



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Estudio de los grupos *01, *03, *04 y *05 de
locusDQA1 en pacientes mestizos Mexicanos con
enfermedades gastroduodenales

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

WENDY GUADALUPE VÁZQUEZ GONZÁLEZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ

ASESOR INTERNO

DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA

México D. F., Octubre 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 fue realizado en el
Laboratorio de Histocompatibilidad de la Unidad
de Investigación Médica en Inmunología del
Hospital de Pediatría CMN-SXXI del IMSS,
bajo la dirección de la Dra. en Ciencias
Martha Esthela Pérez Rodríguez
y la asesoría del Dr. en Ciencias
Rubén Marroquín Segura
de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

El presente trabajo recibió el apoyo del Fondo
para el Fomento de la Investigación (FOFOI)

IMSS 2002/110

Un agradecimiento muy especial a:

Dr. Rubén Marroquín Segura

Dra. Martha Esthela Pérez Rodríguez

M. en C. Araceli García del Valle

Dra. Raquel Retana Ugalde

M. en C. Juana Pérez Rosado

por sus acertados comentarios para mejorar mi trabajo.

Dedicatoria

Tengo que reconocer que este es el logro más grande de mi vida y quiero dedicárselo a las personas más importantes que forman parte de ella.

Ami madre gracias por educarme con amor y por enseñarme a luchar para superar cada una de mis metas. TE AMO MAMITA!!!!!!!!!!

Ami mama Tita, eres lo máximo gracias por defenderme de todos, porque muchas veces tú eras la única persona que me entendía, por consentirme, por cuidarme, por aconsejarme, por escucharme, por todo MIL GRACIAS!!!!!!!!!!

No creo que la vida me alcance para agradecerles todo lo que han hecho por mi y espero que dios me permita remunerarles un poco de todo el amor desinteresado que ustedes me han dado. Ustedes son el pilar de mi vida y sin ustedes yo no sería nadie. GRACIAS POR CREER EN MI!!!!!!!!!!

Amis hermanitos los cuales amo mucho Lucero, Ricardo y Flaquita los quiero mucho y estoy orgullosa de cada uno de ustedes.

Muy especialmente, a la nueva luz que ilumina mi nuestra vida, te quiero mucho Rubiquita, nunca pensé que un bebe pudiera cambiarte la manera de ver la vida. Te quiero mucho nena como si fueras mi propia hija.

Dra Martha Pérez gracias por aceptarme en su equipo de trabajo, por siempre apoyarme, por escucharme, creer en mi y darme toda su confianza. Quiero que sepa que en este tiempo que he trabajado con usted, he aprendido a quererla porque es además de una persona muy inteligente, es un ser humano maravilloso.

A mi querida Daniela y Eyerahi gracias amigas las quiero por entenderme y ayudarme, y gracias por hacer del laboratorio de HLA un espacio muy ameno para trabajar.

A todos mis compañeros de la universidad, con los cuales he vivido los momentos más divertidos de mi vida, en especial a Lupita, Fabiola, Achu, Conny, Pepe, Roy, Lesli, Carlitos, Ale, Olinka y Moisés, los quiero mucho chicos y gracias por todo.

A la UNAM por aceptarme como alumna, y en especial a mi segunda casa FES-Zaragoza por ser el lugar en el que me forme como profesionista y por supuesto a cada uno de los excelentes profesores que me dieron clase brindándome las armas para defenderme en el campo laboral. GRACIAS!!!!!!!!!!

Índice

Resumen	1
Introducción	2
Marco teórico.....	3
Características microbiológicas	3
Curso de la infección	4
Progreso de la infección.....	4
Respuesta inmune a la infección.....	6
MHC de clase II y su relación con las enfermedades gastroduodenales	7
Complejo principal de histocompatibilidad	9
Localización del MHC	9
Estructura y función de las moléculas del MHC.....	11
Clase I.....	11
Clase II.....	11
Planteamiento del problema	13
Objetivos.....	14
Específicos	14
General	14
Hipótesis	15
Diseño experimental.....	16
Tipo de estudio.....	16
Población de estudio	16
Criterios de inclusión	16
Criterios de exclusión	17
Criterios de eliminación.....	17
Variables	17
Dependientes	17
Independientes.....	17
Material y Método	18
Material Biológico	18
PCR-SSP	18
Diagrama de flujo	19
Diseño estadístico	20
Resultados.....	21
Iniciadores diseñados	21
Estandarización.....	22
Condiciones de reacción.....	22
Condiciones de amplificación.....	22
Discusión de resultados	34
Conclusión	36
Propuestas y/o recomendaciones.....	37
Referencias	38

Resumen

H. pylori es un factor preponderante para el desarrollo de enfermedades gastroduodenales. Se ha propuesto además que, genes del complejo principal de histocompatibilidad, como el gen DQA1, confieren susceptibilidad o resistencia, tanto a la adquisición de la infección como al subsecuente desarrollo de estos padecimientos. En la tipificación alélica de DQA1 los kits comerciales sólo estudian el exón 2. Sin embargo, no es posible determinar algunos alelos pertenecientes a los grupos *01, *03, *04 y *05 a causa de tener la misma secuencia en este exón. Con el propósito de tipificar los alelos de estos grupos en muestras de pacientes (389) y controles (145), se analizaron el exón 1 y 3 mediante la técnica de PCR-SSP. La distribución de los pacientes fue de 200 con gastritis superficial (GS), 83 con metaplasia intestinal (MI), 54 con cáncer gástrico (CG) y 52 con úlcera duodenal (UD). El grupo control se denominó como grupo asintomático. Se observó mayor frecuencia de los alelos DQA1*01:01 y DQA1*05:01:01 en metaplasia intestinal. Así mismo, la frecuencia del alelo DQA1*04:01:01 fue elevada en cáncer gástrico. Por otra parte, los genotipos DQA1*01:01/DQA1*02:01 y DQA1*03:01:01/DQA1*04:01:01 muestran una frecuencia elevada en metaplasia intestinal, mientras que el genotipo DQA1*01:01/DQA1*04:01:01 presenta la misma tendencia en cáncer gástrico. En conclusión, nuestros resultados junto con la evidencia publicada en la literatura, apoyan que los alelos pertenecientes a los grupos *01, *04 y *05 del *locus* DQA1 participan en la susceptibilidad o resistencia al desarrollo de enfermedades gastroduodenales derivadas de la infección.

Introducción

H. pylori coloniza el estómago del 50 al 80% de la población adulta Mexicana y es el agente causal de gastritis crónica, gastritis atrófica, úlceras duodenales, úlceras gástricas o linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) y cáncer gástrico. Sin embargo, solo el 10% de los pacientes afectados desarrollaran úlceras gástricas o duodenales y aproximadamente el 1% cáncer gástrico. Motivo por el cual se mencionan la existencia de factores propios de la bacteria, ambientales y del hospedero, como variables en el desarrollo de la enfermedad.

Al respecto, en población japonesa se ha reportado al alelo DQA1*01:02 como un factor genético de riesgo al desarrollo de gastritis atrófica, cáncer gástrico e incluso para la adquisición de la infección. En población Mexicana, se ha asociado la ausencia del alelo DQA1*05:03 como un factor de riesgo para el desarrollo de displasia de alto grado y de cáncer gástrico.

Anteriormente nuestro grupo de trabajo estudió el complejo principal de histocompatibilidad de clase II con la finalidad de determinar la asociación entre los polimorfismos del gen DQA1 y la evolución de las lesiones gástricas asociadas a *H. pylori* en pacientes Mexicanos. Sin embargo, para la tipificación del *locus* DQA1 se analizó solo el exón 2, en el cual no es posible diferenciar entre alelos de los grupos *01 (*01:01, *01:04 y *01:05), *03 (*03:01, *03:02 y *03:03), *04 (*04:01 y *04:02) y *05 (*05:01:01, *05:03 y *05:05), por lo que el estudio de los exones 1 y 3 permitiría distinguir entre los alelos antes mencionados; brindando mejor información que haga posible evidenciar la asociación entre presencia de estos alelos con una resistencia o susceptibilidad al desarrollo de enfermedades gastroduodenales a partir de la infección por *H. pylori*.

Marco teórico

Características microbiológicas

H. pylori coloniza el estómago y es el agente causal de gastritis crónica, gastritis atrófica, úlceras duodenales, úlceras gástricas o linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT). Adicionalmente, estudios epidemiológicos y estadísticos han asociado la infección crónica de esta bacteria con un riesgo elevado, de 75%, de desarrollo de malignidad gástrica. Así, la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer, organismo perteneciente a la OMS, ha caracterizado a este patógeno como carcinógeno de clase I.^{1,2}

H. pylori cuenta con la habilidad específica de colonizar el epitelio gástrico, causando la infección bacteriana más común a nivel mundial.^{1,2}

H. pylori es una bacteria Gramnegativa, en forma de espiral, de aproximadamente $0.5 \times 5 \mu\text{m}$ de longitud, que cuenta con 5 a 7 flagelos polares, además de ser microaerofílica.^{3,4}

Los factores críticos que permiten que la bacteria colonice y sobreviva en el hospedero incluyen su habilidad para producir una gran cantidad de ureasa la cual hidroliza la urea a amonio y dióxido de carbono y por lo tanto es vital para la neutralización del ácido del estómago, la presencia de flagelos que le permiten a la bacteria moverse, navegar y persistir colonizando la capa mucosa que recubre el epitelio gástrico y la habilidad de la bacteria para producir enzimas que deterioran la capa surfactante sobre el epitelio gástrico lo que permite tener acceso a los componentes nutricionales en el hospedero.⁵

Además de los factores de virulencia anteriormente mencionados, hay evidencia de que algunos otros factores correspondientes a la bacteria parecen promover el desarrollo de

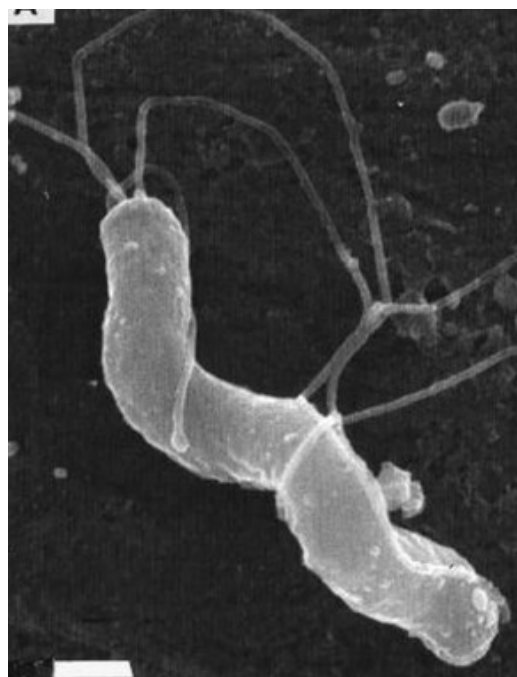


Fig 1. Morfología de *Helicobacter pylori* (Tomado de Mobley, 2001)

enfermedades gastroduodenales de mayor severidad, por ejemplo, las cepas que expresan los genes *cagA* y *vagA* están fuertemente asociados a la carcinogénesis gástrica.⁵

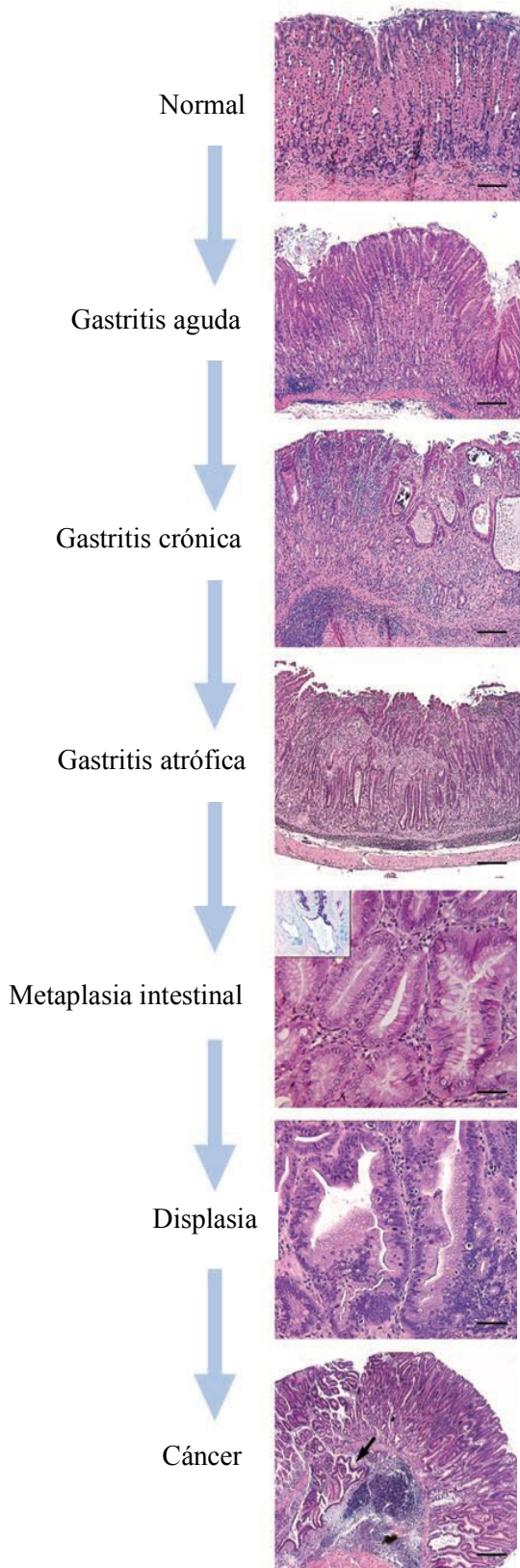
Curso de la infección

El curso natural de la infección es extremadamente variable. La infección es adquirida en edades tempranas de la vida y esta permanece en una larga fase quiescente donde persiste una gastritis crónica de variable intensidad sin o con mínima sintomatología, no presentándose enfermedades gastroduodenales sino varias décadas después de la infección.^{3,5}

La enfermedad de úlcera peptídica tiende a desarrollarse en pacientes de 20 a 30 años, mientras que el cáncer gástrico aparece varias décadas después. Sin embargo, las enfermedades gastroduodenales no se presentan en todos los individuos que adquirieron la infección. Sólo de un 10% de individuos infectados desarrollará úlcera peptídica y el riesgo estimado para el desarrollo de cáncer es del aproximadamente el 1%. Lo que deja a entrever que la infección no es suficiente para inducir el desarrollo de trastornos gastroduodenales sino que ésta solo participa como un importante factor de riesgo. Por lo que el desarrollo de trastornos gastroduodenales es producto de la participación variable de factores de tipo ambiental, de la bacteria y del hospedero.^{3,5}

Progreso de la infección

Las interacciones de *H. pylori* con el hospedero son una serie de eventos complejos que inducen a la patogénesis mientras permite que la bacteria persista. La conexión al epitelio, a través de múltiples factores de virulencia, induce una respuesta inmune proinflamatoria severa de la mucosa y una respuesta inmune local y sistémica. Estas respuestas pueden afectar la viabilidad de la célula del hospedero y conduce a uno de dos eventos mutuamente exclusivos: mientras la excesiva producción de ácido conduce a la ulceración, la inflamación crónica conduce a la atrofia de la pared del estómago y a crecimientos malignos anormales.^{3,5,6}



El resultado de la infección depende de la severidad y de la distribución anatómica de la gastritis adquirida después de la infección.^{3, 5, 6}

Los pacientes infectados que desarrollan una ligera gastritis en el cuerpo y el antro estomacal cursan con una secreción de ácido que es casi normal y generalmente no se desarrolla ninguna secuela de gravedad.^{3, 5, 6}

Las úlceras gástricas son asociadas a gastritis predominantes en el pan o en el cuerpo del estómago, con niveles normales o reducidos de ácido, y las úlceras usualmente surgen entre la mucosa del cuerpo y el antro, una zona de inflamación intensa.^{3, 5, 6}

Las úlceras duodenales surgen en un contexto de gastritis predominante en el antro, esto causa hipergastrinemia y elevada producción de ácido desde el cuerpo gástrico sano después de una estimulación

Fig 2. Progresión histológica de cáncer gástrico inducido por *H. pylori* en modelo de ratón. **Normal:** Histología del cuerpo del estómago. **Gastritis aguda:** Infiltración de la mucosa y submucosa gástrica con linfocitos y polimorfonucleares acompañados por ligeros defectos en la mucosa y edema. **Gastritis crónica:** Inflamación de moderada a severa con marcados defectos en las células epiteliales incluyendo dilatación y mineralización de glándulas. **Gastritis atrófica:** Inflamación crónica con fibrosis focal y completa pérdida células parietales. **Metaplasia intestinal:** Metaplasia del epitelio gástrico hacia un fenotipo intestinal caracterizado por la elongación columnar que ocasionalmente forman células calciformes y producen una mezcla de mucinas ácidas (azul, tipo intestinal) y neutras (roja, tipo gástrico) cuando se hace una tinción con Azul Alcian/PAS. **Displasia:** Arquitectura irregular frecuentemente formada por estructuras tubulares compactas llamadas adenomas. Los cambios atípicos se observan tanto en la célula como en núcleo. **Cáncer:** Neoplasia intraepitelial gástrica (Tomado de Fox, 2007).

hormonal o por alimentos.^{3, 5, 6}

Las úlceras duodenales ocurren comúnmente a mediana edad mientras que las úlceras gástricas típicamente afectan a personas de edad más madura.^{3, 5, 6}

El duodeno desarrolla metaplasia presumiblemente en respuesta a carga elevada de ácido y probablemente la mucosa duodenal puede ser colonizada por la bacteria como resultado de la inflamación y ulceración.^{3, 5, 6}

El adenocarcinoma gástrico ha sido clasificado en dos tipos: el más común es el de tipo intestinal (o adenocarcinoma diferenciado) mientras que el menos común es el de tipo difuso (indiferenciado), el cual es más rápidamente progresivo y tiende a ocurrir en adultos jóvenes.^{3, 5, 6}

El cáncer difuso surge en un contexto de una gastritis inducida por la bacteria por todo el estómago sin causar atrofia, pero esto no ha sido bien estudiado.^{3, 5, 6}

El cáncer de tipo intestinal surge en el contexto de gastritis predominante en el cuerpo del estómago, por lo que este tipo de cáncer puede ser el estado final de una progresión a través de una serie de pasos discretos conocidos como vía Correa que abarca desde gastritis simple e hipoclorhidria hasta gastritis atrófica, metaplasia, displasia y carcinoma. El desarrollo de atrofia gástrica definida como una pérdida de las estructuras glandulares de la mucosa del estómago como resultado de la inflamación crónica permanente es reconocido como un paso crítico en esta vía para al desarrollo de cáncer gástrico, por lo que es reconocido un mejor indicador de riesgo al desarrollo de cáncer.^{3, 5, 6}

Respuesta inmune a la infección

Aunque cada día ingerimos una vasta cantidad de microorganismos, la mayoría no puede colonizar nuestro estómago debido al repertorio de propiedades antibacteriales de éste. Una de las más importantes es la acidez. Bajo condiciones normales el pH del lumen gástrico es menor de 2 lo cual previene la proliferación bacteriana dentro de la capa de la mucosa gástrica. Sobre las células epiteliales, existe un gradiente de pH que va de 2 en la superficie luminal a entre 5 y 6 en la superficie de las células epiteliales. Después de entrar al estómago, la bacteria penetra la mucosa gástrica y por ello encuentra un ambiente menos ácido que el de lumen. El 80 al 90% de la población bacteriana se queda nadando

libremente dentro de esta capa mucosa, mientras que el otro 10 al 20% se encuentra en contacto con las células epiteliales. *H. pylori* típicamente no atraviesa la barrera epitelial por lo que es clasificado como una bacteria extracelular no invasiva.⁷

La infección inicialmente induce la activación de la respuesta inmune del hospedero, debido a que algunos antígenos derivados de la bacteria son reconocidos por los receptores tipo Toll (TLRs), así como por los receptores Nod (NLRs) de las células de la respuesta inmune tales como macrófagos, células dendríticas y epiteliales. La activación de los receptores mencionados genera la posterior respuesta inmune adaptativa caracterizada, al tratarse de una bacteria extracelular, por la fagocitosis, procesamiento y presentación sobre las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC II), de péptidos antigénicos sobre la superficie de las denominadas células presentadoras de antígenos, APC.^{3,4} De ahí que muchos estudios han notado que la respuesta inmune esta polarizada y que la población de células CD4+ en la mucosa gástrica de personas infectadas se encuentre elevada y por consiguiente también la producción de citoquinas Th1.^{8,9,10}

MHC de clase II y su relación con enfermedades gastroduodenales

La diferencia en los resultados clínicos desarrollados a partir de la infección y su presencia solo en una baja proporción de los pacientes infectados son el motivo por el cual se mencionan la existencia de factores propios de la bacteria, ambientales, y del hospedero como variables en el desarrollo de la enfermedad.¹¹

Entre los factores correspondientes al hospedero, estudios inmunogenéticos sugieren que el polimorfismo del gen HLA-DQA1 confiere susceptibilidad o resistencia tanto a la adquisición de la infección así como al desarrollo de secuelas graves derivadas de la dicha infección.¹¹

Hace trece años, en 1998, un estudio de genotipificación de este gen en población japonesa arrojó que la frecuencia del alelo DQA1*01:02 fue significativamente menor en pacientes positivos a la infección con gastritis atrófica y adenocarcinoma gástrico tipo intestinal que en los controles. Por lo que la ausencia de este alelo puede ser un factor

genético de riesgo para el hospedero en el desarrollo de gastritis atrófica y cáncer gástrico de tipo intestinal en esta población.¹²

Los resultados obtenidos mediante una investigación realizada por otro grupo de trabajo dirigido por Magnusson y colaboradores en población caucásica coinciden con los del grupo de Azuma y colaboradores, al aspecto de aseverar que este alelo se asocia con la protección al desarrollo de cáncer gástrico y añaden que también le brinda al hospedero resistencia a la infección por *H. pylori*.¹³

También en población japonesa, se reportó que el gen DQA1*01:02:01 esta inversamente relacionado con el desarrollo de gastritis, úlcera gástrica y úlcera duodenal.¹⁴

Por último y en esta misma dirección, el alelo DQA1*02:01 fue reportado menos frecuente en pacientes con carcinoma de colon comparado con los controles sanos, por lo que la ausencia de este gen puede considerarse como un factor de riesgo para el desarrollo de este tipo carcinoma en población caucásica que tiene la infección.¹⁵

En contraste, han sido reportado varios alelos de este gen como factores de susceptibilidad. Por ejemplo, la existencia del alelo DQA1*01:03 está directamente relacionado con el desarrollo de linfoma de MALT en población japonesa.¹⁶ Así mismo, el alelo DQA1*01:04 ha sido asociado con la susceptibilidad a la infección en niños de origen chino y vietmanita.¹⁷ Por último, el alelo DQA1*05:05 ha sido involucrado con la susceptibilidad al desarrollo de gastritis atrófica crónica en población japonesa.¹⁸

En lo que respecta a la población Mexicana el estudio desarrollado en Nuevo León por Garza-González caracterizó la ausencia del alelo DQA1*05:03 como un factor de riesgo para el desarrollo displasia de alto grado y de cáncer gástrico.¹¹

Contrastando con ambas partes, la investigación de la contribución de los alelos DQA1*01:02 y DQA1*03:01 a la infección por *H. pylori* y la enfermedad ulcerosa péptica se demostró que ser portador ellos no modifica ni la susceptibilidad a la infección ni su evolución a úlcera péptica en una población caucásica del sur de Europa.¹⁹

Complejo principal de histocompatibilidad (MHC)

Localización del MHC

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC) se encuentra dentro del brazo corto del cromosoma 6 en la posición 21.3, abarca aproximadamente 4Mb y codifica para aproximadamente 224 genes dentro de los cuales se encuentran genes de vital importancia en la regulación del sistema inmune así como algunos indispensables para llevar a cabo procesos celulares esenciales.^{20, 21, 22}

El MHC se encuentra dividido en tres regiones principales: la región de clase I, más próxima al telómero seguido por la región de clase III y la región de clase II.²⁰

La región de clase I contiene genes clásicos y no clásicos. Los genes no clásicos son diferenciados de los genes clásicos en base a que éstos tienen polimorfismo limitado; la distribución tisular de la expresión de estos genes es restringida y ellos parecen tener un rol menos definido en la medicina del trasplante. Hay 19 genes dentro del locus del HLA de clase I, donde 3 son genes clásicos (HLA-A, HLA-B y HLA-C), 3 no clásicos (HLA-E, HLA-F y HLA-G) y 13 genes no codificantes o pseudogenes (HLA-S/17, HLA-X, HLA-N/30, HLA-L/92, HLA-J/59, HLA-80, HLA-21, HLA-K/70, HLA-16, HLA-H/54, HLA-90 y HLA-75), localizados dentro de tres bloques duplicados separados, designados como bloques α , β y κ .²⁰

Hay además 7 genes MIC, son genes parecidos a los de HLA de clase I, distribuidos en los tres bloques de duplicación de los cuales solo los dos localizados en el bloque β son expresados.²⁰

La región de clase III, se encuentra localizada entre las regiones de clase I y II. Esta región no es tan bien conocida como las regiones I y II pero contiene los genes algunos de los factores del complemento (C2, C4 y CFB), genes de algunas citoquinas (TNF, LTA y LTB) y muchos otros genes sin relación obvia con las funciones del sistema inmune y la inflamación. Muchos de los productos de los genes de clase III son de vital importancia en

los procesos celulares, tal como la regulación de la transcripción (BAT1, VARS, RDBO, STK19, SKIV2L, CREBL1, y PBX2), mantenimiento celular, (DOM3Z, NEU1, AGPAT1, CL1C1 y CSNK2B), biosíntesis, transporte de electrones y actividad hidrolasa (PPT2, DDAH2 y ATP6V1G2), interacciones proteína-proteína tanto intracelulares como intercelulares, función chaperona y señalización (C6orf46, HSPA1A, HSPA1B, BAT3, BAT8, AGER, RNF5, FKRPL, TNXB y NOTCH4).²⁰

La región de clase II comprende 0.7Mb de DNA y contiene los genes clásicos de las cadenas alfa y beta, HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ los cuales son expresados en las células presentadoras de antígenos para presentar péptidos a los linfocitos T cooperadores.²⁰ Además de los genes clásicos, en esta región contiene genes no clásicos como HLA-DM y HLA-DO.²⁰

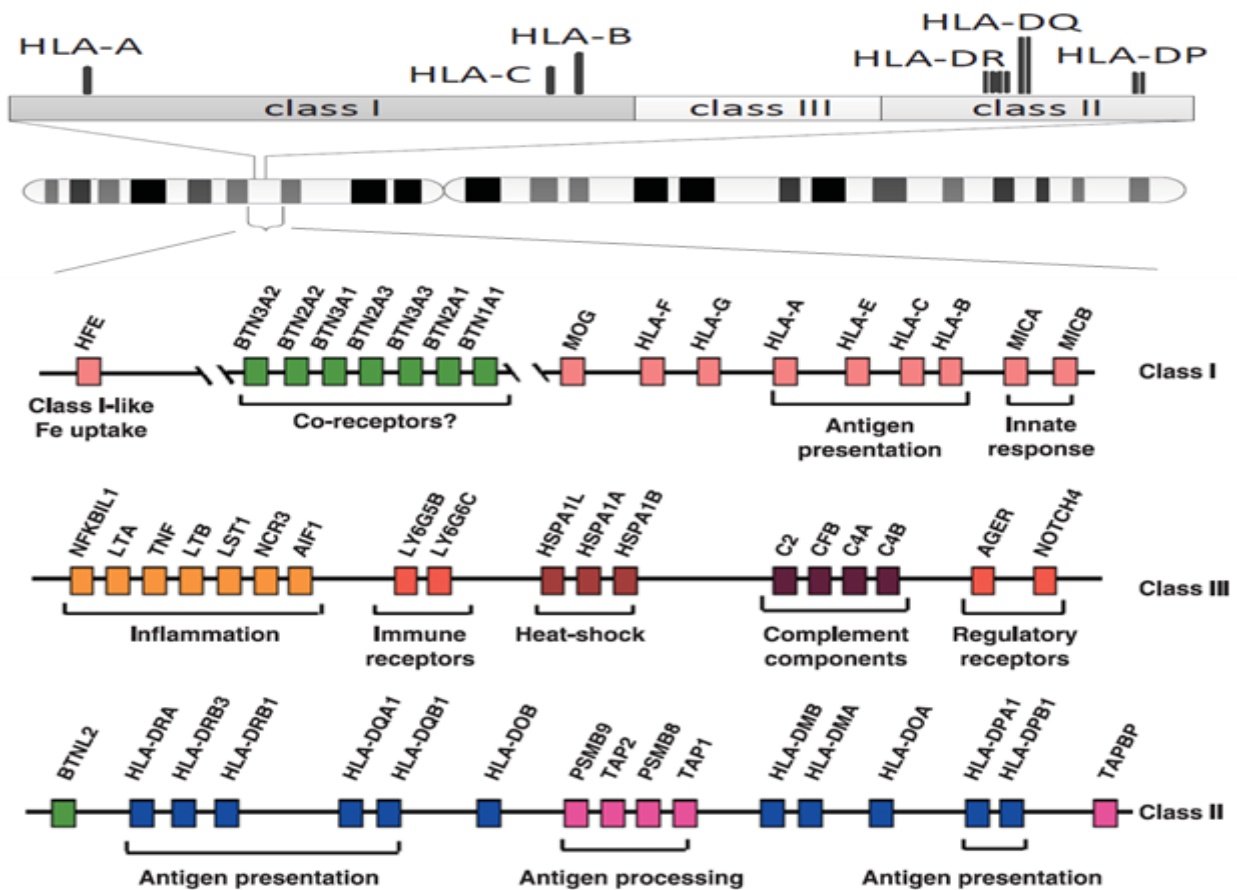


Fig 3. Localización, organización y estructura genética del Complejo Principal de Histocompatibilidad humano sobre el cromosoma 6 (Modificado de Traherne, 2008)

ructura y función de las moléculas del MHC

Las proteínas MHC pueden subdividirse en dos grupos principales: las moléculas MHC de clase I y clase II, ambas presentan estructuras muy similares pues son heterodímeros transmembranales cuyos dominios extracelulares amino terminales se unen al antígeno para su presentación a las células T.²³

Clase I

Las moléculas MHC de clase I se expresan prácticamente en todas las células nucleadas, posiblemente debido a que las células T citotóxicas deben ser capaces de concentrarse en cualquier célula del cuerpo que haya sido infectada por un microorganismo intracelular. La molécula HLA de clase I está compuesta de una cadena pesada glicosilada de 45 kD (denominada α) que está dividida en tres dominios extracelulares globulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ cada uno con no más de 90 aminoácidos de largo), una región transmembranal y una cola citoplasmática, codificados cada uno por exones diferentes. Todas las cadenas α están asociadas de forma no covalente a una pequeña proteína extracelular no glicosilada denominada $\beta 2$ -microglobulina de 12 kD no polimórfica que no atraviesa la membrana y esta codificada por un gen que no pertenece al grupo de genes MHC, localizado dentro del cromosoma 15. Los dos dominios amino terminales de la cadena α , ($\alpha 1$ y $\alpha 2$) que son los más alejados de la membrana, se unen al péptido antigénico de 8 a 10 residuos de aminoácidos y contienen los aminoácidos polimórficos que son reconocidos por las células T mientras el dominio carboxilo está formado por la cola citoplasmática.^{23,24}

Clase II

El MHC II es expresado como glicoproteínas transmembrana tipo I encontradas principalmente en la superficie de células especializadas del sistema inmune como células B, macrófagos y otras células presentadoras de antígenos (APC), que extraen los antígenos del líquido extracelular e interactúan con las células T CD4⁺ colaboradoras. Estas son moléculas heterodiméricas asociadas no covalentemente, constituidos por cadenas alfa de 35kDa y las beta de 28 kDa codificadas por separado en los genes A y B respectivamente.

Estas glicoproteínas contienen dominios externos, un segmento transmembranal y un segmento citoplasmático. La estructura general que adopta las moléculas de clase II se logra debido a la asociación de las cadenas alfa y beta. La parte extracelular de la molécula del MHC II se pliega de tal manera que crean un surco alargado compuesto de dos hélices alfa unidas por ocho cadenas betas plegables. El surco contiene una longitud nueve uniones en los que se anclan las cadenas laterales del péptido. Las uniones 1, 4, 6 y 9 son consideradas como principales mientras que las otras posiciones son superficiales y secundarias. Considerando que los extremos del surco, del MHC II, están abiertos este puede acomodar péptidos de 13 a 20 aa, mucho más largos que los que se enlazan a las moléculas de clase I. El elevado polimorfismo de los genes del MHC, produce un complejo hipervariable, por lo cual el sistema inmune se encarga de diferenciar las células propias de las que no lo son.^{24, 25}

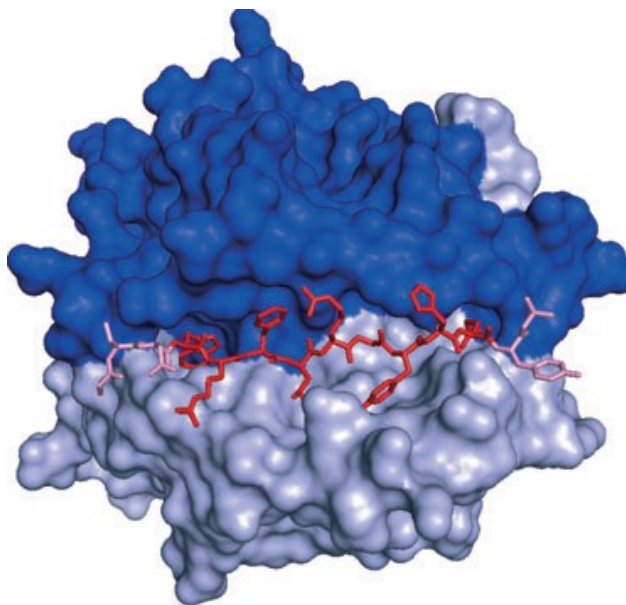


Fig 4. Estructura cristalina del complejo (MHC) claseII (HLA-DRB1 *0101) y el péptido procesado. El MHC de la cadena α se muestra en azul oscuro, y la cadena β en azul claro. El péptido (GSDWRFLRGYHQYA) se muestra en rojo, con el núcleo de unión al péptido (WRFLRGYHQ) en rojo, y los aminoácidos que flanquean en color rosa (Tomado de Nielsen, 2010).

Planteamiento del problema

Helicobacter pylori es un carcinógeno tipo uno que presenta una seroprevalencia de 50 al 80 % en la población adulta Mexicana. La infección es adquirida durante la niñez y puede persistir por toda la vida en ausencia de un tratamiento adecuado. La colonización de *H. pylori* en el estómago causa gastritis crónica, esta infección inicial puede perdurar por décadas sin ninguna sintomatología o evolucionar a enfermedades más severas como úlcera duodenal, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT) o adenocarcinoma gástrico. Aunque la incidencia del desarrollo de cáncer gástrico pos infección es baja (aproximadamente del 1%), a nivel mundial, el cáncer gástrico es el cuarto tipo de cáncer más común, representando la segunda causa de muerte por neoplasias malignas y cobrando aproximadamente 700,000 vidas al año. En México, el adenocarcinoma gástrico representa el quinto tipo de cáncer más común. El cáncer gástrico es una enfermedad multifactorial y la infección por *H. pylori* es un factor de riesgo para su desarrollo, sin embargo, se han propuesto otros factores de susceptibilidad como factores ambientales, alimentación y genética. En este último, existen estudios enfocados al polimorfismo de moléculas de clase II que apoyan su participación en el desarrollo de estas enfermedades gastroduodenales pos infección.

¿Los alelos pertenecientes a los grupos *01 (*01:01, *01:04 y * 01:05), *03 (*03:01:01,*03:02 y *03:03), *04 (*04:01:01 y *04:02) y *05 (*05:01:01, *05:03 y *05:05) del *locus* DQA1 participan en la susceptibilidad o resistencia al desarrollo de enfermedades gastroduodenales en pacientes infectados por *H. pylori*?

Hipótesis

De acuerdo con los múltiples estudios que evidencian la participación del MHC de clase II en el desarrollo de enfermedades gastroduodenales en pacientes infectados por *H. pylori* suponemos que, los alelos pertenecientes a los grupos *01 (*01:01, *01:04 y *01:05), *03 (*03:01:01, *03:02 y *03:03), *04 (*04:01:01 y *04:02) y *05 (*05:01:01, *05:03 y *05:05) del *locus* DQA1 participarán en la susceptibilidad o resistencia al desarrollo de las mismas.

Objetivos

General

- Tipificar los alelos pertenecientes a los grupos *01 (*01:01, *01:04 y * 01:05), *03 (*03:01:01, *03:02 y *03:03), *04 (*04:01:01, y *04:02) y *05 (*05:01:01, *05:03 y *05:05) del *locus* DQA1 en pacientes mestizos Mexicanos con enfermedades gastroduodenales

Específicos

- Analizar si los alelos de los grupos *01, *03, *04 y *05 del *locus* DQA1 están relacionados con el desarrollo de enfermedades gastroduodenales
- Distinguir los alelos de los grupos *01, *03, *04 y *05 del *locus* DQA1 del grupo asintomático
- Conocer la frecuencia de los alelos del *locus* DQA1 en la población del D.F.
- Desarrollo de la técnica PCR-SSP en el análisis del exón 1 y 3 del *locus* DQA1

Diseño experimental

Tipo de estudio

Es un estudio de casos y controles

Población de estudio

Pacientes

Se estudiaron 389 DNAs de pacientes mayores de 30 años con padecimientos gastroduodenales previamente clasificados en 200 con gastritis superficial (GS), 83 con metaplasia intestinal (MI), 54 con cáncer gástrico (CG) y 52 con úlcera duodenal (UD), de acuerdo al diagnóstico de histología (clasificación de Sydney). Todas las muestras provienen del Hospital General de México SSA y el Hospital de Oncología del IMSS.

Asintomáticos

Se estudiaron 145 DNAs de donadores mayores de 30 años, sin reporte de enfermedades gástricas y/o sintomatología, sin antecedentes familiares de enfermedades asociadas al MHC y sin antecedentes familiares de cáncer, de los Bancos de Sangre del Hospital General Regional No. 25 y del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Criterios de inclusión

- Muestras que hayan sido clasificadas con HLA de clase II dentro de los grupos *01, *03, *04 y *05 del *locus* DQA1
 - DNA de buena calidad
 - DNA con concentración mayor a 200ng/μL
 - DNA con volumen igual o mayor a 100μL
-

- DNA que pertenezca al grupo asintomático (cumpliendo con las especificaciones mencionadas en la sección anterior)
- DNA que pertenezca a pacientes (cumpliendo con las especificaciones mencionadas en la sección anterior)

Criterios de exclusión

- DNA degradado
- DNA con concentración menor a 200ng/ μ L
- DNA con volumen menor a 100 μ L

Criterios de eliminación

- Muestra con resultados incompletos de los alelos de DQA1
- Muestras que no amplifiquen mediante la reacción de PCR-SSP con ninguno de los iniciadores

Variables

Variables independientes

- Polimorfismo del gen HLA-DQA1
- *H. pylori*

Variable dependiente

- Enfermedad gastroduodenal
-

Material y Métodos

Material biológico

Muestras de DNA genómico obtenidas mediante la técnica de *salting out* de Miller a partir de leucocitos de sangre periférica.

PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers*)

La reacción en cadena de la polimerasa mediante el uso de iniciadores de secuencia específica es un sistema de tipificación aplicable para la identificación de los alelos con base en el polimorfismo que presenta. Esta metodología se aplica en el estudio de alelos de clase I y II del MHC que pertenecen a esta región.

Esta técnica se realiza con, como su nombre lo indica, iniciadores de secuencia específica y para ello ambos iniciadores deben unirse específicamente a la región de DNA blanco, sobre todo el extremo 3', sin presentar ningún desajuste. Por lo tanto, solo si los iniciadores corresponden con la secuencia blanco se obtiene la amplificación. La presencia o ausencia de amplificación es detectada mediante electroforesis en gel de agarosa y se visualiza por la incorporación de bromuro de etidio o sustitutos.

PCR-SSP

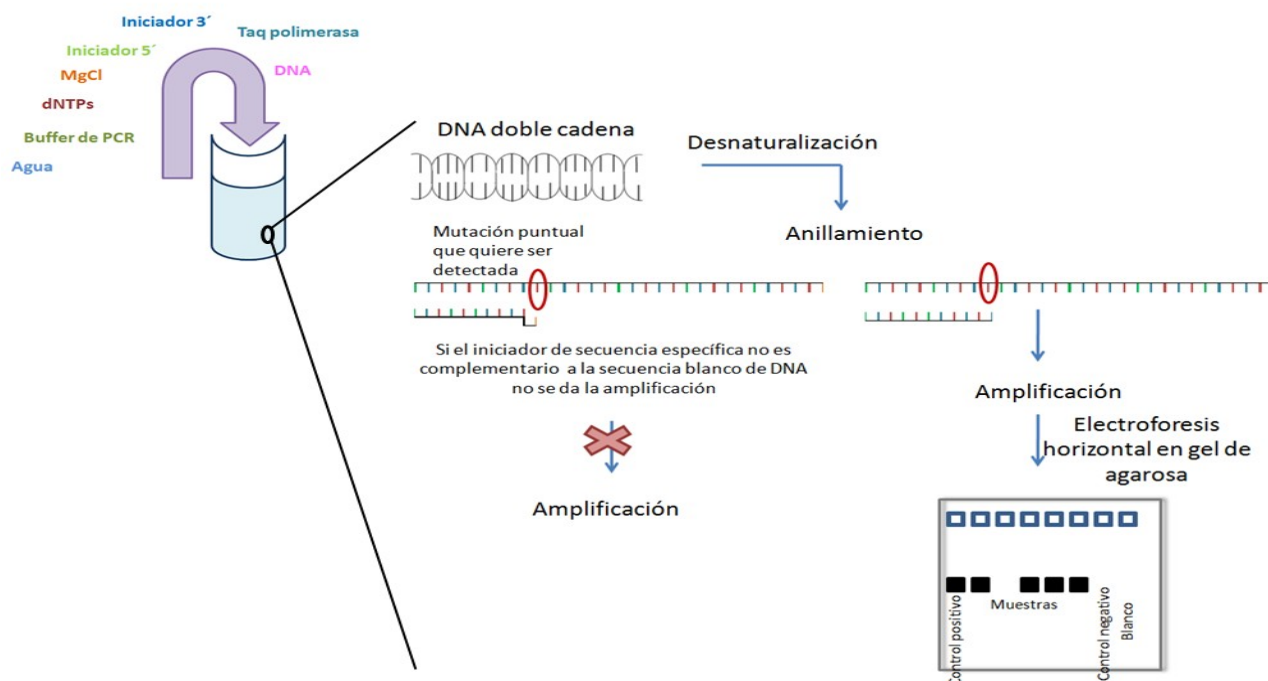
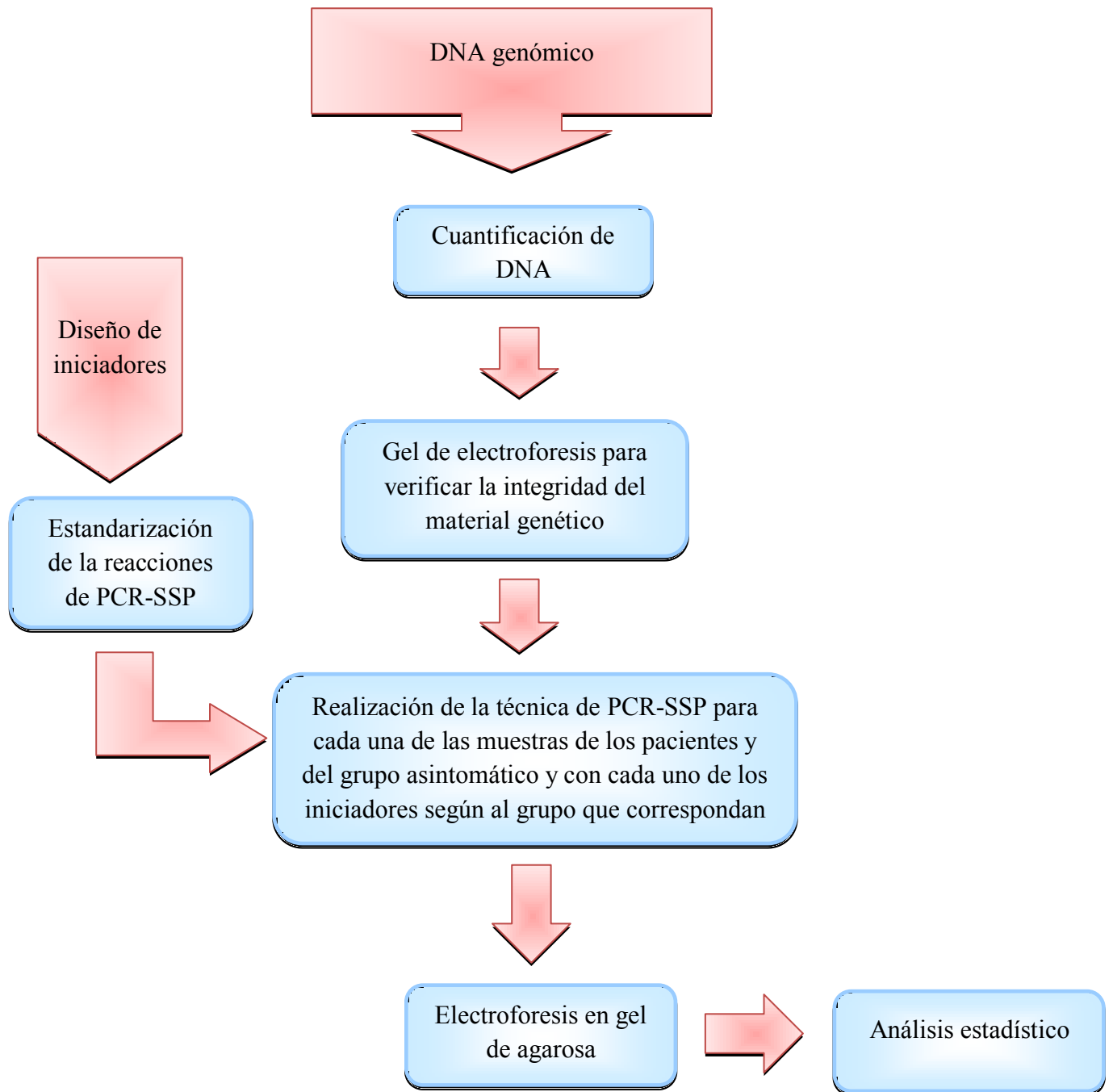


Diagrama de Flujo



Análisis estadístico

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los pacientes con GS, CG y UD se compararon contra los sujetos con GS y los asintomáticos. Las diferencias fueron evaluadas estadísticamente mediante la prueba de χ^2 con el programa estadístico EPIINFO. La magnitud de asociación fue valorada realizando análisis de riesgos univariado con intervalo de confianza al 95%.

Resultados

Iniciadores diseñados

En la tabla 1 se presentan los iniciadores es que se utilizaron para la amplificación de alelos en los diferentes grupos de HLA-DQA1

Tabla 1. Iniciadores diseñados para la tipificación de alelos de los grupos *01, *03, *04 y *05

Nombre	Secuencia 5'→3'	Alelo analizado
Iniciador 1	GCC CTC GCT CTG ACC ACC GT	DQA1*01:01
Iniciador 2	GCC CTC GCT CTG ACC ACC GC	DQA1*01:04 y DQA1*01:05
Iniciador 3	TGA CCA CCA TGA TGA GCC CG	DQA1*01:01 y DQA1*01:04
Iniciador 4	TGA CCA CCA TGA TGA GCC CA	DQA1*01:05
Iniciador 5	TCG CCC TGA CCA CCG TGA G	DQA1*03:01:01 y DQA1*03:03
Iniciador 6	TCG CCC TGA CCA CCG TGA A	DQA1*03:02
Iniciador 7	CAC CTT CCT CCC TTC TGC T	DQA1*03:01:01
Iniciador 8	CAC CTT CCT CCC TTC TGC A	DQA1*03:02 y DQA1*03:03
Iniciador 9	CAG AAG GTG TTT CTG AGA A	DQA1*04:01:01
Iniciador 10	CAG AAG GTG TTT CTG AGA G	DQA1*04:02
Iniciador 11	AAG CTC TGA TGC TGG GGG C	DQA1*05:01:01 y DQA1*05:03
Iniciador 12	AAG CTC TGA TGC TGG GGA T	DQA1*05:05
Iniciador 13	TCA CCC TCC TCC CTT CTG C	DQA1*05:01:01 y DQA1*05:05
Iniciador 14	TCA CCC TCC TCC CTT CTT T	DQA1*05:03
Iniciador 3' Ex1	TCA TGC ACT CAC CCA CAA T	Alelos de los grupos *01,*03,*05
Iniciador 3' Ex 3	GAA AAC AAG TTT TGG GAT ATA	Alelos de los grupos *03,*05

Estandarización

Para la estandarizar cada par de iniciadores específicos se realizaron pruebas para determinar la temperatura y la concentración de cloruro de magnesio óptima para llevar a cabo la reacción. Del mismo modo, fueron determinadas las condiciones de amplificación óptimas para cada par.

Una vez estandarizada la reacción, se probó si las condiciones de reacción y amplificación eran reproducibles con las muestras a analizar.

Cada estandarización se llevó a cabo con una línea celular homocigota al alelo específico a analizar.

Condiciones de reacción

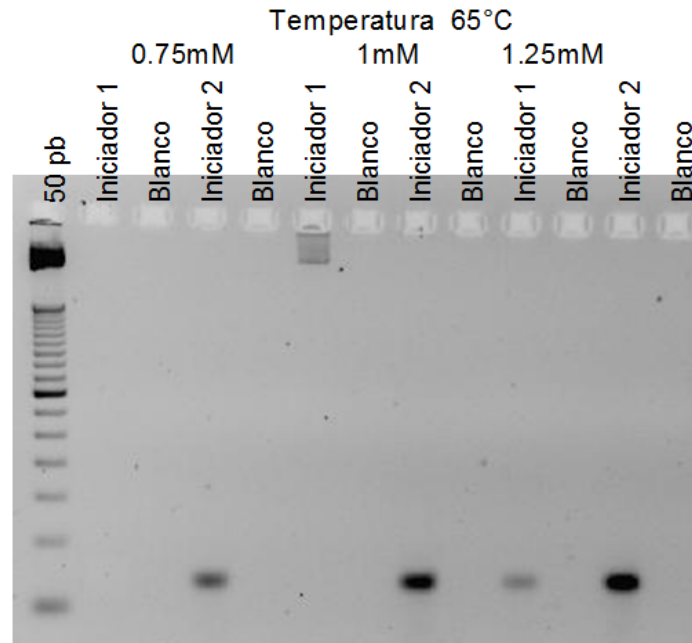
La tipificación fue realizada mediante la reacción de PCR-SSP en 25µl reacción (excepto para los iniciadores 13 y 14 que fue de 20µl) con 125ng de DNA, 1.25 UI de Taq polimerasa Invitrogene, California, USA, 12.5pmol de cada iniciador, 0.2mM de dNTPs y una concentración de MgCl₂ de 0.375mM en el caso de los iniciadores 3 y 4, 0.5mM en los iniciadores 5, 6, 11 y 12, 1mM para los iniciadores 1, 2, 13 y 14, 1.5mM para los iniciadores 9 y 10, y 2mM para los iniciadores 7 y 8.

Condiciones de amplificación

Las condiciones de amplificación fueron un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 4 minutos, seguido por 33 ciclos que constan de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, anillamiento por el mismo periodo de tiempo a 65°C para los iniciadores 1 y 2, 65.5°C para los iniciadores 3 al 6, 55.5°C para los iniciadores 7 y 8, 59.3°C para el 9 y 10, 62.9°C para 11 y 12, y elongación a 72°C por 30 segundos, la reacción se concluye con un ciclo final de amplificación a 72°C por 8 minutos más. En el caso de los iniciadores 13 y 14 las condiciones de amplificación fueron diferentes, se inició con un ciclo de desnaturalización igual al mencionado anteriormente, seguido por 30 ciclos que constaron de otro ciclo de desnaturalización por 1 minuto a la misma temperatura, anillamiento a 60°C por el mismo tiempo, y un periodo de elongación a 72°C por 3 minutos, para finalizar con un ciclo de elongación por 10 minutos a la misma temperatura.

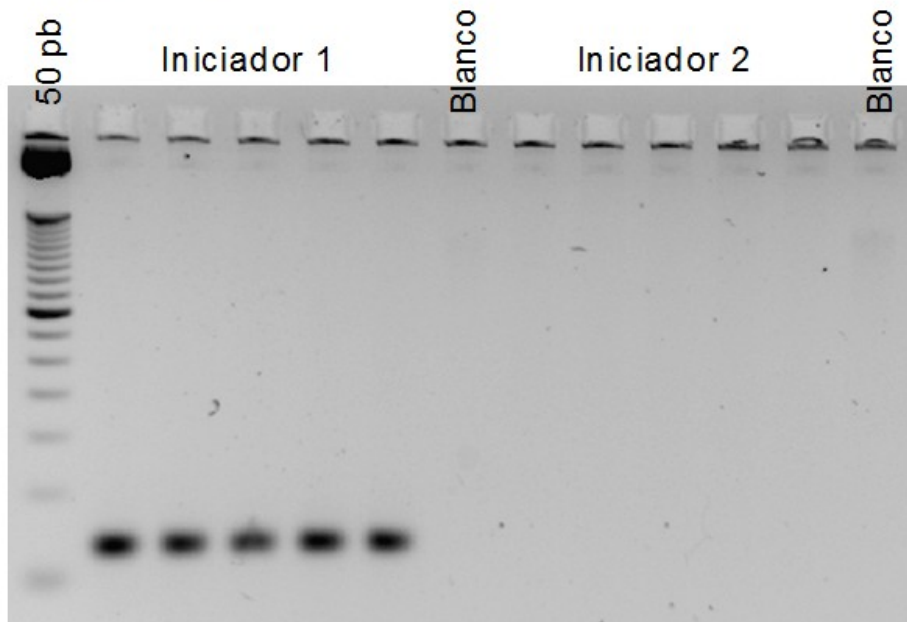
Grupo *01

Imagen 1. Estandarización de iniciadores 1 y 2



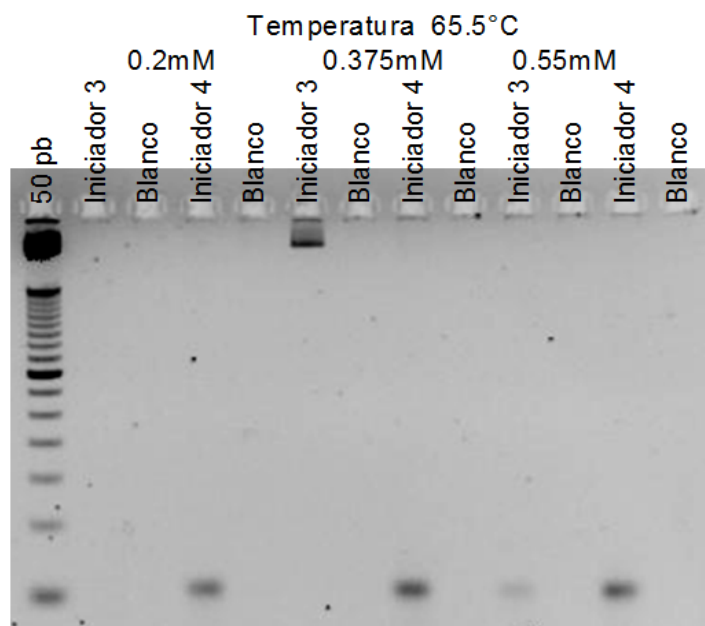
Fragmento 64pb
Iniciador 1 específico para *01:01
Iniciador 2 específico para *01:04 y *01:05

Imagen 2. Tipificación de muestras con iniciadores 1 y 2



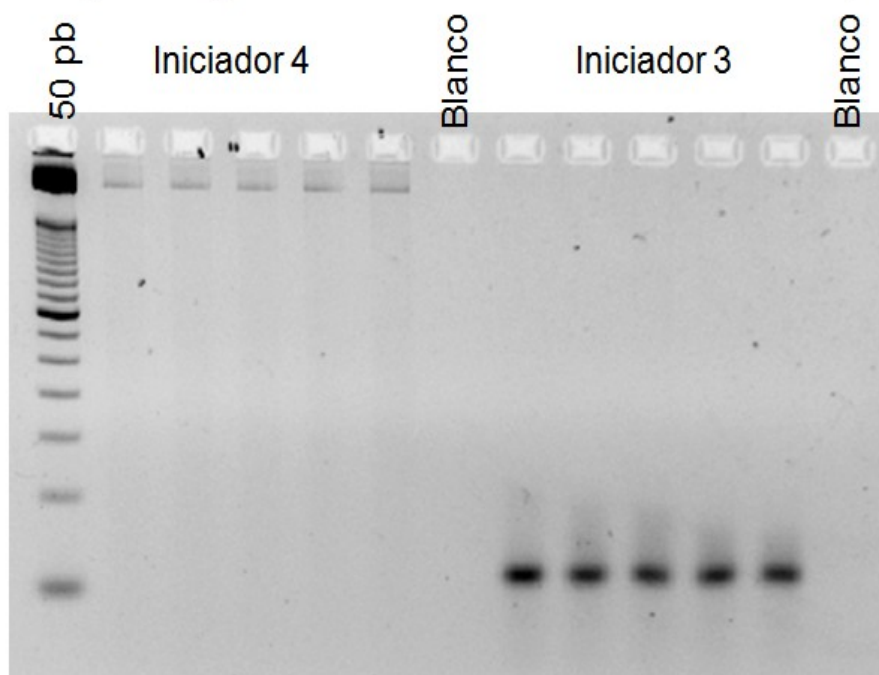
Fragmento 64pb
Iniciador 1 específico para *01:01
Iniciador 2 específico para *01:04 y *01:05

Imagen 3. Estandarización de iniciadores 3 y 4



Fragmento 54pb
Iniciador 3 específico para *01:01, *01:04,
Iniciador 4 específico para *01:05

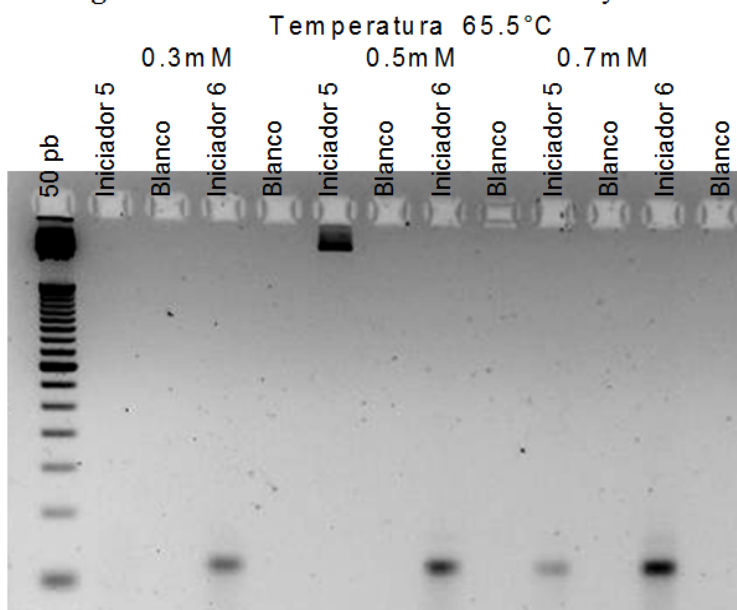
Imagen 4. Tipificación de muestras con iniciadores 3 y 4



Fragmento 54pb
Iniciador 3 específico para *01:01, *01:04,
Iniciador 4 específico para *01:05

Grupo *03

Imagen 5. Estandarización de iniciadores 5 y 6

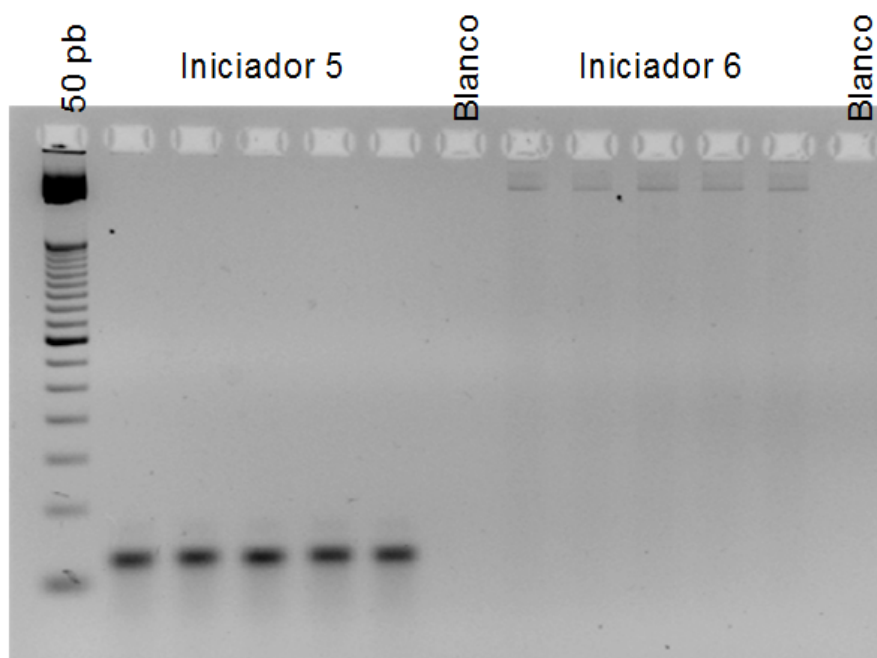


Fragmento 60pb

Iniciador 5 específico para *03:01, *03:03

Iniciador 6 específico para *03:02

Imagen 6. Tipificación de muestras con iniciadores 5 y 6

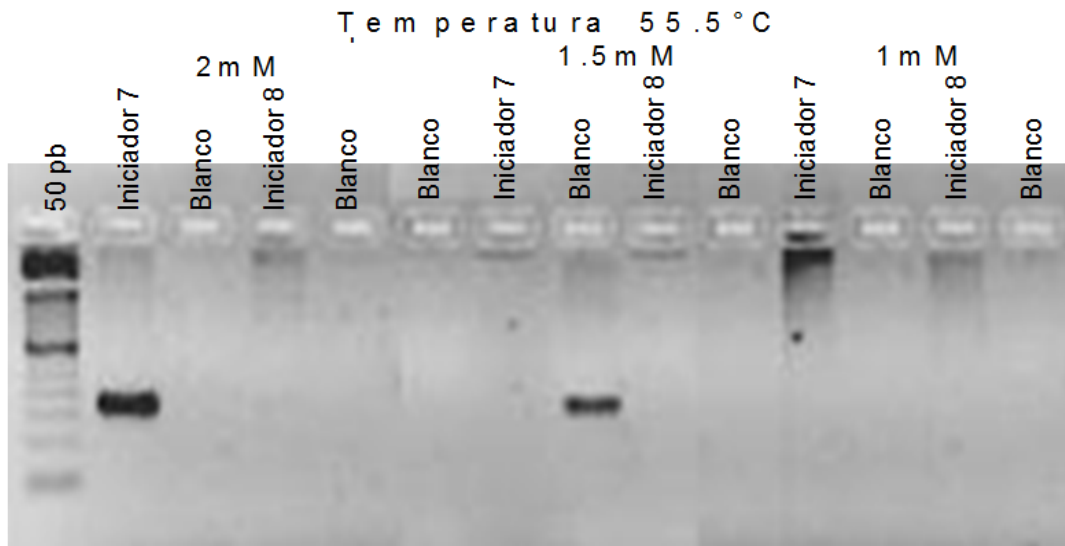


Fragmento 60pb

Iniciador 5 específico para *03:01, *03:03

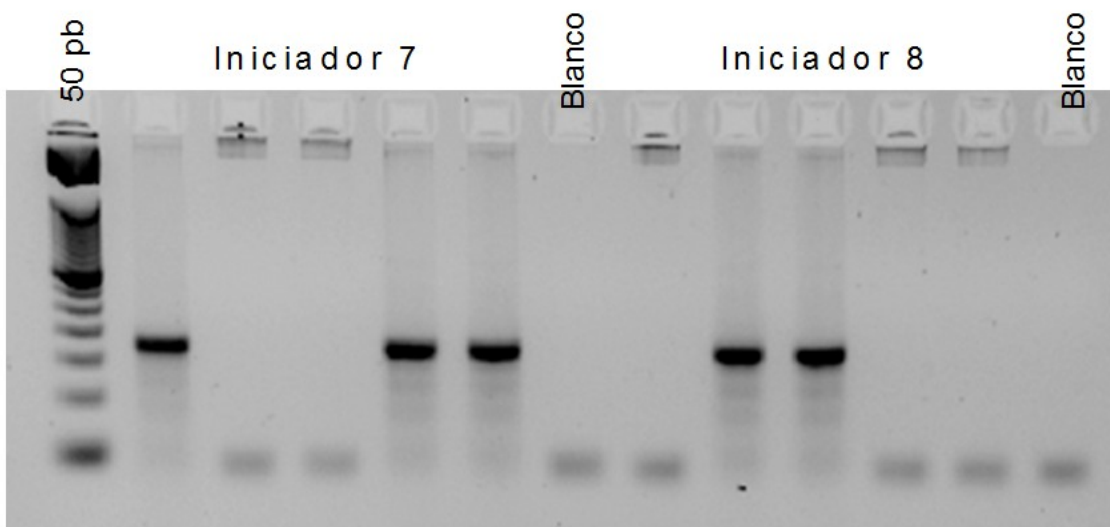
Iniciador 6 específico para *03:02

Imagen 7. Estandarización de iniciadores 7 y 8



Fragmento 175pb
Iniciador 7 específico para *03:01:01
Iniciador 8 específico para *03:02 y *03:03

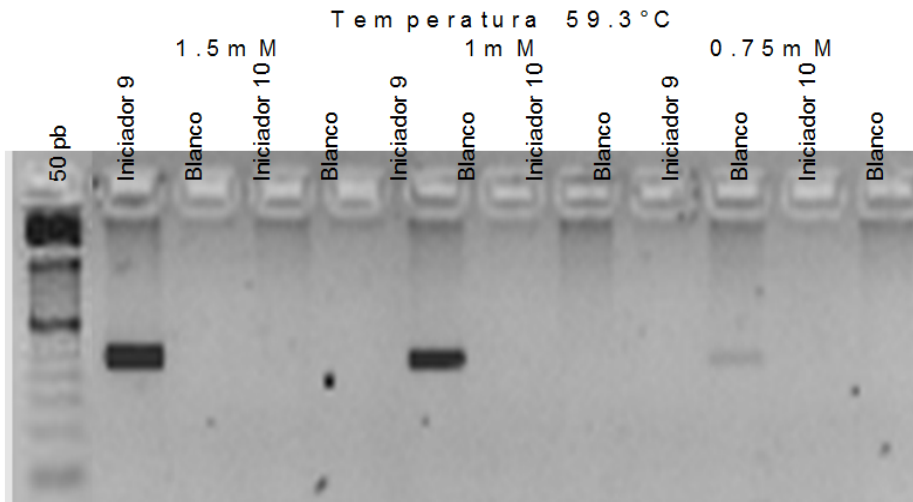
Imagen 8. Tipificación de muestras con iniciadores 7 y 8



Fragmento 175pb
Iniciador 7 específico para *03:01:01
Iniciador 8 específico para *03:02 y *03:03

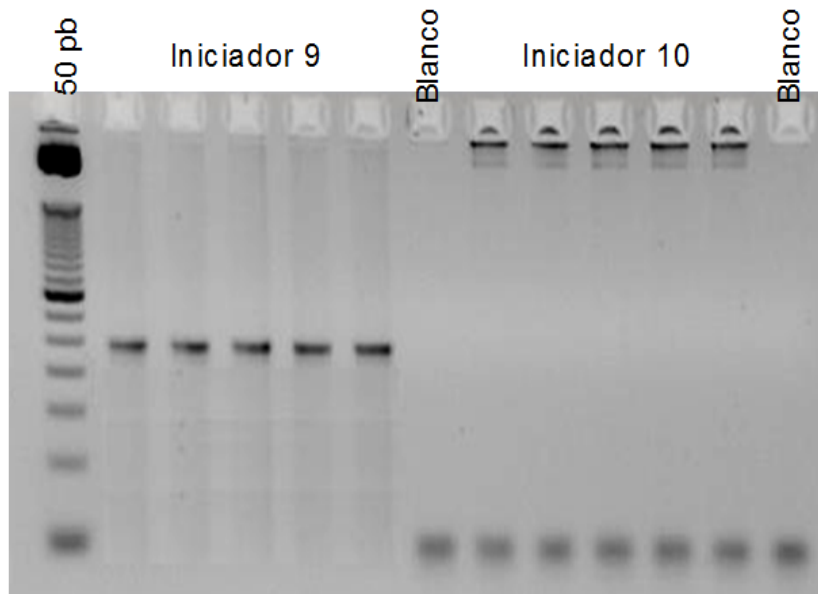
Grupo *04

Imagen 9. Estandarización de iniciadores 9 y 10



Fragmento 242pb
Iniciador 9 específico para *04:01:01
Iniciador 10 específico para *04:02

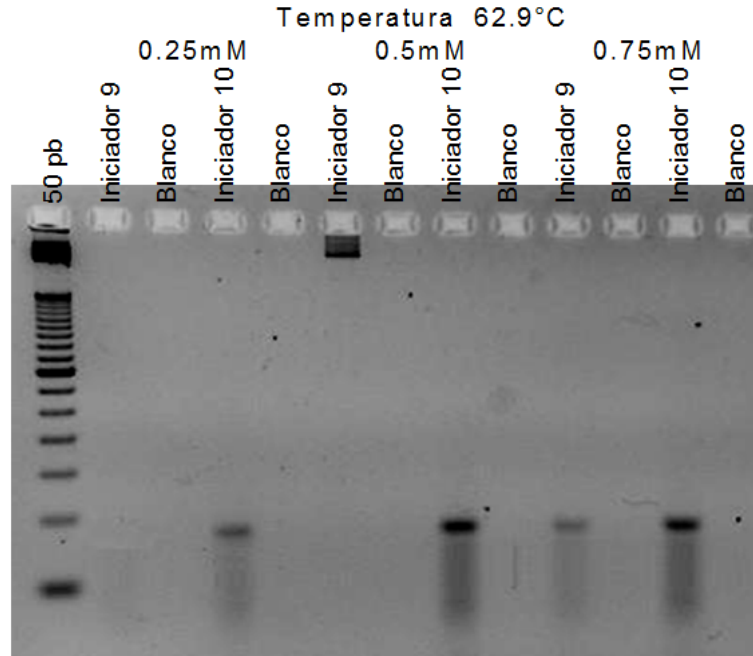
Imagen 10. Tipificación de muestras con iniciadores 9 y 10



Fragmento 242pb
Iniciador 9 específico para *04:01:01
Iniciador 10 específico para *04:02

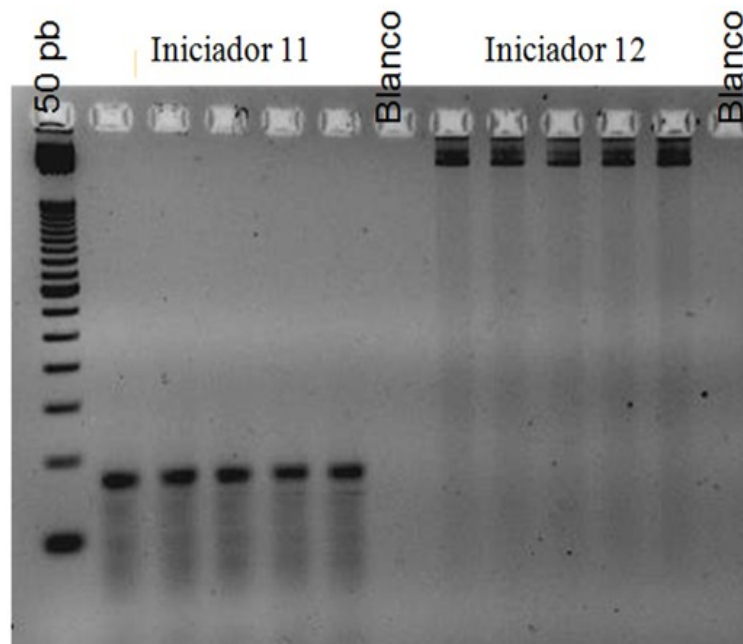
Grupo *05

Imagen 11. Estandarización de iniciadores 11 y 12



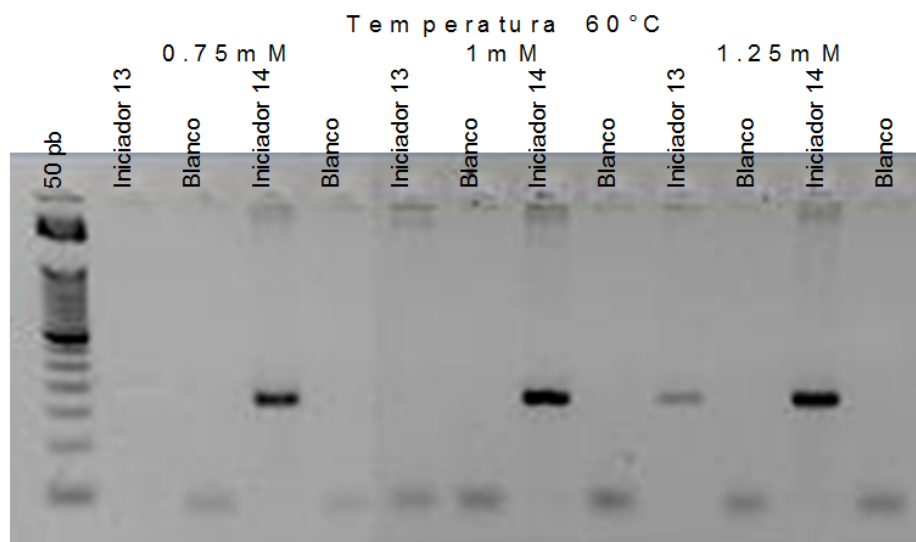
Fragmento 81pb
Iniciador 11 específico para *05:01:01, *05:03
Iniciador 12 específico para *05:05

Imagen 12. Tipificación de muestras con iniciadores 11 y 12



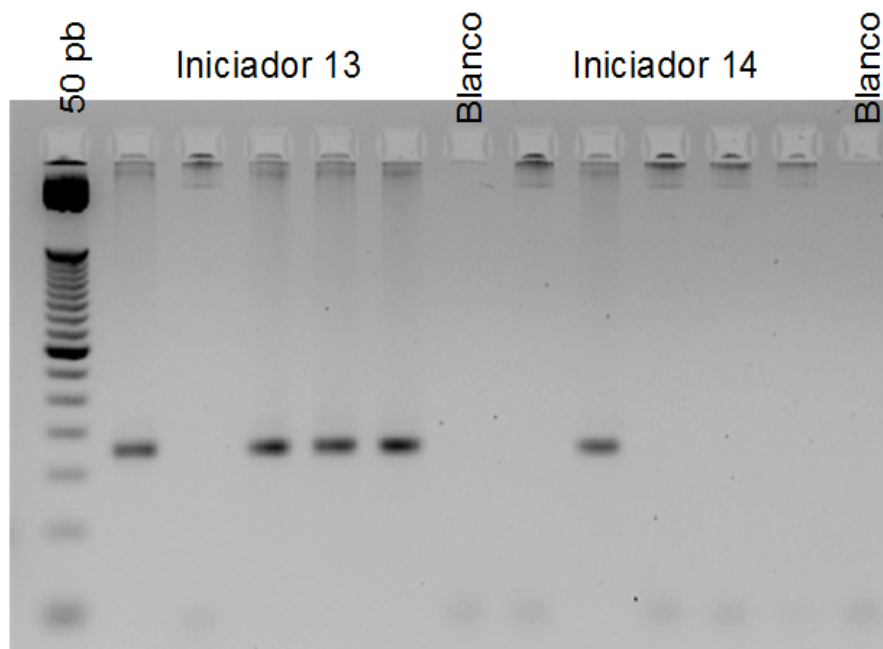
Fragmento 81pb
Iniciador 11 específico para *05:01:01, *05:03
Iniciador 12 específico para *05:05

Imagen 13. Estandarización de iniciadores 13 y 14



Fragmento 176pb
Iniciador 13 específico para *05:01:01, *05:05
Iniciador 14 específico para *05:03

Imagen 14. Tipificación de muestras con iniciadores 13 y 14



Fragmento 176pb
Iniciador 13 específico para *05:01:01, *05:05
Iniciador 14 específico para *05:03

Tabla 2. Distribución de la frecuencia alélica (fa) entre los diferentes grupos en estudio

Alelos	Asintomático (277) n (fa)	Gastritis superficial (379) n (fa)	Metaplasia intestinal (161) n (fa)	Cáncer gástrico (104) n (fa)	Úlcera duodenal (98) n (fa)
DQA1*01:01	17 (0.061)	18 (0.047)	16 (0.099)	8 (0.077)	5 (0.051)
DQA1*01:02	8 (0.029)	17 (0.045)	11 (0.068)	3 (0.029)	5 (0.051)
DQA1*01:03	8 (0.029)	7 (0.018)	5 (0.031)	1 (0.01)	2 (0.02)
DQA1*03:01:01	98 (0.354)	140 (0.369)	53 (0.329)	38 (0.366)	36 (0.367)
DQA1*03:02	12 (0.043)	16 (0.042)	5 (0.031)	3 (0.029)	3 (0.031)
DQA1*04:01:01	48 (0.173)	76 (0.201)	41 (0.255)	32 (0.308)	20 (0.204)
DQA1*05:01:01	70 (0.253)	87 (0.23)	24 (0.149)	18 (0.173)	22 (0.224)
DQA1*05:03	16 (0.058)	18 (0.047)	6 (0.037)	1 (0.01)	5 (0.051)

Tabla 3. Distribución de la frecuencia genotípica (fg) entre los diferentes grupos en estudio

Genotipo	Asintomático (145) n (fg)	Gastritis superficial (200) n (fg)	Metaplasia intestinal (83) n (fg)	Cáncer gástrico (54) n (fg)	Úlcera duodenal (52) n (fg)
DQA1*01:01/DQA1*01:01	3 (0.021)	2 (0.01)	3 (0.036)	0 (0.0)	0 (0.0)
DQA1*01:01/DQA1*01:02	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.019)	0 (0.0)
DQA1*01:01/DQA1*01:03	0 (0.0)	1 (0.005)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
DQA1*01:01/DQA1*02:01	0 (0.0)	1 (0.005)	2 (0.024)	0 (0.0)	0 (0.0)
DQA1*01:01/DQA1*03:01:01	0 (0.0)	3 (0.015)	4 (0.048)	2 (0.037)	1 (0.019)
DQA1*01:01/DQA1*04:01:01	1 (0.007)	6 (0.03)	2 (0.024)	4 (0.074)	3 (0.058)
DQA1*01:01/DQA1*05:01:01	9 (0.062)	3 (0.015)	1 (0.012)	1 (0.019)	1 (0.019)
DQA1*01:01/DQA1*05:03	1 (0.007)	0 (0.0)	1 (0.012)	0 (0.0)	0 (0.0)
DQA1*01:02/DQA1*01:02	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.012)	0 (0.0)	0 (0.0)
DQA1*01:02/DQA1*01:03	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.012)	0 (0.0)	1 (0.019)
DQA1*01:02/DQA1*02:01	0 (0.0)	2 (0.01)	1 (0.012)	0 (0.0)	1 (0.019)
DQA1*01:02/DQA1*03:01:01	1 (0.007)	8 (0.04)	1 (0.012)	0 (0.0)	1 (0.019)
DQA1*01:02/DQA1*03:02	0 (0.0)	1 (0.005)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
DQA1*01:02/DQA1*04:01:01	3 (0.021)	2 (0.01)	2 (0.024)	0 (0.0)	1 (0.019)
DQA1*01:02/DQA1*05:01:01	4 (0.028)	4 (0.02)	3 (0.036)	2 (0.037)	1 (0.019)
DQA1*01:02/DQA1*05:03	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.012)	0 (0.0)	0 (0.0)
DQA1*01:03/DQA1*01:03	2 (0.014)	0 (0.0)	1 (0.012)	0 (0.0)	0 (0.0)
DQA1*01:03/DQA1*02:01	1 (0.007)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
DQA1*01:03/DQA1*03:01:01	0 (0.0)	2 (0.010)	1 (0.012)	1 (0.019)	1 (0.019)
DQA1*01:03/DQA1*03:02	0 (0.0)	1 (0.005)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
DQA1*01:03/DQA1*04:01:01	1 (0.007)	3 (0.015)	1 (0.012)	0 (0.0)	0 (0.0)
DQA1*01:03/DQA1*05:01:01	2 (0.014)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
DQA1*02:01/DQA1*03:01:01	6 (0.041)	8 (0.04)	1 (0.012)	2 (0.037)	2 (0.038)
DQA1*02:01/DQA1*03:02	1 (0.007)	2 (0.01)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
DQA1*02:01/DQA1*04:01:01	2 (0.014)	2 (0.01)	1 (0.012)	1 (0.019)	2 (0.038)

DQA1*02:01/DQA1*05:01:01	2 (0.014)	6 (0.03)	0 (0.0)	1 (0.019)	1 (0.019)
DQA1*02:01/DQA1*05:03	1 (0.007)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
DQA1*03:01:01/DQA1*03:01:01	30 (0.207)	28 (0.14)	15 (0.181)	11 (0.204)	8 (0.154)
DQA1*03:01:01/DQA1*03:02	5 (0.034)	4 (0.02)	2 (0.024)	1 (0.019)	2 (0.038)
DQA1*03:01:01/DQA1*04:01:01	5 (0.034)	20 (0.10)	9 (0.108)	5 (0.093)	4 (0.077)
DQA1*03:01:01/DQA1*05:01:01	19 (0.131)	29 (0.145)	5 (6.0)	5 (0.093)	7 (0.135)
DQA1*03:01:01/DQA1*05:03	2 (0.014)	10 (0.050)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.038)
DQA1*03:02/DQA1*03:02	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.012)	0 (0.0)	0 (0.0)
DQA1*03:02/DQA1*04:01:01	0 (0.0)	3 (0.015)	1 (0.012)	2 (0.037)	1 (0.019)
DQA1*03:02/DQA1*05:01:01	3 (0.021)	4 (0.020)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
DQA1*03:02/DQA1*05:03	3 (0.021)	1 (0.005)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
DQA1*04:01:01/DQA1*04:01:01	13 (0.09)	15 (0.075)	8 (0.096)	7 (0.13)	2 (0.038)
DQA1*04:01:01/DQA1*05:01:01	10 (0.069)	8 (0.040)	8 (0.096)	6 (0.111)	3 (0.058)
DQA1*04:01:01/DQA1*05:03	0 (0.0)	2 (0.01)	1 (0.012)	0 (0.0)	2 (0.038)
DQA1*05:01:01/DQA1*05:01:01	6 (0.041)	14 (0.07)	2 (0.024)	1 (0.019)	4 (0.077)
DQA1*05:01:01/DQA1*05:03	9 (0.062)	5 (0.025)	3 (0.036)	1 (0.019)	1 (0.019)

Tabla 4. Alelos de riesgo al desarrollo de cáncer gástrico en la población de estudio

Alelo	Razón de momios (RM)	Intervalo de confianza (IC)	<i>p</i>
DQA1*04:01:01 ¹	1.77	1.06-2.96	0.02
DQA1*04:01:01 ²	2.12	1.22-3.68	0.004

Prueba de χ^2

1Gastritis superficial como grupo de referencia

2Asintomático como grupo de referencia

Tabla 5. Genotipos de riesgo al desarrollo de cáncer gástrico en la población de estudio

Genotipo	Razón de momios (RM)	Intervalo de confianza (IC)	<i>p</i>
DQA1*01:01/DQA1*04:01:01	11.52	1.17-277.25	0.02

Prueba de χ^2

Asintomáticos como grupo de referencia

Tabla 6. Alelos protectores al desarrollo de metaplasia intestinal en la población de estudio

Alelo	Razón de momios (RM)	Intervalo de confianza (IC)	<i>p</i>
DQA1*01:01 ¹	2.21	1.04-4.70	0.02
DQA1*05:01:01 ¹	0.59	0.35-0.99	0.03
DQA1*05:01:01 ²	0.52	0.30-0.89	0.01

Prueba de χ^2

1Gastritis superficial como grupo de referencia

2Asintomáticos como grupo de referencia

Tabla 7. Genotipos de riesgo al desarrollo de metaplasia intestinal en la población de estudio

Genotipo	Razón de momios (RM)	Intervalo de confianza (IC)	<i>p</i>
DQA1*01:01/DQA1*03:01:01	9.13	1.01-210.04	0.02
DQA1*03:01:01/DQA1*04:01:01	3.14	1.00-12.18	0.02

Prueba de χ^2

Asintomáticos como grupo de referencia

Discusión de resultados

La función del MHC es reconocer tanto péptidos propios como extraños. Al reconocer los péptidos provenientes de agentes infecciosos protege al organismo contra éstos al iniciarse la respuesta inmune adaptativa. Así, en la eliminación de organismos extraños y antígenos ataca a las células o tejidos infectados.^{21,22}

Los niveles extremadamente elevados de polimorfismo y heterocigosidad dentro de la región genómica del MHC brindan al sistema inmune una ventaja contra la diversidad y la variabilidad de los patógenos. Sin embargo, el polimorfismo que presenta el MHC también puede aumentar el riesgo de asociación con enfermedades autoinmunes, inflamatorias e infecciosas.²¹

La patogénesis de las enfermedades gastroduodenales es multifactorial, involucrándose factores bacterianos, del hospedero y ambientales, los cuales tienen una función importante en su desarrollo. La infección por *H. pylori* ha sido documentada como un factor de riesgo para el desarrollo de estos padecimientos. De igual forma, estudios previos han reportado la asociación entre moléculas del MHC de clase II y enfermedades gastroduodenales.¹¹

Para la tipificación del *locus* DQA1 los kits comerciales se basan en el análisis únicamente del exón 2, en el cual es posible diferenciar entre los diferentes grupos, e incluso entre algunos alelos. Sin embargo, no es posible diferenciar entre alelos de los grupos *01 (*01:01, *01:04 y *01:05), *03 (*03:01, *03:02 y *03:03), *04 (*04:01 y *04:02) y *05 (*05:01:01, *05:03 y *05:05). Por lo que en la tipificación se obtenía la frecuencia de éstos alelos en conjunto (DQA1*01:01/*01:04/*01:05, DQA1*03:01:01/*03:02/*03:03, DQA1*04:01:01/*04:02 y DQA1*05:01:01/*05:03/*05:05). En éste estudio se analizaron los exones 1 y 3, lo cual permitió distinguir entre los alelos antes mencionados; brindando mejor información que hace posible evidenciar la asociación entre presencia de estos alelos con una resistencia o susceptibilidad al desarrollo de

enfermedades gastroduodenales a partir de la infección por *H. pylori* evitando así las especulaciones.

En este estudio encontramos que el alelo HLA-DQA1*01:01 es un marcador genético de riesgo para el desarrollo de metaplasia intestinal debido a la diferencia estadísticamente significativa y el valor de RM evidencian que los individuos con gastritis superficial que presentan este alelo tienen 1.21 veces mayor probabilidad de desarrollar metaplasia intestinal que los pacientes con gastritis que no lo presentan. Cabe señalar que este alelo no había sido reportado de riesgo en ninguna otra población.^{11, 13-9}

Al comparar la distribución alélica de los pacientes con metaplasia intestinal, cáncer gástrico y úlcera duodenal *versus* los pacientes con gastritis superficial y el grupo asintomático se obtuvo que la presencia del alelo HLA DQA1*04:01:01 es un factor de riesgo para el desarrollo de adenocarcinoma gástrico. Por el contrario, los valores de RM menores a la unidad muestran que la presencia del alelo DQA1*05:01:01 representa un factor de protección tanto para los sujetos asintomáticos como para los individuos con gastritis superficial contra el desarrollo de la metaplasia intestinal. Es importante señalar que la presencia de éstos alelos no había sido asociada con el riesgo y protección, respectivamente, hacia el desarrollo de cáncer gástrico y metaplasia intestinal ni por el estudio realizado en el norte de la República ni en otras poblaciones a nivel mundial.^{11, 13-9}

En nuestro análisis estadístico el alelo DQA1*01:02, mencionado en la literatura japonesa^{12,14} como un factor genético de resistencia al desarrollo de las mismas enfermedades gastroduodenales objetivo de este estudio, no mostraron significancia estadística, por lo que al parecer no actúa como un factor de protección para la población Mexicana. Esta discrepancia evidencia la enorme diferencia entre los grupos raciales, las cuales podrían reflejar mecanismos distintos de la misma asociación patogénica.²⁹

Comparando lo reportado por Garza-González y colaboradores,¹¹ en nuestro análisis estadístico alelo DQA1*05:03 no fue estadísticamente significativo por lo que al parecer no contribuye de forma especial en la protección al desarrollo de cáncer gástrico. A pesar, de que se trata de una investigación también realizada en población Mexicana múltiples estudios han reportado que los individuos del norte del país son genéticamente

diferentes a los del centro y el sur de la República Mexicana, lo que podría justificar la discrepancia entre ambos estudios.¹¹

En lo que respecta a la comparación de distribución genotípica se observó que para el desarrollo de metaplasia intestinal la presencia de los genotipos DQA1*01:01/DQA1*03:01:01 y DQA1*03:01:01/DQA1*04:01:01 podrían ser marcadores genéticos de susceptibilidad para el desarrollo de esta enfermedad. Así mismo, se muestra que el genotipo DQA1*01:01/DQA1*04:01:01 está relacionado con riesgo para desarrollar cáncer gástrico.

Como se puede observar, en los genotipos DQA1*01:01/DQA1*03:01:01 y DQA1*01:01/DQA1*04:01:01 en el análisis estadístico mostró rangos amplios en los intervalos de confianza lo cual refleja que el tamaño de muestra analizada fue pequeño, a razón de que la baja prevalencia de las enfermedades gastroduodenales posteriores a la infección por *H. pylori*¹ nos limitó para aumentarlo. Lo anteriormente mencionado no le resta confiabilidad a los resultados obtenidos en este estudio, pues los valores de *p* y los intervalos de confiabilidad denotan que los datos son estadísticamente significativos y ésta significancia no es debida al azar.

El conocimiento de estos marcadores genéticos de riesgo asociados con el desarrollo o protección de las enfermedades gastroduodenales relacionadas con la infección por *H. pylori*, podrían usarse como marcadores genéticos para la detección temprana de metaplasia intestinal y cáncer gástrico, con la finalidad de evitar desencadenar una secuela de mayor gravedad o en el desarrollo de cáncer gástrico que en nuestro país representa la quinta causa de muerte por neoplasias malignas.

Conclusión

Nuestros resultados, junto con la evidencia publicada en la literatura, apoyan que los alelos pertenecientes a los grupos *01, *04 y *05 del *locus* DQA1 participan en la susceptibilidad o resistencia al desarrollo de enfermedades gastroduodenales derivadas de la infección por *H. pylori*.

Perspectivas

Los resultados obtenidos justifican la línea de investigación y se espera los kits comerciales consideren la importancia del análisis de los exones uno y tres en la tipificación de los alelos del gen DQA1. Aunque el polimorfismo de éste gen no es tan amplio (debido a que sólo existen 35 alelos) es necesario tipificarlos para conocer su frecuencia en diferentes poblaciones, lo que podrían ayudar en la asociación de enfermedades así como en casos de trasplantes de órganos o tejidos.

Referencias

1. Beswick EJ, Suarez G, Reyes VE. *H. pylori* and host interactions that influence pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology* 2006;12(35): 5599-605
2. Suarez G, Reyes VE, Beswick EJ. Immune response to *H. pylori*. *World Journal of Gastroenterology* 2006;12(35): 5593-8
3. Ricci V, Romano M, Boquet P. Molecular cross-talk between *Helicobacter pylori* and human gastric mucosa. *World Journal of Gastroenterology* 2011;17(11):1383-99
4. Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. Washington (DC): ASM Press; 2001
5. Fox JG, Wang TC. Review series: Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *The Journal of Clinical Investigation* 2007; 117(1): 60-9
6. Atherton JC, Blaser MJ. Review series: Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *Journal of Clinical Investigation* 2009; 119(9): 2475-87
7. Algood HM, Cover TL. *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews* 2006;19(4):597-613
8. Suarez G, Reyes VE, Beswick EJ. Immune response to *H. pylori*. *World Journal of Gastroenterology* 2006;12(35): 5593-8
9. Peña A. Genetic factors determining the host response to *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology* 2000;6(5):624-5
10. Vorobjova T, Watanabe T, Chiba T. *Helicobacter pylori* immunology and vaccines. *Helicobacter* 2008;13 Suppl 1:18-22
11. Garza-González E, Bosques-Padilla FJ, Pérez-Pérez GI, Flores-Gutiérrez JP, Tijerina-Menchaca R. Association of gastric cancer, HLA-DQA1, and infection with *Helicobacter pylori* CagA⁺ and VacA⁺ in a Mexican population. *Journal of Gastroenterology* 2004; 39(12): 1138-42
12. Azuma T, Ito S, Sato F, Yamazaki Y, Miyaji H, Ito Y, Suto H, Kuriyama M, Kato T, Kohli Y. The role of the HLA-DQA1 gene in resistance to atrophic gastritis and

-
- gastric adenocarcinoma induced by *Helicobacter pylori* infection. *Cancer* 1998; 82 (6):1013-18
13. Magnusson PKE, Enroth H, Eriksson I, Held M, Nyre'n O, Engstrand L, Hansson LE, Gyllensten UB. Gastric cancer and human leukocyte antigen: distinct DQ and DR alleles are associated with development of gastric cancer and infection by *Helicobacter pylori*. *Cancer Research* 2001;61(6):2684-9
 14. Yoshitake S, Okada M, Kimura A, Sasazuki T. Contribution of major histocompatibility complex genes to susceptibility and resistance in *Helicobacter pylori* related diseases. *European Journal of Immunogenetics* 1999; 11(8): 875-80
 15. Perri F, Piepoli A, Quitadamo M, Quarticelli M, Merla A, Bisceglia M. HLA-DQA1 and -DQB1 genes and *Helicobacter pylori* infection in Italian patients with gastric adenocarcinoma. *Tissue Antigens* 2002;59(1):55-7
 16. Kawahara Y, Mizuno M, Yoshino T, Yokota K, Oguma K, Okada H, Fujiki S, Shiratori Y. HLA-DQA1*0103-DQB1*0601 haplotype and *Helicobacter pylori*-positive gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2005;3(9):865-8
 17. Wang LL, Tran DB, Lin WX, Jiang HX, Shan QW, Xie XZ, Liang DM. Association of HLA-DQA1 loci with *Helicobacter pylori* infection in children of Guangxi Zhuang, Mulam nationalities, China and central Jing nationality, Vietnam. *ZhonghuaErKeZaZhi* 2004;42(8):577-80
 18. Lee HW, Hahm KB, Lee JS, Ju YS, Lee KM, Lee KW. Association of the human leukocyte antigen class II alleles with chronic atrophic gastritis and gastric carcinoma in Koreans. *Chinese Journal of Digestive Diseases* 2009;10(4): 265-71
 19. Santolaria S, Barrios Y, Benito R, Piazuolo E, Quintero E, Lanas A. *Helicobacter pylori* and immunogenetic factors of the host: relevance of the HLA-DQA1*0102 and *0301 alleles in peptic ulcer. *Gastroenterología y hepatología* 2001; 24(3): 117-21
 20. Xie M, Li J, Jiang T. Accurate HLA type inference using a weighted similarity graph. *BMC Bioinformatics* 2010; Suppl 11: 1-10
-

-
21. Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, Kulski JK. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *Journal of Human Genetics*. 2009; 54(1):15-39
 22. Traherne JA. Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies. *International Journal of Immunogenetics* 2008;35(3):179-92
 23. Rajagopal D, Bal V, George A, Rath S. Review article: Diversity & overlap in the mechanisms of processing protein antigens for presentation to T cells, Review article. *Indian Journal of Medical Research* 2004;120(2):75-85
 24. Landsverk OJB, Bakke O, Gregers TF. MHC II and the endocytic pathway: regulation by invariant chain, Review article. *Scandinavian Journal of Immunology* 2009;70(1):184-93
 25. Krawczyk M, Reith W. Regulation of MHC class II expression, a unique regulatory system identified by the study of a primary immunodeficiency disease. *Tissue Antigens* 2006;67(3):183-97
 26. Nielsen M, Lund O, Buus S, Lundegaard C. Review article: MHC Class II epitope predictive algorithms. *Immunology* 2010;130(1):319–28
 27. Traherne JA. Review article: Human MHC architecture and evolution: implications for disease association studies. *International Journal of Immunogenetics* 2008; 35(1):179–92
 28. Peek RM, Fiske C, Wilson KT. Role of innate immunity in helicobacter pylori-induced gastric malignancy. *Physiol Rev* 2010; 90(3): 831–58
 29. Herrera-Goepfert R, Zúñiga J, Hernández-Guerrero A, Rodríguez-Reyna T, Osnalla N, Ruíz Morales J, Vargas-Alarcón G, Yamamoto-Furusho J, Mohar-Betancourt A, Hernández-Pando R, Granados J. Asociación del alelo HLA-DQB1*05:01del complejo mayor de histocompatibilidad con cáncer gástrico en México. *Gaceta Médica de México* 2003; 140(3): 299-303
-