Durante la fase temprana de la infección, la unión de *H. pylori* con las células epiteliales induce la activación de factores de transcripción como el factor nuclear kappa b (NF-κB) y la proteína activadora 1 (AP-1),<sup>9, 10</sup> estos factores de transcripción inducen la secreción de quimiocinas como la interleucina 8 (IL-8), el oncogén  $\alpha$  relacionado con el crecimiento (GRO $\alpha$ ) y la proteína activadora de neutrófilos derivada de células epiteliales (ENA7),<sup>11</sup> posteriormente se inicia la secreción de RANTES, de la proteína inflamatoria de los macrófagos 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) y de la proteína 1 quimioatrayente de monocitos MCP-1.<sup>11,19 12</sup>

Este patrón sugiere que la IL-8 y las quimiocinas de la misma familia atraen granulocitos en la fase temprana de la infección por *H. pylori* y posteriormente, se incrementa la migración de células mononucleares.

Tanto el infiltrado celular como la mucosa gástrica producen citocinas proinflamatorias, estas citocinas son capaces de activar a las diferentes células reclutadas. Se ha reportado

que al inicio de la infección por *H. pylori* se induce un aumento en la expresión de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y posteriormente la expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y del factor de crecimiento de granulocitos y macrófagos (GM-CSF).<sup>11</sup>

Aunque no existe un perfil claro de citocinas entre las diferentes patologías asociadas a la infección, Strömberg y col. demostraron que en pacientes con úlcera duodenal, la síntesis de IL-8, del interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) y del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) se encuentra disminuida, específicamente en el área del duodeno.<sup>13</sup>

Citocinas como el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  inducen la expresión de moléculas de coestimulación (CD80 y CD86) y del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC II) en células epiteliales, lo que las hace competentes para la presentación de antígenos exógenos. IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  estimulan también la síntesis de IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-6 por células epiteliales.<sup>14, 15</sup>

Después de la inflamación aguda inicial, la exposición continua a los antígenos bacterianos induce la generación de una respuesta específica de células T y B hacia *H. pylori*.<sup>16, 17, 18, 19</sup> La migración de linfocitos a la mucosa gástrica se ve favorecida por la expresión de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM1) y la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM1)<sup>20</sup> que son inducidas por las quimiocinas del microambiente. La sobreexpresión de moléculas de adhesión facilita la extravasación de los linfocitos y su llegada al sitio de la infección.

*H. pylori* induce una fuerte respuesta humoral, tanto sistémica como en la mucosa. Sin embargo, los anticuerpos sintetizados no son capaces de erradicar la infección.<sup>16, 17</sup> Durante la respuesta inmune adaptativa inducida por *H. pylori* se observa preferentemente la expresión de citocinas tipo Th1,<sup>19</sup> posiblemente debido a una alta expresión de IL-18 en respuesta a la infección por *H. pylori*.<sup>21</sup>

La figura 2 nos muestra las principales estirpes celulares, citocinas y quimiocinas que participan en la respuesta inmune inducida por la infección con *H. pylori*.

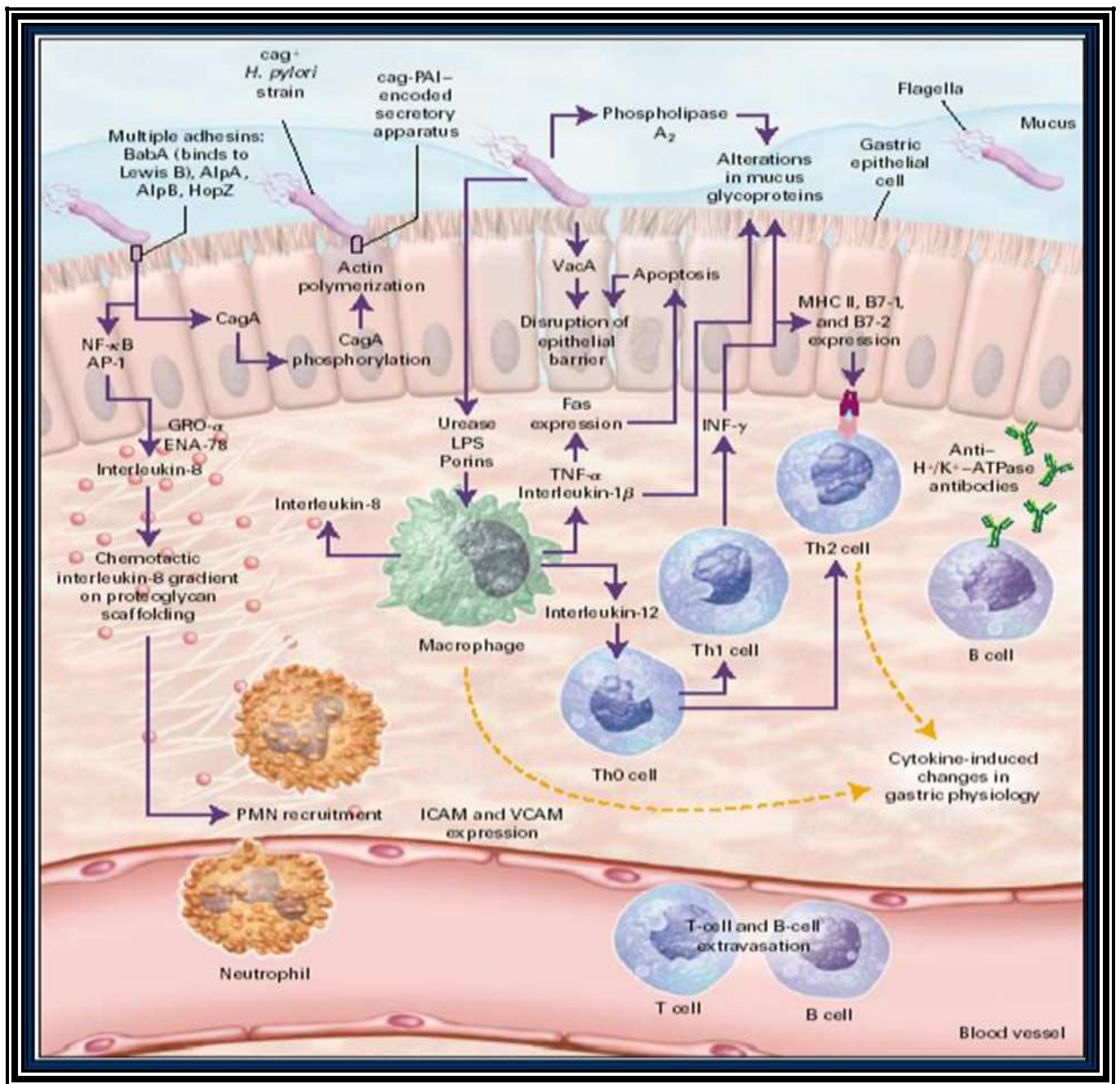


Fig 2. Respuesta inmune inducida por la infección de *H. pylori*. Tomado de: N Engl J Med. 2002

La respuesta inmune juega un papel fundamental en el daño causado al epitelio gástrico durante la infección por *H. pylori*. Los neutrófilos activados liberan radicales libres que pueden dañar las células del epitelio gástrico.<sup>22</sup> Citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  pueden inducir la apoptosis de células epiteliales gástricas<sup>23, 24</sup> y alterar la secreción de moco, además de estimular a las células parietales incrementando la síntesis de gastrina y,

por lo tanto, la secreción de ácido, alterando la homeostasis del estómago. Tanto el TNF- $\alpha$  como la IL-1 $\beta$  disminuyen el número de células D del antro. Las modificaciones aquí descritas podrían promover el desarrollo de atrofia gástrica, lo cual es un paso inicial en la vía que conduce a carcinogénesis en el estómago.

Se ha observado que el polimorfismo de genes que codifican para moléculas que participan en la respuesta inmune, tales como IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , afectan la evolución de la enfermedad producida por *H. pylori*,<sup>25, 26, 27</sup> ya que inducen una mayor síntesis de estas citocinas exacerbando su efecto.<sup>28</sup> El polimorfismo de IL-10 aumenta también el riesgo a desarrollar cáncer gástrico y úlcera péptica.<sup>35 29</sup> Este polimorfismo se asocia a una menor síntesis de IL-10, lo que puede llegar a romper la homeostasis del organismo permitiendo una reacción inflamatoria exagerada.<sup>28</sup>

### *LOS RECEPTORES TIPO TOLL*

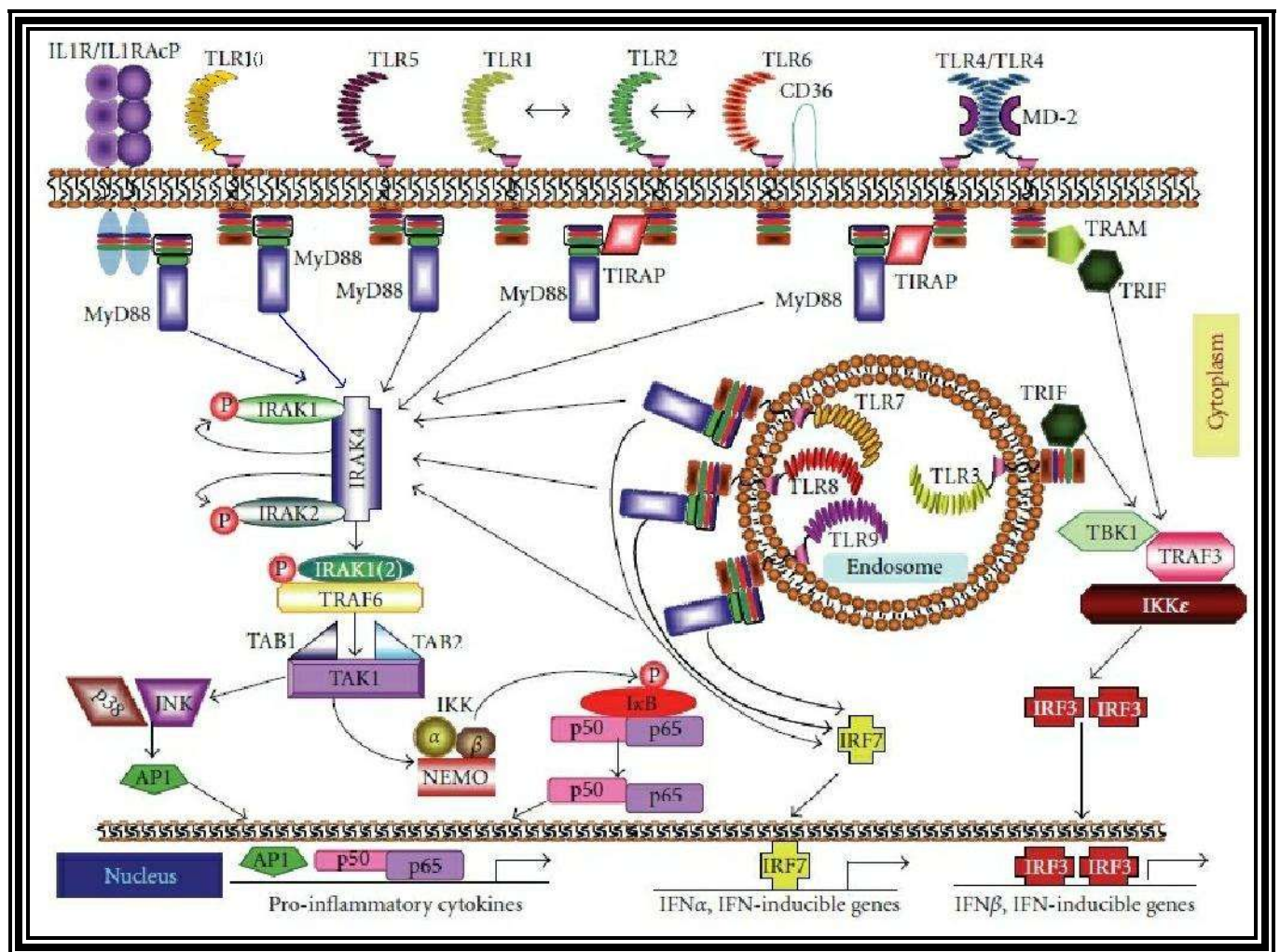
Una de las formas de interacción de las células del hospedero con *H. pylori*, es por medio de receptores de la respuesta inmune innata conocidos. Estos receptores, como los receptores de reconocimiento patrón (PRRs), son capaces de reconocer productos constitutivos y altamente conservados de los microorganismos que son esenciales para su sobrevivencia. A estos productos microbianos se les dio el nombre de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs).<sup>30</sup>

Entre los PRRs podemos encontrar a los receptores tipo Toll (TLRs) que son receptores transmembranales tipo I. Los TLRs se caracterizan por tener un dominio extracelular con regiones, de 24 a 29 aminoácidos (a.a), de repeticiones ricas en leucina (LRR) y una o dos regiones ricas en cisteína. La región citoplasmática de los TLRs, formada por aproximadamente 200 aa contiene un motivo similar al que presenta la familia de receptores de IL-1 (IL-1R), denominado TIR (Toll/IL-1R).

El dominio LRR de los TLRs se encuentra involucrado en el reconocimiento del ligando, mientras que su dominio intracelular es un módulo de interacción proteína-proteína cuya



función es principalmente la transducción de señales.<sup>31,32</sup> A la fecha se han identificado 11 miembros de la familia de los TLRs en el humano, cada uno con ligandos específicos.<sup>31,32</sup> Los TLRs, después de reconocer a los PAMPs, pueden iniciar cascadas de señalización que inducen señales inflamatorias a través de la activación de NF- $\kappa$ B, AP-1, la cinasa N terminal de Jun (JNK), p38 y/o el factor 3 regulador del interferon (IRF 7) e IRF-3.<sup>32</sup> Como se observa en la figura 3 la vía de señalización de los TLRs es similar a la vía de señalización de IL-1R. Ambas vías comparten moléculas tales como la cinasa asociada al receptor de IL-1 (IRAK), el factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF6) y el factor de diferenciación mieloide (MyD88).



**Fig 3. Familia de receptores tipo Toll.** Se ilustra los once miembros de los TLRs humanos con su región transmembranal, la región carboxilo terminal y su región amino terminal y el receptor de IL-1 (IL-1R), así como las diversas vías de señalización que activan. Tomado de: *Mediators.Inflamm.* 2010. Modificado por: M en C. Leticia Alejandra Trejo de la O



MyD88 se une a la región citoplasmática de los TLRs mediante su dominio TIR y posteriormente a IRAK-4 e IRAK-1 gracias a su dominio de muerte. La unión de MyD88 con IRAK-4 e IRAK-1 induce la fosforilación de estas cinasas, lo que les permite activar a TRAF6. El complejo IRAK/TRAF6 se asocia a la cinasa activada por TGF- $\beta$  (TAK1), la proteína 1 asociada a TAK (TAB1) y TAB2. La interacción de ambos complejos induce la fosforilación de las I $\kappa$ B cinasas (IKK). En células en reposo NF- $\kappa$ B está unido a I $\kappa$ B que le mantiene secuestrado en el citoplasma, para activar a NF- $\kappa$ B se requiere la fosforilación del I $\kappa$ B por las IKK. El I $\kappa$ B fosforilado es degradado en el proteasoma y libera a NF- $\kappa$ B permitiendo su traslocación al núcleo. TAK1 además de activar a NF- $\kappa$ B permite la activación de JNK y de ERK, estos factores de transcripción inducen la transcripción de genes de la respuesta inmune.<sup>31</sup>

Experimentos en ratones knock out de MyD88 demostraron que la existencia de una vía independiente que activa NF- $\kappa$ B, ERK y a IRF-3. La vía independiente a MyD88 induce la activación de la proteína adaptadora asociada al dominio TIR inductora de interferon (TRIF), esta proteína se une al factor 3 asociado al receptor de TNF (TRAF3), a TRAF6 y a la proteína 1 de interacción con el receptor (RIP1). El complejo TRAF6/RIP activa a NF- $\kappa$ B, mientras que TRAF3 activa la cinasa de unión a TANK1 (TBK1) y la cinasa I $\kappa$ B inducible (IKKi) ambas cinasas están involucradas en la activación de IRF-3 e IRF7.

Excepto por TLR3, todos los TLRs inducen la activación de NF- $\kappa$ B por la vía de MyD88. Sin embargo, existen diferencias importantes entre cada receptor, la unión de MyD88 a TLR2 y TLR4 requiere de la participación de la proteína adaptadora que contiene el dominio TIR (TIRAP). TLR3 señala exclusivamente mediante TRIF, mientras que TLR4 puede utilizar tanto la vía dependiente, como la independiente de MyD88.

### *POLIMORFISMO DE RECEPTORES TIPO TOLL*

Los genes que codifican a los TLRs son genes polimórficos, el polimorfismo genético se caracteriza porque diferentes individuos presentan distintos nucleótidos o variantes en una posición concreta del genoma, sin embargo, a diferencia de las mutaciones, este cambio se

presenta en al menos 1% de la población. Cuando hablamos de polimorfismos de una sola base (SNPs), este cambio involucra solamente un nucleótido. Diversos estudios demuestran que la presencia de SNPs en los TLRs modifica la respuesta inmune inducida por la activación de estos receptores.<sup>33-37</sup>

Se han reportado 2 SNPs en la región del gen que codifica para el dominio extracelular de TLR4: La substitución de una glicina por un aspartato aa 299 (D299G) y la sustitución de una isoleucina por una treonina en el aa 399 (T399I). Ambas sustituciones se han relacionado con un aumento en el riesgo a desarrollar choque séptico por microorganismos gramnegativos.<sup>38,39</sup> Las mujeres que presentan el alelo 299G tienen un mayor riesgo al parto pretermino, posiblemente debido al incremento en la susceptibilidad a infecciones vaginales que puedan poner en riesgo el término del embarazo.<sup>40</sup> Personas con el genotipo D299G tienen una menor concentración en plasma de moléculas proinflamatorias como IL-6, fibrinógeno y VCAM-1.<sup>41-43</sup> lo que disminuye el riesgo a desarrollar aterosclerosis carótida.<sup>41,43</sup>

TLR5 puede presentar una substitución de una citosina por una timina en la posición 1174 de la secuencia nucleotídica, dando como resultado la inserción de un codón de terminación en el aminoácido 392 de la región extracelular, normalmente conformada por 642 aa. El SNP R392\* provoca la pérdida de la región transmembranal y citoplasmática de la proteína.<sup>36,44</sup> Células CHO y HEK293 transfectadas con esta substitución polimórfica son incapaces de activar NF- $\kappa$ B a pesar de que aumenta la expresión de TLR5 en membrana celular.<sup>37</sup> Se ha reportado además la substitución de una adenina por una guanina a las 2848 pb, que resulta en el cambio de una aspargina por una serina en el aminoácido 592.<sup>36</sup> Estos polimorfismos en TLR5 se han asociado con una mayor susceptibilidad a la enfermedad de los Legionarios.<sup>36</sup>

TLR9 se encuentra codificado en el cromosoma 3p21.3. Se ha descrito que en la región rio arriba del gen de TLR9 se puede presentar el cambio de una citosina por una timina en la posición 1237 pb, así como la substitución de una guanina por una adenina en la posición 2848 pb de la secuencia nucleotídica.<sup>45</sup> La presencia estos SNP de TLR9 se asocia con un

aumento en el riesgo a desarrollar asma en población euroamericana y la enfermedad de Chron en población europea.

### *Helicobacter pylori* Y LOS RECEPTORES TIPO TOLL

A pesar de que aún quedan algunas controversias, varios estudios resaltan la importancia de los TLRs en el reconocimiento inicial de *H. pylori* y sus estructuras, lo que inicia diferentes tipos de respuestas celulares.

Kawahara y col. demostraron que el el reconocimiento de el lipopolisacarido (LPS) de *H. pylori* activa el gen de la mitógeno oxidasa-1 en células del epitelio gástrico de cobayos.<sup>46</sup> Además, el LPS de *H. pylori* al ser reconocido por TLR4 induce la apoptosis de células epiteliales gástricas. Diversos estudios demuestran la importancia del LPS de *H. pylori* en el desarrollo de gastritis, involucrando la activación de NF-κB. El LPS de *H. pylori* tiene además la capacidad de inducir la proliferación de líneas celulares de cáncer gástrico, de manera dependiente de TLR4 e incluso inhibir la respuesta antitumoral.<sup>47</sup> Ogawa y col. demostraron que el lípido A de *H. pylori* presenta actividad inmunológica aunque de menor intensidad que la inducida por el LPS de *E. coli*<sup>48</sup> y Uno y col. reportaron que la activación de TLR4 por el LPS de *H. pylori* induce la sobreexpresión de TLR2, lo que conlleva al aumento de la síntesis de radicales libres del nitrógeno vía la oxido nítrico sintasa inducible (iNOS).<sup>49</sup> El LPS parece no ser el único ligando de TLR4 presente en *H. pylori*, la proteína HP0175, que se presenta casi exclusivamente en cepas asociadas al desarrollo de úlcera duodenal, induce apoptosis de células epiteliales al unirse a TLR4,<sup>50</sup> estimulando la síntesis del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) vía la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) e induciendo la síntesis de IL-6 mediante la señalización de NF-κB y MAPK. Células epiteliales gástricas tanto de cultivo primario como de diferentes líneas celulares expresan TLR4.<sup>51,52</sup> Schmausser y col. reportaron la expresión de este receptor en biopsias de epitelio gástrico de pacientes infectados por *H. pylori*.<sup>52,53</sup> *H. pylori* induce la activación y sobreexpresión de este receptor. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede en células mieloides, la evidencia previa sugiere que la activación de TLR4 por *H. pylori* no induce la síntesis de IL-8, los estudios existentes hasta el momento indican que el reconocimiento de *H. pylori* vía TLR4 induce una respuesta diferencial entre las

células epiteliales y las monocíticas, probablemente debido a que las primeras carecen de moléculas como son CD14 y MD2, que son necesarias para la activación del TLR4. Su B. sugirió que en células epiteliales el TLR4 podría funcionar como receptor de unión para *H. pylori*.<sup>54</sup>

En lo que respecta a TLR5 se han reportado que tanto FlaA como FlaB son reconocidas por este receptor, aunque su capacidad de activar TLR5 se encuentra marcadamente reducida en comparación con las flagelinas de otras bacterias gramnegativas como de *Salmonella typhimurium*.<sup>55-57</sup> Torok y col. describieron que *H. pylori* induce la síntesis de IL-8 tanto de manera dependiente como independiente de TLR5.<sup>57</sup>

Hasta la fecha existen pocas evidencias de la participación del TLR9 en el reconocimiento de *H. pylori*, de acuerdo a lo esperado, los datos recolectados hasta el momento parecen indicar el DNA de *H. pylori* es reconocido por TLR9.<sup>58</sup> El reconocimiento de *H. pylori* por este receptor activa a las MAPK e induce la sobreexpresión de la ciclooxygenasa 2.

Varios trabajos han tratado de integrar la participación de todos los TLRs en el reconocimiento de *H. pylori* y la inflamación subsecuente a la infección. Hoffman y col. realizaron un estudio de microarreglos del cDNA de biopsias de pacientes infectados con *H. pylori* en el que se observó la sobreexpresión de TLR1, TLR4, TLR5 y TLR6, indicando que estos receptores deben participar de manera importante en la respuesta inmune contra este microorganismo.<sup>59</sup> La infección de *H. pylori* induce la sobreexpresión del mRNA tanto de TLR2 como TLR4 en biopsias gástricas.<sup>59</sup> Los estudios realizados por Schmausser y col. apoyan estas hipótesis al demostrar que la proteína de TLR4, TLR5 y TLR9 se expresan en el epitelio gástrico de manera polarizada, y que la distribución de estos receptores cambia en pacientes infectados por *H. pylori* e incluso se vuelve difusa en el epitelio de lesiones precancerosas y en células cancerígenas.<sup>(52,53)</sup> Recientemente, Rad y col. describieron que el reconocimiento de *H. pylori* por las células dendríticas involucra tanto a TLR4 como a TLR2 en la membrana plasmática con la colaboración del TLR9 como receptor intracelular<sup>58</sup> e influye en la maduración de estas células afectando la respuesta inmune adaptativa hacia *H. pylori*.<sup>60</sup>

La figura 4 resume los diferentes TLRs que participan en el reconocimiento a *H. pylori* y los ligandos descritos hasta el momento.

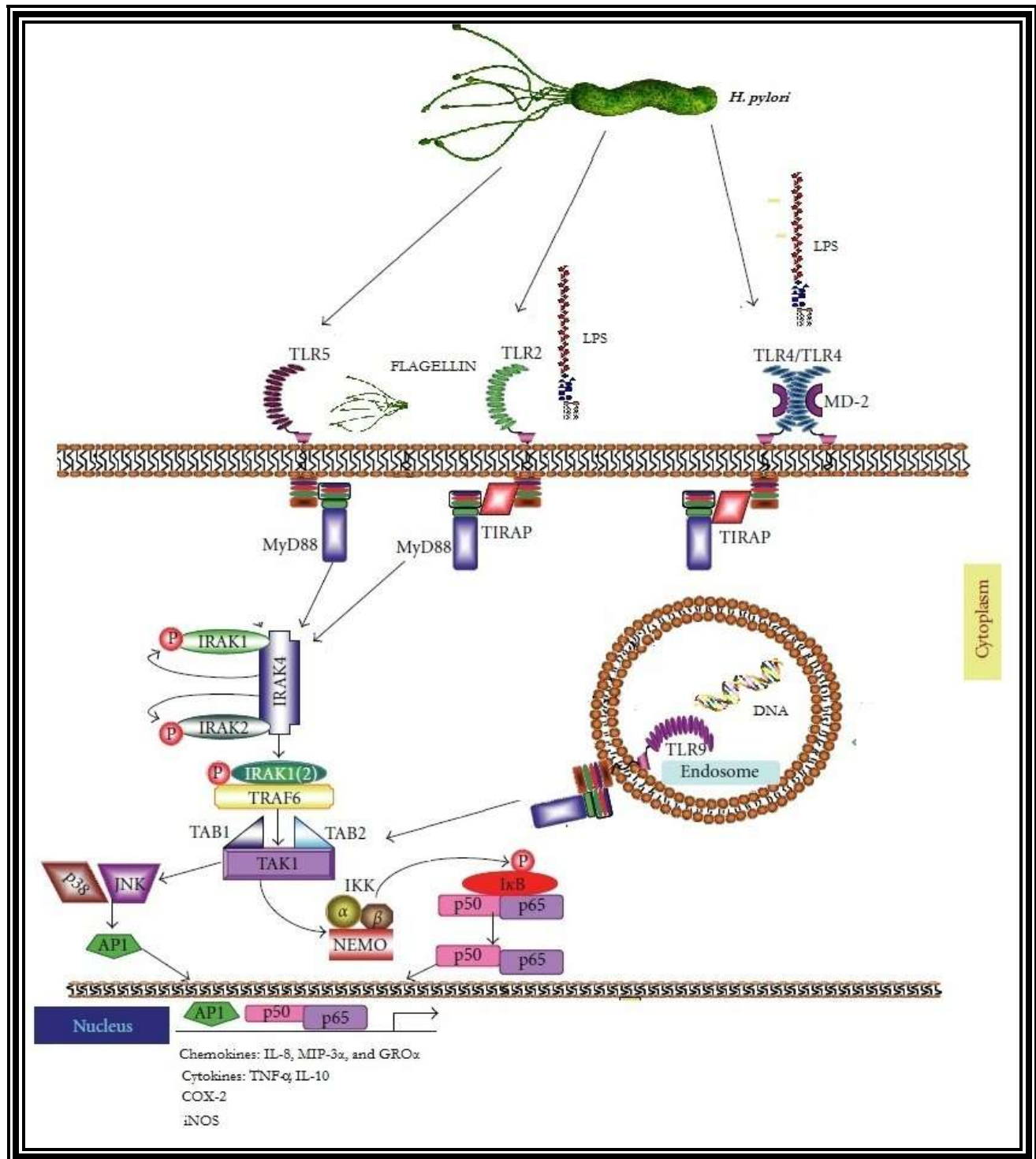


Fig 4. TLRs que participan en el reconocimiento de *H.pylori*. Se ha confirmado el reconocimiento de *H. pylori*, así como, de sus componentes por TLR2, TLR4, TLR5 y TLR9. Tomado de: Mediators.Inflamm. 2010. Modificado por: M en C. Leticia Alejandra Trejo de la O

## *Helicobacter pylori* Y EL POLIMORFISMO DE LOS RECEPTORES TIPO TOLL

Debido a la relevancia de los TLRs como parte del reconocimiento inicial *hacia H. pylori*, sumado a los antecedentes que existen sobre el efecto que tienen los SNPs en estos receptores, diversos estudios se han enfocado en determinar la asociación entre los polimorfismos de *TLR4* y el desarrollo de las enfermedades presentes en la infección por *H. pylori*.

Sin embargo, como se puede observar en la tabla 1, estos estudios son escasos y hasta el momento los resultados son controversiales, además muy pocos de ellos investigan el efecto biológico del polimorfismo, la mayoría se limita a determinar posibles asociaciones con enfermedades gastroduodenales.

**Tabla 1.** Polimorfismos de TLRs asociados a la infección con *H. pylori*

Gen	SNP	Patología	Asociación	Población	Referencia
TLR4	D299G	MALT	OR=0.37	Alemana	Hellming 2005
	D299G	Lesiones precancerosas	No	Venezolana	Kato 2006
	D299G T399I	Cancer	No	Japonesa	Tahara 2006
	D299G T3299I	Cáncer gástrico	No	Mexicana	Garza-González 2007
	D299G	Cáncer gástrico	OR=1.4	Caucásica	Hold et al 2007
	D299G T3299I	Úlcera duodenal Gastritis	No	Húngara	Hofner 2007
TLR9	-1237T/C	Cáncer gástrico	No	Polaca Estadounidense	Hold 2009
	-1237T/C	Atrofia gástrica	OR=3.9	Escocesa	Ng 2009
TLR2	R753Q R677W	Úlcera duodenal	No	Brasileña	Moura 2008
TLR4	D299G				
TLR5	392 <sup>stop</sup>				

Hellming y col demostraron que en población caucásica el polimorfismo D299G del gen *TLR4* podía proteger del desarrollo del linfoma gástrico de tejido linfoide asociado a mucosa

(MALT) en pacientes infectados por *H. pylori*.<sup>(61)</sup> Sin embargo, Türe-Ozdemir y colaboradores no pudieron demostrar este mismo efecto en población turca.<sup>(62)</sup>

Una de las patologías más severas asociadas a la infección por *H. pylori* es el cáncer gástrico, diversos estudios se han enfocado en investigar si el riesgo a desarrollar esta enfermedad aumenta en personas que presentan SNPs en el gen TLR4. Garza-Gonzalez y col. reportaron que el alelo 299D de TLR4 se presenta en una frecuencia de 4.2% en población mestiza mexicana, pero la presencia del este alelo no demostró tener relación alguna con el desarrollo de cáncer gástrico.<sup>(63)</sup> Además, la frecuencia de este alelo es nula en población oriental.<sup>64,65</sup> Sin embargo, Hold y col. reportaron que la presencia del alelo 299G de *TLR4* era un factor de riesgo a desarrollar cáncer gástrico en población caucásica.<sup>66</sup> y hasta once veces más el riesgo a desarrollar gastritis atrófica.<sup>66</sup> En el caso de la población hindú el genotipo heterocigoto del SNP T399I en TLR4 se asocia con un aumento en el infiltrado celular de la mucosa gástrica, que lleva al desarrollo de atrofia y metaplasia intestinal.<sup>67</sup> Sin embargo, parece no existir relación alguna entre la presencia de estos polimorfismos y el desarrollo de metaplasia intestinal en población hispana.<sup>68</sup>

En el espectro contrario de las patologías asociadas a la infección por *H. pylori*, tenemos a la úlcera duodenal. Los datos obtenidos hasta el momento parecen demostrar que la presencia de variaciones genéticas en los TLRs, no influyen en el desarrollo de la patología en población caucásica<sup>69</sup> o mestiza, independientemente de la edad.<sup>70</sup>

Recientemente, se ha investigado el papel del polimorfismo genético en otros TLRs en la infección por *H. pylori*. Sin embargo, los primeros estudios parecen indicar que no existe relación entre los polimorfismos de los genes TLR2, TLR5 y TLR9 con el desarrollo de úlcera o cáncer,<sup>70,71</sup> a pesar de que la presencia del alelo -1237C del gen TLR9 está asociado con un incremento en el riesgo a desarrollar hipoclorhidria y gastritis atrófica ya que este alelo presenta una mayor actividad transcripcional, consecuencia de una mayor activación de NF- $\kappa$ B<sup>72</sup>

Consideramos que una respuesta inmune innata eficiente podría evitar el establecimiento de la infección por *H. pylori* y resolver o al menos controlar el proceso infeccioso tempranamente, además de dirigir la respuesta inmune adaptativa a fin de coadyuvar en la resolución de la infección o detener el progreso de la enfermedad. Sabemos que la intensidad de la respuesta inmune puede ser un factor determinante para que la infección se resuelva o se controle. Sin embargo, también puede ser perjudicial debido al daño que causa en la mucosa gástrica. La respuesta inmune puede modificarse en gran medida por la variación genética de los TLRs. Hasta la fecha no es clara la importancia del polimorfismo de los TLRs en la infección con *H. pylori* y su asociación con respecto a la infección y gravedad de la enfermedad. Además, no se ha estudiado como la presencia de estos polimorfismos afecta a la respuesta inflamatoria inducida por *H. pylori*.



## **JUSTIFICACIÓN**

La inflamación juega un papel importante en la fisiopatología de las enfermedades asociadas a la infección por *H. pylori*. Debido a la función de los TLRs, SNPs en estos receptores podrían modificar el reconocimiento de *H. pylori* y la respuesta inflamatoria asociada a la infección. Sin embargo, a la fecha se desconoce si esto sucede, por lo que es necesario estudiar el efecto del polimorfismo de estos receptores en la respuesta inflamatoria inducida por *H. pylori* y su asociación con las patologías derivadas de esta infección

Comprender el efecto de los SNPs en TLRs sobre la respuesta inflamatoria producida por *H. pylori* contribuirá a la comprensión del proceso histopatológico de la infección. Además, investigar si existe alguna asociación entre estos SNPs y los datos clínicos de las patologías gastroduodenales podría permitir la identificación de genes candidato.

## **HIPÓTESIS**

El polimorfismo de los TLRs modifica la respuesta inflamatoria inducida por *H. pylori*, provocando un aumento en el riesgo a desarrollar las diferentes patologías asociadas a la infección.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la frecuencia del polimorfismo de los genes *TLR4*, *TLR5* y *TLR9* en la población mexicana infectada por *H. pylori* e investigar su asociación con las enfermedades provocadas por la infección y la respuesta inflamatoria en la mucosa gástrica de los pacientes infectados.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar el genotipo de las regiones polimórficas de *TLR4*, *TLR5* y *TLR9* en pacientes infectados por *H. pylori*.
- Investigar si existe asociación entre los polimorfismos estudiados y las diferentes patologías relacionadas a la infección por *H. pylori*.
- Evaluar el efecto del polimorfismo de los TLRs en el perfil de citocinas y quimiocinas para establecer su efecto en la inflamación gástrica asociada a la infección por *H. pylori*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **DISEÑO DEL ESTUDIO**

El estudio fue de casos y controles, doble ciego, transversal y comparativo.

### **TIPO Y TAMAÑO DE MUESTRA**

Se incluyeron en el estudio 450 pacientes infectados o no con *H. pylori* protocolizados para endoscopia. De cada paciente se tomaron 5 ml de sangre con heparina como anticoagulante y se obtuvo el paquete celular para aislar el DNA y el plasma, el cual se utilizó para diagnóstico de la infección. Se obtuvieron además 2 biopsias de antro y cuerpo para el diagnóstico histopatológico y una biopsia de antro para el aislamiento de RNA.

### **POBLACIÓN DEL ESTUDIO**

Las muestras de este trabajo fueron obtenidas en un estudio previo aprobado por el comité de ética del Hospital de Pediatría del CMNSXXI, el estudio se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (U.I.M.E.I.P.). Los sujetos de estudio fueron seleccionados de pacientes con síntomas gastrointestinales programados para endoscopia y biopsia gástrica, todos los pacientes incluidos en el estudio firmaron el consentimiento informado específico para este protocolo.

El número de hombres y mujeres incluidos en el estudio fue definido considerando la frecuencia aproximada por sexo de las patologías asociadas a la infección por *H. pylori*. El diagnóstico de infección se determinó mediante una prueba serológica previamente validada en población mexicana.<sup>73</sup>

En la tabla 2 se muestran los criterios de inclusión y no inclusión de los pacientes seleccionados para el estudio.

**Tabla 2.** Criterios de inclusión y no inclusión de los pacientes estudiados.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN	CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN
Edad $\geq$ 18 años	Edad $<$ 18 años
Mexicano con ascendencia de al menos dos generaciones	Mexicano con ascendencia de una generación
Hombre o mujer	Extranjero
Pacientes con síntomas gastroduodenales programados para endoscopia y biopsia gástrica	Pacientes que hayan tomado antibióticos, antiinflamatorios no esteroideos, compuestos de bismuto e inhibidores de la bomba de protones.

### *EXTRACCIÓN DEL DNA*

Se extrajo DNA genómico de células mononucleares de sangre periférica mediante la microtécnica de “*salting-out*” utilizando 5 ml de sangre. La muestra sanguínea se centrifugó a 170 g durante 7 min para recolectar el anillo leucocitario y trasvasarlo en tubos estériles de 2 ml. Se hicieron tres lavados con 800  $\mu$ l de la solución de lisis 1 y después de cada lavado se centrifugó a 170 g durante 1 min. Una vez realizados los lavados se adicionó a cada tubo 400  $\mu$ l de la solución de lisis 2, 10  $\mu$ l de SDS al 20% y 110  $\mu$ l de perclorato de sodio 5M. Los tubos se colocaron en una placa de agitación durante diez minutos y se adicionó a cada uno 200  $\mu$ l de NaCl 6M, se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 7,380 g durante 5 minutos. Se recolectó el sobrenadante de cada tubo y se le adicionó un volumen igual de isopropanol concentrado a 4°C. Los tubos se incubaron por 3 horas a -20°C y posteriormente se centrifugaron a 7,380 g durante 5 min para descartar el sobrenadante. Se adicionó al tubo 1 ml de alcohol al 70% y se mezcló vigorosamente. Los tubos se centrifugaron a 7380 g durante 2 minutos, se decantaron y se colocaron en un desecador por 20 minutos. Por último a cada tubo se adicionaron de 100  $\mu$ l a 200  $\mu$ l de agua estéril y se mantuvieron en agitación durante 24 horas.

La concentración y calidad del DNA obtenido se evaluó mediante cuantificación espectrofotométrica y corrimiento en gel de agarosa al 0.7%. Las muestras de DNA genómico se diluyeron a una concentración de 50 ng/μl para su uso.

### DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DE LOS GENES DE TLRs

El genotipo de los pacientes se determinó mediante discriminación alélica, una aplicación de la PCR cuantitativa. Se utilizaron sondas TaqMan® específicas para cada genotipo buscado marcadas con los fluorocromos VIC y FAM. La reacción de PCR se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante (Applied Biosystems®, Foster City, Estados Unidos) utilizando 20 ng de DNA en un volumen total de reacción de 10 μl y se corrió a 95°C durante 10 minutos seguido por 40 ciclos a 95°C 15 s, 60°C 1 min en el termociclador ABI7000 (Applied Biosystems®, Foster City, Estados Unidos). La fluorescencia se leyó en el detector de secuencias ABI7000 (Applied Biosystems®, Foster City, Estados Unidos). Los iniciadores y las sondas se diseñaron utilizando el software *Primer Express*® (Applied Biosystems®, Foster City, Estados Unidos) y se enlistan en las tablas 3 y 4.

**Tabla 3.** Lista de iniciadores utilizados para la determinación del genotipo de TLRs

Gen	Polimorfismo	Iniciadores
TLR4	D299G	F 5'- CAAAGGTTGCTGTTCTCAAAGTGAT-3'
		R 5'-GGTAATAACACCATTGAAGCTCAGATCTA-3'
	T399I	F 5'-CCATTCCCCAGCGCTTCT-3'
		R 5'-CCAGGTAGGTCTTGGTGTTTCATT-3'
TLR5	N592S	F 5'-TGTGATGCACTTGGATAGTCTCTGTT -3'
		R 5'- GGTCCTTGCGACTGCTGTGAATT-3'
	R392*	F 5'-GACTGCTCTGCTGCGCGCAGGGC -3'
		R 5'-CCCCGACTTCCGCAAGGCCTTCC -3'
TLR9	T-1237C	F 5'- GTCATGGTCTGGAGTCTCGGAGTCC-3'
		R 5'- GGCGATGGCCACGATGACCAGCAGG -3'
	G2848A	F 5'- -AAGTACTTAACAATGGATATTTGAT'
		R 5'- GTGGTCCTTTAGGTCTGTACCAGGG3-3'

**Tabla 4.** Sondas TaqMan utilizadas para la determinación del genotipo de TLRs

GEN	POLIMORFISMO	BASE	SONDA	FLOUROCROMO
TLR4	D299G	A	5'-CTTTAGGCTGGTTGTCC-3'	VIC
		T	5'-TTTAGGCTGATTGTCC-3'	FAM
	T399I	G	5'-AAGCTGCAGAAGAT-3'	FAM
		A	5'-AAGCTGCGGAAGAT-3	VIC
TLR5	R392*	C	5'-CCTCTACCCTTTAG -3'	FAM
		T	5'-CCAGAACTGCTTTGAATA-3'	VIC
	N592S	A	5'-CCAATTGCTGGGGCG -3'	FAM
		G	5'-GATGAAGTCACGACACG-3'	VIC
TLR9	-C1237T	C	5'-CGACTGCTCGGTCAG-3'	FAM
		T	5'-ACGGTGTACGAGCCACG-3	VIC
	G2848A	G	5'-AGGTGTCTGTGCGCG-3	FAM
		G	5'-GTGAGAGGACAAAGCTGGGAG-3	VIC

#### *DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN mRNA DE CITOCINAS Y QUIMIOCINAS*

Para establecer los niveles de expresión de las citocinas y quimiocinas estudiadas se extrajo el RNA total de las biopsias obtenidas de cada paciente empleando columnas RNAqueus-micro® (Ambion. Estados Unidos) y se siguieron las especificaciones del fabricante. Todo el RNA obtenido de las muestras se convirtió en cDNA mediante la enzima Super Script II® (Invitrogen, Estados Unidos) añadiendo 1 µg de RNA por cada 20 µl de reacción.

Se diseñaron iniciadores específicos, enlistados en la tabla 5, con la ayuda del Universal ProbeLibrary Assay Design Center (Roche®, Indianapolis, Estados Unidos) y se ocuparon sondas Universal Probe Library (UPL)® marcadas con el fluorocromo FAM para cuantificar los niveles de expresión de IL-1B, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, GRO-α, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, MCP-1, MIP-1B y TNF-α, los cuales se normalizaron utilizando como gen endógeno β-actina. La reacción de PCR se realizó siguiendo las especificaciones del fabricante (Roche®, Indianapolis, Estados Unidos) adicionando 1 µg de cDNA en un volumen total de reacción de

10 µl y se corrió a 95°C durante 10 minutos seguido por 40 ciclos a 95°C 15 s, 60°C 1min en el termociclador LightCycler®2.0 ó el LightCycler® 480 (Roche®, Indianapolis, Estados Unidos).

**Tabla 5.** Lista de iniciadores utilizados para determinar la expresión de citocinas

Gen	Iniciador
IFN-γ	F-GGCATTTTGAAGAATTGGAAAG
	R-TTTGGATGCTCTGGTCATCTT
IL-1β	F-TACCTGTCCTGCGTGTTGAA
	R-TCTTTGGGTAATTTTGGGATCT
IL-4	F-GAAACGGCTCGACAGGAAC
	R-CTCTGGTTGGCTTCCTTCAC
IL-6	F-GATGAGTACAAAAGTCCTGATCCA
	R-CTGCAGCCACTGGTTCTGT
IL-10	F-CTGGGGGAGAACCTGAAGA
	R-GGGAAGAAATCGATGACAGC
IL-12	F-CACTCCCAAAACCTGCTGAG
	R-TCTCTTCAGAAGTGCAAGGGTA
IL-17	F-TGGGAAGACCTCATTGGTGT
	R-GGATTTCTGTTGGGATTGTGAT
TNF-α	F-CAGCCTCTTCTCCTTCTGAT
	R-GCCAGAGGGCTGATTAGAGA
GRO-α	F-TCCTGCATCCCCATAGTTA
	R-CTTCAGGAACAGCCACCAGT
IL-8	F-AGACAGCAGAGCACACAAGC
	R-ATGGTTCCTTCCGGTGGT
MCP-1	F-AGTCTCTGCCGCCCTTCT
	R-GTGACTGGGGCATTGATTG
MIP-1α	F-TGCAACCAGTTCTCTGCATC
	R-AATCTGCCGGGAGGTGTA
RANTES	F-ACACCAGTGGCAAGTGCTC
	R-ACACACTTGGCGGTTCTTTC

## *ANÁLISIS ESTADÍSTICO*

Las frecuencias alélicas de los SNPs en los TLRs fueron comparadas entre sí mediante la prueba P de Fisher, utilizando tablas de contingencia de 2 x 2. Se estimó el grado de asociación de los distintos SNPs comparando proporciones de los alelos en los pacientes con las diferentes patologías estudiadas, el vigor de asociación se determinó calculando la Razón de Momios (RM) y su correspondiente intervalo de confianza al 95 %. La comparación entre los niveles de expresión de las citocinas y quimiocinas se realizó utilizando la prueba de U de Mann-Whitney. Todos estos análisis se llevaron a cabo con el programa STATA (SE/8, Stata Corp, TX). Se consideraron significativos los valores de  $p < 0.05$ .



## RESULTADOS

### CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

Como se muestra en la tabla 6, la población del estudio se clasificó en cuatro grupos, de acuerdo al criterio histopatológico: pacientes con gastritis superficial, metaplasia intestinal, cáncer gástrico o úlcera duodenal. Se consideró como grupo control los pacientes diagnosticados con gastritis superficial, debido a que presentan un fenómeno inflamatorio crónico sin desarrollar ninguna sintomatología asociada a la infección.

**Tabla 6.** Características y diagnóstico clínico de los pacientes incluidos en el estudio

Diagnóstico	N	Edad (Promedio $\pm$ SD)	Hombre/Mujer	<i>H. pylori</i> + No. (%)
Gastritis	223	47.8 $\pm$ 12.2	72/151	190 (85.20)
Metaplasia	96	57.9 $\pm$ 13.2	33/63	86 (89.58)
Cáncer	73	60.9 $\pm$ 13.9	44/29	67 (87.67)
Úlcera duodenal	58	51.8 $\pm$ 12.4	31/27	54 (93.10)

### DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DE TLR4, TLR5 Y TLR9

Se realizó una investigación bibliográfica de las regiones polimórficas descritas en los genes *TLR4*, *TLR5* y *TLR9*. Se eligieron para el estudio SNPs con antecedentes previos de asociación con alguna enfermedad de tipo infeccioso o inflamatorio<sup>35-39,45,74</sup> y se determinó el genotipo de estas regiones en población mexicana.

Se analizaron un total de 450 pacientes cuyas características se enlistan en la Tabla 6, de los cuales se excluyeron 42 pacientes cuyo historial médico no estuvo completo, presentaron un diagnóstico histopatológico diferente al previamente mencionado, o cuya muestra biológica no cumplió con los requisitos mínimos de concentración y calidad requeridos para el análisis.

## Genotipo de TLR4

Para el gen *TLR4* se determinaron las regiones polimórficas que codifican para los aminoácidos (a.a) 299 y 399. Ambos SNPs se encontraron en equilibrio Hardy-Weingber. Se encontró una frecuencia del 6.5% del alelo 299G en la población estudiada, el 88.2% presentó infección por *H. pylori* y la distribución del alelo polimórfico entre los individuos infectados fue de 4.6%.

Como se observa en la tabla 7 la frecuencia del alelo 299D fue del 4.2% en los pacientes con gastritis superficial y en el grupo de metaplasia fue de 4.5%, notablemente, en los pacientes con diagnóstico de cáncer y úlcera duodenal la frecuencia de este SNP aumentó (0.5% y 14.7% respectivamente). Sin embargo, solamente en el grupo de úlcera duodenal este incremento fue estadísticamente significativo ( $p=0.04$ ). Para determinar si la presencia de este alelo aumenta el riesgo a desarrollar las diferentes patologías estudiadas se calculó la razón de momios, aunque los valores obtenidos sugieren que el riesgo de presentar cáncer y úlcera aumenta en los pacientes que presentan el alelo 299G, las diferencias no fueron estadísticamente significativas como se describe en la tabla 7.

Para el alelo 399I se encontró una frecuencia del 5.6% en la población de estudio, mientras que su distribución entre los pacientes infectados y pacientes no infectados fue de 6.1% y 5.8%, respectivamente. Al observar la frecuencia del alelo 399I en los diferentes grupos de estudio, podemos advertir que en los pacientes que presentan gastritis superficial este alelo se presenta con una frecuencia del 4.5%, 5.5% en el grupo de metaplasia e incrementa levemente en el grupo de pacientes diagnosticados con cáncer (6.6%). La frecuencia de este SNP es mayor en pacientes con úlcera duodenal (9.9%), aunque en ningún caso la diferencia fue estadísticamente significativa, como se describe en la tabla 8. Al establecer la razón de momios para cada grupo, Tabla 8, podemos advertir que existe la posibilidad de que el riesgo de presentar úlcera duodenal aumente hasta 2.2 veces si se presenta el alelo 399I, aunque el valor de OR no alcanza significancia estadística, este comportamiento se observa también al incluir en el análisis solo los pacientes infectados por *H. pylori*.

**Tabla 7 Frecuencia del genotipo TLR4 D299G**

Grupo(N)	D/D	D/G	G/G	Frecuencia del Alelo 299G	p	OR (95% IC)
<b>Gastritis</b>						
Todos los casos (144)	138	6	0	4.2		
Infectados (110)	105	5	0	4.5		
<b>Metaplasia</b>						
Todos los casos (44)	42	2	0	4.5	0.37	1.8 (0.19-7.89)
Infectados (37)	35	2	0	5.4	1	1.2 (0.10-7.72)
<b>Cáncer</b>						
Todos los casos (38)	34	4	0	10.5	0.22	2.7 (0.36-10.7)
Infectados (20)	18	2	0	10.0	0.29	2.3 (0.20-15.5)
<b>Úlcera duodenal</b>						
Todos los casos (34)	29	4	1	14.7	<b>0.04*</b>	4.2 (0.77-16.8)
Infectados (30)	26	3	1	13.3	0.09	3.2 (0.59-16.0)

**Tabla 8 Frecuencia del genotipo TLR4 T399I**

Grupo (N)	T/T	T/I	I/I	Alelo 399I (%)	p	OR (95% IC)
<b>Gastritis</b>						
Todos los casos (202)	193	9	0	4.4		
Infectados (151)	145	6	0	4.0		
<b>Metaplasia</b>						
Todos los casos (90)	85	5	0	5.5	0.76	1.30 (0.29-4.30)
Infectados (74)	69	5	0	6.8	0.51	1.75 (0.4-7.13)
<b>Cáncer</b>						
Todos los casos (61)	57	4	0	6.5	0.50	1.40 (0.36-5.38)
Infectados (36)	34	2	0	5.6	0.65	1.40(0.13-8.38)
<b>Úlcera duodenal</b>						
Todos los casos (55)	50	4	1	9.1	0.18	2.20 (0.47-7.51)
Infectados (49)	44	4	1	10.2	0.14	2.70(0.62-11.3)

## Genotipo de TLR5

Se realizó una investigación bibliográfica previa, enfocada a encontrar SNPs en el gen TLR5 previamente descritos, que además modificaran la respuesta inmune hacia bacterias flageladas y se asociaran con enfermedades infecciosas o inflamatorias. Se eligieron dos polimorfismos, la inserción temprana de un codón de terminación (a.a 392) en donde debería encontrarse una arginina y en la segunda región se observa la sustitución de una serina por una alanina en el aminoácido 592.

Al determinar el genotipo de la región polimórfica Arg392\* se encontró que la frecuencia del alelo 392\* fue del 5.8%. Después de clasificar a los pacientes de acuerdo al estado de infección, la distribución del alelo polimórfico entre los individuos infectados fue de 5.4% mientras que en pacientes no infectados fue de 5.6%.

Como se describe en la tabla 9, el alelo 392\* tiene una frecuencia del 7.5% en los pacientes con gastritis superficial y el grupo de metaplasia la frecuencia fue de 5.4%. Además, en los pacientes diagnosticados con cáncer, esta frecuencia aumentó hasta un 10.3%. Sorpresivamente, en pacientes que presentan úlcera duodenal la frecuencia de este alelo disminuyó a un 2.6%. Sin embargo, en ningún caso se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas.

Al determinar la razón de momios para cada grupo los valores obtenidos parecen indicar que la presencia del alelo 392\* tiende a proteger contra el desarrollo de úlcera duodenal (OR= 0.3), no obstante, podría ser un factor de riesgo a desarrollar cáncer gástrico, aunque no se obtuvo significancia estadística en ningún caso, como se indica en la tabla 9.

La tabla 10 muestra la frecuencia del alelo 592S en nuestra población de estudio, la cual fue de solamente 1.2% encontrándose esta variante en un paciente diagnosticado con metaplasia (1.6%) y dos pacientes con úlcera duodenal (4.3%). Esto difiere de la frecuencia descrita en otras poblaciones

**Tabla 9** Frecuencia del genotipo TLR5 R392\*

Grupo (N)	R/R	R/*	*/*	Alelo 392* (%)	p	OR (95% IC)
<b>Gastritis</b>						
Todos los casos (141)	133	7	1	5.7		
Infectados (106)	98	7	1	7.5		
<b>Metaplasia</b>						
Todos los casos (66)	62	4		6.1	0.56	1.07(0.22-4.1)
Infectados (55)	52	3	0	5.4	0.44	0.70(0.11-3.18)
<b>Cáncer</b>						
Todos los casos (43)	40	3	0	7.0	0.49	1.24(0.20-5.51)
Infectados (29)	26	3	0	10.3	0.29	1.40 (0.22-6.42)
<b>Úlcera duodenal</b>						
Todos los casos (43)	42	1	0	2.3	0.30	0.36 (0.0-2.8)
Infectados (39)	38	1	0	2.6	0.24	0.30 (0.0-2.5)

**Tabla 10** Frecuencia del genotipo TLR5 N592S

Grupo (N)	N/N	N/S	S/S	Alelo 592S (%)	p
<b>Gastritis</b>					
Todos los casos (163)	163	0	0	0	
Infectados (120)	120	0	0	0	
<b>Metaplasia</b>					
Todos los casos (74)	73	1	0	1.35	0.31
Infectados (61)	60	1	0	1.64	0.83
<b>Cáncer</b>					
Todos los casos (41)	41	0	0	0	
Infectados (28)	28	0	0	0	
<b>Úlcera duodenal</b>					
Todos los casos (45)	44	1	0	2.22	0.21
Infectados (41)	39	1	0	4.87	0.25

## Genotipo de TLR9

Para el gen TLR9 se determinaron dos regiones polimórficas, T-1237C y G2848A, localizadas en regiones no codificantes del gen. Ambos SNPs se han asociado previamente con diferentes patologías inflamatorias.

El alelo -1237C presenta una frecuencia del 16.8% en nuestra población de estudio, la distribución de este alelo entre los individuos infectados fue de 17.5% y en los pacientes no infectados fue de 16.9%.

En el grupo de pacientes con gastritis superficial este alelo se presentó con una frecuencia de 13.7%. La frecuencia de este SNP aumento en el grupo de metaplasia y cáncer (19.3% y 28.6%, respectivamente). Sin embargo, la diferencia solo fue significativa en el grupo de cáncer,  $p=0.05$ , como puede observarse en la tabla 11.

El alelo 2848A se presentó con una alta frecuencia en nuestra población (50.2%), siendo mayor la proporción de la variante heterocigota (40.2%), que la homocigota (9.9%) del alelo.

La distribución del alelo 2848A entre los pacientes infectados fue de 53.21%. Este alelo tuvo una frecuencia de 53.21% en pacientes infectados con *H. pylori*, similar a la de pacientes sin infección (51.12%). Como ilustran los datos presentados en la tabla 12, en pacientes diagnosticados con gastritis superficial el alelo 2848A tuvo una frecuencia del 45.19%, en el grupo de metaplasia la frecuencia del alelo fue de un similar (51.72%), lo mismo que en el grupo de cáncer (48.27%).

Es muy importante hacer notar que el alelo 2848A aumentó de manera significativa en pacientes con úlcera duodenal (62.5%,  $p=0.04$ ). La presencia de este alelo incrementó hasta 2.1 veces el riesgo a desarrollar esta patología.

**Tabla 11 Frecuencia del genotipo TLR9 T-1237C**

Grupo (N)	T/T	T/C	C/C	Alelo -1237C (%)	p	OR (95% IC)
<b>Gastritis</b>						
Todos los casos (152)	127	24	1	19.7		
Infectados (112)	97	15	0	13.4		
<b>Metaplasia</b>						
Todos los casos (68)	55	13	0	19.1	0.38	1.20 (0.52-2.64)
Infectados (57)	46	11		19.3	0.21	1.50 (0.59-3.92)
<b>Cáncer</b>						
Todos los casos (41)	31	10	0	24.4	0.17	1.60 (0.63-3.98)
Infectados (28)	20	8	0	28.6	<b>0.05*</b>	2.58 (0.8-27.54)
<b>Úlcera duodenal</b>						
Todos los casos (43)	37	5	1	13.9	0.32	0.68 (0.19-2.00)
Infectados (38)	32	5	0	15.8	0.58	1.01 (0.26-3.22)

**Tabla 12 Frecuencia del genotipo TLR9 G2848A**

Grupo (N)	G/G	G/A	A/A	Alelo 2848A (%)	p	OR (95% IC)
<b>Gastritis</b>						
Todos los casos (144)	74	61	9	47.2		
Infectados (104)	57	38	9	45.2		
<b>Metaplasia</b>						
Todos los casos (70)	36	26	8	51.7	0.32	1 (0.55-1.89)
Infectados (58)	28	22	8	48.6	0.52	1.20(0.42-5.26)
<b>Cáncer</b>						
Todos los casos (40)	24	13	3	40	0.24	0.72 (0.33-1.56)
Infectados (29)	15	11	3	48.3	0.45	1.10 (0.4 3-6.18)
<b>Úlcera duodenal</b>						
Todos los casos (45)	17	25	3	62.2	0.06	1.79 (0.85-3.81)
Infectados (40)	15	22	3	62.5	<b>0.04*</b>	<b>2.10 (1.01-6.23)</b>

## *EFECTO DE LA VARIACIÓN GENÉTICA DE LOS TLRs SOBRE EL PERFIL DE CITOCINAS Y QUIMIOCINAS*

Una de las características principales de la infección por *H. pylori* es la inflamación local. Esta inflamación se caracteriza por el infiltrado leucocitario en la mucosa gástrica debido, en gran parte, a la síntesis local de quimiocinas. Además, en la mucosa gástrica de los pacientes infectados aumenta la producción de citocinas inflamatorias, tanto por los leucocitos presentes en la submucosa, como por las células epiteliales de la mucosa gástrica, por lo que decidimos determinar si la presencia de SNPs en los TLRs modifica la expresión de estos mediadores inflamatorios.

Se eligieron quimiocinas cuya producción estuviera previamente reportada en la respuesta inmune hacia *H. pylori* como MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , IL-8, GRO- $\alpha$  y RANTES.<sup>11,14,18</sup> El mismo criterio se utilizó para elegir citocinas importantes de la respuesta inflamatoria como IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ .<sup>11,14,18</sup>

En el caso específico del efecto del polimorfismo del gen *TLR9*, se determinó además la expresión de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , debido a la relevancia del TLR9 en la síntesis de interferones tipo I.

### EFECTO DE LOS SNPs DE TLR4 SOBRE EL PERFIL DE CITOCINAS Y QUIMIOCINAS

Se eligieron biopsias de 22 pacientes infectados por *H. pylori* que presentaron el alelo 299G y/o el alelo 399I en el gen de TLR4. Para cada caso elegido, se seleccionó un control (alelo 299D y 399T de TLR4) de la misma edad, género y patología y se procedió a determinar los niveles de expresión utilizando RT-PCR cuantitativa.

Se compararon los niveles de expresión de IFN- $\gamma$  e IL-4 para determinar si los SNPs de TLR4 modificaban el perfil de citocinas que polarizan la respuesta hacia Th1 o Th2. Sin embargo, los niveles de expresión del mRNA de estas citocinas fueron similares en los pacientes con el alelo ancestral y en aquellos que presentaban la versión polimórfica del gen. Además, no



se detectó la expresión de IL-12, otra citocina de gran importancia para establecer una respuesta tipo Th1.

Reportes previos mencionan la importancia de IL-17 en el establecimiento de la respuesta inflamatoria contra *H. pylori*.<sup>75</sup> Con todo, en nuestro grupo de estudio no se detectó su expresión.

Otra citocina de gran relevancia durante la infección de *H. pylori* es IL-1 $\beta$ , como observamos en la Figura 5. La expresión del mRNA de IL-1 $\beta$  disminuye significativamente ( $p=0.002$ ) en los pacientes con alguna variación en el gen de TLR4, lo mismo ocurre con la IL-6 ( $p=0.006$ ). Sorprendentemente, en el caso de TNF- $\alpha$ , otra citocina pro-inflamatoria, el comportamiento observado fue totalmente diferente, ya que su expresión aumentó en los pacientes con SNPs en TLR4 ( $p=0.01$ ).

Se determinó también la expresión de IL-10, debido a su actividad antiinflamatoria y pudimos observar que en los pacientes con el alelo 299G y/o 399I disminuye significativamente ( $p=0.001$ ).

Como mencionamos previamente, otros mediadores inflamatorios importantes son las quimiocinas. La figura 6 nos muestra que IL-8, una quimiocina característica en la infección por *H. pylori*, disminuye su expresión significativamente ( $p=0.001$ ) en pacientes con algún polimorfismo en el gen TLR4, lo mismo ocurre con la expresión de GRO- $\alpha$  ( $p=0.002$ ), ambas quimiocinas tienen la capacidad de atraer polimorfonucleares a la mucosa gástrica.

La expresión de MCP-1 y MIP-1 $\alpha$ , conocidas por su capacidad de atraer mononucleares al sitio de la infección, aumenta en el grupo de pacientes con SNPs en TLR4 ( $p=0.001$  y  $p=0.01$ , respectivamente).

No se detectó el mRNA de RANTES, a pesar de que estudios previos demuestran que la expresión de esta quimiocina aumenta en la infección por *H. pylori*.

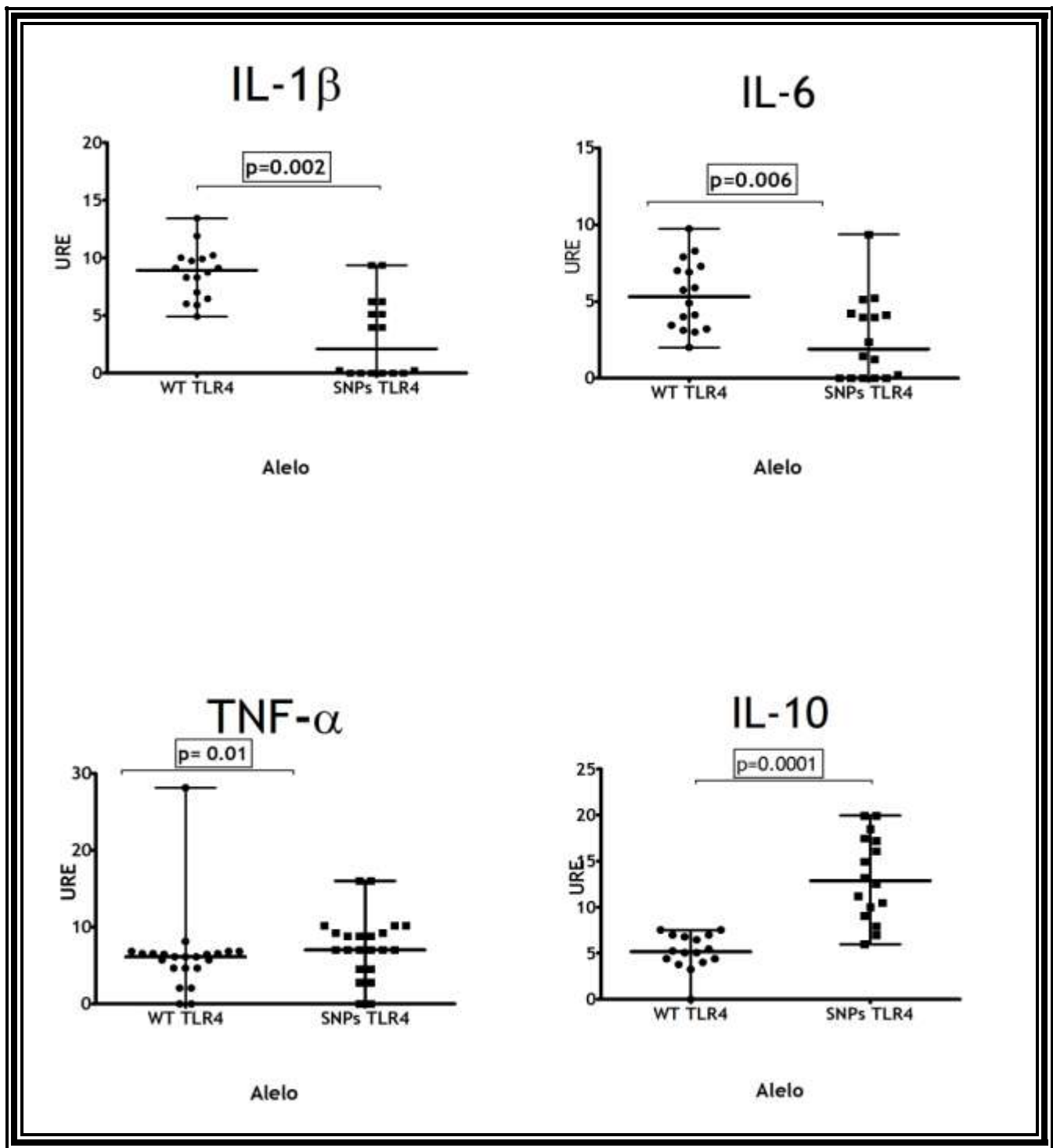
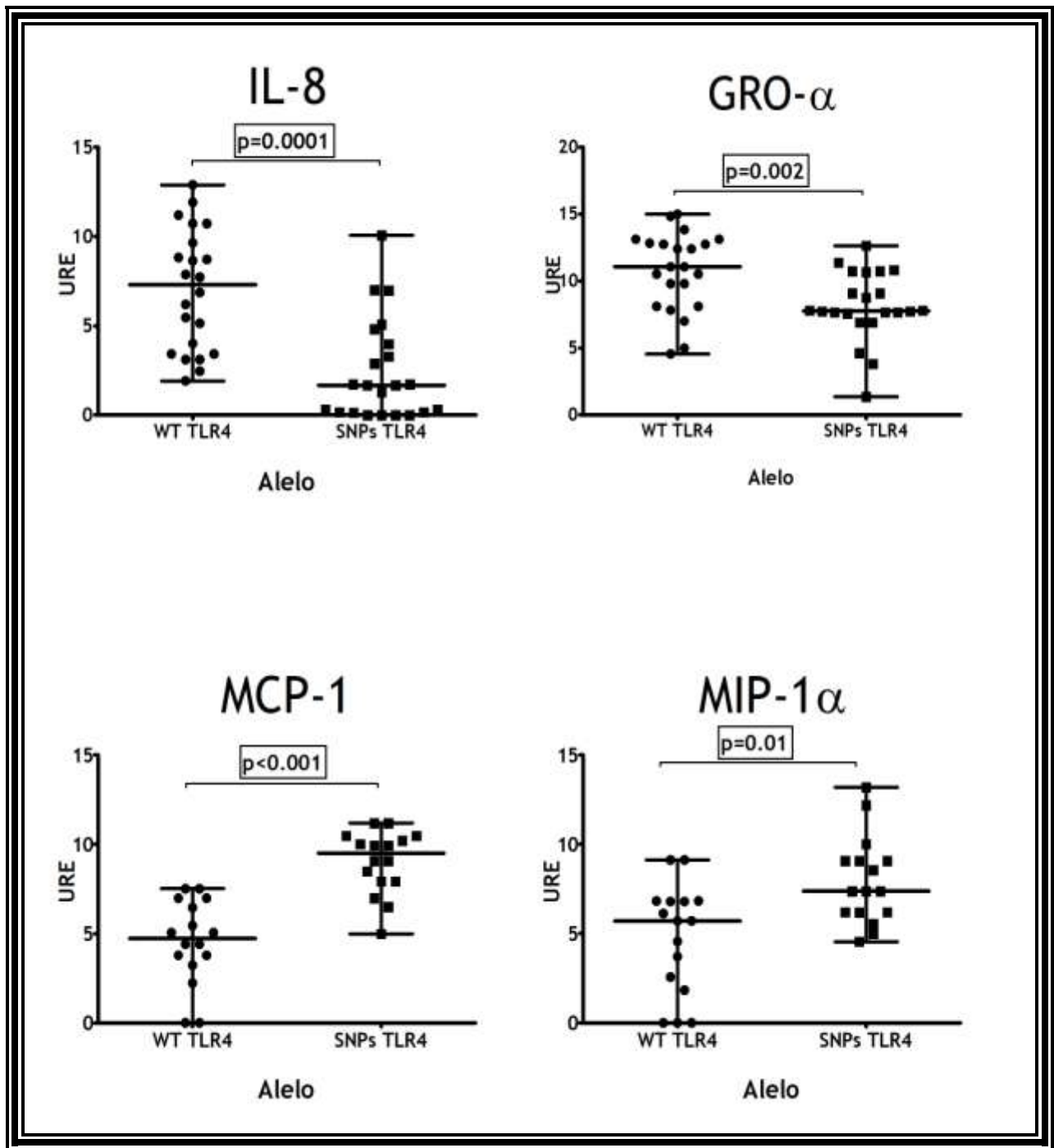


Fig 5. Efecto del polimorfismo de TLR4 en la expresión de citocinas en la mucosa gástrica. Podemos observar los niveles de expresión, en unidades relativas de expresión (URE), del mRNA de diferentes citocinas de pacientes que presentaban variaciones genéticas en TLR4 y su comparación con los niveles de expresión de pacientes que tienen la versión silvestre del gen. Los valores obtenidos se normalizaron utilizando la expresión del gen  $\beta$ -actina. Las diferencias entre los grupos se analizaron utilizando la prueba estadística U-Mann Whitney considerándose estadísticamente significativa una  $p < 0.05$ .



**Fig 6. Efecto del polimorfismo de TLR4 en la expresión de quimiocinas en la mucosa gástrica.** Podemos observar los niveles, en unidades relativas de expresión (URE), del mRNA de diferentes citocinas de pacientes que presentaban variaciones genéticas en TLR4 y su comparación con los niveles de expresión de pacientes que tienen la versión silvestre del gen. Los valores obtenidos se normalizaron utilizando la expresión del gen  $\beta$ -actina. Las diferencias entre los grupos se analizaron utilizando la prueba estadística U-Mann Whitney considerándose estadísticamente significativa una  $p<0.05$

## EFFECTO DE LOS SNPs DE TLR5 SOBRE EL PERFIL DE CITOCINAS Y QUIMIOCIAS

De los dos polimorfismos estudiados en el gen TLR5, R392\* y N592S, solamente el primero se presentó en una frecuencia suficiente para estudiar su efecto sobre la expresión de citocinas en la mucosa gástrica. Se eligieron a los 15 pacientes que presentaban el alelo 392\* e igual número de pacientes con el alelo 392R, ambos grupos con características similares (edad, género y patología). En ambos grupos se determinaron los niveles de expresión, en la mucosa gástrica, de las citocinas y quimioquinas previamente mencionadas.

Similar a lo que ocurrió con el polimorfismo de TLR4, no fue posible detectar la expresión de IL-17, ni IL-12 en nuestro grupo de estudio (dato no mostrado).

De manera importante el mRNA de IL-4 aumentó significativamente en el grupo de pacientes que presentó el alelo 392\* ( $p=0.02$ ), como se muestra en la figura 7, y la expresión de IFN- $\gamma$  disminuyó, aunque en este caso no se alcanzó una diferencia estadísticamente significativa. Estos datos podrían sugerir que este SNP influye en la polarización de la respuesta a Th2 a diferencia del polimorfismo de TLR4.

La expresión de IL-1 $\beta$ , e IL-6 fue significativamente menor ( $p=0.01$  y  $p=0.005$ , respectivamente) en pacientes con el alelo 392\* en comparación con pacientes que presentan el alelo 392Arg. Sin embargo, en contraste con lo que sucede en el gen *TLR4*, el grupo de pacientes con el alelo polimórfico tiene una menor expresión de TNF- $\alpha$  ( $p=0.001$ ) e IL-10 ( $p=0.04$ ), como se muestra en la Figura 8.

Al determinar la expresión de quimioquinas en los pacientes con el alelo 392\* observamos que los niveles de expresión del mRNA de IL-8, GRO- $\alpha$ , MCP-1 y MIP1- $\alpha$  fueron similares a la de los pacientes con el alelo 392R, lo que nos indica que este polimorfismo no influye en la síntesis de estos mediadores inflamatorios como se ilustra en la figura 9.

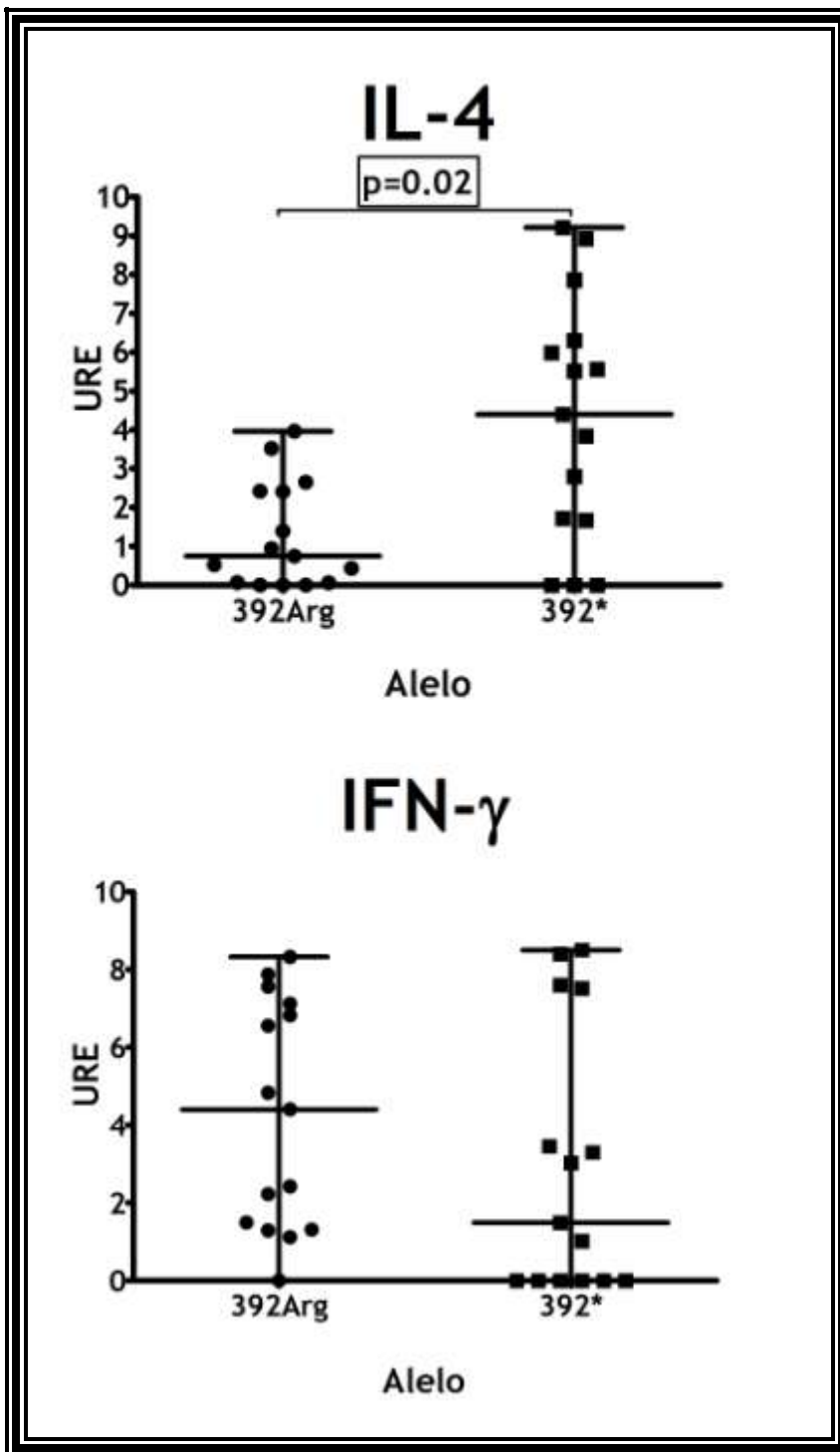
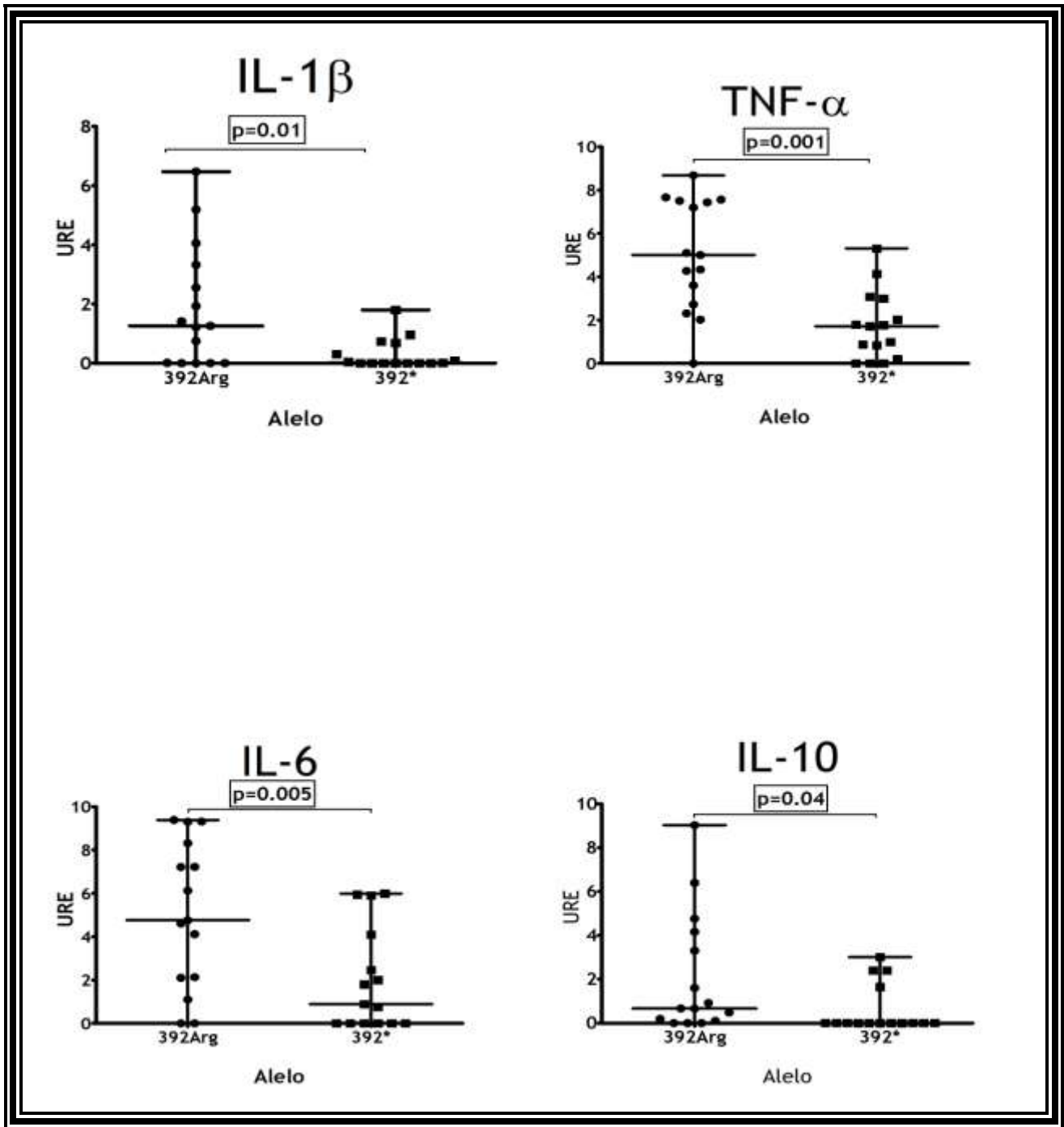


Fig 7. Efecto del polimorfismo de TLR5 en la expresión de IL-4 e INF- $\gamma$  en la mucosa gástrica. Podemos observar los niveles de expresión, en unidades relativas de expresión (URE), del mRNA de IL-4 e INF- $\gamma$  de pacientes que presentaban el alelo 392stop del gen de TLR5 y su comparación con los niveles de expresión de pacientes que tienen la versión silvestre del gen. Los valores obtenidos se normalizaron utilizando la expresión del gen  $\beta$ -actina. Las diferencias entre los grupos se analizaron utilizando la prueba estadística U-Mann Whitney considerandose estadísticamente significativa una  $p < 0.05$



**Fig 8.** Efecto del polimorfismo de TLR5 en la expresión de citocinas en la mucosa gástrica. Podemos observar los niveles de expresión, en unidades relativas de expresión (URE), del mRNA de diferentes citocinas de pacientes que presentaban el alelo 392stop del gen de TLR5 y su comparación con los niveles de expresión de pacientes que tienen la versión silvestre del gen. Los valores obtenidos se normalizaron utilizando la expresión del gen  $\beta$ -actina. Las diferencias entre los grupos se analizaron utilizando la prueba estadística U-Mann Whitney considerandose estadísticamente significativa una  $p < 0.05$

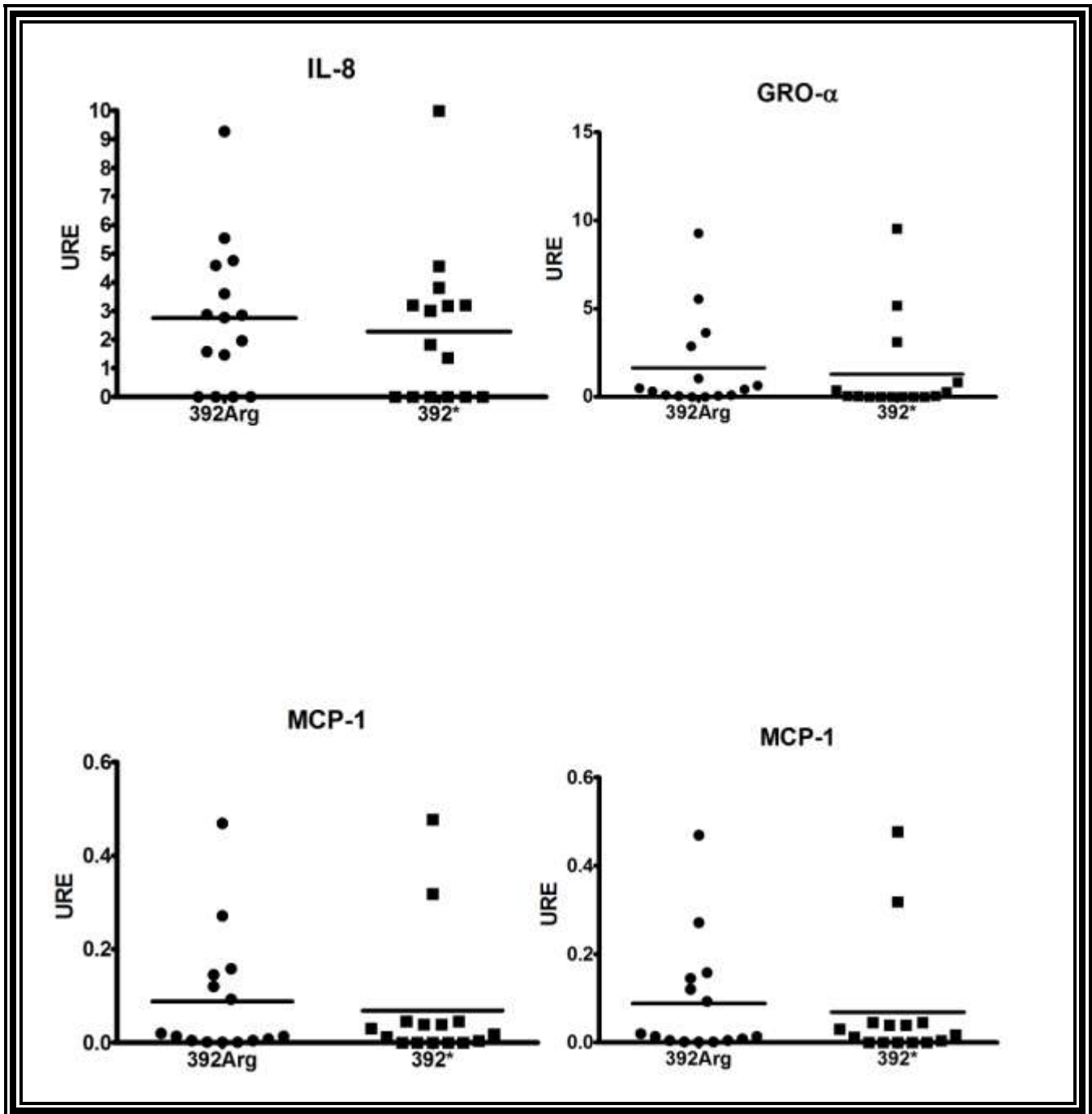


Fig 9. Efecto del polimorfismo de TLR5 en la expresión de quimiocinas en la mucosa gástrica. Podemos observar los niveles de expresión, en unidades relativas de expresión (URE), del mRNA de diferentes quimiocinas de pacientes que presentaban el alelo 392stop del gen de TLR5 y su comparación con los niveles de expresión de pacientes que tienen la versión silvestre del gen. Los valores obtenidos se normalizaron utilizando la expresión del gen  $\beta$ -actina. Las diferencias entre los grupos se analizaron utilizando la prueba estadística U-Mann Whitney, considerándose estadísticamente significativa una  $p < 0.05$

## EFFECTO DE LOS SNPs DE TLR9 SOBRE EL PERFIL DE CITOCINAS Y QUIMIOCIAS

Para determinar el efecto del polimorfismo en el gen TLR9 sobre la respuesta inflamatoria de la mucosa gástrica infectada por *H. pylori*, se eligió determinar la expresión de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 debido a los reportes previos, que indican que la activación del TLR9 induce la producción de estas citocinas. Conjuntamente, se determinó la expresión de IL-8 por su importancia en la respuesta hacia *H. pylori*. Se estudió también la expresión de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , ya que se sabe que el TLR9 por la vía de señalización independiente de MyD88 activa a IRF3 que induce la transcripción de interferones tipo I.

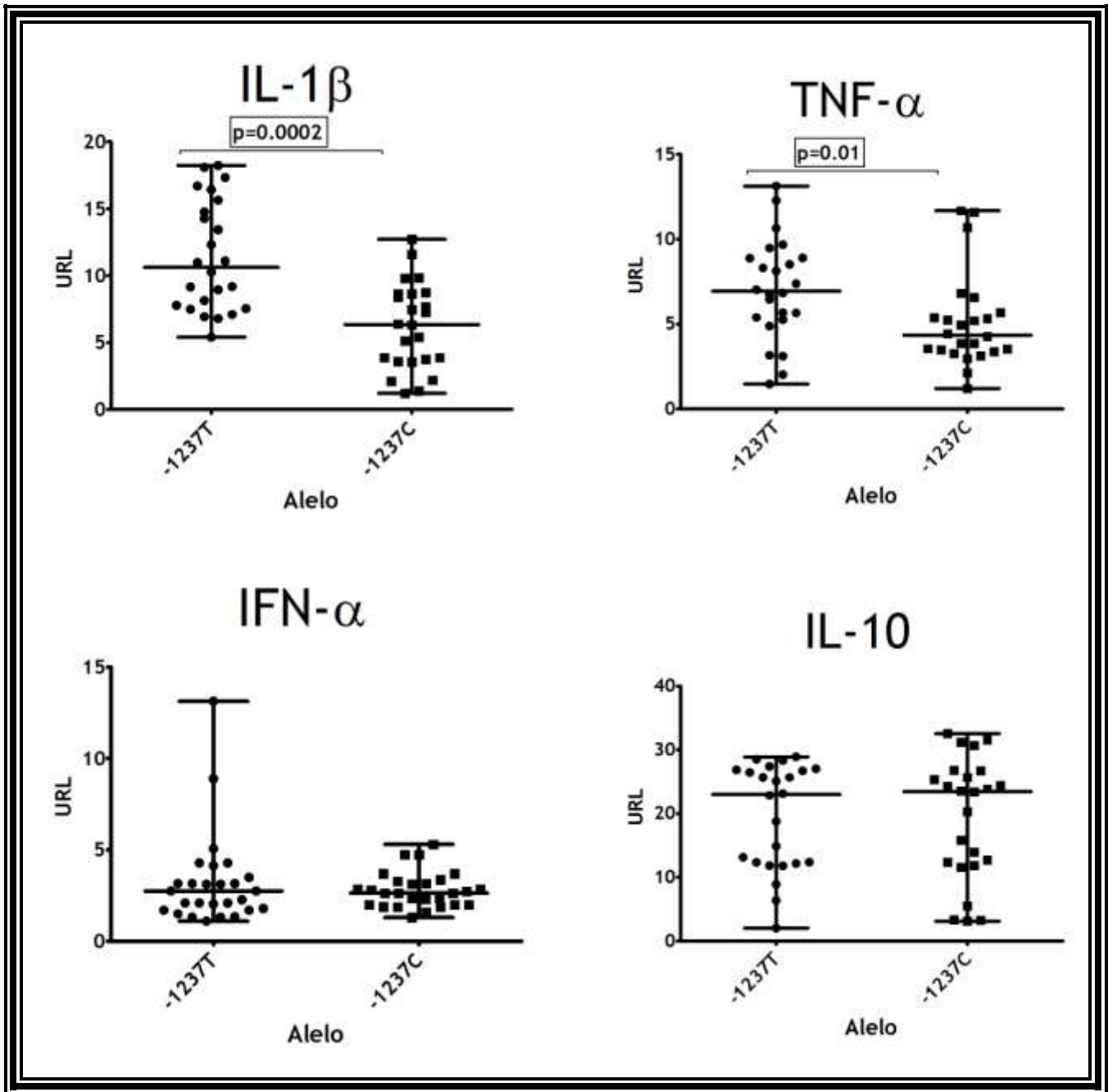
Se determinó primero la expresión de estas citocinas en 24 pacientes que presentaron el alelo -1237C y se comparó contra la expresión de las mismas citocinas en 24 pacientes con el alelo -1237T.

El segundo grupo de estudio estuvo conformado por 24 pacientes que presentaron el genotipo 2848G/A y 24 pacientes que presentaban el genotipo 2848 A/A, ambos contrastados con un grupo de pacientes que presentaban el genotipo 2848 G/G (nuestro grupo control por presentar la versión silvestre del gen TLR9).

En la figura 10 podemos observar que tanto la expresión de IL-1 $\beta$  como la de TNF- $\alpha$  disminuyó significativamente en el grupo de pacientes que presentaron el alelo -1237C ( $p=0.002$  y  $0.01$ , respectivamente). Sin embargo, no existe diferencia entre los niveles de expresión IL-10, IL-8 o IFN- $\alpha$ , además, no se detectó expresión de IFN- $\beta$  en estas muestras.

Esta tendencia se conserva en los pacientes que presentaron variación genética en la región 2848 del gen (figura 11), donde también existió una disminución estadísticamente significativa de la expresión de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  ( $p=0.001$  y  $p<0.0001$  respectivamente) en los pacientes que presentaron el alelo 2848A, independientemente si el cambio se da de forma heterocigota u homocigota.





**Fig 10.** Efecto del SNP T-1237C de TLR9 en la expresión de citocinas en la mucosa gástrica. Podemos observar los niveles de expresión, en unidades relativas de expresión (URE), del mRNA de diferentes citocinas de pacientes que presentaban el alelo -1237C del gen de TLR9 y su comparación con los niveles de expresión de pacientes que tienen la versión silvestre del gen. Los valores obtenidos se normalizaron utilizando la expresión del gen  $\beta$ -actina. Las diferencias entre los grupos se analizaron utilizando la prueba estadística U-Mann Whitney, considerándose estadísticamente significativa una  $p < 0.05$

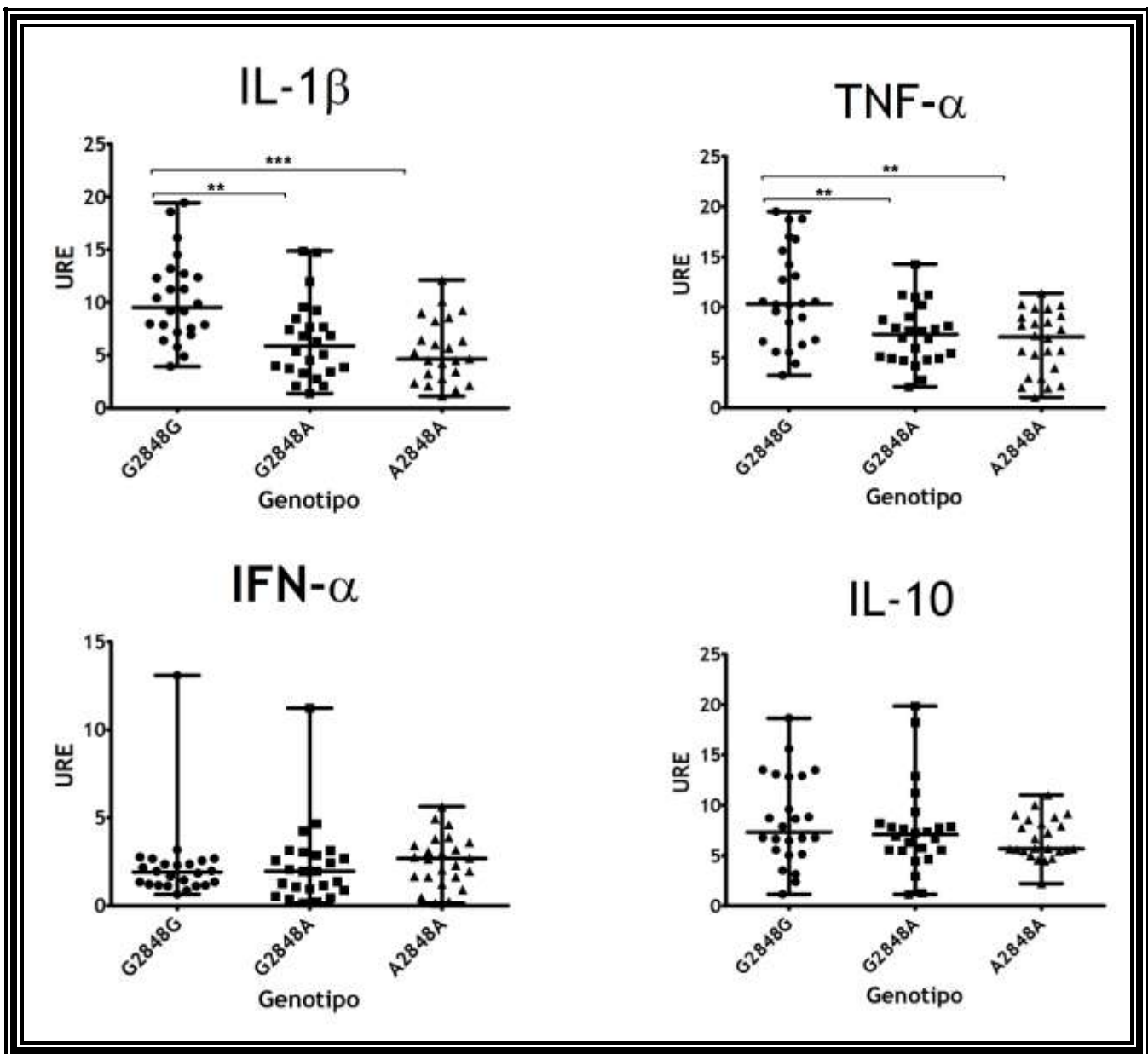


Fig 11. Efecto del SNP G2848A de TLR9 en la expresión de citocinas en la mucosa gástrica. Podemos observar los niveles de expresión, en unidades relativas de expresión (URE), del mRNA diferentes citocinas de pacientes que presentaban el alelo 2848G/A y el alelo 2848A/A del gen de TLR9 y su comparación con los niveles de expresión de pacientes que tienen la versión silvestre del gen. Los valores obtenidos se normalizaron utilizando la expresión del gen  $\beta$ -actina. Las diferencias entre los grupos se analizaron utilizando la prueba estadística U-Mann Whitney, considerándose estadísticamente significativa una  $p < 0.05$

## DISCUSIÓN

La infección por *H. pylori* causa inflamación en la mucosa gástrica y esta inflamación puede existir en un estado asintomático durante toda la vida del individuo. Sin embargo, en aproximadamente el 30% de pacientes infectados, las consecuencias clínicas de esta infección crónica pueden ir desde atrofia gástrica hasta el cáncer gástrico o, en otro espectro de la enfermedad, provocar úlcera duodenal.<sup>2,4,6</sup>

Existen varias maneras de abordar el interrogante de por qué una misma infección crónica puede llevar a tan diversas manifestaciones clínicas. La primera, más estudiada hasta el momento, es la diversidad genética de la bacteria y sus factores de virulencia. Otro enfoque consiste en estudiar la variabilidad genética del hospedero y que modificaciones causa en la respuesta inmune. Esta diferencia genética en la respuesta inmune del hospedero ante la infección por *H. pylori*, puede resultar no solo en una insuficiencia en el control de la infección, sino incluso en el daño crónico en la mucosa gástrica por una desregulación del fenómeno inflamatorio.<sup>25-27,29</sup>

Dentro de los genes cuya variabilidad puede modificar la respuesta inmune hacia patógenos, sobresalen los TLRs debido a que son los primeros en reconocer microorganismos, como *H. pylori*.<sup>46,51,55,56,76-79</sup> En respuesta a los patógenos la señalización vía TLRs induce la activación de NF- $\kappa$ B, ERK e IRF que llevan a las células a producir mediadores inflamatorios. Dentro de estos mediadores inflamatorios encontramos a las citocinas como IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, e IL-10 y a las quimiocinas como IL-8, GRO- $\alpha$ , MCP-1 y MIP1- $\alpha$ . De manera paradójica, esta inflamación en lugar de resultar benéfica para el hospedero, puede ser la causa principal del daño inducido en las patologías asociadas a *H. pylori* en caso de no existir un mecanismo de homeostasis.

Estudios de asociación demuestran que una variación en los TLRs puede modificar el desarrollo de una patología, por lo que es fácil suponer, bajo esta misma lógica, que algo similar puede suceder en las patologías gastroduodenales asociadas a la infección por *H. pylori*, y nuestros resultados parecen apoyar esta hipótesis.

La frecuencia del alelo 299G del gen TLR4 tiende a aumentar en pacientes con cáncer gástrico, aunque en nuestro caso la diferencia no es estadísticamente significativa. Por lo tanto, los resultados aquí presentados sugieren que la presencia de este SNP en *TLR4* podría incrementar la susceptibilidad en población mestiza mexicana a desarrollar cáncer en pacientes infectados por *H. pylori*, lo cual concordaría con lo reportado por Hold y col. en población caucásica.<sup>66</sup> Sin embargo, debido a la falta de evidencia estadística es necesario un estudio más amplio para confirmar esta hipótesis.

Es importante hacer notar que la frecuencia del alelo 299G del gen TLR4 aumentó de manera significativa en pacientes con úlcera duodenal, esto parece otorgar una fuerza mayor a la hipótesis propuesta, la presencia de una variación en la región 299 de TLR4 podría llegar a ser un factor de riesgo en el desarrollo de las patologías más graves descritas en la infección por *H. pylori*.

Varios reportes asocian el polimorfismo de TLR4 con la infección por *H. pylori* o sus patologías. Sin embargo, hasta la fecha, existen solo 2 estudios que describen la asociación de SNPs en otros TLRs,<sup>70,71</sup> que también han sido descritos como receptores de *H. pylori*.

Nosotros encontramos que el alelo 592S de *TLR5* se presenta en muy baja frecuencia en nuestra población de estudio (1.2%) a diferencia de lo reportado para población caucásica, donde la frecuencia llega a casi el 5%. En cuanto al polimorfismo en 392 de *TLR5* observamos dos tendencias diferentes: en el caso del cáncer gástrico, podemos notar que la frecuencia del alelo polimórfico aumentó lo que indicaría un posible riesgo a desarrollar esta patología, mientras que en el caso de úlcera duodenal podemos observar una disminución importante de la frecuencia de este SNP, lo que podría asociarse a protección a desarrollar esta patología. Sin embargo, en ninguno de los casos la diferencia fue estadísticamente significativa y este dato representa únicamente una tendencia, por lo que es importante realizar un estudio de replicación que incluya un mayor número de pacientes. Hasta el momento, solo existe otro estudio que investigó el polimorfismo de este gen en asociación con la infección por *H. pylori*.<sup>70</sup> Sin embargo, en este estudio Moura y col. no encontraron

ninguna asociación o tendencia entre la presencia del polimorfismo y el desarrollo de úlcera duodenal; no obstante, debemos tomar en cuenta que este estudio se llevo a cabo en niños, donde la fisiopatología podría ser diferente y además el fondo genético de sus pacientes difiere al de nuestro grupo de estudio.<sup>70</sup>

Hold y col. (2009) trataron de demostrar que el alelo -1237C del gen TLR9 podría ser un factor de riesgo a desarrollar cáncer gástrico.<sup>71</sup> Sin embargo, no pudieron corroborar su hipótesis. En nuestro estudio encontramos que la frecuencia de este alelo aumenta en pacientes diagnosticados con cáncer, aunque no obtuvimos diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control. En el caso del alelo 2848A del gen *TLR9*, la frecuencia aumentó en el grupo de úlcera duodenal, además, presentar este polimorfismo aumentó el riesgo a desarrollar esta patología hasta 2.2 veces. Este resultado es de particular relevancia, debido a que, hasta el momento, somos los primeros en reportar la asociación entre algún polimorfismo de TLR9 y el riesgo a desarrollar úlcera duodenal.

Aunque pudimos observar tendencias claras dentro de nuestro grupo de estudio, solamente en el caso de los pacientes con úlcera duodenal que presentaban el alelo 299G del gen *TLR4* y el alelo 2848G del gen *TLR9*, hubo diferencias estadísticamente significativas. Por lo anterior, es necesario realizar estudios de replicación que incluyan un número mayor de pacientes esto nos permitirá corroborar los datos obtenidos en este trabajo.

Una explicación plausible de la relación entre la variación genética de los TLRs y su posible asociación con las patologías gastroduodenales estudiadas, implica que el polimorfismo en estos receptores provoque una desregulación en la respuesta inflamatoria inducida por *H. pylori*. Los TLRs participan de manera importante en el inicio de la respuesta inmune innata y en la modulación de la respuesta inmune adaptativa. Además, varios estudios demuestran que los factores genéticos influyen en la síntesis de citocinas de la respuesta inmune. Conjuntamente, se ha demostrado en otras patologías, que la presencia de SNPs en los TLRs disminuye la activación de factores de transcripción, lo que resulta una modificación en la síntesis de citocinas inflamatorias. En base a estos antecedentes decidimos investigar

efecto que tiene el polimorfismo de los TLRs estudiados en la expresión del mRNA de citocinas de la mucosa gástrica.

Nuestros resultados demuestran que la variación genética de TLR4 produce una disminución en la expresión de IL-1 $\beta$  e IL-6, lo que concuerda con lo reportado por otros autores para diferentes bacterias gramnegativas. Sorprendentemente, en individuos con SNPs en TLR4 encontramos una sobreexpresión del mRNA de TNF- $\alpha$  e IL-10, se debe tomar en cuenta, sin embargo, que nosotros estudiamos la expresión en biopsias de tejido gástrico donde podemos encontrar varias estirpes celulares, mientras que los estudios realizados por Arbour y Schwartz se realizaron en líneas celulares. La variación en el gen de *TLR5* produce una disminución en la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-10, comportamiento similar a lo reportado por Hawn y col. en respuesta a la infección por *Legionella pneumophila*, otra bacteria flagelada.

Es importante señalar que no existen estudios previos que describan la relación entre los SNPs de los TLRs y la expresión de citocinas de pacientes infectados por *H. pylori*. Resulta muy interesante observar que la variación genética de los TLRs modifica la expresión de citocinas de la mucosa gástrica, lo que corrobora la hipótesis propuesta. Los cambios de expresión en el perfil de citocinas fueron diferentes para los SNPs en TLR4, TLR5 o TLR9. Sería inesperado que el efecto fuera idéntico en todos los casos, puesto que la vía de señalización descrita para estos receptores, a pesar de ser conservada entre ellos, presenta diferencias importantes dependiendo del TLR activado, un ejemplo claro es la participación de moléculas adaptadoras exclusivas para cada TLR, como TIRAP. Adicionalmente, TLR4 puede activar tanto la vía independiente como la dependiente de MyD88, mientras que el TLR5 y el TLR9 requieren de la unión con dicha proteína adaptadora.

Otra factor importante que debemos de tomar en cuenta es que la variación genética no afecta el mismo dominio proteico en todos los TLRs e incluso, como en el caso del *TLR9*, solo está presente en el gen, por lo que es de esperarse que influya de manera diferente en la expresión de citocinas.

En el caso de TLR4, en donde la región polimórfica modifica el dominio extracelular de la proteína, la hipótesis más aceptada es que se afecta la afinidad con la que éste receptor se une a su ligando, por lo que la señal que se envía después del reconocimiento probablemente se ve disminuida, lo que se traduce como una modulación de la respuesta inflamatoria, más que una regulación negativa. En cambio, el SNP R392\* de TLR5, en donde falta la porción intracelular del receptor, provoca una deficiencia en la señalización intracelular, lo que podría inducir la disminución en la expresión que observamos en todas las citocinas.

En el gen de TLR9, en el que ambos polimorfismos estudiados se encuentran en regiones no codificantes de la proteína, es más complejo tratar de proponer un mecanismo mediante el cual se afecte la señalización celular y por lo tanto la síntesis de citocinas. De acuerdo a lo publicado recientemente, este polimorfismo no modifica la expresión de TLR9, sin embargo, la versión -1237C de este receptor parece incluir un sitio más de unión a NF- $\kappa$ B,<sup>80</sup> lo que podría traducirse en un fenotipo que favorece la síntesis de proteínas en los pacientes que poseen este alelo, lo que concuerda con lo que observamos en nuestros resultados.

La frecuencia de los SNPs en los TLRs estudiados tiene una tendencia a aumentar en las patologías más severas asociadas a la infección por *H. pylori*, lo que concuerda con lo reportado por otros autores. Sin embargo, la hipótesis más aceptada sugiere que las enfermedades provocadas por *H. pylori* son causadas por una inflamación crónica exacerbada que provoca atrofia gástrica<sup>81-83</sup> y el efecto descrito de los SNPs en los TLRs es la disminución de la síntesis de citocinas y por lo tanto la inflamación.g

El exceso de producción de TNF- $\alpha$  en los pacientes con alelos heterocigotos de TLR4 y TLR9 puede asociarse a un daño en la mucosa gástrica, pues aunque en condiciones de homeostasis esta citocina forma parte de los mecanismos de defensa del hospedero, su producción exacerbada puede conducir a la necrosis de la mucosa gástrica, hiperproducción de ácido e incluso favorecer la metástasis de células tumorogénicas.<sup>84,85</sup> La sobre producción de IL-10 también podrían dañar la mucosa ya que son citocinas que afectan la

fisiología gástrica y además pueden tener efectos directos sobre el crecimiento y la sobrevivencia de células tumorales.

Podemos observar que la variación genética de los TLRs no afecta solamente a una citocina, sino a un grupo de ellas. El polimorfismo de TLR5 y TLR9 disminuye la expresión de citocinas, esta disminución podría inducir protección hacia la inflamación exacerbada, no obstante, también podría incrementar la susceptibilidad a ser infectado por cepas más virulentas de *H. pylori*; en cambio, los individuos que no presentan estas variaciones genéticas, al tener una respuesta inmune normal podrían eliminar adecuadamente a este tipo de cepas. Además, debido a que la respuesta inmune de los pacientes con SNPs en TLR5 y TLR9 está disminuida, es posible también que falle el control de la infección, permitiendo un mayor desarrollo de la bacteria y por lo tanto una mayor exposición a sus factores de virulencia. No obstante, habría que realizar varios estudios para comprobar estas hipótesis.

Otra explicación plausible para relacionar los datos obtenidos se enfoca en la importancia de los TLRs en el mantenimiento de la homeóstasis. En el 2004, se demostró que el reconocimiento de la flora comensal por los TLRs es necesario para mantener la homeostasis en el intestino y que la modificación de este reconocimiento puede inducir a la necrosis de la mucosa intestinal.<sup>86</sup> Los ratones deficientes de TLR2, TLR4 y MyD 88 presentan una desregulación en la proliferación de las células del epitelio intestinal, lo que hace a estas células más susceptibles al daño, reduciendo su capacidad de recuperación y la síntesis de IL-6, TNF- $\alpha$  y KC-1. Estas citocinas son factores importantes para la protección de varias estirpes celulares, incluyendo las células del epitelio intestinal.<sup>86</sup> Si extrapolamos estos resultados a la mucosa gástrica y tomamos en cuenta la hipótesis que propone que *H. pylori* es una bacteria comensal, podríamos suponer que algo similar puede suceder en el epitelio gástrico, por lo que una respuesta modificada de los diferentes TLRs presentes en las células epiteliales gástricas, causaría un desbalance en la homeostasis del estómago, induciendo a una desorganización de la mucosa gástrica y permitiendo el daño de la misma, esto podría llevar al establecimiento de las patologías causadas por la infección de *H. pylori*.



## CONCLUSIONES

- ❖ La frecuencia de los SNPs en TLRs presenta una tendencia a aumentar en los pacientes con cáncer, lo que sugiere que la presencia de estos alelos polimórficos podrían asociarse con un incremento en el riesgo a desarrollar esta enfermedad. Sin embargo, en ningún caso la diferencia fue estadísticamente significativa, por lo que es necesario replicar este estudio incluyendo un mayor número de pacientes para confirmar nuestros resultados.
- ❖ La frecuencia de las variantes polimórficas de TLR4 y TLR9 aumentó en pacientes con úlcera duodenal, siendo la diferencia estadísticamente significativa en los alelos 299D de TLR4 y 2848G de TLR9. Notablemente, la presencia del alelo 2848G aumenta hasta dos veces el riesgo a desarrollar esta patología.
- ❖ Las variaciones genéticas en los TLRs se asocian a una alteración en la expresión del mRNA de citocinas de la mucosa gástrica.
- ❖ Los alelos polimórficos de TLR9 y TLR5 disminuyen la expresión de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , el alelo 392\* está relacionado, además, con una menor expresión de IL-6 e IL-10.
- ❖ Pacientes con SNPs en TLR4 presentan una mayor expresión de TNF- $\alpha$ , IL-10, MCP-1 y MIP-1 $\alpha$ , no obstante, la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y GRO- $\alpha$  disminuye significativamente. El polimorfismo de este receptor se asocia con modificaciones, no solo en la expresión de citocinas, sino también de quimiocinas, favoreciéndose la síntesis de citocinas quimioattractantes de monocitos sobre aquellas que actúan en granulocitos

## **PERSPECTIVAS**

Nuestros resultados sugieren que la frecuencia de los SNPs estudiados aumenta en pacientes con úlcera duodenal y cáncer gástrico. Sin embargo, es necesario realizar un estudio de replicación que incluya un mayor número de pacientes dentro de cada subgrupo, esto nos permitiría alcanzar el poder estadístico suficiente para confirmar nuestros datos y descartar cualquier artefacto estadístico.

Así mismo, sería conveniente realizar experimentos que demuestren que los cambios en la expresión de las citocinas y quimiocinas, descritos en este trabajo, alteran la inflamación de la mucosa gástrica. Esta recomendación es importante, ya que nos permitiría explicar el mecanismo por el cual, SNPs en los TLRs afectan la inflamación y de esta forma entender el porqué la variación genética de los TLRs podría asociarse con un incremento en el riesgo a desarrollar las patologías gastroduodenales presentes en la infección por *H. pylori*.

## **BIBLIOGRAFÍA**

<sup>1</sup> F. Hernandez and J. Monge-Najera, "Ultrastructure of the bacteria *Campylobacter* and *Helicobacter*: implications for the phylogeny of mammal gastric bacteria," *Rev. Biol. Trop.* **42 Suppl 2**, 85 (1994).

Ref Type: Journal

<sup>2</sup> G. I. Perez-Perez, D. Rothenbacher, and H. Brenner, "Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection," *Helicobacter.* **9 Suppl 1**, 1 (2004).

Ref Type: Journal

<sup>3</sup> "Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994," *IARC Monogr Eval. Carcinog. Risks Hum.* **61**, 1 (1994).

Ref Type: Journal

<sup>4</sup> P. Sipponen, "Natural history of gastritis and its relationship to peptic ulcer disease," *Digestion* **51 Suppl 1**, 70 (1992).

Ref Type: Journal

<sup>5</sup> N. Uemura, *et al.*, "*Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer," *N. Engl. J. Med.* **345**(11), 784 (2001).

Ref Type: Journal

<sup>6</sup> L. J. van Doorn, *et al.*, "Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*," *Gastroenterology* **115**(1), 58 (1998).

Ref Type: Journal

<sup>7</sup> R. E. Pounder and D. Ng, "The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries," *Aliment. Pharmacol. Ther.* **9 Suppl 2**, 33 (1995).

Ref Type: Journal

<sup>8</sup> P. Correa, *et al.*, "Gastric precancerous process in a high risk population: cohort follow-up," *Cancer Res.* **50**(15), 4737 (1990).

Ref Type: Journal

<sup>9</sup> M. Naumann, *et al.*, "Activation of activator protein 1 and stress response kinases in epithelial cells colonized by *Helicobacter pylori* encoding the *cag* pathogenicity island," *J. Biol. Chem.* **274**(44), 31655 (1999).

Ref Type: Journal

<sup>10</sup> S. Keates, *et al.*, "Differential activation of mitogen-activated protein kinases in AGS gastric epithelial cells by *cag*<sup>+</sup> and *cag*<sup>-</sup> *Helicobacter pylori*," *J. Immunol.* **163**(10), 5552 (1999).

Ref Type: Journal

<sup>11</sup> R. M. Peek, Jr., *et al.*, "Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to *cagA*<sup>+</sup> *Helicobacter pylori* strains," *Lab Invest* **73**(6), 760 (1995).

Ref Type: Journal

<sup>12</sup> C. S. Goodwin, J. A. Armstrong, and B. J. Marshall, "*Campylobacter pyloridis*, gastritis, and peptic ulceration," *J. Clin. Pathol.* **39**(4), 353 (1986).

Ref Type: Journal

<sup>13</sup> E. Stromberg, *et al.*, "Decreased epithelial cytokine responses in the duodenal mucosa of *Helicobacter pylori*-infected duodenal ulcer patients," *Clin. Diagn. Lab Immunol.* **10**(1), 116 (2003).

Ref Type: Journal

<sup>14</sup> Y. Yamaoka, *et al.*, "Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by *cagA* gene positive *Helicobacter pylori* strains," *Gut* **41**(4), 442 (1997).

Ref Type: Journal

<sup>15</sup> G. Ye, *et al.*, "Expression of B7-1 and B7-2 costimulatory molecules by human gastric epithelial cells: potential role in CD4+ T cell activation during *Helicobacter pylori* infection," J. Clin. Invest **99**(7), 1628 (1997).

Ref Type: Journal

<sup>16</sup> G. I. Perez-Perez, *et al.*, "*Campylobacter pylori* antibodies in humans," Ann. Intern. Med. **109**(1), 11 (1988).

Ref Type: Journal

<sup>17</sup> R. Negrini, A. Savio, and B. J. Appelmek, "Autoantibodies to gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection," *Helicobacter*. **2 Suppl 1**, S13-S16 (1997).

Ref Type: Journal

<sup>18</sup> P. R. Harris, *et al.*, "Inflammatory cytokine mRNA expression during early and persistent *Helicobacter pylori* infection in nonhuman primates," J. Infect. Dis. **181**(2), 783 (2000).

Ref Type: Journal

<sup>19</sup> L. E. Smythies, *et al.*, "*Helicobacter pylori*-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not IFN-gamma, gene-deficient mice," J. Immunol. **165**(2), 1022 (2000).

Ref Type: Journal

<sup>20</sup> N. Yoshida, *et al.*, "Effects of *Helicobacter pylori* water extract on expression of endothelial adhesion molecules," Can. J. Gastroenterol. **18**(6), 387 (2004).

Ref Type: Journal

<sup>21</sup> T. Tomita, *et al.*, "Expression of Interleukin-18, a Th1 cytokine, in human gastric mucosa is increased in *Helicobacter pylori* infection," J. Infect. Dis. **183**(4), 620 (2001).

Ref Type: Journal

<sup>22</sup> J. E. Crabtree, "Immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* infection," Scand. J. Gastroenterol. Suppl **215**, 3 (1996).

Ref Type: Journal

<sup>23</sup> J. Wang, *et al.*, "Negative selection of T cells by *Helicobacter pylori* as a model for bacterial strain selection by immune evasion," J. Immunol. **167**(2), 926 (2001).

Ref Type: Journal

<sup>24</sup> J. Rudi, *et al.*, "Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand system in *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial apoptosis," J. Clin. Invest **102**(8), 1506 (1998).

Ref Type: Journal

<sup>25</sup> E. M. El-Omar, *et al.*, "Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer," Nature **404**(6776), 398 (2000).

Ref Type: Journal

<sup>26</sup> C. Li, *et al.*, "TNF gene polymorphisms and *Helicobacter Pylori* infection in gastric carcinogenesis in Chinese population," Am. J. Gastroenterol. **100**(2), 290 (2005).

Ref Type: Journal

<sup>27</sup> T. Thye, *et al.*, "Genomewide linkage analysis identifies polymorphism in the human interferon-gamma receptor affecting *Helicobacter pylori* infection," Am. J. Hum. Genet. **72**(2), 448 (2003).

Ref Type: Journal

<sup>28</sup> R. Rad, *et al.*, "Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during *Helicobacter pylori* infection," Gut **53**(8), 1082 (2004).

Ref Type: Journal

<sup>29</sup> M. S. Wu, *et al.*, "Interleukin-10 genotypes associate with the risk of gastric carcinoma in Taiwanese Chinese," *Int. J. Cancer* **104**(5), 617 (2003).

Ref Type: Journal

<sup>30</sup> Y. Kumagai and S. Akira, "Identification and functions of pattern-recognition receptors," *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**(5), 985 (2010).

Ref Type: Journal

<sup>31</sup> E. J. Hennessy, A. E. Parker, and L. A. O'Neill, "Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics?," *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**(4), 293 (2010).

Ref Type: Journal

<sup>32</sup> M. Loiarro, V. Ruggiero, and C. Sette, "Targeting TLR/IL-1R signalling in human diseases," *Mediators. Inflamm.* **2010**, 674363 (2010).

Ref Type: Journal

<sup>33</sup> C. J. Kirschning, *et al.*, "Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide," *J. Exp. Med.* **188**(11), 2091 (1998).

Ref Type: Journal

<sup>34</sup> D. A. Schwartz, "TLR4 and LPS hyporesponsiveness in humans," *Int. J. Hyg. Environ. Health* **205**(3), 221 (2002).

Ref Type: Journal

<sup>35</sup> N. C. Arbour, *et al.*, "TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans," *Nat. Genet.* **25**(2), 187 (2000).

Ref Type: Journal

<sup>36</sup> T. R. Hawn, *et al.*, "A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease," *J. Exp. Med.* **198**(10), 1563 (2003).

Ref Type: Journal

<sup>37</sup> S. Merx, *et al.*, "Characterization and functional investigation of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the human TLR5 gene," *Hum. Mutat.* **27**(3), 293 (2006).

Ref Type: Journal

<sup>38</sup> P. Y. Bochud, T. R. Hawn, and A. Aderem, "Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signaling," *J. Immunol.* **170**(7), 3451 (2003).

Ref Type: Journal

<sup>39</sup> W. Eder, *et al.*, "Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers," *J. Allergy Clin. Immunol.* **113**(3), 482 (2004).

Ref Type: Journal

<sup>40</sup> E. Lorenz, *et al.*, "Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock," *Arch. Intern. Med.* **162**(9), 1028 (2002).

Ref Type: Journal

<sup>41</sup> N. Ameziane, *et al.*, "Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**(12), e61-e64 (2003).

Ref Type: Journal

<sup>42</sup> S. M. Boekholdt, *et al.*, "Variants of toll-like receptor 4 modify the efficacy of statin therapy and the risk of cardiovascular events," *Circulation* **107**(19), 2416 (2003).

Ref Type: Journal

<sup>43</sup> S. Kiechl, *et al.*, "Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis," *N. Engl. J. Med.* **347**(3), 185 (2002).

Ref Type: Journal

<sup>44</sup> A. Aderem and R. J. Ulevitch, "Toll-like receptors in the induction of the innate immune response," *Nature* **406**(6797), 782 (2000).



Ref Type: Journal

<sup>45</sup> R. Lazarus, *et al.*, "Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies," *Genomics* **81**(1), 85 (2003).

Ref Type: Journal

<sup>46</sup> T. Kawahara, *et al.*, "Type I *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide stimulates toll-like receptor 4 and activates mitogen oxidase 1 in gastric pit cells," *Infect. Immun.* **69**(7), 4382 (2001).

Ref Type: Journal

<sup>47</sup> K. Chochi, *et al.*, "*Helicobacter pylori* augments growth of gastric cancers via the lipopolysaccharide-toll-like receptor 4 pathway whereas its lipopolysaccharide attenuates antitumor activities of human mononuclear cells," *Clin. Cancer Res.* **14**(10), 2909 (2008).

Ref Type: Journal

<sup>48</sup> T. Ogawa, *et al.*, "Immunobiological activities of chemically defined lipid A from *Helicobacter pylori* LPS in comparison with *Porphyromonas gingivalis* lipid A and *Escherichia coli*-type synthetic lipid A (compound 506)," *Vaccine* **15**(15), 1598 (1997).

Ref Type: Journal

<sup>49</sup> K. Uno, *et al.*, "Toll-like receptor (TLR) 2 induced through TLR4 signaling initiated by *Helicobacter pylori* cooperatively amplifies iNOS induction in gastric epithelial cells," *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* **293**(5), G1004-G1012 (2007).

Ref Type: Journal

<sup>50</sup> C. Basak, *et al.*, "The secreted peptidyl prolyl cis,trans-isomerase HP0175 of *Helicobacter pylori* induces apoptosis of gastric epithelial cells in a," *J. Immunol.* **174**(9), 5672 (2005).

Ref Type: Journal

<sup>51</sup> B. Su, *et al.*, "*Helicobacter pylori* activates Toll-like receptor 4 expression in gastrointestinal epithelial cells," *Infect. Immun.* **71**(6), 3496 (2003).

Ref Type: Journal

<sup>52</sup> B. Schmausser, *et al.*, "Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection," *Clin. Exp. Immunol.* **136**(3), 521 (2004).

Ref Type: Journal

<sup>53</sup> B. Schmausser, *et al.*, "Toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on gastric carcinoma cells: an implication for interaction with *Helicobacter pylori*," *Int. J. Med. Microbiol.* **295**(3), 179 (2005).

Ref Type: Journal

<sup>54</sup> B. Su, *et al.*, "*Helicobacter pylori* activates Toll-like receptor 4 expression in gastrointestinal epithelial cells," *Infect. Immun.* **71**(6), 3496 (2003).

Ref Type: Journal

<sup>55</sup> A. T. Gewirtz, *et al.*, "*Helicobacter pylori* flagellin evades toll-like receptor 5-mediated innate immunity," *J. Infect. Dis.* **189**(10), 1914 (2004).

Ref Type: Journal

<sup>56</sup> S. K. Lee, *et al.*, "*Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5," *Microbes. Infect.* **5**(15), 1345 (2003).

Ref Type: Journal

<sup>57</sup> A. M. Torok, A. H. Bouton, and J. B. Goldberg, "*Helicobacter pylori* induces interleukin-8 secretion by Toll-like receptor 2- and Toll-like receptor 5-dependent and -independent pathways," *Infect. Immun.* **73**(3), 1523 (2005).

Ref Type: Journal

<sup>58</sup> R. Rad, *et al.*, "Extracellular and intracellular pattern recognition receptors cooperate in the recognition of *Helicobacter pylori*," *Gastroenterology* **136**(7), 2247 (2009).  
Ref Type: Journal

<sup>59</sup> V. J. Hofman, *et al.*, "Gene expression profiling in human gastric mucosa infected with *Helicobacter pylori*," *Mod. Pathol.* **20**(9), 974 (2007).  
Ref Type: Journal

<sup>60</sup> R. Rad, *et al.*, "Toll-like receptor-dependent activation of antigen-presenting cells affects adaptive immunity to *Helicobacter pylori*," *Gastroenterology* **133**(1), 150 (2007).  
Ref Type: Journal

<sup>61</sup> S. Hellmig, *et al.*, "Association study of a functional Toll-like receptor 4 polymorphism with susceptibility to gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma," *Leuk. Lymphoma* **46**(6), 869 (2005).  
Ref Type: Journal

<sup>62</sup> F. Ture-Ozdemir, *et al.*, "Association of polymorphisms of NOD2, TLR4 and CD14 genes with susceptibility to gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma," *Anticancer Res.* **28**(6A), 3697 (2008).  
Ref Type: Journal

<sup>63</sup> E. Garza-Gonzalez, *et al.*, "Assessment of the toll-like receptor 4 Asp299Gly, Thr399Ile and interleukin-8 -251 polymorphisms in the risk for the development of distal gastric cancer," *BMC. Cancer* **7**, 70 (2007).  
Ref Type: Journal

<sup>64</sup> T. Tahara, *et al.*, "Association of polymorphism of TLR4 and CD14 genes with gastroduodenal diseases in Japan," *Inflammopharmacology.* **15**(3), 124 (2007).  
Ref Type: Journal

<sup>65</sup> M. S. Wu, *et al.*, "Functional polymorphisms of CD14 and toll-like receptor 4 in Taiwanese Chinese with *Helicobacter pylori*-related gastric malignancies," *Hepatogastroenterology* **53**(71), 807 (2006).

Ref Type: Journal

<sup>66</sup> G. L. Hold, *et al.*, "A functional polymorphism of toll-like receptor 4 gene increases risk of gastric carcinoma and its precursors," *Gastroenterology* **132**(3), 905 (2007).

Ref Type: Journal

<sup>67</sup> B. R. Achyut, *et al.*, "Association of Toll-like receptor-4 (Asp299Gly and Thr399Ileu) gene polymorphisms with gastritis and precancerous lesions," *Hum. Immunol.* **68**(11), 901 (2007).

Ref Type: Journal

<sup>68</sup> I. Kato, *et al.*, "Polymorphisms in genes related to bacterial lipopolysaccharide/peptidoglycan signaling and gastric precancerous lesions in a population at high risk for gastric cancer," *Dig. Dis. Sci.* **52**(1), 254 (2007).

Ref Type: Journal

<sup>69</sup> P. Hofner, *et al.*, "Genetic polymorphisms of NOD1 and IL-8, but not polymorphisms of TLR4 genes, are associated with *Helicobacter pylori*-induced duodenal ulcer and gastritis," *Helicobacter.* **12**(2), 124 (2007).

Ref Type: Journal

<sup>70</sup> S. B. Moura, *et al.*, "Toll-like receptor (TLR2, TLR4 and TLR5) gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection in children with and without duodenal ulcer," *Microbes. Infect.* **10**(14-15), 1477 (2008).

Ref Type: Journal

<sup>71</sup> G. L. Hold, *et al.*, "CD14-159C/T and TLR9-1237T/C polymorphisms are not associated with gastric cancer risk in Caucasian populations," *Eur. J. Cancer Prev.* **18**(2), 117 (2009).

Ref Type: Journal

<sup>72</sup> M. T. Ng, *et al.*, "Increase in NF-kappaB binding affinity of the variant C allele of the toll-like receptor 9 -1237T/C polymorphism is associated with *Helicobacter pylori*-induced gastric disease," *Infect. Immun.* **78**(3), 1345 (2010).

Ref Type: Journal

<sup>73</sup> M. Camorlinga-Ponce, *et al.*, "Validation of a serologic test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and the immune response to urease and CagA in children," *Am. J. Gastroenterol.* **93**(8), 1264 (1998).

Ref Type: Journal

<sup>74</sup> E. Lorenz, *et al.*, "Association of TLR4 mutations and the risk for acute GVHD after HLA-matched-sibling hematopoietic stem cell transplantation," *Biol. Blood Marrow Transplant.* **7**(7), 384 (2001).

Ref Type: Journal

<sup>75</sup> S. Shiomi, *et al.*, "IL-17 is involved in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model," *Helicobacter.* **13**(6), 518 (2008).

Ref Type: Journal

<sup>76</sup> M. Aihara, *et al.*, "Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45," *Infect. Immun.* **65**(8), 3218 (1997).

Ref Type: Journal

<sup>77</sup> S. Maeda, *et al.*, "cDNA microarray analysis of *Helicobacter pylori*-mediated alteration of gene expression in gastric cancer cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**(2), 443 (2001).

Ref Type: Journal

<sup>78</sup> L. Mandell, *et al.*, "Intact gram-negative *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and *Helicobacter hepaticus* bacteria activate innate immunity via toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4," *Infect. Immun.* **72**(11), 6446 (2004).

Ref Type: Journal

<sup>79</sup> G. I. Perez-Perez, *et al.*, "Activation of human THP-1 cells and rat bone marrow-derived macrophages by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide," *Infect. Immun.* **63**(4), 1183 (1995).

Ref Type: Journal

<sup>80</sup> L. Hamann, *et al.*, "Toll-like receptor (TLR)-9 promotor polymorphisms and atherosclerosis," *Clin. Chim. Acta* **364**(1-2), 303 (2006).

Ref Type: Journal

<sup>81</sup> J. Houghton, *et al.*, "Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells," *Science* **306**(5701), 1568 (2004).

Ref Type: Journal

<sup>82</sup> K. A. Roth, *et al.*, "Cellular immune responses are essential for the development of *Helicobacter felis*-associated gastric pathology," *J. Immunol.* **163**(3), 1490 (1999).

Ref Type: Journal

<sup>83</sup> J. G. Fox, *et al.*, "Concurrent enteric helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces helicobacter-induced gastric atrophy," *Nat. Med.* **6**(5), 536 (2000).

Ref Type: Journal

<sup>84</sup> J. Calam, *et al.*, "How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage? Its effect on acid and gastrin physiology," *Gastroenterology* **113**(6 Suppl), S43-S49 (1997).

Ref Type: Journal

<sup>85</sup> J. C. Luo, *et al.*, "Tumor necrosis factor-alpha stimulates gastric epithelial cell proliferation," *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* **288**(1), G32-G38 (2005).

Ref Type: Journal

<sup>86</sup> S. Rakoff-Nahoum, *et al.*, "Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis," *Cell* **118**(2), 229 (2004).

Ref Type: Journal