



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

CARRERA DE BIOLOGÍA

Unidad de Investigación Médica en Inmunología
Laboratorio de Histocompatibilidad
Hosp. De Pediatría CMN-SXXI

**"Análisis polimórfico de HLA clase II
en familias nahuas infectadas con
Helicobacter pylori"**

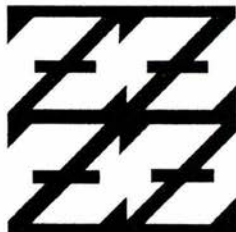
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A:

ERIC GREGORIO HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

U N A M

**FES
ZARAGOZA**



**LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXIÓN**

**DIRECTORA DE TESIS:
Dra. MARTHA PÉREZ RODRÍGUEZ**

**ASESOR:
Dr. ALBERTO MONROY GARCÍA**

MÉXICO, D. F.

2004



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 MEDICA EN INMUNOLOGIA DEL
HOSPITAL DE PEDIATRIA DEL CENTRO MEDICO NACIONAL
SIGLO XXI, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. MARTHA
PEREZ RODRÍGUEZ.**

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Martha Pérez Rodríguez por brindarme su confianza, apoyo y valiosa asesoría durante la realización de este proyecto.
- A los biólogos Miriam E. Nieves Ramírez y Oswaldo Partida Rodríguez por su ayuda, orientación y por considerarme su amigo. Siéntanse parte de este esfuerzo.
- A todos mis amigos que me apoyaron durante la carrera.
- A los jefes de laboratorio, trabajadores y alumnos de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología por su tiempo, disposición y ayuda durante todo este tiempo.
- A los sinodales del jurado por sus valiosas recomendaciones y aportaciones al trabajo.
 - Dr. Mario Altamirano Lozano
 - Dr. Alberto Monroy García
 - Dra. Lourdes Mora García
 - M en C Luis Sánchez Sánchez
- Y finalmente a la UNAM por darme la oportunidad de concluir esta meta.

DEDICATORIA

- *A mis queridos padres, Esteban y María Victoria, por su paciencia y confianza en mi y de quienes siempre he recibido apoyo total e incondicional. Gracias por ser mi ejemplo.*
- *A mi abuela Ana María Mateos Rosas, por dedicar gran parte de su vida a educarme y procurarme siempre.*
- *A María de Lourdes Alonso de la Rosa por tu consejo de seguir y no darme por vencido. Gracias por estar conmigo y por llenar mi vida desde que te conozco.*
- *A mis hermanos: Adriana, Esdras y Elesban, por contar con ellos en cualquier circunstancia.*
- *A mis sobrinos: Deni, Liliana, Elesban y Eneas, por darme grandes momentos.*

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Complejo Principal de Histocompatibilidad	3
Localización del sistema HLA	4
Genes	5
Estructura	8
Función	11
Nomenclatura	13
Enfermedades asociadas con HLA	13
<i>Helicobacter pylori</i>	15
Características	15
Virulencia	16
Infección	17
Enfermedad	18
POBLACIÓN DE ESTUDIO	20
Antecedentes	20
Localización	21
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	24
METODOLOGÍA	25
RESULTADOS Y ANÁLISIS	36
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	53
CONCLUSIONES	54
REFERENCIAS	55
APENDICES	65

ABREVIATURAS DE USO FRECUENTE

Cy5'	Carbocianina -5
DNA	Acido desoxirribonucleico
FLR	Referencia marcada con fluorocromo (<i>Fluorescent labelled reference</i>)
HLA	Antígenos leucocitarios humanos (human leukocyte antigen)
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad (<i>major histocompatibility complex.</i>).
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (polimerase chain reaction)
RSCA	Análisis conformacional de referencia de cadena sencilla (reference strand conformation análisis).

RESUMEN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria que tiene la habilidad de colonizar el tracto gástrico de más del 50% de la población mundial. Alrededor del 20% de los infectados desarrollarán una enfermedad gastro-duodenal, y de éstos aproximadamente el 1% presentará el cáncer gástrico. La infección por *H. pylori* es adquirida principalmente durante la niñez, pero la enfermedad se manifestará en la edad adulta. En los países en vías de desarrollo la seroprevalencia infantil llega a ser hasta el 80% mientras que en los países desarrollados es del 10%. En México la seroprevalencia infantil es de 50% y en la edad adulta llega a ser del 80%. En nuestro país existen zonas de bajo (Estado de México), medio (D.F.) y alto (Chiapas) riesgo. Los factores del huésped y ambientales también participan en las interacciones de la bacteria y del huésped. Aunque pocos estudios se han centrado al sistema HLA se ha llegado a reportar una asociación con el alelo DQB1*0401 y la gastritis atrófica en la población japonesa, DQB1*0301 y DQB1*0501 se han relacionado con el cáncer gástrico en la población caucásica y mexicana respectivamente. Para analizar la posible existencia de un alelo o haplotipo que se relacione en forma positiva o negativa al desarrollo de enfermedades causadas por *H. pylori* se estudiaron 30 familias nahuas (N = 108) provenientes de Milpa Alta, D.F. (67% de seropositividad a *H. pylori*). El exón 2 de los loci HLA-DQA1 y HLA-DQB1 fueron analizados por la técnica de RSCA (*Reference Strand mediated Conformation Analysis*).

Como era de esperarse los resultados mostraron que el 90% de la población presentó alelos amerindios, DQA1*030101/0302/0303 (39%), DQA1*0401/0402 (26.6%), DQA1*050101/02/0503/0505 (26%), DQB1*030101 (29.5%), DQB1*0302 (28.1%) y DQB1*0402 (32.2%). Aunque no hubo significancia estadística se pudo observar una mayor frecuencia de los alelos DQA1*0401/0402, DQA1*050101/02/0503/0505, y DQB1*0402, mientras que DQA1*030101/0302/0303 y DQB1*0302 fueron menos frecuentes en individuos positivos a la infección.

Los haplotipos DQA1*030101/0302/0303-DQA1*050101/02/0503/0505, DQA1*0401/0402-DQA1*050101/02/0503/0505, DQB1*030101-DQB1*0402 y DQA1*050101/02/0503/0505-DQB1*030101 fueron significativos aunque esta

significancia se perdió cuando la p fue corregida, conservándose en el haplotipo DQA1*050101/02/0503/0505-DQB1*030101 (pc=0.02)

Estos resultados podrían sugerir la participación de los genes HLA en la infección por *H. pylori*.

INTRODUCCIÓN

Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC)

La base de la inmunidad adaptativa es el reconocimiento por parte de receptores de células T (TCR) de antígenos extraños presentados por moléculas del MHC de clase I y de clase II. En mamíferos los genes que codifican moléculas MHC clase I y clase II son notables por su polimorfismo, así como por su enlace dentro de una región cromosomal llamada complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés, *major histocompatibility complex*) (Parham, 1999). Este ha permanecido a través de la evolución y se denomina en el humano sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA, del inglés, *human leucocyte antigen*), debido a que su descubrimiento se inició en la superficie de los leucocitos (Roitt *et al.*, 2000).

La interacción más importante de la célula T es la del TCR. Las células T convencionales expresan TCR's $\alpha\beta$, los cuales se unen a antígenos procesados y presentados en moléculas HLA (van der Merwe y Davis, 2003).

El sistema HLA es la región de genes más densa del genoma humano secuenciado hasta ahora, con 1556 alelos descritos hasta julio 31 del 2002 (**Tabla 1**) (Marsh *et al.*, 2002). Este polimorfismo extremo es mantenido por la extensa batalla hacia la supremacía entre nuestro sistema inmune y los patógenos infecciosos (Aguado *et al.*, 1999).

Tabla 1. Número de alelos con nombres oficiales en cada *locus* hasta julio del 2002 (Marsh *et al.*, 2002).

<i>Locus</i>	Número de alelos
HLA-A	250
HLA-B	490
HLA-C	119
HLA-E	6
HLA-F	1
HLA-G	15
HLA-DRA	3
HLA-DRB1	315
HLA-DRB2	1
HLA-DRB3	38
HLA-DRB4	12

HLA-DRB5	15
HLA-DRB6	3
HLA-DRB7	2
HLA-DRB8	1
HLA-DRB9	1
HLA-DQA1	22
HLA-DQB1	53
HLA-DPA1	20
HLA-DPB1	99
HLA-DOA	8
HLA-DOB	8
HLA-DMA	4
HLA-DMB	6
TAP1	6
TAP2	4
MICA	54

Localización del sistema HLA

Las moléculas HLA son producidas por un grupo de genes extendidos en el brazo corto del cromosoma 6 humano, en la banda 6p21.3 y abarca aproximadamente 4 Mb (4,000 kb) (Rhodes y Trowsdale, 1999).

La región HLA esta dividida convencionalmente en tres regiones, región II (1Mb), región III (1Mb) y región I (2Mb), localizadas en ese orden de centrómero a telómero (**Figura 1**) (Shiina *et al.*, 1999, Lydyard *et al.*, 2000). Recientemente un número de genes involucrados en la inflamación han sido identificados en la región central del HLA, en el extremo telomérico de la región III y en el extremo centromérico de la región I. Este grupo de genes (Hsp70, SKI2W, AIF-1, 1C7, B144, IkBL, BAT1, TNF, LTA y LTB) pueden participar en varios aspectos de *stress*, inflamación e infección. Sugiriéndose que la función de estos genes es lo suficientemente clara para ser designada como la región HLA clase IV (Gruen y Weissman, 1997).

Cada una de las regiones es altamente compleja y polimórfica. Dos de las tres regiones, región I y II, corresponden a genes HLA (Nussbaum *et al.*, 2001).

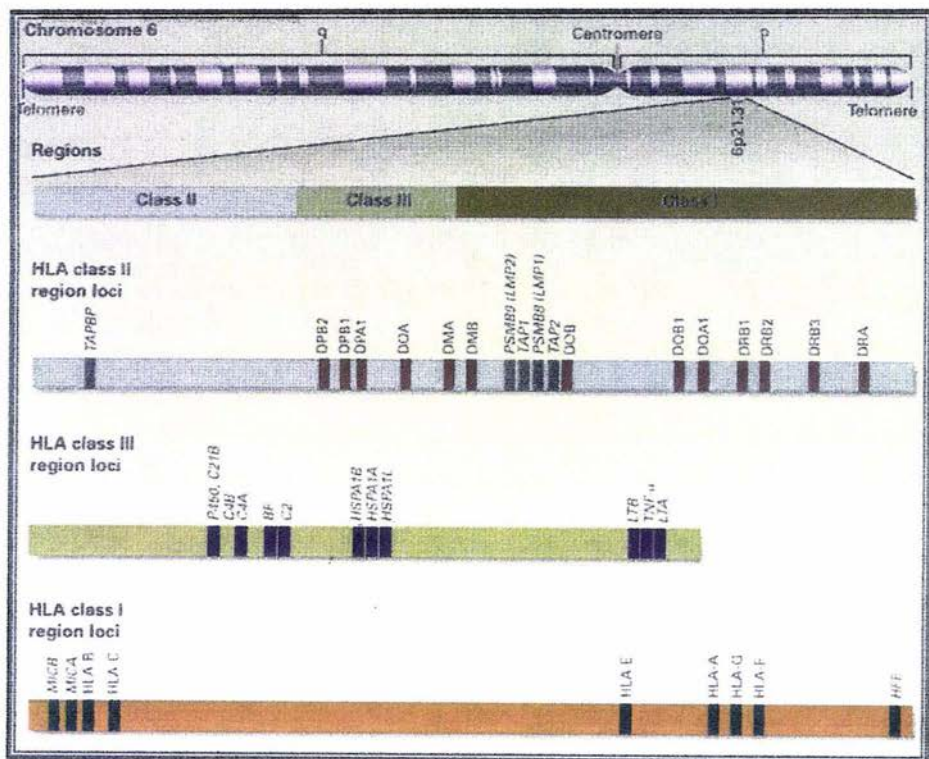


Figura 1. Localización y organización del complejo HLA en el cromosoma 6 humano (Tomado de Klein y Sato, 2000).

Genes

Muchos de los *loci* que codifican a las moléculas MHC son los más polimórficos que se conocen en vertebrados superiores; es decir, en una especie existen un número extraordinariamente grande de alelos (formas alternativas de un mismo gen) en cada *locus* (Alberts *et al.*, 1996).

Los genes HLA clase I, codifican antígenos que son parte integral de la membrana citoplasmática de las células nucleadas (Nussbaum *et al.*, 2001). También codifican a los antígenos HLA solubles clase I (sHLA-I) detectados en suero, en sudor, en líquido amniótico, en fluido linfático, en orina, en articulaciones, en plaquetas y en fluido cerebroespinal, así como en individuos con padecimientos renales crónicos (Aultman *et al.*, 1999; Kedzierska y

Turowski, 2001). La detección de moléculas HLA solubles (sHLA) se debe al desarrollo de ensayos precisos de ELISA, además, los estudios bioquímicos han revelado que las moléculas sHLA son secretadas activamente por períodos prolongados. Esto significa que las sHLA circulan en diferentes formas con pesos moleculares variables (Baker, 2000). Los genes HLA clase I se pueden clasificar en genes clásicos (HLA-A, B y Cw) y genes no clásicos (HLA-E,-F,-G y -H). Los genes clásicos codifican a las moléculas que participan en transplante (Geraghty *et al.*, 1992). HLA-E constituye el ligando preferencial del heterodímero NKG2A (NKG2C)/CD94 de la célula NK (Lopez-Botet *et al.*, 1999; Urosevic *et al.*, 2002). HLA-F contiene un grupo de genes que codifican a los receptores del segmento 7-transmembrana de la familia de receptores olfatorios (Fan *et al.*, 1995; Gruen y Weissman, 1997). Mientras que HLA-G puede tener una función específica en la interfase materno-fetal (Shiina *et al.*, 1999b) y un estudio reciente identificó una mutación en el gen C282Y localizado en HLA-H que es un excelente marcador para hemocromatosis hereditaria (HH) un desorden autosomal recesivo común en el metabolismo del hierro, que provoca la acumulación de este en hígado, páncreas y corazón (Parkkila *et al.*, 1997; Annichino-Bizzacchi *et al.*, 2000).

Los genes que codifican las cadenas pesadas de HLA clase I tienen una estructura característica en los diferentes dominios de la proteína que son codificados por exones separados. El péptido líder es codificado por el exón 1, los tres dominios extracelulares (α_1 , α_2 y α_3) son codificados por los exones 2, 3 y 4, respectivamente, la región transmembranal es codificada por el exón 5, la cola citoplasmática por los exones 6 y 7, y la región 3' intrascrita por el exón 8 (**Figura 2**). En total los genes de los exones de la cadena pesada clase I consisten de 1089-1101 nucleótidos (Marsh *et al.*, 2000).

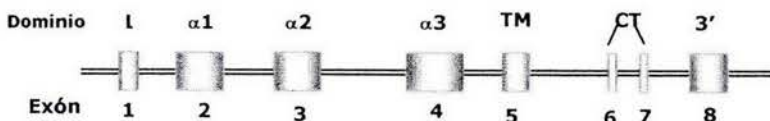


Figura 2. Organización exón-intrón de las moléculas HLA clase I

Los *loci* HLA clase II están localizados en las subregiones HLA-DP, DR y DQ, que contienen por lo menos un par de genes funcionales para la síntesis de las cadenas α y β de los antígenos de histocompatibilidad clase II. Los genes de la región II han sido denominados DP α 1 y DP β 1, DQ α 1 y DQ β 1, DR α 1 y DR β 1 (Nussbaum *et al.*, 2001). Además de codificar antígenos en la superficie celular, también codifican antígenos HLA solubles clase II (sHLA-II) que constituyen normalmente al suero, presentándose también en orina de sujetos normales y con problemas renales crónicos (Aultman *et al.*, 1999). Las moléculas HLA clase II son también heterodímeros, expresados primordialmente por linfocitos B, macrófagos, células dendríticas y células epiteliales de ductos mamarios, túbulos renales y tracto digestivo (Moreno, 1996).

La organización exón-intrón de los genes clase II es similar a la de los genes de clase I, en la que los exones codifican por separado a los dominios de la proteína. Los genes de la cadena α y la β tienen una estructura parecida en la cual el exón 1 codifica al péptido líder y los exones 2 y 3 codifican los dos dominios extracelulares. En la cadena β el gen del exón 4 codifica el dominio transmembrana y el exón 5 codifica la cola citoplasmática. Por contraste, en la cadena α el gen del exón 4 codifica tanto la región transmembranal como la citoplasmática (**Figura 3**) (Marsh *et al.*, 2000).

La región clase III es conocida por genes que codifican componentes del complemento: factor B (BF), C4 y C2, los cuales codifican subunidades proteicas para las convertasas C3 y C5 que son esenciales en la activación del complemento, ruta de la respuesta inmune humoral (Yung *et al.*, 2000).

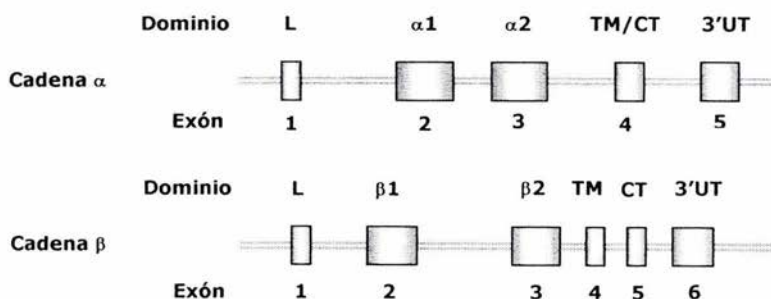


Figura 3 . Organización exón-intrón de las moléculas HLA clase II.

Estructura

La estructura de las moléculas HLA de clase I está compuesta de una cadena pesada glucosilada (45 kdal) asociada de forma no covalente a la β_2 -microglobulina (12 kdal), un polipéptido no polimórfico, el cual es codificado por un gen fuera de la región del MHC, (en el cromosoma 15), que se puede encontrar también en forma libre en el suero (Marsh *et al.*, 2000).

Las cadenas pesadas de clase I están compuestas por tres dominios extracelulares (α_1 , α_2 y α_3) una región transmembranal y una cola citoplasmática. El extremo amino terminal lo forma el dominio α_1 y el extremo carboxilo es formado por la cola citoplasmática. Cada uno de los tres dominios extracelulares contiene no más de 90 aminoácidos, y estos dominios pueden ser separados de la superficie celular mediante la enzima proteolítica papaína. Los dominios α_2 y α_3 contienen enlaces disulfurointracatenarios, que generan unos bucles de 63 y 86 aminoácidos, respectivamente. El dominio α_3 es homólogo con los dominios Fc de las inmunoglobulinas. El grado de glucosilación de la parte extracelular de la cadena pesada de clase I depende de la especie y del alelo. La región transmembranal es predominantemente hidrófoba, está compuesta por 25 aminoácidos y atraviesa la bicapa lipídica, adoptando probablemente una configuración de hélice α . El dominio citoplasmático es de naturaleza hidrófila, consta de 30-40 aminoácidos (**Figura 4**) (Roitt *et al.*, 2000). El polimorfismo de las moléculas clase I es casi exclusivo de los dominios α_1 y α_2 (Moreno, 1996).

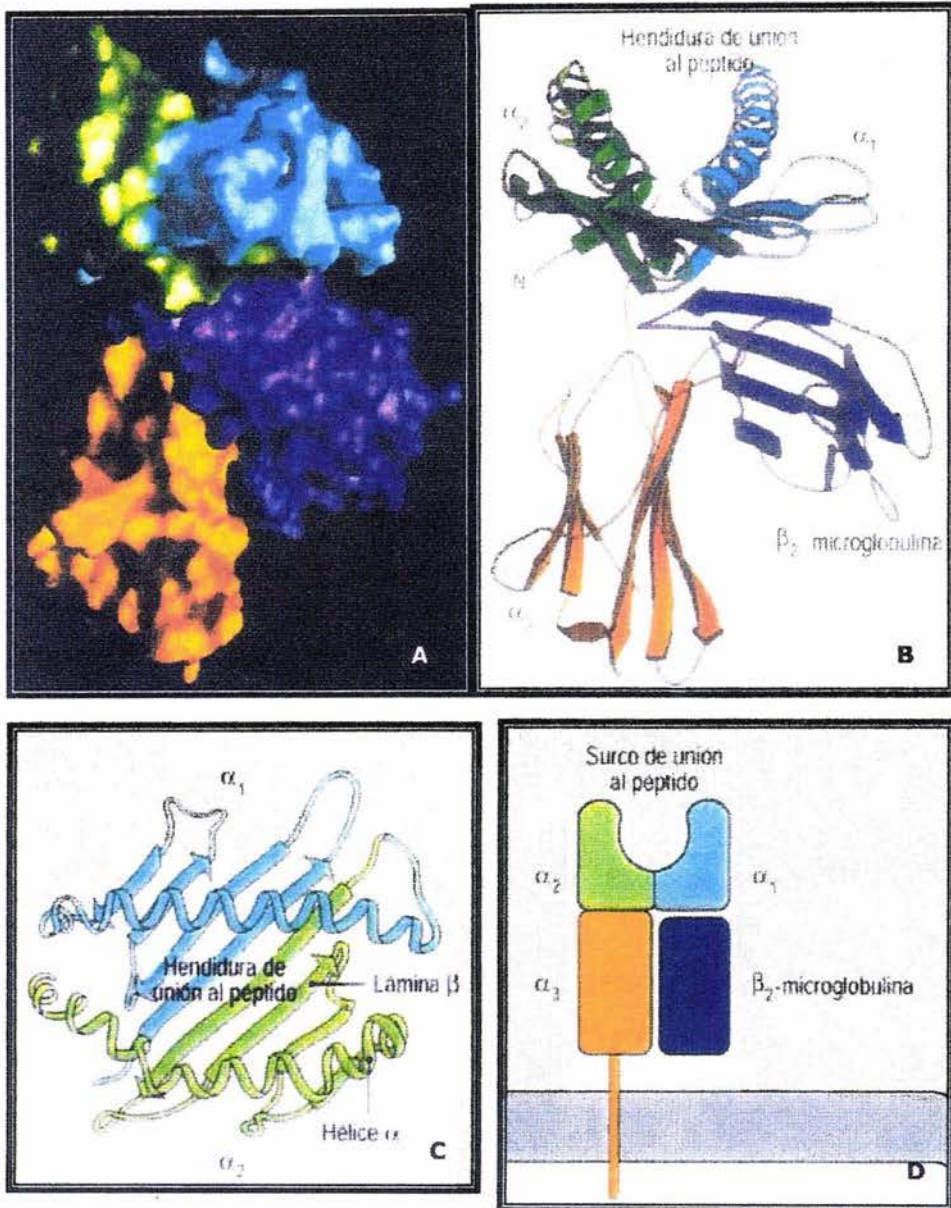


Figura 4. Diferentes modelos estructurales de la molécula HLA de clase I. **A** gráfica computarizada, **B** diagrama de *ribbons*, **C** diagrama de *ribbon* vista superior de los dominios α_1 y α_2 y **D** estructura simplificada (Tomado de Janeway *et al.*, 1999).

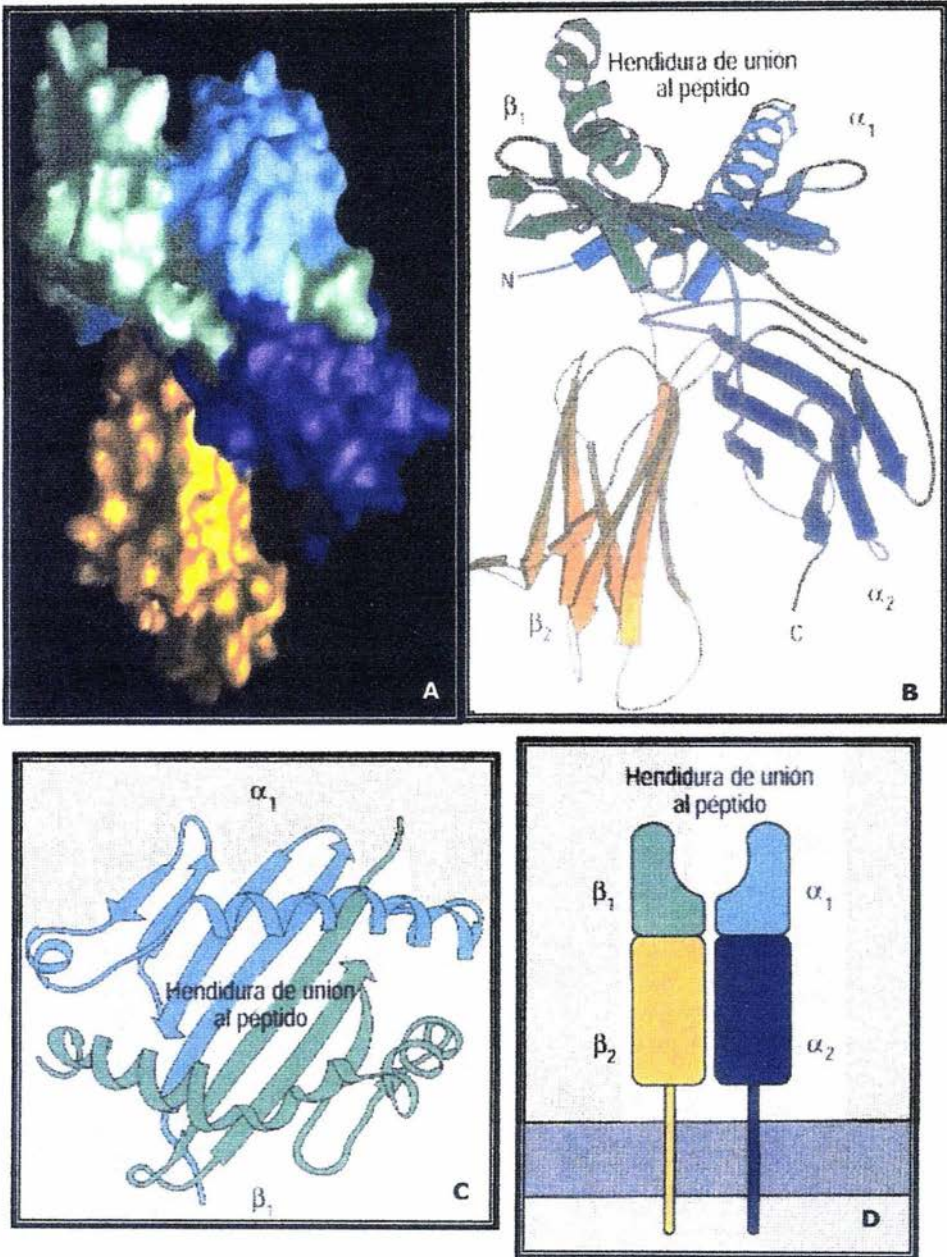


Figura 5. Diferentes modelos estructurales de las moléculas HLA clase II. **A** gráfica computarizada, **B** diagrama de *ribbon*, **C** vista superior en diagrama de *ribbons* de dominios α_1 y β_1 y **D** estructura simplificada (Tomado de Janeway et al., 1999).

Todas las moléculas de clase II están compuestas por dos cadenas polipeptídicas unidas de forma no covalente. La cadena α (32 a 34 kD) es ligeramente más grande que la cadena β (29 a 32 kD) debido a una mayor glucosilación. Tanto la cadena α como la cadena β tienen dos dominios extracelulares, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$ con sus respectivos extremos aminoterminal y carboxilo terminal intracelular (**Figura 5**); las dos son codificadas por diferentes genes y ambas son polimórficas, excepto la cadena α de HLA-DR (Abbas *et al.*, 2001).

Función

Los antígenos de clase I y clase II están involucrados en el control genético de la respuesta inmune adaptativa al desarrollar oligopéptidos antigénicos para el receptor $\alpha\beta$ de las células T; lo que conforma una interacción importante para contrarrestar invasiones microbiológicas, controlar la proliferación de células malignas y determinar el éxito de trasplantes (Shiina *et al.*, 1999).

Las células T están restringidas por su propio MHC; reconocen y responden a un péptido antigénico presentado por una célula presentadora de antígeno (APC) solo si dicha APC expresa una molécula MHC que la célula T reconoce como propia (Abbas *et al.*, 2001), de lo cual surge el concepto de que el reconocimiento de lo propio es parte esencial de la respuesta inmune mediada por los linfocitos T (Moreno, 1996).

Los péptidos antigénicos se unen, ya sea, a las moléculas HLA clase I o HLA clase II y los presentan a los linfocitos T $CD8^+$ y $CD4^+$ respectivamente. A las moléculas clase I se les unen péptidos que derivan de proteínas del citosol, mientras que a las moléculas clase II se les unen péptidos derivados de proteínas de los compartimientos del endosoma y lisosoma, aunque ambas moléculas pueden presentar péptidos antigénicos intra (**Figura 6**) o extra celulares (**Figura 7**). Así, la localización de un antígeno dentro de la célula dicta el tipo de respuesta inmune que se iniciará. El HLA clase I dirige la respuesta de la célula T $CD8^+$ enfocada a virus y tumores. En contraste, la molécula HLA clase II conduce la respuesta a células T $CD4^+$ enfocada a patógenos que residen en compartimiento endosomal/lisosomal o en el medio extracelular (Van, 2001).

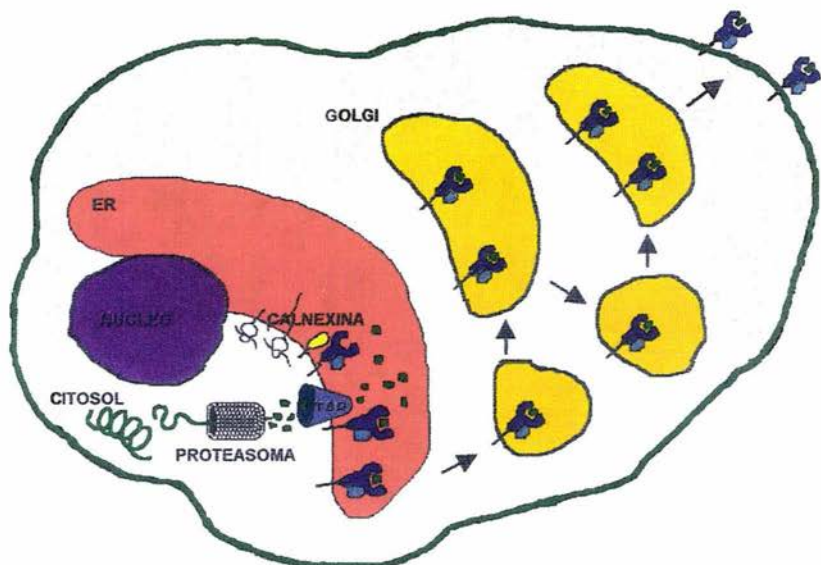


Figura 6. Representación esquemática de la ruta por la que los antígenos intracelulares son procesados y presentados por las moléculas HLA clase I (tomado de Marsh *et al.*, 2000).

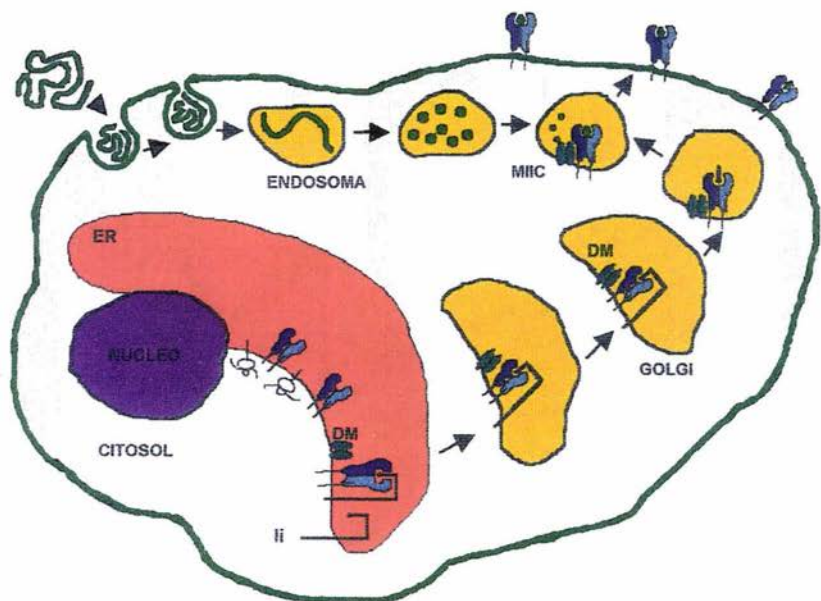


Figura 7. Esquema que muestra la ruta por la cual los antígenos extracelulares son procesados y presentados por las moléculas HLA clase II (tomado de Marsh *et al.*, 2000).

Nomenclatura

Por el constante incremento del número de genes y alelos reconocidos dentro del sistema HLA, su nomenclatura está continuamente en revisión. De acuerdo a la nomenclatura genética internacional, se denomina primero al *locus* seguido por un número que reconoce al alelo. Para la proteína que se define por serología o por técnicas celulares, sólo se indica el *locus* y un número (*i.e.* HLA-DQ4). En el caso del gen que se demuestra por técnicas moleculares se denomina la letra del *locus* y un asterisco, seguido de éste, los primeros dos números indican la designación serológica del alelo y los siguientes señalan su subtipo molecular (*i.e.* HLA-DQB1*0402) (Radillo, 1999).

Enfermedades asociadas con HLA

Se dice que una enfermedad esta relacionada al MHC o HLA si uno o más alelos incrementan o decremantan significativamente cuando un grupo o subgrupo de pacientes es comparado con un grupo control relevante. Existe de esta forma, uno o más genes dentro de la región del MHC que contribuyen a la susceptibilidad genética (Dawkins *et al.*, 1999).

Es preciso subrayar la importancia biomédica, de que el HLA se asocia con diversas enfermedades dentro de las regiones del genoma humano, incluyendo la mayoría de las enfermedades de tipo autoinmune (Aguado *et al.*, 1999), las cuales afectan al 4% de la población mundial. La diabetes mellitus Insulino-dependiente (IDDM) se asocia con DR3/DR4, la mayoría de las espóndilo artropatías (espondilitis anquilosante, tiroiditis de Hashimoto, síndrome de Reiter y lupus eritematoso sistémico (SLE)) se asocian con B27, la esclerosis múltiple (MS) con DR2, y la artritis reumatoide con DR4 (**Tabla 2**) (Rodees y Trowsdale, 1999., Lydyard *et al.*, 2000).

Dos tipos de métodos se emplean para buscar asociación entre un marcador o una característica genética; en este caso antígenos del sistema HLA y susceptibilidad a enfermedad:

El primero de ellos es la tipificación de alelos HLA en una serie de enfermos no relacionados entre sí y se comparan sus frecuencias con las observadas en un grupo de individuos sanos.

El segundo es el estudio intrafamiliar, obteniendo fenotipos y haplotipos de sujetos sanos y enfermos, y valorando si los miembros afectados poseen los mismos haplotipos HLA con frecuencia mayor de la esperada (Nungaray y Granados, 1994).

Enfermedad	Antígeno	Riesgo relativo
Espondilitis anquilosante	B27	87
Diabetes mellitus insulino-dependiente	DR3, DR4	25
Síndrome de Goodpasture	DR2	16
Psoriasis vulgaris	DR4	14
Uveítis aguda anterior	B27	10
Lupus eritematoso sistémico	DR3	6
Esclerosis múltiple	DR2	5
Enfermedad de Graves	DR3	4
Artritis reumatoide	DR4	4
Miastenia gravis	DR3	3

Tabla 2. Enfermedades asociadas con HLA

El riesgo relativo (RR) es la medición de una fuerte asociación. Esta es definida como hK/Hk , donde h es la frecuencia de pacientes con el antígeno, k es la frecuencia de pacientes sin el antígeno, H es la frecuencia de controles saludables con el antígeno y K es la frecuencia de controles sin el antígeno (tomado de Marsh *et al.*, 2000).

Un panorama común de la asociación HLA-enfermedad autoinmune es que el desarrollo de la enfermedad envuelve una predisposición genética, resultado de una combinación de factores en HLA y otros genes. De igual forma entre los individuos que tienen esta predisposición genética, sólo una reducida parte de ellos desarrollará la enfermedad. En quienes lo hagan, la enfermedad desencadena la respuesta inmune a la infección durante la cual una o pocas clonas de la célula T escapan de la tolerancia y llegan a reactivarse contra sus propios péptidos. Las células T atacan a células presentadoras de sus propios péptidos causando inflamación y destrucción celular. Esto incrementa el procesamiento y presentación de proteínas propias las cuales extienden la respuesta inmune e incrementan la inflamación y la destrucción del tejido. Así, la respuesta positiva lleva a una inflamación descontrolada en el tejido blanco y perjudica su función fisiológica (Marsh *et al.*, 2000).

Helicobacter pylori

Características

Helicobacter pylori (*H. pylori*), es un patógeno que infecta el antro gástrico de la mitad de la población mundial, se piensa que es el principal causante de patologías gastroduodenales agudas y crónicas (Parsonnet *et al.*, 1991; Marsall, 1994). Existen otras cepas de *Helicobacter* que infectan el intestino humano como: *Helicobacter canadensis*, *Helicobacter pullorum*, *Helicobacter fennelliae*, *Helicobacter cinaedi*, *Helicobacter* sp.Mainz y *Helicobacter* sp.Flexispira. *Helicobacter westmeadii* es aislado de sangre de pacientes con SIDA pero de origen desconocido (Versalovic y Fox, 2001).

H. pylori (conocido antes como *Campylobacter pylori* y *Campylobacter pyloridis*) es un bacilo Gram-negativo pequeño (3x0.5µm), ondulado o en forma de coma (Sleisenger y Fordtran, 1997). Vive debajo de la capa mucosa que cubre el epitelio gástrico (Parsonnet, 1999). Tiene múltiples flagelos en un polo, es microaerofílico, crece idealmente en una atmósfera de oxígeno reducido (alrededor de 5%), y es una fuente importante, quizás exclusiva, de ureasa gástrica (**Figura 8**). La cual cataliza la hidrólisis de urea en amoníaco y dióxido de carbono incrementando el pH localmente, lo cual le permite colonizar la mucosa gástrica (Peek y Blaser, 1999).

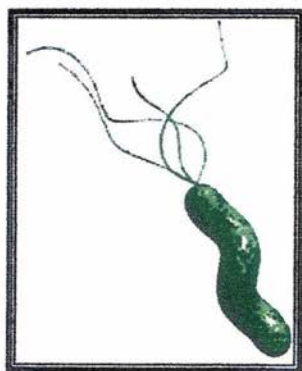


Figura 8. *Helicobacter pylori*
Bacteria ondulada con sus múltiples flagelos en un polo lo cual le permite nadar a través de la capa de moco para establecer contacto con el epitelio gástrico.

Virulencia

En varios patógenos, las regiones que codifican bloques de genes de virulencia son designadas islas de patogenicidad; las cuales se componen de secuencias largas de DNA (de 10 a > 200 kpb) (Stein *et al.*, 2001). La mayoría de los aislados clínicos de *H. pylori* poseen la isla de patogenicidad *cag* (*cag* PAI), *cag* por sus siglas en inglés *cytotoxin associated gene* ya que fue la primera proteína identificada en la isla; por lo tanto *CagA* es considerada como un marcador de patogenicidad para la presencia de esta isla de aproximadamente 35 Kpb (Censini *et al.*, 1996). *CagA* es frecuentemente coexpresada con la citotoxina vacuolada, *VacA* (Crabtree *et al.*, 1995; Tummuru *et al.*, 1994; Xiang *et al.*, 1995). Recientemente, un nuevo gen ha sido descubierto dentro de la isla, designado *iceA* (inducido por el contacto con el epitelio). Existen 2 principales variantes alélicas del gen, *iceA1* y *iceA2* (Peek *et al.*, 1998). La expresión de *iceA1* es sobrerregulada al contacto entre *H. pylori* y las células del epitelio humano y esta, posiblemente, asociada con la enfermedad úlcera péptica (van Doorn *et al.*, 2001). Así con más de 30 genes esta isla codifica proteínas que presentan funciones importantes en la virulencia de *H. pylori*, la virulencia de las cepas de *H. pylori* se puede dividir en tipo I (virulencia alta) y tipo II (virulencia menor) de acuerdo a la presencia o ausencia de la isla de patogenicidad (Covacci y Rappuoli, 1998). Hay una fuerte asociación epidemiológica entre la presencia de *cagA* y el genotipo *vacA*. La función de *CagA* es desconocida pero la infección con cepas *cagA+* (las que contienen esta isla de patogenicidad) es asociada con un incremento en el riesgo de desarrollar gastritis atrófica y cáncer gástrico (Blaser *et al.*, 1995; Kuipers *et al.*, 1995). *CagA* produce más daño en células epiteliales, induce la secreción de citocinas proinflamatorias como la interleucina-8, por lo que presenta una infiltración de neutrofilos y células mononucleares más intensa en la mucosa gástrica (**Figura 9**) (Blaser, 1999). Las islas de patogenicidad se caracterizan frecuentemente por su inestabilidad. Al parecer la adquisición de estas islas de patogenicidad suministra a ciertos microorganismos ventaja selectiva contra sus parientes comensales y les permite colonizar nuevos y menores sitios de manera eficiente (Stein *et al.*, 2001).

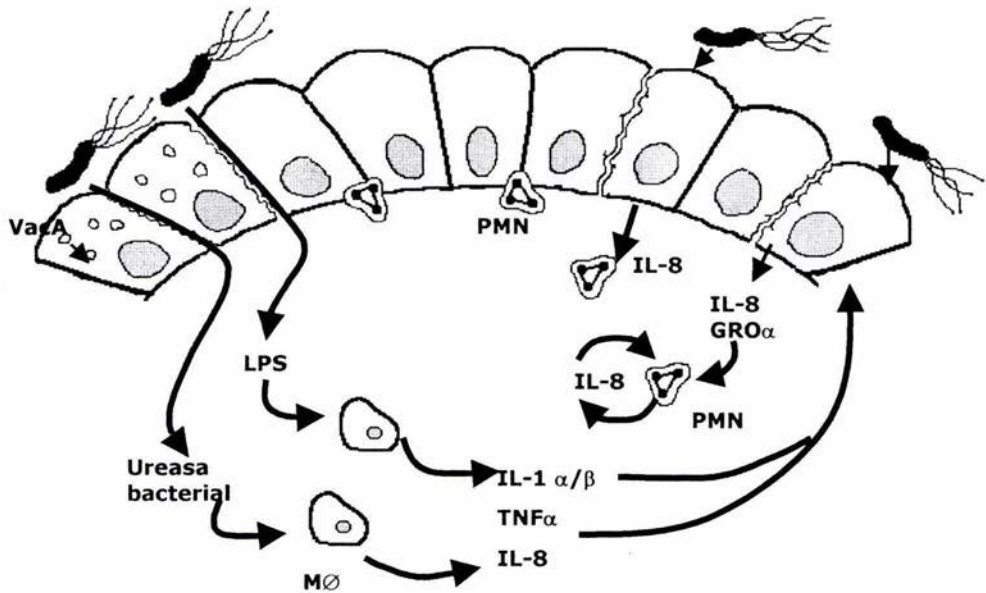


Figura 9. Rutas de la inducción de *Helicobacter pylori* de quimiocinas mucosas en la estimulación bacteriana directa de citocinas tales como IL-8 y GRO- α y activación de macrófagos. La liberación de citocinas proinflamatorias tales como IL-1 α/β y TNF α de macrófagos activados incrementará citocinas C-X-C en el epitelio gástrico (tomado de Crabtree, 2001).

Infección

La infección con *H. pylori*, particularmente cuando proviene de la cepa *cagA* positiva, puede ser considerada como factor de riesgo para el adenocarcinoma gástrico (Rugge *et al.*, 1999).

La mayoría de las bacterias entéricas son transmitidas en asociación con comida y agua, frecuentemente de persona a persona y es particularmente transmitida por saliva o vomito. Los principales vehículos de infección para algunas especies particulares de bacterias son ocasionalmente diferentes en distintos ambientes geográficos. El agua es el vehículo más común en países en vías de desarrollo (Feldman, 2001). La transmisión es probablemente vía fecal-oral y/o oral-oral (Peek y Blazer, 1999). La adquisición de *H. pylori* durante la niñez se da de manera consistente, por la transmisión de persona a

persona entre padres e hijos (Mo *et al.*, 1998). Otro factor de riesgo a la infección es el bajo nivel socio-económico y/o un bajo nivel de educación que incrementan el predominio de infección por *H. pylori* (Malaty *et al.*, 1996). Esta bacteria coloniza el estómago por años o décadas, no por días o semanas como es usualmente el caso de bacterias patógenas (Peek y Blazer, 1999). La mayoría de los pacientes infectados con *H. pylori* son incapaces de liberarse del patógeno, sugiriendo que *H. pylori* puede de algún modo evitar la respuesta inmune del hospedero (Molinari *et al.*, 1998).

Enfermedad

H. pylori fue detectada por patólogos alemanes observando bajo microscopio tejido gástrico humano (Blaser, 1992 y Cover *et al.*, 2001), pero no fue sino hasta un siglo después, en 1982 que los médicos australianos Robin Warren y Barry Marshall identificaron al bacilo curvo, adyacente al epitelio gástrico de pacientes con gastritis crónica. Desde entonces se ha establecido un fuerte lazo entre *H. pylori* y las enfermedades gastroduodenales (gastritis crónica, úlcera gástrica y duodenal, adenocarcinoma gástrico; y linfoma no-Hodgkin del estómago) (Peek y Blaser, 1999). En 1994, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) designa a *H. pylori* como un carcinógeno humano (Falk *et al.*, 2001).

La consecuencia histopatológica más obvia de la colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori* es la adquisición de un tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT) el cual es acompañado por la acumulación de leucocitos polimorfonucleares. El desarrollo de tal actividad crónica induce gastritis que es la plataforma común de varios resultados clínicos por infección de *H. pylori* en diferentes sujetos (Faller y Kirchner, 2001).

Casi el 80% de los individuos infectados por *H. pylori* desarrolla gastritis asintomática, esto es probablemente por varios factores de virulencia tales como la producción de citocinas y la presencia de CagA y VacA (**Tabla 3**). Aunque la bacteria no invada el epitelio gástrico, la infección entra en una intensa infiltración pleomórfica con citocinas, expresión que perpetua la inflamación. *H. pylori* también induce células inflamatorias para producir metabolitos de oxígeno reactivo que pueden dañar el DNA y promover la

carcinogénesis. Los productos bacteriológicos en combinación con las citocinas incrementan los niveles de gastrina (Scheiman y Cutler, 1999). En el mundo, la mayoría de los individuos con gastritis asociada con *H. pylori* son asintomáticos y tienen una mucosa gástrica de aspecto normal cuando se le observa por endoscopia (Sleisenger y Fordtran, 1997).

Constituyente	Función
Ureasa	Resistencia al ácido
Flagelos	Movilidad
HspB	Chaperona
HspA	Chaperona, unión níquelada
BabA2	Adhesina
HpaA	Adhesina
Porinas	Transporte, proinflamatorio
Hp-NAP	Adhesina de Neutrofilo, bacterioferritin, Unión a DNA
Superoxido dismutasa	Decrementa daño oxidativo
Catalasa	Decrementa daño oxidativo
Isla de patogenicidad <i>cag</i>	Inducción de citocinas en células epiteliales
VacA	Alteraciones en la función de células epiteliales, permeabilidad en monocapa y procesamiento de antígenos
Antígenos de Lewis LPS	Mimetismo molecular.

Tabla 3. Constituyentes potencialmente importantes de *H. pylori* para la colonización inicial o la persistencia de la infección (tomado de Cover *et al.*, 2001).

A nivel del huésped, se han realizado algunos estudios de asociación entre alelos del sistema HLA y cáncer gástrico distal asociado a infección crónica con *H. pylori* en poblaciones japonesas y caucásicas (Azuma *et al.*, 1998; Karhukorpi *et al.*, 1999 y Lee *et al.*, 1996). En Japón el alelo DQA1*0102 es menos frecuente en pacientes con gastritis atrófica cuando se les compara con pacientes de gastritis superficial y con testigos *H. pylori* negativo. En esta misma población la frecuencia del haplotipo DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 confiere protección a la infección causada por *H. pylori* (Azuma *et al.*, 1998; Kunstmann *et al.*, 2002). Sin embargo, en la población caucásica no

se encontró asociación alguna con DQA1 (Karhukorpi *et al.*, 1999), aunque algún estudio aislado reportó elevación de DQB1*0301 en pacientes con cáncer gástrico (Lee *et al.*, 1996).

POBLACIÓN DE ESTUDIO

La familia náhuatl o nahua es la familia más sureña del tronco lingüístico yutonahua. Esta es la familia de lenguas indígenas con más hablantes en el México de hoy, más de un millón y medio de hablantes. El nombre "náhuatl" proviene de una raíz *nahua* (nawa) que significa 'sonido claro' u 'orden'. El tronco yutonahua esta compuesto por cinco familias: corachol, náhuatl, pimana y tarachita (<http://www.sil.org/mexico/nahuatl>).

ANTECEDENTES

El Altiplano central mexicano, cuyo centro es la cuenca de México y los cercanos valles de Puebla, Toluca y Morelos, fue una región clave en la antigua Mesoamérica y más tarde se convirtió en el corazón del Imperio azteca. Habitado por pueblos de habla náhuatl y de las lenguas derivadas de la familia otopame, la población indígena de esta región es la que mayor influencia ha sufrido de la población mestiza y de las transformaciones que ha tenido lugar durante el periodo colonial y republicano. Es también donde los indígenas se han integrado más rápidamente a la población mestiza. Milpa Alta es asiento de uno de estos pueblos nahuas. Aunque políticamente pertenece al Distrito Federal, forma parte, junto con Xochimilco, de la zona más rural de la capital de la República.

Los primeros habitantes de la región pertenecieron a familias chichimecas cazadoras-recolectoras, que se asentaron al sur de los "lagos centrales" entre los siglos XII y XIII. Los nahuas de esta zona fueron tributarios de los mexicas, quienes en la consolidación de su imperio los sometieron a través del señorío de Xóchimilco; el tributo consistía en bienes y en fuerza de trabajo. Posteriormente fueron sometidos por la Corona española (Ramírez Contreras A H. en www.ini.gob.mx).

LOCALIZACIÓN

Milpa Alta fue un antiguo asentamiento nahua. Actualmente es una de las 16 delegaciones políticas que conforman el Distrito Federal. Con una extensión de 27 828 ha, es una de las delegaciones rurales más extensas del valle de México. Los nahuas de Milpa Alta habitan en doce pueblos: Villa Milpa Alta, que es la cabecera delegacional; San Antonio Tecomitl; San Francisco Tecoxpa; San Jerónimo Miacatlán; San Agustín Ohtenco, todos éstos situados al oriente de la delegación; San Pedro Atocpan, San Pablo Oztotepec, San Bartolomé Xicomulco y San Salvador Cuauhtenco localizados al sureste y, por último, al sur se encuentran San Lorenzo Tlacoyucan, Santa Ana Tlacotenco y San Juan Tepenahuac (Ramírez Contreras A H. en www.ini.gob.mx).

JUSTIFICACIÓN

Los estudios realizados en infecciones causadas por *H. pylori* se han enfocado a factores bacterianos y existen pocos estudios relacionados con los factores del huésped. Las características del huésped son importantes en el resultado de la infección, ya que, la mayoría de los individuos infectados (80%) son asintomáticos. La respuesta del huésped parece estar dada por la sensibilidad de la población infectada, que se manifiesta como la magnitud de la respuesta inmune e inflamatoria del individuo. Los genes HLA tienen una participación importante dentro de la respuesta inmune (*i.e.* trasplantes, enfermedades autoinmunes y la respuesta a la infección); motivo por el cual es necesario correlacionar los mecanismos bacterianos y los del huésped, con la finalidad de conocer los factores que causan el desarrollo de una infección o los procesos de protección en individuos asintomáticos o negativos a *H. pylori*.

En las familias nahuas pertenecientes a los pueblos de San Pedro Atocpan y Santa Ana Tlacotenco de Milpa Alta D.F., sujetas a este estudio, no se tienen antecedentes respecto al desarrollo de la infección con *H. pylori*. Por lo que el estudio a realizar en las muestras colectadas de estas familias nahuas representa la oportunidad de trabajar con poblaciones endémicas, cuyos haplotipos son semejantes, lo que permite menos variantes y al mismo tiempo obtener de estas mismas familias un grupo control, ya que no todos los sujetos pertenecientes a estas familias, presentan infección con *H. pylori*, buscándose así, determinar si existe un haplotipo que les confiera cierta protección o susceptibilidad a padecer dicha infección. Por lo antes mencionado es importante realizar estudios de asociación con alelos HLA de clase II y la infección causada por *H. pylori*.

HIPÓTESIS

Existe una predisposición genética o resistencia a esta bacteria en la población nahua, diferente a otras poblaciones, en el desarrollo de la infección por *Helicobacter pylori*, entonces se espera que en algunas familias nahuas existan haplotipos HLA-DQA1 y HLA-DQB1 que se asocien, ya sea de forma positiva o negativa, a la adquisición de la infección por esta bacteria.

OBJETIVOS

Objetivo general

- ♦ Analizar si existe una predisposición genética o resistencia a la adquisición y el desarrollo natural de la enfermedad asociada a la infección por *H pylori*, determinando la frecuencia alélica de HLA-DQA1 y DQB1 en las familias nahuas.

Objetivos particulares

- ♦ Amplificación por medio de PCR de los *loci* HLA-DQA1 y HLA-DQB1 del exón 2 del DNA de todas las muestras, líneas celulares (con iniciadores sin marcar) y de las líneas celulares utilizadas como referencias (con iniciadores marcados con Cy5) para el análisis conformacional por RSCA.
- ♦ Comprobación por medio de electroforesis de la calidad de producto de PCR en muestras, líneas celulares y referencias utilizando marcador de pesos moleculares.
- ♦ Hibridación del producto de PCR de cada referencia marcada con el producto de PCR de líneas celulares y miembros de familias nahuas, para su posterior estudio en el secuenciador.
- ♦ Interpretación de los resultados enfrentando las movilidades de los alelos específicos de cada línea celular contra las movilidades del alelo o alelos pertenecientes a cada miembro de la población de estudio con ayuda del programa *allele locator*[™] para la técnica RSCA.
- ♦ Obtención de los porcentajes de frecuencias de alelos HLA-DQA1 y HLA-DQB1, así como de haplotipos presentes en individuos infectados y sanos, para determinar asociaciones positivas o negativas de estos alelos con la infección.

METODOLOGÍA

Sujetos de estudio

Esta investigación se realizó en dos generaciones de 30 familias nahuas con un total de 108 muestras de sangre periférica. Las familias fueron procedentes de San Pedro Atocpan y Santa Ana Tlacotenco, de la delegación Milpa Alta en el Distrito Federal. Las muestras fueron aportadas por la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMEIP) del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

H. pylori

El estudio de *H. pylori* se realizó en cada individuo con la determinación de anticuerpos IgG anti-CagA por ELISA en relación al valor de densidad óptica de la muestra, los valores mayores a 1.0 fueron considerados como seropositivos y la prueba de aliento (UBT *urea breath test*), método no invasivo que consiste en la ingestión de una cápsula de urea marcada con el isótopo carbono 13 no radioactivo y detección posterior del mismo incorporado al CO₂ expirado, producto del desdoblamiento de la urea por la ureasa de *H. pylori*, estas pruebas fueron llevadas a cabo en la UIMEIP.

Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó a partir de sangre periférica mediante una microtécnica de *salting-out* que utiliza dos detergentes: uno para lisar eritrocitos (TTS) y el otro leucocitos (SDS 10%, NaCl 5mM y saturado). La separación del DNA se obtuvo de una dilución de cloroformo y alcohol isoamílico (SEVAG). El DNA se precipitó con alcohol absoluto, posteriormente se lavó dos veces con alcohol al 70% y se disolvió en 100µl de agua bidestilada, para su almacenamiento a -30°C hasta su utilización (**Apéndice I**). La calidad del DNA se verificó mediante electroforesis y espectrofotometría. La electroforesis se llevó a cabo sobre un gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio y cubierto por solución amortiguadora TBE 1X, en una cámara de electroforesis con voltaje de 100 volts durante 30 minutos (**Apéndice II**), el gel se colocó para su evaluación sobre un transiluminador foto documentador (UVP Bio Doc-It™ System USA). La determinación

espectrofotométrica se realizó en un espectrofotómetro Gene Quant *pro* Amersham Pharmacia Biotech Sweden a longitudes de 260 nm (que indica la concentración de DNA) y 280 nm (que mide la concentración de proteínas). La relación 260/280 calcula la pureza del DNA, la optima es de 1.8.

Líneas celulares

Se utilizaron paneles de 7 y 13 DNAs de líneas celulares linfoblastoides de alelos conocidos para DQA1 y DQB1, respectivamente, para la tipificación de los alelos clase II de las muestras de DNA a estudiar. Estas se obtuvieron del 12^{avo} Taller Internacional de Histocompatibilidad.

LÍNEA CELULAR	ALELO DQA1*
KAS 116	0101
LBVF	0201
SPOO10	0102
BTB	0401
OMW	0103
Steinlin	050101
JY	030101

LÍNEA CELULAR	ALELO DQB1*	LÍNEA CELULAR	ALELO DQB1*
STEINLIN	0201	KAS 116	050101
CALOGERO	050201	AMALA	030101
C47	050301	DBB	030302
	y 0201/02	WT47	060401
AKIBA	060101	LBVF	0202
WT51	0302	OMW	0603
MGAR	0602	BTB	0402

Iniciadores

La secuencia de los iniciadores 5' y 3' utilizados en la amplificación de los *locis* HLA-DQA1 y HLA-DQB1 se encuentran localizados en el intrón 1 e intrón 2 respectivamente (Pérez *et al.*, en proceso).

Condiciones para PCR

DQA1

Diferentes concentraciones de los reactivos que se utilizaron en la reacción de PCR del exón 2 fueron probados para su estandarización. La concentración final de la reacción de DQA1 fue de 16mM buffer 10X (NH₄), de 0.08mM dNTP's, de 1.5mM MgCl₂, de 0.5mM para los iniciadores 5' y 3', de 0.05U para la Taq polimerasa (BIOLINE U.K. Ltd.) y de 0.5 µg de DNA en 25 µl de volumen final.

DQB1

La reacción de PCR del exón 2 del *locus* DQB1 se realizó a una concentración final de 16mM buffer 10X (NH₄), 0.2mM dNTP's, 2mM MgCL₂, 0.5mM de cada iniciador (5' y 3'), 0.03U *Taq* polimerasa (BIOLINE U.K. Ltd.) y 0.5 µg de DNA en un volumen final de 25 µl. Se preparó una mezcla de reacción en un tubo eppendorf de 0.5ml, se agregaron las cantidades correspondientes de cada reactivo sin el DNA de la muestra. Posteriormente, se añadió a cada tubo de 0.2 ml para PCR, 22.5 µl de la mezcla de reacción y a continuación 2.5 µl del DNA a amplificar (paciente o línea celular); para el control negativo se añadió 2.5 µl de agua bidestilada.

Una vez terminadas de montarse las reacciones de PCR para la amplificación de los *locis* DQA1 y DQB1 de las muestras, se procedió a introducirlas al termociclador (PTC-200, M.J. Research Watertown Massachussets) con el correspondiente programa de PCR (**Tabla 4**):

PROGRAMA PARA DQA1

Paso 1	95°C por 4 min
Paso 2	95°C por 30 seg
Paso 3	54°C por 50 seg
Paso 4	72°C por 30 seg
Paso 5	Ir a 2, 32 veces
Paso 6	72°C por 8 min
Paso 7	15°C por siempre
Paso 8	Fin

PROGRAMA PARA DQB1

Paso 1	95°C por 4 min
Paso 2	95°C por 30 seg
Paso 3	63°C por 50 seg
Paso 4	72°C por 30 seg
Paso 5	Ir a 2, 32 veces
Paso 6	72°C por 8 min
Paso 7	15°C por siempre
Paso 8	Fin

Tabla 4. Programas de PCR, para los locus estudiados.

El producto de PCR de las muestras de DNA de pacientes y de líneas celulares, se observaron, mediante electroforesis horizontal sobre un gel de agarosa al 2% (**Figura 10**).

El tamaño del producto amplificado fue de 366 pares de bases(pb) para DQA1 y de 316 pb para DQB1.

Preparación de *ladders* (DNA control)

Con la finalidad de controlar las variaciones entre todos los geles se diseñaron conjuntos de 2 a 3 *ladders* (controles de DNA) para cada FLR de DQA1 y DQB1. Cada conjunto estuvo formado de 7 a 13 alelos conocidos de DQA1 y DQB1 respectivamente. Las *ladders* fueron preparadas por hibridación independiente con la correspondiente FLR como se describió anteriormente (**Figura 11**). Luego los heterodúplex formados fueron mezclados a volúmenes iguales, en tal forma que cada conjunto de DNAs control contenían todos los alelos disponibles de DQA1 y DQB1.

Fundamento de la técnica RSCA

RSCA (*Reference Strand mediated Conformation Analysis*) es una técnica capaz de estudiar el polimorfismo de cualquier gen, identificando alelos nuevos que difieren únicamente por una substitución nucleotídica (**Figura 12**). En este estudio se tipificaron alelos HLA-DQA1 y DQB1.

El primer paso de RSCA consistió en la obtención de referencias marcadas (FLR *fluorescent labelled reference*). Las FLRs se elaboraron a partir de líneas celulares linfoblastoides que fueron amplificadas para el exón 2 del *locus* a estudiar. Para ello uno de los iniciadores (5' ó 3') se marcó con Cy5' (carbocianina-5) en la posición 5' del iniciador. Al realizarse la amplificación del exón solo una de las cadenas del producto de PCR se encontró marcada. En forma independiente, se realizó la amplificación de las mismas líneas celulares utilizadas para las FLRs usando iniciadores sin marcar (iniciadores 5' y 3' para DQA1 y DQB1). A continuación se llevó a cabo la desnaturalización e hibridación de la FLR (1µl del producto de PCR marcado con Cy5) y de la línea celular (3µl de producto de PCR), formándose varios dúplex (homodúplex y heterodúplex) (**Figura 11**). La conformación molecular de los dúplex es única, y la movilidad del DNA de doble cadena en un gel no desnaturalizante, PAGE, depende únicamente de las condiciones electroforéticas, así la migración de los dúplex dependerá de las diferencias en la conformación molecular. El peso molecular será el mismo en todos los alelos, sin embargo, pueden presentarse excepciones en caso de existir alelos con inserciones o deleciones (Pérez, 2000).

PCR

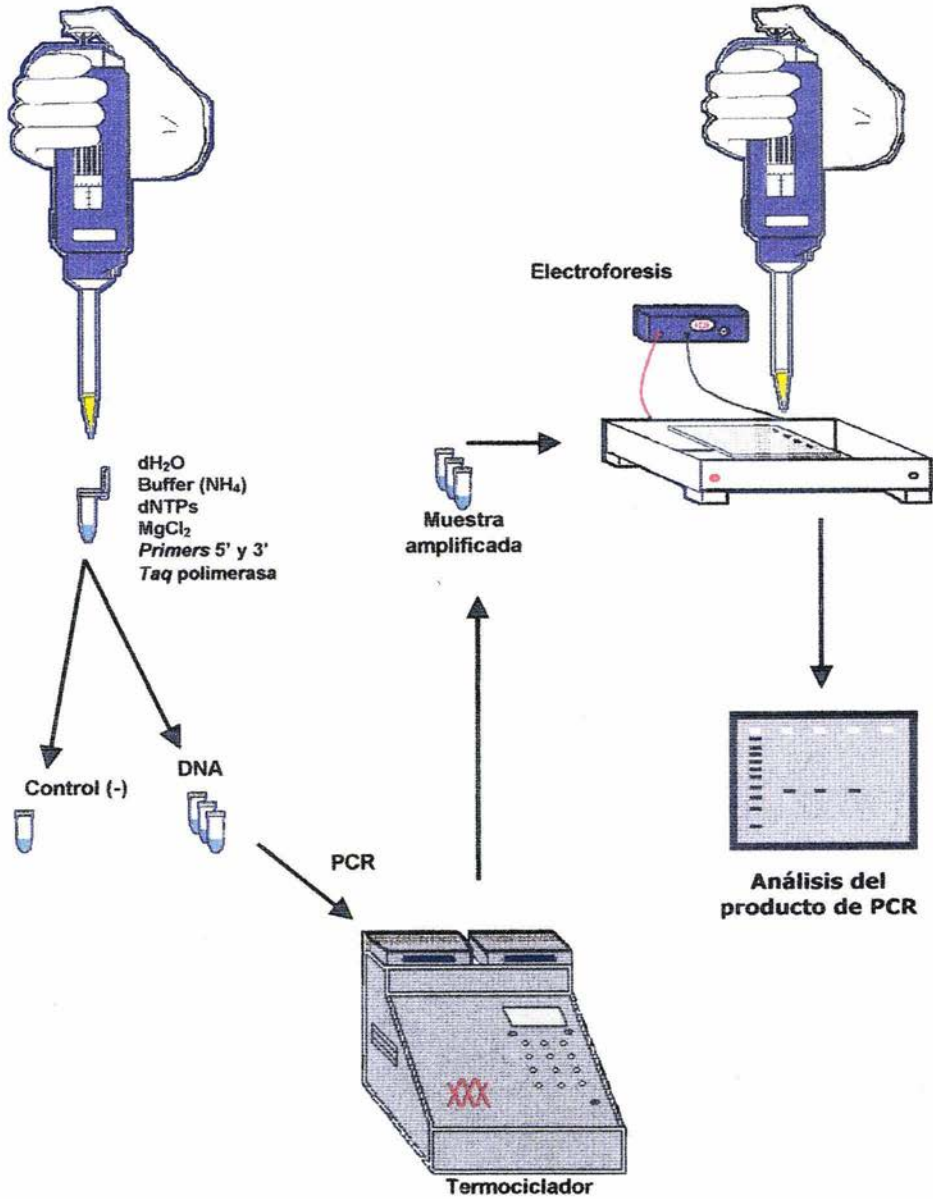


Fig.10. Procedimiento de PCR, con el que se da inicio a la técnica RSCA, amplificándose el *locus* de interés (DQA1 y DQB1), con iniciadores marcados (Cy5) y sin marcar.

HIBRIDACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR DE LINEAS CELULARES Y MUESTRAS CON FLRS



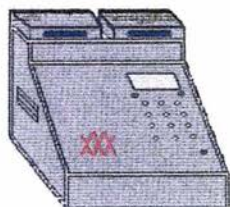
1 µl FLR

Se agregó 1 µl de la FLR correspondiente (para DQA1 o DQB1).



1 µl FLR + 3 µl DNA

A continuación se agregan 3 µl del producto de PCR de la línea celular o muestra a hibridar con la referencia.



Se introduce al termociclador para su desnaturalización e hibridación.

Paso 1	95°C	por 4 min
Paso 2	55°C	por 5 min
Paso 3	15°C	por siempre



1 µl FLR + 3 µl DNA
+ 1 µl Buffer de carga

Se añade buffer de carga (1µl) a cada muestra, y se cargan en el gel, del ALF*express*, 1µl de la muestra hibridada para iniciar la electroforesis.

Figura 11. Representación simplificada de la preparación de líneas celulares y muestras a hibridar con su respectiva FLR, previo a su electroforesis en el secuenciador automatizado ALF*express*™.

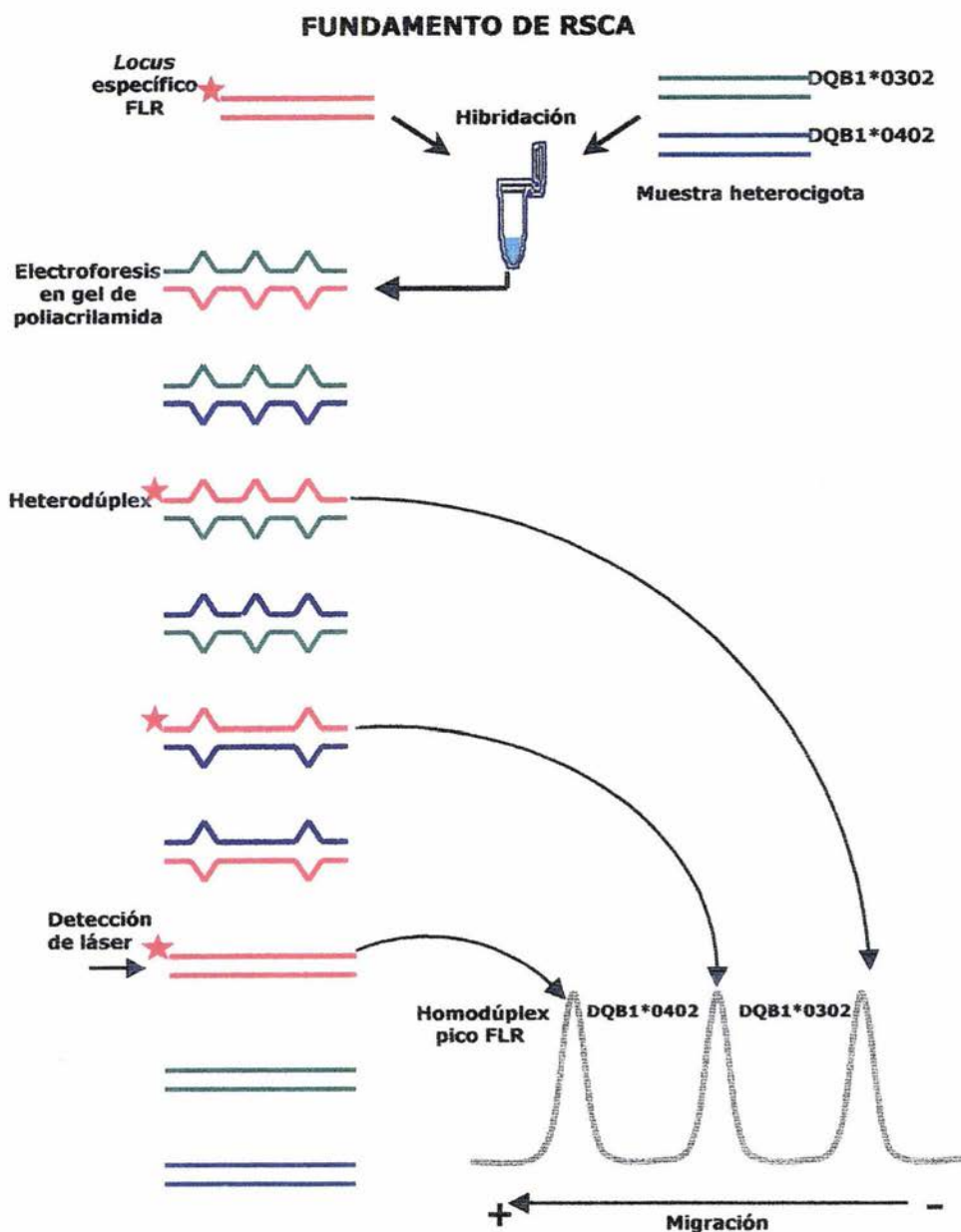


Figura 12. Representación esquemática de RSCA. La conformación de cada fragmento alélico HLA es controlado por la combinación del locus específico del producto de PCR con una molécula del DNA FLR. Únicamente los heterodúplex marcados con Cy5 serán detectados por el láser (Tomado de Argüello *et al.*, 1998).

Electroforesis

Antes de cargar las muestras en el gel, se agregó a cada tubo 1 μ l de buffer de carga (15% Ficoll y 0.25% de azul de bromofenol) y se centrifugo (**Figura 11**). Se colocó 1 μ l de cada línea celular ó muestra, hibridada con la FLR en cada pozo del gel. Las muestras se analizaron por electroforesis en un secuenciador automatizado ALFexpress™ (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) (**Figuras 13 y 14**), mediante un gel no desnaturizante al 0.25X de poliacrilamida: 20 ml MD™ Gel solution, 8 ml de buffer TBE 10X (ambos de Biowhittaker, MD, USA), 48 μ l de TEMED y 480 μ l de persulfato de amonio al 10% (ambos de Pharmacia Biotech), para un volumen total de 80 ml. La longitud del gel fue de 25 cm y su grosor de 0.5 mm. Las condiciones de la electroforesis fueron 30W de poder constante, la temperatura se mantuvo a 40°C durante la electroforesis por un sistema externo (Lauda Brinkmann. Instruments Inc. USA), el tiempo de corrimiento fue de 400 minutos. La movilidad de cada dúplex fluorescente fue analizada usando el programa *Allele Locator*™ (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) (**Apéndice IV**).

Análisis Estadístico

El método más simple y más eficiente para estudiar la asociación entre una enfermedad y un locus marcador, es el de construir una tabla de 2x2. En este se asume la existencia de dos grupos tomados al azar, uno con la enfermedad y el otro control negativo a dicha enfermedad, cada grupo formado por individuos clasificados por tener un alelo marcador o no. Sin embargo, la asociación de una enfermedad con un marcador genético perteneciente a un sistema altamente polimórfico como el sistema HLA, requiere del análisis de un gran número de especificidades antigénicas, lo cual puede originar asociaciones significativas al azar, por este motivo Svejgaard sugirió reducir el número de inferencias incorrectas mediante la corrección de Bonferroni que consiste en multiplicar el nivel de significancia (p), obtenido por X^2 o mediante p exacta de Fisher, por el número de antígenos evaluados (Hawkins, 1981; Svejgaard, 1994).

SECUENCIADOR ALFexpress™

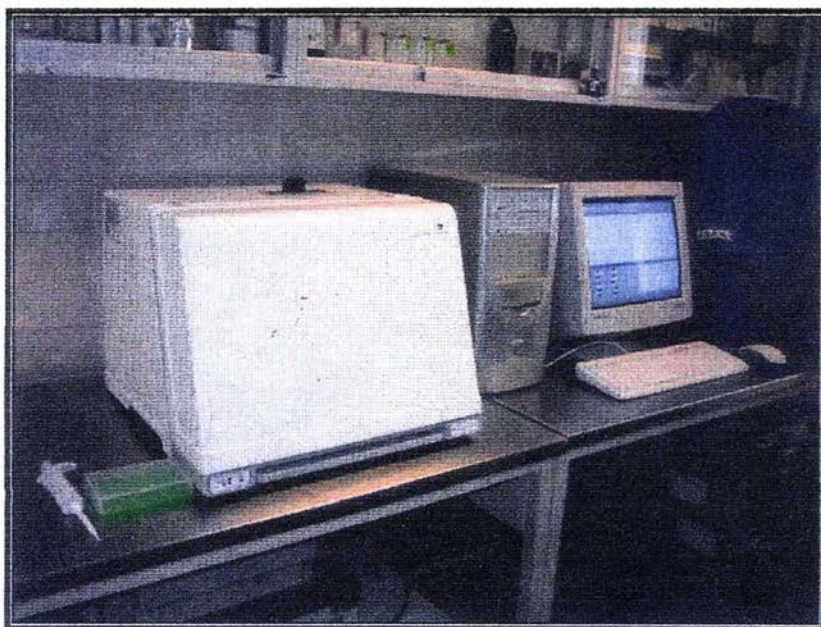
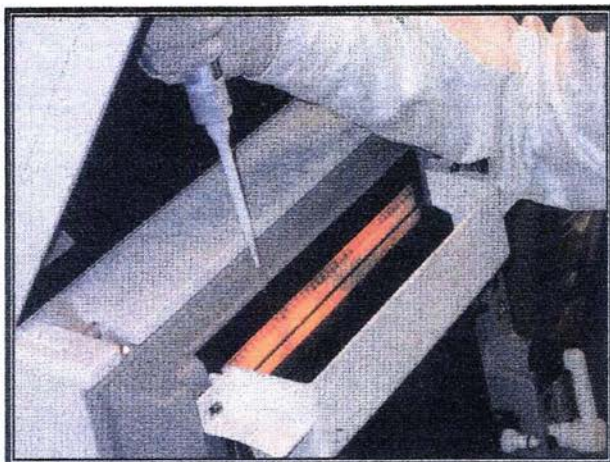


Figura 13. Secuenciador automatizado ALFexpress™, utilizado en la técnica de RSCA, el cual realiza electroforesis utilizando un gel de poliacrilamida vertical, con detección láser en la parte inferior de este que detecta la migración de heterodúplex marcados con fluorocromo. Este equipo se encuentra conectado a una computadora desde donde se controlan las condiciones de la electroforesis, así como, el análisis de los alelos obtenidos mediante el programa *allele locator*™.

MONTAJE DE MUESTRAS Y PREPARACIÓN DEL EQUIPO



Carga de muestras en el gel de poliacrilamida

Terminadas de cargar las muestras se colocan los electrodos correspondientes en la parte superior e inferior del gel, se cubre el láser y se procede a bajar la tapa para dar inicio a la electroforesis

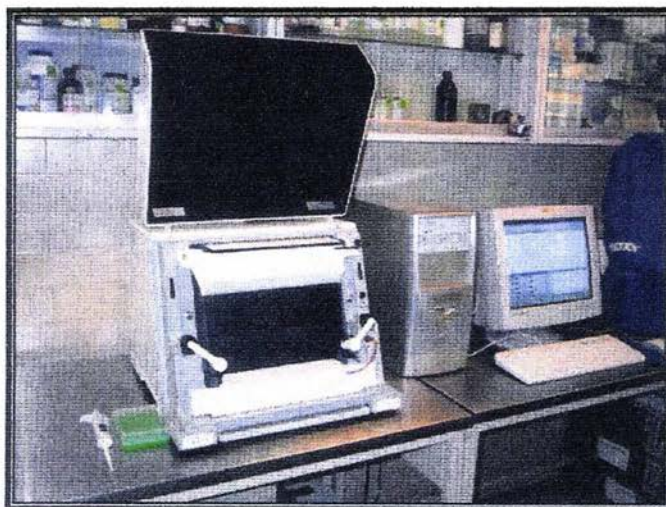


Figura 14. Montaje de muestras y preparación del equipo antes de iniciar la electroforesis.

Diagrama de flujo

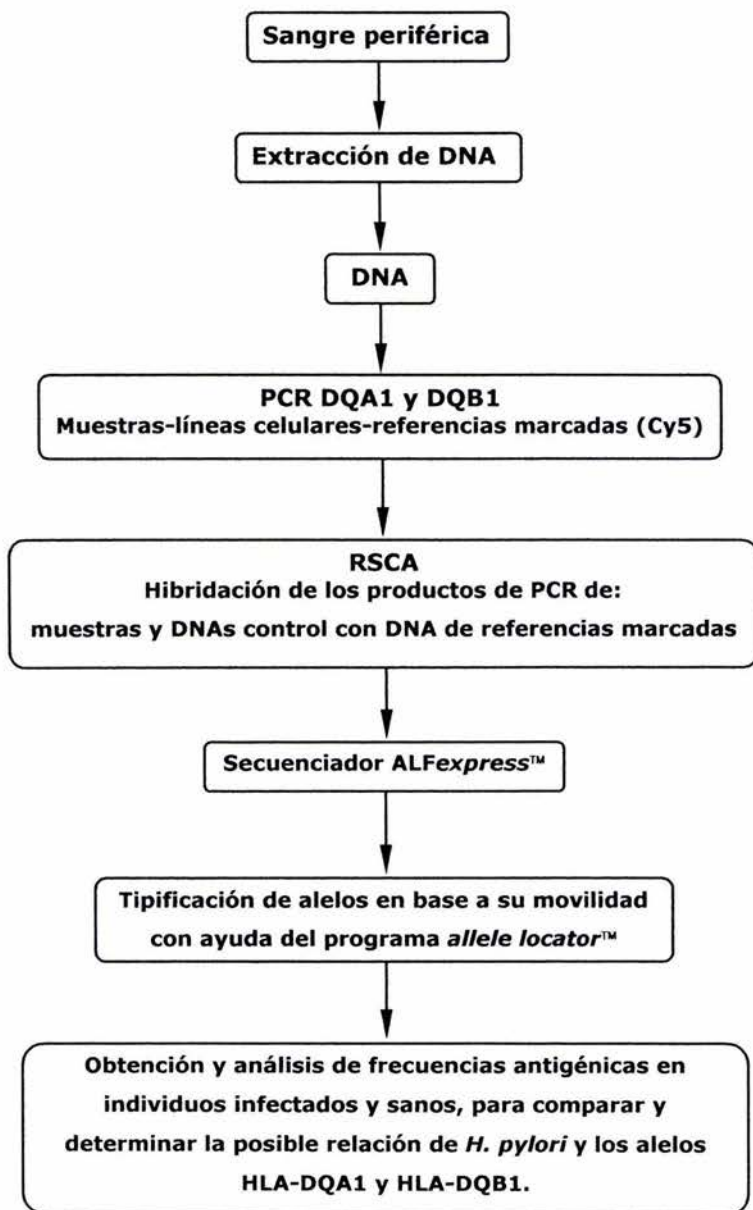


Figura 15. Diagrama de flujo de la metodología utilizada.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Extracción de DNA

La extracción de DNA de las 108 muestras de sangre periférica de indígenas nahuas se realizó a partir de leucocitos, ya que son una buena fuente de DNA. Los resultados de las extracciones de DNA, la corroboración en gel de agarosa y la cuantificación en el espectrofotómetro se encuentran representados en la **figura 16** y en la **tabla 5**.

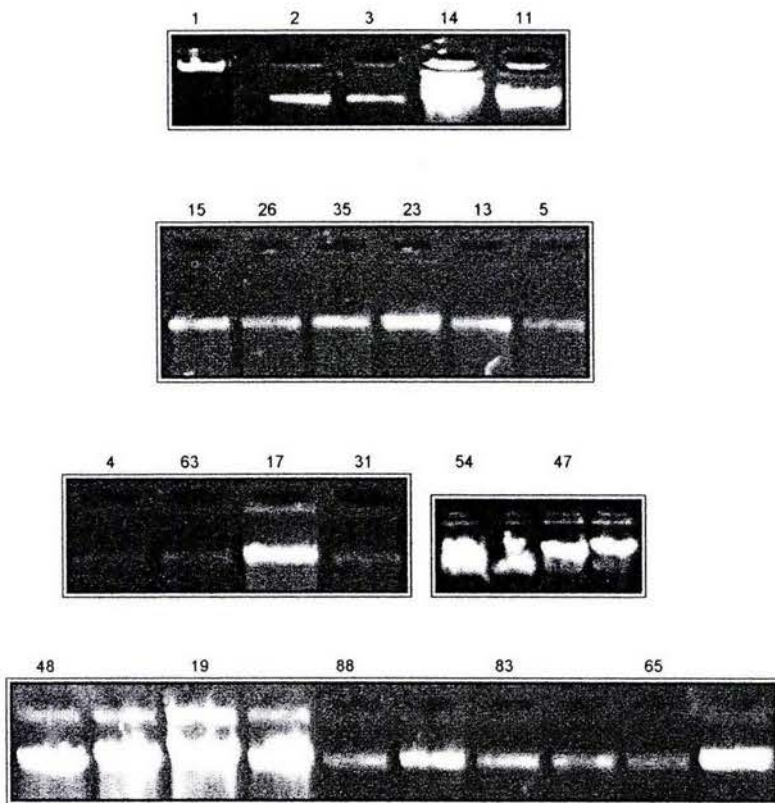


Figura 16. Corroboración de algunas muestras en gel de agarosa al 0.8% , en estos geles, se muestra la presencia del DNA extraído, observable en la intensidad de las bandas.

Tabla 5. Cuantificación del DNA extraído a las 108 muestras de sangre periférica de indígenas nahuas.

No.	260nm	280nm	260/280	[ng/μl]
1	0.101	0.092	1.098	505
2	0.106	0.068	1.559	265
3	0.08	0.082	0.976	400
4	0.035	0.025	1.400	88
5	0.076	0.052	1.462	190
6	0.075	0.072	1.042	375
7	0.129	0.088	1.466	323
8	0.329	0.218	1.509	823
9	0.074	0.053	1.396	185
10	0.033	0.021	1.571	83
11	0.197	0.128	1.539	493
12	0.142	0.103	1.379	355
13	0.050	0.052	0.962	250
14	0.253	0.168	1.506	633
15	0.097	0.063	1.540	243
16	0.182	0.116	1.569	455
17	0.272	0.178	1.528	680
18	0.259	0.170	1.524	648
19	0.492	0.351	1.402	1230
20	0.029	0.025	1.160	73
21	0.002	0.013	0.154	10
22	0.270	0.165	1.636	675
23	0.123	0.069	1.783	308
24	0.126	0.071	1.775	315
25	0.096	0.088	1.091	480
26	0.059	0.054	1.093	295
27	0.096	0.065	1.477	240
28	0.077	0.080	0.963	385
29	0.053	0.038	1.395	265
30	0.025	0.020	1.250	63
31	0.039	0.029	1.345	98
2	0.023	0.018	1.278	58
33	0.022	0.015	1.467	55
34	0.047	0.040	1.175	235
35	0.085	0.055	1.545	213
36	0.135	0.092	1.467	338
37	0.034	0.029	1.172	85
38	0.105	0.075	1.400	525
39	0.071	0.055	1.291	355
40	0.133	0.089	1.494	333
41	0.129	0.087	1.483	323
42	0.033	0.030	1.100	165
43	0.224	0.145	1.545	1120
44	0.103	0.072	1.431	258
45	0.157	0.104	1.510	393
46	0.102	0.073	1.397	255
47	0.077	0.047	1.638	385
48	1.001	0.75	1.335	2503
49	0.062	0.047	1.319	155
50	0.004	0.001	4.000	20
51	0.017	0.016	1.063	43
52	0.015	0.016	0.937	38
53	0.016	0.017	0.941	40
54	0.632	0.465	1.359	1580

No.	260nm	280nm	260/280	[ng/μl]
55	0.016	0.015	1.067	40
56	0.106	0.073	1.452	530
57	0.180	0.125	1.440	450
58	0.115	0.079	1.456	288
59	0.087	0.054	1.611	435
60	0.179	0.123	1.455	448
61	0.019	0.020	0.950	48
62	0.077	0.051	1.510	193
63	0.027	0.023	1.174	68
64	0.040	0.029	1.379	100
65	0.116	0.068	1.719	580
66	0.030	0.018	1.667	30
67	0.071	0.048	1.479	178
68	0.017	0.013	1.308	17
69	0.018	0.019	0.947	45
70	0.014	0.014	1.000	35
71	0.014	0.014	1.000	35
72	0.204	0.121	1.686	510
73	0.166	0.108	1.537	415
74	0.129	0.085	1.518	645
75	0.030	0.031	0.968	150
76	0.019	0.018	1.056	95
77	0.036	0.026	1.385	90
78	0.026	0.021	1.238	65
79	0.034	0.026	1.308	85
80	0.082	0.054	1.519	205
81	0.024	0.019	1.263	60
82	0.254	0.154	1.649	635
83	0.112	0.072	1.556	280
84	0.045	0.033	1.364	113
85	0.105	0.068	1.544	263
86	0.151	0.095	1.589	378
87	0.066	0.043	1.535	165
88	0.120	0.077	1.558	300
89	0.037	0.028	1.321	93
90	0.053	0.02	2.650	265
91	0.071	0.048	1.479	178
92	0.012	0.008	1.500	30
93	0.045	0.032	1.406	113
94	0.118	0.074	1.595	295
95	0.010	0.011	0.909	25
96	0.027	0.023	1.174	68
97	0.040	0.025	1.600	100
98	0.052	0.034	1.529	130
99	0.030	0.019	1.579	75
100	0.004	0.004	1.000	10
101	0.010	0.012	0.833	25
102	0.024	0.020	1.200	60
103	0.025	0.024	1.042	63
104	0.005	0.008	0.625	13
105	0.013	0.015	0.867	33
106	0.027	0.027	1.000	68
107	0.027	0.018	1.500	68
108	0.040	0.029	1.379	100

En algunas muestras de sangre recolectadas no se pudo realizar la extracción del DNA el mismo día de su obtención por lo que la cantidad del DNA no fue la optima (**Figura 16**, muestras 4, 63 y 31.).

Es importante mencionar que para este tipo de estudios, debe extraerse el DNA de las muestras de sangre el mismo día de su obtención, ya que de este modo, se asegura una buena calidad y cantidad del DNA.

Estudio del *locus* DQA1

PCR

La PCR es una manera rápida de obtener grandes cantidades de genes, en nuestro caso genes HLA específicos para su tipificación. Utilizando este método, es posible generar millones de copias de un gen determinado. Una de las ventajas de la PCR es que utiliza dos iniciadores de manera que ambas hebras del DNA son copiadas al colocarse los iniciadores en los extremos de la región a amplificarse. Puesto que la mayoría de los polimorfismos de los genes clase II se encuentran en el segundo exón, los iniciadores son por lo general, diseñados para flanquear esta región.

La amplificación de HLA-DQA1 en las líneas celulares se comprobó por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, y pudo corroborarse la amplificación, a través de un marcador de peso molecular (**Figura 17**).

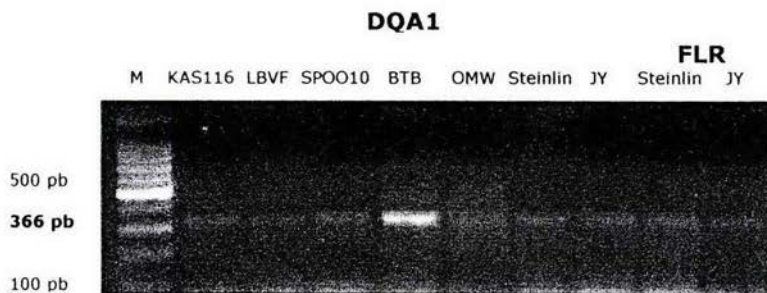


Figura 17. Gel de agarosa al 2%, donde, se observa las amplificación por PCR del *locus* DQA1 de las líneas celulares y FLRs producto de PCR marcado con Cy5. Las bandas corresponden a los 366 pb.

Independientemente de la concentración del DNA obtenido durante el proceso de extracción, las muestras con concentraciones altas de DNA se ajustaron a una concentración de $200^{ng}/\mu l$, ya que la reacción de PCR se estandarizó a partir de esta concentración. Aunque algunas muestras presentaron una concentración menor la reacción de PCR fue aún así favorable para su amplificación (**Figura 18**).



Figura 18. Geles de agarosa al 2% donde se observa la amplificación correspondiente al *locus* DQA1 de las muestras de DNA nahua.

Selección de las mejores FLRs para DQA1

Para obtener las dos FLRs utilizadas en la tipificación de los nahuas infectados y no infectados, fue necesario obtener los productos de PCR marcados con Cy5 y sin marcar de los DNAs de las 7 líneas celulares, luego este producto de PCR marcado correspondiente a una línea celular fue hibridado con el producto de PCR sin marcar de cada una de las líneas celulares restantes por separado, repitiéndose el mismo procedimiento para cada producto de PCR marcado de las líneas celulares. Las 42 hibridaciones se llevaron al secuenciador para analizar sus movilidades en el programa *allele locator™*; las FLRs fueron seleccionadas en base a sus valores de movilidad, claros y diferentes del resto, lo que promovió una mejor resolución al momento de la tipificación, siendo seleccionados para este *locus*: DQA1*030101 correspondiente a la línea celular JY, y el alelo DQA1*050101 de la línea celular Steinlin.

Resultados de las movilidades de los DNA control (Ladders) con las FLRs seleccionadas.

Las movilidades obtenidas para los DNAs control obtenidos con las FLRs DQA1*030101 y FLR DQA1* 050101 (**Tabla 6**) fueron:

FLR DQA1*030101 Controles

POZO	LINEA CELULAR	ALELO DQA1*	MOVILIDAD DEL ALELO
1	KAS 116	0101	1454
2	LBUF	0201	1489
3	SPOO10	0102	1304
4	BTB	0401	1637
5	OMW	0103	1313
6	Steinlin	050101	1642

FLR DQA1*050101 Controles

POZO	LINEA CELULAR	ALELO DQA1*	MOVILIDAD DEL ALELO
7	KAS 116	0101	1608
8	BTB	0401	1103
9	SPOO10	010202	1610
10	JY	030101	1539
11	OMW	0103	1644
12	LBUF	0201	1579

Tabla 6. Líneas celulares con valores de movilidad asignados a cada uno de sus respectivos alelos DQA1, por el software *allele locator*[™].

Tipificación de DQA1

Los iniciadores utilizados en la reacción de PCR no se consumieron al 100%, por tal motivo el iniciador marcado con Cy5 fue el primero en observarse en el electroferograma (pico no mostrado) debido a su tamaño de 20 mer; a este pico se le asignó un valor arbitrario de 1. El homodúplex es el segundo pico en detectarse en el electroferograma y se le asignó un valor de 1000 (**Figuras 19 y 20**), de esta forma se logró alinear a todos los homodúplex, en una escala arbitraria eliminando así el efecto de la "sonrisa", que se observa en la escala de tiempo. Este efecto se observa como un ligero declive ("sonrisa"), en el esquema del programa *allele locator*[™], que debe eliminarse para poder comparar a los DNA control con las muestras a estudiar ya que pueden tener el mismo alelo pero su movilidad será diferente por el efecto antes mencionado. Finalmente, el tercer pico (en caso de ser homocigoto, muestra 76, **Figura 19**) y algunas veces el cuarto pico detectado (en caso de ser heterocigoto muestra 94, **Figura 20**) en el electroferograma representa a los heterodúplex formados por la FLR y la muestra nahua.

Las movilidades de los DNA control se compararon con la movilidad de las muestras nahuas a estudiar y de esta forma se asignaron los alelos correspondientes a cada muestra

Respecto a las FLRs utilizadas para cada *locus*, es importante mencionar que deben ser al menos dos las referencias empleadas para la tipificación; ya que el resultado obtenido de las muestras hibridadas con una referencia servirá para corroborar el resultado de las mismas muestras hibridadas con la segunda FLR, obteniéndose de esta forma, datos más precisos en la tipificación.

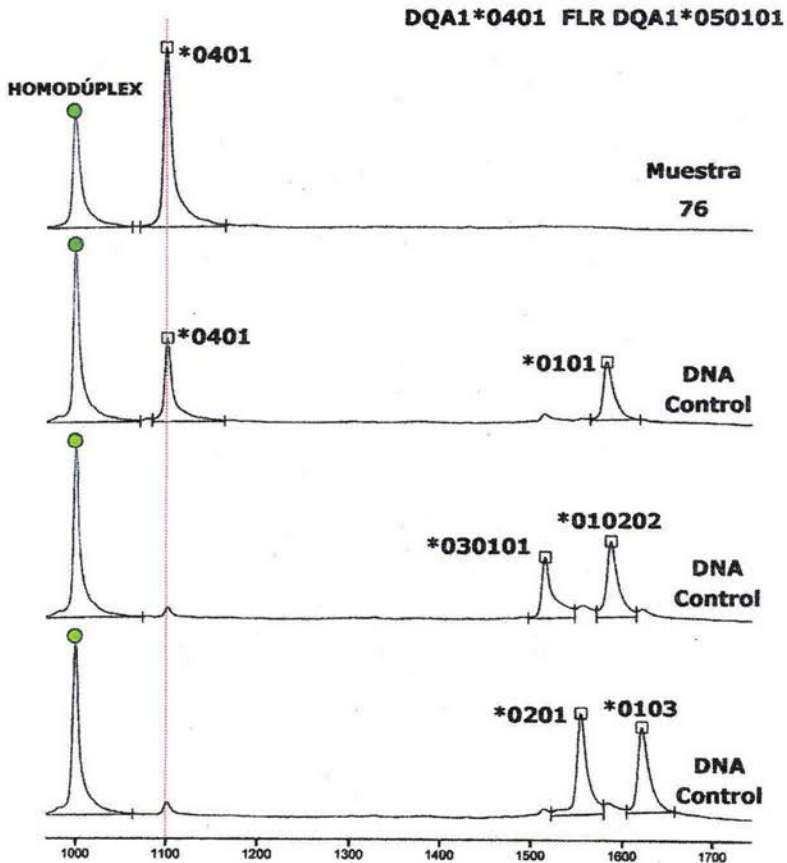


Fig. 19. Análisis de DQA1 por medio de RSCA. La figura muestra el resultado obtenido al comparar la muestra número 76, con los alelos DQA1 contenidos en el DNA control. La FLR utilizada es DQA1*050101 (Steinlin) y el haplotipo identificado para esta muestra (homocigota) es DQA1*0401.

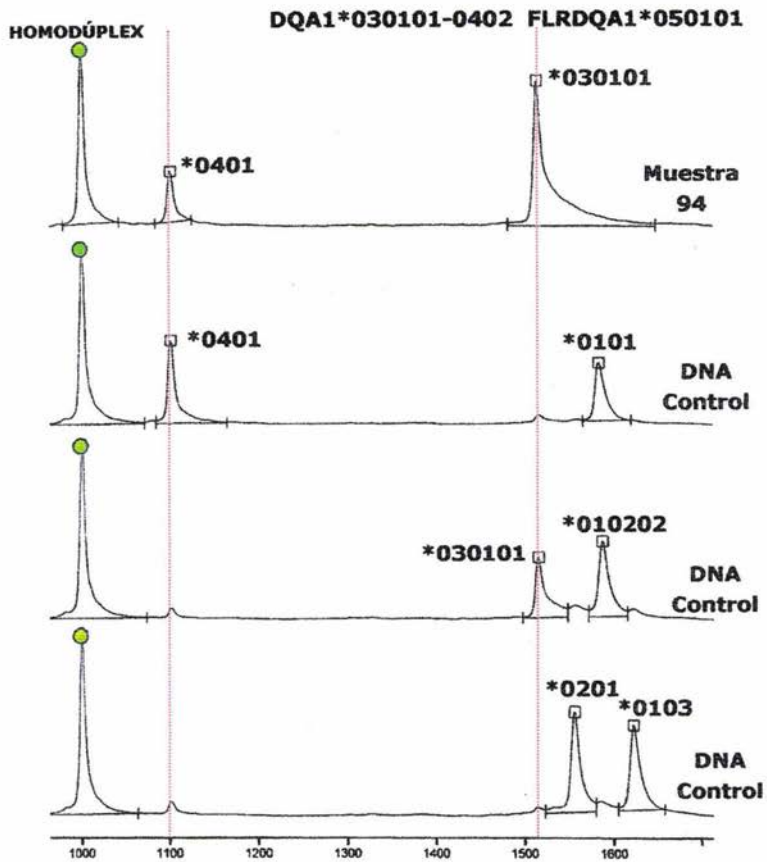


Figura 20. Obtención del haplotipo heterocigoto de la muestra 94 por medio de RSCA, este es DQA1*030101-*0401, la FLR utilizada es DQA1*050101 (Steinlin).

Los alelos más frecuentes en la población nahua se encuentran representados en la **Tabla 7**. Con estos resultados se comprueba que el 90% de la población presenta alelos amerindios, DQA1*030101/*0302/*0303 (39%), DQA1*0401/*0402 (26.6%) y DQA1*050101/02/*0503/*0505 (26%) cuando se comparó con la población mestiza mexicana.

N=77				
Alelo DQA1*	Nahua		Mestizo 96%	Origen
	No	F.G. %	F.G.%	
030101/0302/0303	60	39.0		Amerindio/Caucasoide
0401/0402	41	26.6	12.6	Amerindio/Caucasoide
050101/02/0503/0505	40	26.0	23.7	Amerindio/Caucasoide
0201	7	4.5	6.7	-----
010101/02/0104/0105	4	2.6	5.5	-----
0103	2	1.3		-----

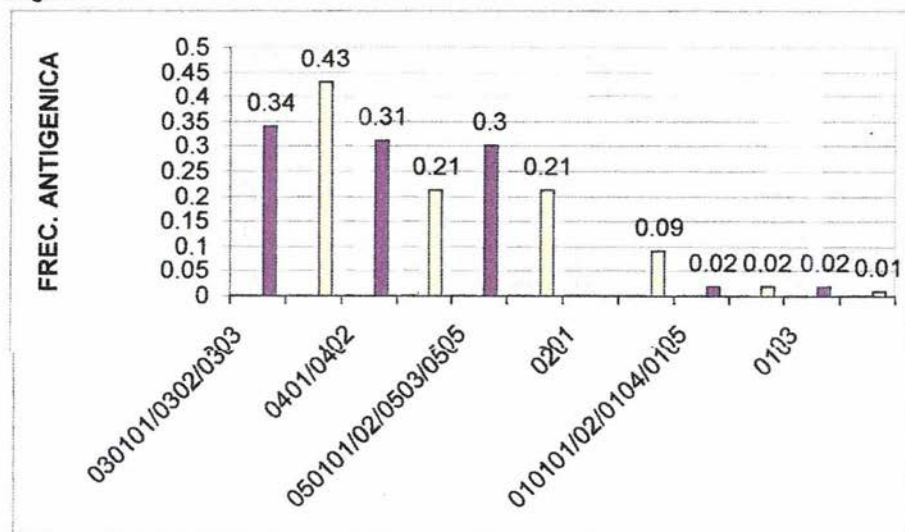
Tabla 7. Alelos DQA1 encontrados en la población nahua. **No.** Número de individuos, **F.G.%** porcentaje de la frecuencia génica, comparadas contra población mestiza y **origen** de cada alelo.

Los alelos HLA-DQA1 de individuos positivos a la prueba de la urea en aliento (**UBT**) y presencia de anticuerpos IgG contra *H. pylori* (**Hp-Ab**) fueron comparados contra los alelos de individuos negativos a estas mismas pruebas (**Tabla 8**). Cuando se realizó el análisis estadístico a estos resultados no se observó ninguna significancia estadística, pero puede observarse una tendencia en los alelos DQA1*0401/0402 y DQA1*050101/02/0503/0505, que fueron más frecuentes en individuos positivos en tanto que DQA1*030101/0302/0303 fue menos frecuente (**Tabla 8 y Gráfica 1**).

Alelo DQA1*	UBT(+) <i>Hp</i> -Ab(+)(40)		UBT(-) <i>Hp</i> -Ab(-)(37)	
	No.	F.A. %	No.	F.A. %
030101/0302/0303	27	33.8	32	43.2
0401/0402	25	31.2	16	21.6
050101/02/0503/0505	24	30	16	21.6
010101/02/0104/0105	2	2.5	2	2.7
0103	2	2.5	1	1.3
0201	0		7	9.4

Tabla 8. Frecuencias de alelos DQA1 en la población positiva en prueba de aliento y anticuerpos para *H. pylori* (UBT(+) *Hp*-Ab(+)), comparadas contra individuos negativos a estas mismas pruebas (UBT(-) *Hp*-Ab(-)).

DQA1*



Grafica 1. Comparación de los porcentajes de las frecuencias de alelos DQA1 en individuos positivos (**guindas**) y negativos (**amarillos**) a la infección por *H. pylori*.

Estudio del *locus* DQB1

PCR

Al igual que los resultados del *locus* DQA1 antes mencionado, los productos de PCR de DQB1 fueron obtenidos y se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio; la amplificación se corroboró utilizando un marcador de peso molecular para observar el producto de 316 pb en las líneas celulares (**Figura 21**).

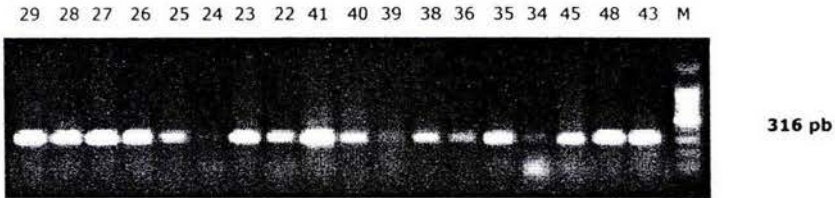


Figura 21 Gel de agarosa al 2% que muestra la amplificación de DQB1 en muestras nahuas.

Selección de las mejores FLRs para DQB1

Para la tipificación de alelos DQB1, se utilizó un panel de DNA de trece líneas celulares linfoblastoides homocigotas, y amplificadas por PCR para el *locus* de interés con iniciadores marcados con Cy5 y sin marcar, se hibridaron los productos de PCR marcados de cada una de las líneas celulares con el producto de PCR de las líneas celulares restantes sin marcar. Las 156 hibridaciones se corrieron por electroforesis en el secuenciador para el análisis posterior de los valores de movilidad con el programa *allele locator*[™]. Las dos mejores referencias seleccionadas para DQB1 fueron los alelos DQB1*0603 y DQB1*0604 correspondientes a las líneas celulares OMW y WT47 respectivamente.

La correcta amplificación de DQB1 en las FLRs seleccionadas para la tipificación de este *locus* fueron observadas por electroforesis (**Figura 22**).

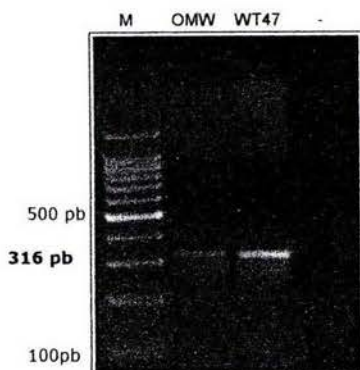


Figura 22. Amplificación por PCR de DQB1 de FLRs OMW y WT47.

Resultados de las movilidades de los DNA control (Ladders) con las FLRs seleccionadas.

Los valores de movilidad de los DNAs control seleccionados, para la FLR DQB1*0603 y la FLR DQB1*0604 (**Tabla 9**) fueron:

FLR DQB1*0603 Controles

POZO	LÍNEA CELULAR	ALELO DQB1	MOVILIDAD DEL ALELO
1	STEINLIN	0201	1324
2	CALOGERO	050201	1266
3	C47	050301 y 0201/02	1225 Y 1326
4	AKIBA	060101	1157
5	WT51	0302	1125
6	MGAR	0602	1016
7	BTB	0402	1305
8	KAS 116	050101	1234
9	AMALA	030101	1142
10	DBB	030302	1112
11	WT47	060401	1065

FLR DQB1*0604 CONTROLES

POZO	LÍNEA CELULAR	ALELO DQB1	MOVILIDAD DEL ALELO
12	LBVF	0202	1306
13	CALOGERO	050201	1256
14	C47	050301 y 0201/02	1218 Y 1308
15	AKIBA	060101	1132
16	WT51	0302	1080
17	OMW	0603	1315
18	BTB	0402	1324
19	KAS 116	050101	1205
20	AMALA	030101	1137
21	DBB	030302	1099

Tabla. 9 . Líneas celulares con valores de movilidad asignados a cada uno de sus respectivos alelos DQB1, por el software *allele locator*™.

Tipificación de DQB1

El análisis del *locus* DQB1 en las muestras nahuas se realizó con las FLRs, DQB1*0603 y DQB1*0604 comparandose las movilidades de los DNA control con las muestras a estudiar.

El *locus* DQB1 cuenta con 53 alelos identificados hasta hoy, pero en este estudio solo pudieron utilizarse un panel de trece alelos DQB1, con los cuales se pudo tipificar de manera satisfactoria a las muestras de DNA nahuas.

En la tipificación de DQB1 por RSCA se comprobaron los resultados tanto en una FLR como con la otra lo que permite de esta manera obtener resultados más confiables, al compararse, que, los mismos alelos obtenidos con la FLR DQB1*0603 están presentes con la segunda FLR DQB1*0604 (Muestra 29 **Figuras 23 y 24**).

Al realizarse el análisis de los alelos del *locus* en la escala de tiempo se pudo observar que tanto DNAs control y muestras tipificadas, tenían movilidades diferentes entre ellos aunque fueran del mismo alelo, debido al efecto de "sonrisa" mencionado anteriormente. Para corregir este efecto una escala arbitraria se le asignó al electroferograma, de resultados, en lugar de la escala de tiempo. Para ello se asignó un valor de 1000 al homodúplex lo que permitió relacionar sin dificultades las muestras contra el DNA control.

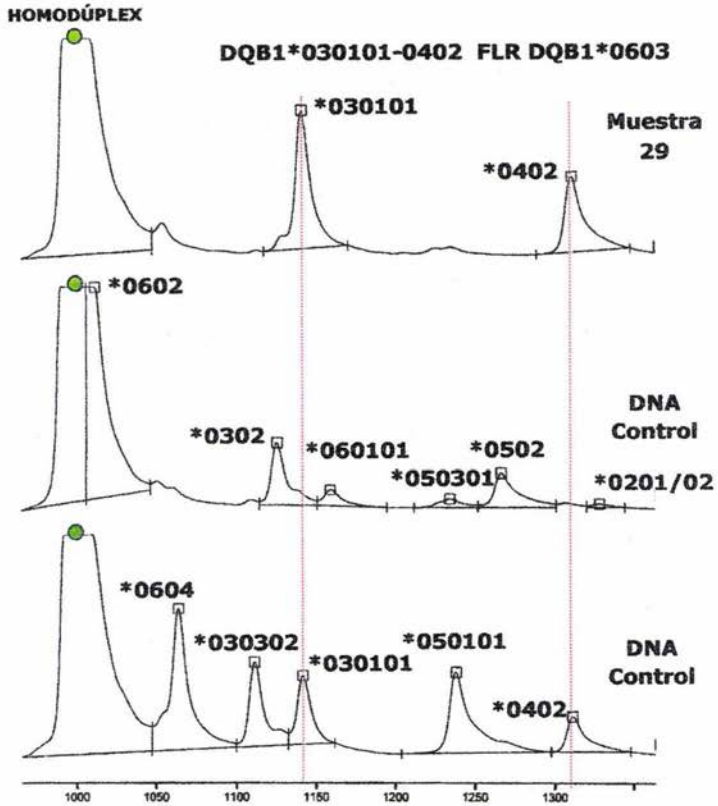


Figura 23. Haplotipo DQB1*030101-*0402 de la muestra número 29 con la FLR DQB1*0603 (OMW).

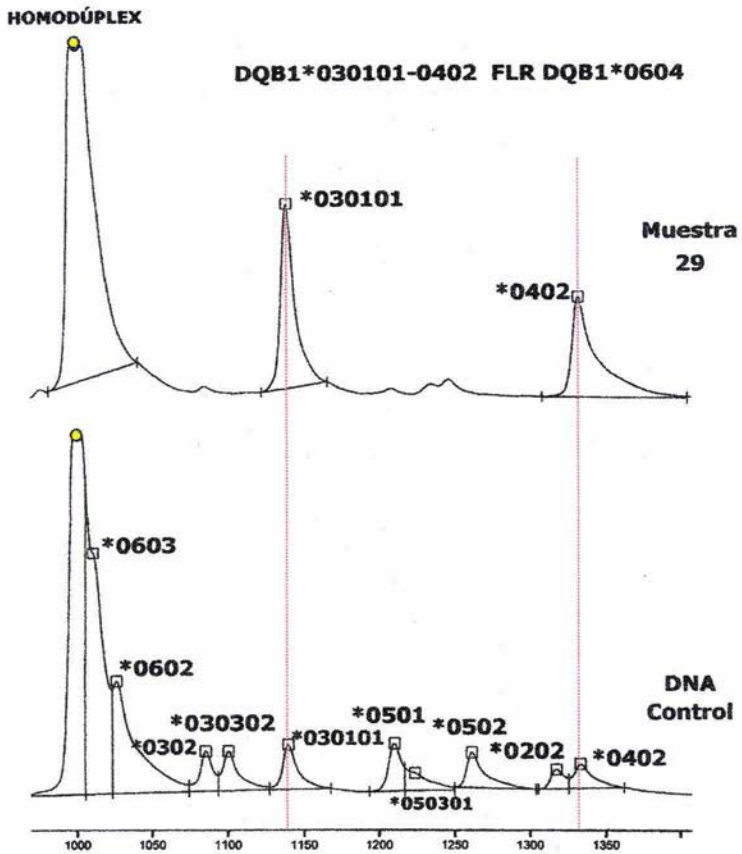


Figura 24. Confirmación del haplotipo DQB1*030101-*0402 en la muestra 29, ahora con la FLR DQB1*0604 (WT47).

Tablas de frecuencias en alelos DQB1

Los resultados de la **tabla 10** muestran que el 90% de la población nahua presentó alelos amerindios, DQB1*0402 (32.2%), DQB1*030101 (29.5%) y DQB1*0302 (28.1%). Demostrándose en el *loci* una relativa homogeneidad étnica.

N=73				
Alelo DQB1*	Nahua		Mestizo 96%	Origen
	No	F.G. %	F.G. %	
0402	47	32.2	15.8	Amerindio/Negro
030101	43	29.5	16.7	Amerindio
0302	41	28.1	12.1	Amerindio
0201/02	8	5.5	11.1	Caucasoide
050101	3	2.0	8.4	Negro/Caucasoide/Oriental
050301	3	2.0		Negro/Caucasoide/Oriental
0604	1	0.6	1.5	Negro/Caucasoide/Oriental

Tabla 10. Alelos DQB1 encontrados en la población de estudio, la tabla muestra el número de individuos **No**, porcentaje de la frecuencia génica (**F.G. %**), comparada contra la población mestiza y el origen de estos.

Con ayuda de la **tabla 11** pudo realizarse el análisis estadístico, relacionando a individuos positivos a la infección por *H. pylori* (**UBT(+) Hp-Ab(+)**) contra los negativos a esta infección (**UBT(-) Hp-Ab(-)**).

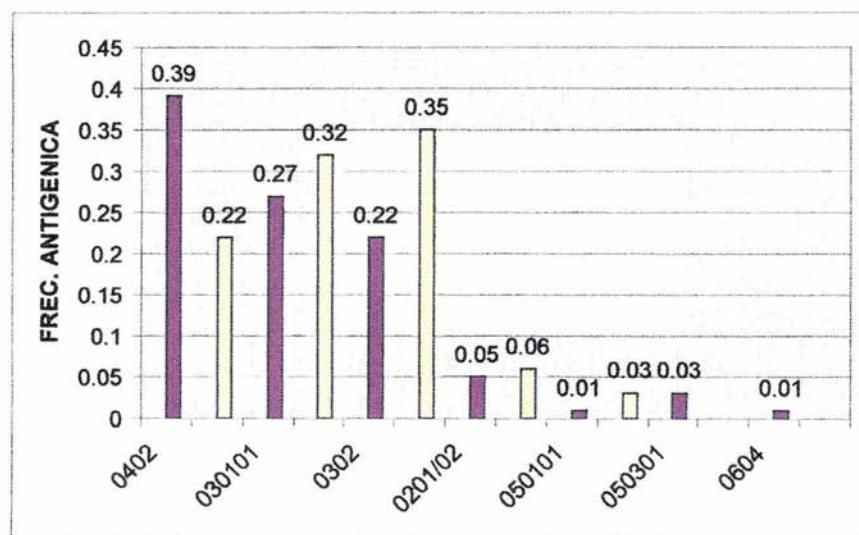
Alelo DQB1*	UBT(+) Hp-Ab(+)(42)		UBT(-) Hp-Ab(-)(31)	
	No.	F.A. %	No.	F.A. %
0402	33	39.2	14	22.6
030101	23	27.4	20	32
0302	19	22.6	22	35.5
0201/02	4	4.7	4	6.4
050101	1	1.2	2	3.2
050301	3	3.6	0	
0604	1	1.2	0	

Tabla 11. Porcentajes de frecuencias observadas en alelos DQB1 en individuos positivos a la infección demostrada por pruebas de aliento (**UBT**) y anticuerpos

contra *H. pylori* (**Hp-Ab**), comparadas contra los porcentajes de las frecuencias observadas en individuos con resultado negativo a estas mismas pruebas.

Los alelos HLA-DQB1 de individuos positivos a la prueba de la urea en aliento (**UBT**) y presencia de anticuerpos IgG contra *H. pylori* (**Hp-Ab**) fueron comparados contra los alelos de individuos negativos a estas mismas pruebas (**Tabla 11**). Cuando se realizó el análisis estadístico a estos resultados también se obtuvieron valores estadísticos no significativos, aunque del mismo modo es notable la frecuencia del alelo DQB1*0402, en individuos positivos a la infección, en tanto que DQB1*0302 fue menos frecuente (**Tabla 11 y Gráfica 2**).

DQB1*



Gráfica 2. Comparación del porcentaje de frecuencias antigénicas entre alelos DQB1 en individuos positivos (**guindas**) y negativos (**amarillos**) a la infección por *H. pylori*.

Frecuencias de haplotipos de DQA1 y DQB1

Los haplotipos obtenidos entre alelos del mismo *locus* y entre los alelos de ambos *locus* fueron también analizados (**Tabla 12**).

Haplotipo HLA	UBT (+)	UBT (-)	p	pc
	<i>Hp</i> -Ab (+) F.A. %	<i>Hp</i> -Ab (-) F.A. %		
DQA1-DQA1	n= 40	N=37		
DQA1*030101/0302/0303-DQA1*050101/02/0503/0505	27.5	8.1	0.02	N.S.
DQA1*0401/0402-DQA1*050101/02/0503/0505	20.0	5.4	0.05	N.S.
DQB1-DQB1	n=42	N=31		
DQB1*030101-DQB1*0402	28.5	9.7	0.04	N.S.
DQB1*030101-DQB1*0302	19.0	9.7	N.S.	N.S.
DQA1-DQB1	n=40	n=31		
DQA1*050101/02/0503/0505-DQB1*030101	45	10.1	0.009	0.02
DQA1*0401/0402-DQB1*0402	42.5	26.0	N.S.	N.S.

Tabla 12. Comparación de haplotipos DQA1, DQB1 y DQA1-DQB1, entre pacientes infectados con *H. pylori* en prueba de aliento y anticuerpos contra *H. pylori* (**UBT(+)*Hp*-Ab (+)**), y negativos (**UBT(-)*Hp*-Ab (-)**), con una tendencia hacia los infectados.

El haplotipo: DQA1*030101/0302/0303-DQA1*050101/02/0503/0505 analizado no fue significativo cuando se obtuvo la pc. El mismo caso se observó en los haplotipos DQA1*0401/0402-DQA1*050101/02/0503/0505 y DQB1*030101-DQB1*0402. En el haplotipo DQA1*050101/02/0503/0505-DQB1*030101 se obtuvo una significancia de 0.010 que se mantuvo cuando la p fue corregida (pc= 0.02).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Pocos estudios han relacionado a genes del sistema HLA con la infección y enfermedades causadas por *H. pylori* en diferentes poblaciones del mundo a pesar de la importancia que tiene este sistema en la respuesta inmune al ser las moléculas HLA de clase II las encargadas de procesar y presentar péptidos antigénicos extracelulares a las células T. Se tiene reportado que en la gastritis atrófica, DQB1*0401 se asocia significativamente en la población japonesa y DQB1*0301 en la población caucásica. Por otra parte el cáncer gástrico se relaciona en la población mexicana con DQA1*0601 y DQB1*0501, mientras que en los japoneses DRB1*1501-DQA1*01021-DQB1*0602 parecen proteger contra la infección por *H. pylori*.

De las 108 muestras nahuas utilizadas para este estudio familiar se obtuvieron resultados en 77 individuos para el locus DQA1 y 73 para DQB1 tomándose cada uno de estos como el 100% de cada *locus*, para obtener el porcentaje de las frecuencias. La pureza del 90% para esta población obtenida en base a las frecuencias de alelos característicos de amerindios, permitió tener menos variantes al momento de la tipificación. Los porcentajes de las frecuencias antigénicas de individuos seropositivos se compararon con las de sus familiares seronegativos, con la finalidad de valorar que alelos o haplotipos se encontraban con mayor frecuencia en cada caso.

En individuos seropositivos a *H. pylori*, los alelos DQA1*0401/0402, DQA1*050101/02/0503/0505 y DQB1*0402 fueron más frecuentes, en tanto que DQA1*030101/0302/0303 y DQB1*0302 fueron menos frecuentes cuando se compararon con sus familiares seronegativos. Los haplotipos DQA1*030101/0302/0303-DQA1*050101/02/0503/0505, DQA1*0401/0402-DQA1*050101/02/0503/0505, DQB1*030101-DQB1*0402, DQA1*0401/0402-DQB1*0402 fueron también frecuentes en esta población, pero solamente DQA1*050101/02/0503/0505-DQB1*030101, tuvo un valor estadístico significativo ($p=0.02$).

CONCLUSIONES

- ❖ La técnica utilizada para la extracción de DNA demostró ser adecuada, y mejor aún, cuando se realiza en muestras tomadas recientemente.
- ❖ La población nahua estudiada mostró una pureza del 90%, con base en los alelos tipificados en el *loci* DQA1 y DQB1 característicos de amerindios. DQA1*030101/0302/0303 (39%), DQA1*0401/0402 (26.6%), DQA1*050101/02/0503/0505 (26%) para este *locus* y en DQB1*0402 (32.2%), DQB1*030101 (29.5%) y DQB1*0302 (28.5%).
- ❖ Los alelos más frecuentes en nahuas infectados cuando se comparó el grupo UBT(+) y *Hp*-Ab(+) contra el grupo UBT(-) y *Hp*-Ab(-) fueron: DQA1*0401/0402 (31.2% vs 21.6%), DQA1*050101/02/0503/0505 (30% vs 21.6) y DQB1*0402 (39.2% vs 22.6%). Los alelos menos frecuentes fueron: DQA1*030101/0302/0303 (33.8% vs 43.2%) y DQB1*0302 (22.6% vs 35.5%).
- ❖ Los haplotipos también frecuentes en los individuos infectados UBT(+) y *Hp*-Ab(+) cuando se compararon contra los negativos a la infección fueron:
DQA1*030101/0302/0303-DQA1*050101/02/0503/0505 (27.5% vs 8.1%), DQB1*030101-DQB1*0402 (28.5 vs 9.7%) y DQA1*050101/02/0503/0505-DQB1*030101 (45 vs 10.1%).
- ❖ En forma individual los alelos no presentaron resultados significativos, esto se observó en el análisis de los haplotipos siendo el más importante el haplotipo DQA1*050101/02/0503/0505-DQB1*030101 con un valor de significancia corregido de 0.02.

REFERENCIAS

- Abbas Abul K.; Lichtman Andrew H. and Pober Jordan S. 2001. CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY. 3^{ra} Edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. New Yorck. USA.
- Aguado B., Bahram S., Beck S., Campbell R.D., Forbes S.A., Geraghty D.,Guillaudeux T., Hood L., Horton R., Inoko H., Janer M., Jasoni C., Madan A., Milne S., Neville M., Oka A., Qin S., Ribas-Despuig G., Rogers J., RowenL.,Shiina T., Spies T., Tamiya G., Tashiro H., Trowsdale J., Vu Q., Williams L.,And Yamazaki M. 1999. COMPLETE SEQUENCE AND GENE MAP OF A HUMANMAYOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX. Nat. Vol 401.
- Alberts Bruce, Bray Dennis, Lewis Julian, Raff Martin, Roberts Keith y Watson James D. 1996. BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA CÉLULA. Ed. Omega. Barcelona. España. pp. 1317-1322.
- Annichino-Bizzacchi J.M., Saad S.T., Arruda V.R., Ramin J.A., Siquiera L.H., Chiaparini L.C. and Mansur A.P. 2000. C282Y MUTATION IN THE HLA-H GENE IS NOT RISK FACTOR FOR PATIENTS WITH MYOCARDIAL INFARCTION. J. Cardiovasc. Risk (1):37:40.
- Argüello J.R., Little A.M., Bohan E., Goldman J.M., Marsh S.G.E. and Madrigal J.A. 1998. HIGH RESOLUTION HLA CLASS I TYPING BY REFERENCE STRAND MEDIATED CONFORMATION ANALYSIS (RSCA). Tiss. Ant. **52**:57-66.
- Aultman Donnie, damashvili Irena, Yaturu Kamalakar, Langford Marlyn, Gelder Frank, Gautreaux Michael, Ghali G.E., and McDonald John.1999. SOLUBLE HLA IN HUMAN BODY FLUIDS. Hum. Imm. 60, 239-244.
- Azuma T., Ito S., Sato F., Yamazaki Y., Miyaji H., Ito Y., Suto H., Kuriyama M., Kato T., and Kohli Y. 1998. THE ROLE OF THE HLA-DQA1 GENE IN

RESISTANCE TO ATROPHIC GASTRITIS AND GASTRIC ADENOCARCINOMA INDUCED BY *Helicobacter pylori* INFECTION. Cancer 82: 1013

- Baker Richard J. 2000. HLA AND TRANSPLANTATION I: ALLORECOGNITION OF HLA MOLECULES IN TRANSPLANTATION. HLA in Health and Disease. Edited by Lechler Robert and Warrens Anthony. Academic Press London.
- Blaser M.J., Pérez-Pérez G.I., Kleanthous H., Cover T.L., Peek R.M., Chyou P.H., Stemmermann G.N., and Nomura A. 1995. INFECTION WITH *Helicobacter pylori* STRAINS POSSESSING *CagA* IS ASSOCIATED WITH AN INCREASED RISK OF DEVELOPING ADENOCARCINOMA OF THE STOMACH. Cancer Res. 55:2111-2115.
- Blaser Martín J. 1996. THE BACTERIA BEHIN ULCERS. Scientific Am. Vol. 274, Issue 2.
- Blaser M.J. 1999. HIPÓTESIS: THE CHANGING RELATIONSHIPS OF *Helicobacter pylori* AND HUMANS:IMPLICATIONS FOR HEALTH AND DISEASE. J. Infec. Diseases. 179: 1523-530.
- Censini S., Lange C., Xiang Z., Crabtree J.E., Ghiara P., Borodovsky M., Rappuoli R., and Covacci A. 1996. *cag*, A PATHOGENICITY ISLAND OF *Helicobacter pylori* ENCODES TYPE I-SPECIFIC AND DISEASE-ASSOCIATED VIRULENCE FACTORS. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 14648-14653.
- Cereb N., Maye P., Lee S., Kong Y., and Yang S.Y. 1995. LOCUS-SPECIFIC AMPLIFICATION OF HLA CLASS I GENES FROM GENOMIC DNA: LOCUS-SPECIFIC SEQUENCESIN THE FIRST AND THIRD INTRONS OF HLA-A,-B AND -C ALLELES. Tiss. Ant. 45: 1-11.
- Charron D., and Fauchet R. 1996. TECHNICAL HANDBOOK OF THE TWELFTH INTERNATIONAL HISTOCOMPATIBILITY WORKSHOP AND CONFERENCE. HLA et Médecine. Paris-France. pp. 1-33

- Covacci A. and Rappuoli R. 1998. *Helicobacter pylori*: MOLECULAR EVOLUTION OF A BACTERIAL QUASI-SPECIES. *Curr. Opin. Microbiol.*1:96-102.
- Cover Timothy L., Berg Douglas E., Blaser Martin J. Mobley Harry L.T. 2001. *Helicobacter pylori* PATHOGENESIS. From: Principles of Bacterial Pathogenesis. Academic Press. Edited by Eduardo A. Groisman. pp. 509-558.
- Crabtree J.E., Kersulyte D., Li S.D., Lindley I.J., and Berg D.E. 1999. MODULATION OF *Helicobacter pylori* INDUCED INTERLEUKIN-8 SYNTHESIS IN GASTRIC EPITHELIAL CELLS MEDIATED BY *cag* PAI ENCODED Vir D4 HOMOLOGUE. *J. Clin. Pathol.* 52:653-657.
- Darnell J. E., Harvey L. y Baltimore D.1993. BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR. Ed. Omega. Barcelona España. p. 233.
- Dawkins Roger, Leelayuwat Chanvit, Gaudieri Silvana, Tay Guan, Hui Jennie, Cattley Sonia, Martínez Patricia and Kulski Jerzy. 1999. GENOMICS OF THE MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX: HAPLOTYPES, DUPLICATION, RETROVIRUSES AND DISEASE. *Immunol. Rev.* Vol.167:275-304.
- Falk Per G., Syder Andrew J., Guruge Janaki L., Engstrand Lars G. and Gordon Jeffrey I. 2001. TRANSGENIC MOUSE MODELS FOR STUDYING THE RELATIONSHIP BETWEEN *Helicobacter pylori* INFECTION AND GASTRIC CANCER. From: *Helicobacter pylori*: Molecular and Cellular Biology. Horizon Scientific Press. Wymondham, UK. pp. 133.
- Faller Gerhard and Kirchner Thomas. 2001. ANTIGASTRIC AUTOIMMUNITY AND PATHOLOGY IN *Helicobacter pylori* GASTRITIS. From: *Helicobacter pylori*:Molecular and Cellular Biology. Horizon Scientific Press. Wymondham, UK. pp.53-62.

- Fan W., Liu Y. C., Parimoo S., Weissman S.M. 1995. OLFACTORY RECEPTOR-LIKE GENES ARE LOCATED IN THE HUMAN MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX. *Genomics*. 27:119.
- Familia Nahuatl. 2002. En: <http://www.sil.org/mexico/nahuatl>
- Feldman Roger A. 2001. EPIDEMIOLOGIC OBSERVATIONS AND OPEN QUESTIONS ABOUT DISEASE AND INFECTION CAUSED BY *Helicobacter pylori*. From: *Helicobacter pylori: Molecular and Cellular Biology*. Horizon Scientific Press. Wymondham, UK. pp.30-51.
- Geraghty D.E., Koller B.H., Hansen J.A., and Orr H.T. 1992. THE HLA CLASS I GENE FAMILY INCLUDES AT LEAST SIX GENES AND TWELVE PSEUDOGENES AND GENE FRAGMENTS. *J. Immunol.* 149(6):1934-1946.
- Gruen Jeffrey R. Sherman M. Weissman. 1997. ENVOLVING VIEWS OF THE MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX. *Blood*. Vol.90. No.11 pp.4252-4265.
- Hawkins B. R. 1981. TABLE OF CRITICAL CHI-SQUARE VALUES FOR INVESTIGATIONS INVOLVING MULTIPLE COMPARISONS. *Tiss. Ant.* 17, 243.
- Innis M. A., Gelfand D.H., Sninsky J. J., White T. J. 1990. PCR PROTOCOLS. Ed. Academic Press. San Diego. California. USA. p. 13.
- Janeway, Jr. Charles A., Travers Paul., Walport Mark and Capra J. Donald. 1999. IMMUNO BIOLOGY THE IMMUNE SYSTEM IN HEALTH AND DISEASE. Current Biology Publications. London.
- Karhukorpi J., Ikaheimo I., Silvennoinen- Kassinen S., Tiilikainen A.S and Karttunen R. 1999. HLA-DQA1 ALLELES AND THE PRESENCE OF *Helicobacter pylori* ANTIBODIES. *Eur. J. Immunogen.* 26:15.

- Kedzierska A. Turowski G. 2001. [HISTOCOMPATIBILITY HLA SYSTEM OF MAN CONSIDERATIONS IN THE LIGHT OF CURRENT CONCEPTS] SOLUBLE HLA CLASS I ANTIGENS (sHLA-1). *Przegl Lek* 58 (9): 864-867.
- Klein J., Sato A. 2000. THE HLA SYSTEM. *New Engl. J. Med.* 343: 702-709.
- Kuipers E.J., Pérez-Pérez G.I., Meuwissen S.G., and Blaser M.J. 1995. *Helicobacter pylori* AND ATROPHIC GASTRITIS: IMPORTANCE OF THE *CagA* STATUS. *J. Natl. Cancer Inst.* 87: 1777-1780.
- Kunstmann E., Hardt C., Treitz H., Suerbaum S., Faller G., Peitz U., Schmiegel W., and Epplen J.T. 2002. IN THE EUROPEAN POPULATION HLA-CLASS II GENES ARE NOT ASSOCIATED WITH *Helicobacter pylori* INFECTION. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 14 (1): 49-53.
- Lechler R. 1994. HLA AND DISEASE. Ed. Academic Press. San Diego California. USA. p.1.
- Lee J.E., Lowy A.M., Thompson W.A., Lu M., Loflin P.T., Skibber J.M., Eyans D.B., Curley S.A., Mansfield P.F., and Reveille J.D. 1996. ASSOCIATION OF GASTRIC ADENOCARCINOMA WITH THE HLA CLASS II GENE DQB*10301. *Gastroenterology.* 111: 426.
- Lo Dennis Y.M. 1998. CLINICAL APPLICATIONS OF PCR. From: *Methods in Molecular Medicine.* Vol 16. Ed. Human Press Totowa, New Jersey. pp.3.
- López-Botet M., Navarro F., Llano M. 1999. HOW DO NK CELLS SENSE THE EXPRESSION OF HLA-G CLASS Ib MOLECULES? *Semin. Cancer Biol.* 9:19-26.
- Lydyard P.M., Whelan A. And Fanger M.W. 2000. INSTANT NOTES IN IMMUNOLOGY. Bios Scientific Publishers Limited. USA.

- Malaty H.M., Kim S.D., and Graham D.Y. 1996. PREVALENCE OF *Helicobacter pylori* INFECTION IN KOREAN CHILDREN: INVERSE RELATION TO SOCIOECONOMIC STATUS DESPITE A UNIFORMLY HIGH PREVALENCE IN ADULTS. Am. J. Epidemiol. 143: 257-262.
- Marsall, B.J. 1994. *Helicobacter pylori*. Am. J. Gastroenterol.89:116-128
- Marsh Steven G.E., Parham Peter and Barber Linda D. 2000. THE HLA Ed. Academic Press. San Diego Ca. USA. pp.14,26 y44.
- Marsh Steven G.E., Ekkehard D. Albert., Bodmer Walter F., Bontrop Ronald E., Dupont Bo., Erlich Henry A., Geraghty Daniel E., Hansen John A., Mach Bernard., Mayr Wolfgang R., Parham Peter., Petersdorf Effie W., Sasazuki Takehiko., Schreuder Geziena M.T., Strominger Jack L., Svejgaard Arne and Terasaki Paul I. 2002. NOMENCLATURE FOR FACTORS OF THE HLA SYSTEM,2002. Hum. Immunol. 63, 1213-1268.
- Mo J.L., You W.C., Gail M.H., Zhang L., Blot W.J., Chang Y.S., *et al.* 1998. *Helicobacter pylori* INFECTION AND MODE OF TRANSMISSION IN A POPULATION AT HIGH RISK OF STOMACH CANCER. Int. J. Epidemiol. 27 (4): 570-573.
- Molinari M., Salio M., Galli C., Norais N., Rappuoli R., Lanzavecchia A., and Montecucco C. 1998. SELECTIVE INHIBITION OF LI-DEPENDENT ANTIGEN PRESENTATION BY *Helicobacter pylori* toxin VacA. J. Exp. Med. 187:135-140.
- Moreno R. J. 1996. RESPUESTA INMUNE Y MECANISMOS DE AUTOINMUNIDAD. Ed. Limusa México. pp. 28-29, 31 y 33.
- Nussbaum Robert L., McInnes Roderick R. And Williard Huntington F. 2001 THOMPSON & THOMPSON GENETICS OF THE IMMUNE SYSTEM. 6ª Edición. Ed. W.B. Saundes Company. USA. pp.277-278.

- Parham Peter. 1999. VIRTUAL REALITY IN THE MHC. Immunol. Rev. Vol. 167:5-15.
- Parkkila Seppo., Waheed Abdul., Britton Robert S., Feder John N., Tsuchihashi Zenta., Schatzman Randall C., Bacon Bruce R. and Sly William. 1997. IMMUNOHISTOCHEMISTRY OF HLA-H, THE PROTEIN DEFECTIVE IN PATIENTS WITH HEREDITARY HEMOCHROMATOSIS, REVEALS UNIQUE PATTERN OF EXPRESSION IN GASTROINTESTINAL TRACT. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol.94 pp.2534-2539.
- Parsonnet, J., Friedman, G.D., Vandersteen, D.P. Chang, Y., Vogelman, J.H. Orentreich, N., and Sibley, R.K. 1991. *Helicobacter pylori* infection and the risk Of gastric cancer. New Engl. J. Med. 325:1127-1131.
- Parsonnet Julie. 1999. *Helicobacter pylori* AND GASTRIC ADENOCARCINOMA. From: MICROBES AND MALIGNANCY Infection as a cause of human cancers. Oxford University Press. New York. pp. 372-397.
- Peek, R.M.J., Thompson S.A., Donahue J.P., Tham K.T., Atherton J.C., Blaser M.J., and Miller G.G. 1998. ADHERENCE TO GASTRIC EPITHELIAL CELLS INDUCES EXPRESSION OF A *Helicobacter pylori* GENE *iceA*, THAT IS ASSOCIATED WITH CLINICAL OUTCOME. Proc. Amer. Assn. Phys. 110:531-544.
- Peek Richard M., Blaser Martín J. 1999. *Helicobacter pylori*: PATOGÉNESIS OF A "SLOW" BACTERIAL INFECTION. From: Mechanisms of Microbial Disease Third Edition. Lippincott Williams & Wilkins USA.
- Pérez-Rodríguez Martha E. 2000. ANÁLISIS DE NUEVOS POLIMORFISMOS ASOCIADOS AL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

- Pérez Rodríguez Martha E., Corell Alfredo., Argüello Rafael., Marsh Steven G.E. y Alejandro Madrigal (En proceso).
- Radillo González Alfredo. 1999. MEDICINA TRANSFUSIONAL. Ed. Prado, S.A. de C.V. México.
- Ramírez-Contreras A.H. 2002. MONOGRAFÍA DE LOS PUEBLOS INDÍGENAS DE MÉXICO EN: www.ini.gob.mx
- Rhodes D. A., Trowsdale J. 1999. GENETICS AND MOLECULAR GENETICS OF THE MHC. Rev. Immunogenetics. 1:21-31.
- Roitt Ivan; Brostoff Jonathan; Male David. 2000. INMUNOLOGIA. 5ª Edición ed. Harcourt, S.A. Madrid España. Pp. 1-2, 6, 14, 85-86.
- Rugge M., Busatto G., Cassaro M., Shiao Y.H., Russo V., Leandro G., et al. 1999. PATIENTS YOUNGER THAN 40 YEARS WITH GASTRIC CARCINOMA: *Helicobacter pylori* GENOTYPE AND ASSOCIATED GASTRITIS PHENOTYPE. Cancer. 85 (12): 2506-2511.
- Scheiman J.M., and Cutler A.F. 1999. *Helicobacter pylori* AND GASTRIC CANCER. Am. J. Medicine. 106: 222-226.
- Shiina T, Tamiyita G, Oka A, Takishima N, Yamagata T, Kikkawa E, Iwata K, Tomizawa M, Okuaki N, Kuwano Y, Watanabe K, Fukuzumi Y, Itakura S, Sugawara Ch, Ono A, Yamazaki M, Tashiro H, Ando A, Ikemura T, Soeda E, Kimura M, Bahram S and Inoko H. 1999a. MOLECULAR DYNAMICS OF THE HLA MHC GENESIS UNRAVELED BY SÉQUENCE ANÁLISIS OF THE 1,796,938-bp CLASS I REGION. Natl. Acad. Sci. USA. 96(23): 13282-13287.

- Shiina T., Tamiya G., Oka A., Takishima N., and Inoko H. 1999b. GENOME SEQUENCING ANALYSIS OF THE 1.8 Mb ENTIRE HUMAN MHC CLASS I REGION. *Immunol. Rev.* 167:193-199.
- Sleisenger Marvin H., Fordtran John S. 1997. ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES "FISIOPATOLOGÍA, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO" 5ª Edición. Ed. Panamericana. Buenos Aires Argentina. Pp.563-565.
- Stein Markus, Rappuoli Rino, and Covacci Antonello. 2001. THE *cag* TYPE IV SECRETION SYSTEM OF *Helicobacter pylori* AND CagA INTRACELLULAR TRANSLOCATION. From: *Helicobacter pylori: Molecular and Cellular Biology*. Horizon Scientific Press. Wymondham,UK,pp.227-243.
- Svejgaard A. and Ryder L. P. 1994. HLA AND DISEASE ASSOCIATIONS: DETECTING THE STRONGEST ASSOCIATION. *Tiss. Ant.* 43, 18.
- Tummuru M.K., Cover T.L. and Blaser M.J. 1994. MUTATION OF THE cytotoxin-associated *cagA* gene DOES NOT AFFECT THE VACUOLATING CYTOTOXIN ACTIVITY OF *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 62:2609-2613.
- Urosevic Mirjana., Willers Joerg., Mueller Beatrix., Kempf Werner., Burg Guenter and Dummer Reinhard. 2002. HLA-G PROTEIN UP-REGULATION IN PRIMARY CUTANEOUS LYMPHOMAS IS ASSOCIATED WITH INTERLEUKIN-10 EXPRESSION IN LARGE CELL T-CELL LIMPOMAS AND INDOLENT B-CELL LYMPHOMAS. *Blood*. Volume 99 Number 2 pp. 609-617.
- van der Merwe P. Antón. Davis J. Simon. 2003. MOLECULAR INTERACTIONS MEDIATING T CELL ANTIGEN RECOGNITION. *Annu. Rev. Immunol.* 21:659-684.

- van Doorn Leen-Jan, Figueiredo Céu and Quint Wim. 2001. MOLECULAR TYPING OF *Helicobacter pylori*. From: *Helicobacter pylori: Molecular and Cellular Biology*. Horizon Scientific Press. Wymondham, UK. pp. 293-310.
- Van Kaer Luc. 2001 ACCESSORY PROTEINS THAT CONTROL THE ASSEMBLY OF MHC MOLECULES WITH PEPTIDES. *Immunol. Res.* Vol.23-2/3 pp. 205-214.
- Versalovic James and Fox James G. 2001. TAXONOMY AND PHYLOGENY OF *Helicobacter pylori*. From: *Helicobacter pylori: Molecular and Cellular Biology*. Horizon Scientific Press. Wymondham,UK.pp.15-28.
- Watson James D. Gilman Michael and Zoller Mark. 1992. RECOMBINANT DNA. 2^{da} Edición. Ed. Scientific American Books USA pp. 79-83.
- www.antonymolan.com
- Xiang Z., Censini S., Bayeli P.F., Telford J.L., Figura N., Rappuoli R., and Covacci A. 1995. ANALYSIS OF EXPRESSION OF Cag A AND VacA VIRULENCE FACTORS IN 43 STRAINS OF *Helicobacter pylori* REVEALS THAT CLINICAL ISOLATES CAN BE DIVIDED INTO TWO MAJOR TYPES AND THAT CagA IS NOT NECESSARY FOR EXPRESSION OF THE VACUOLATING CYTOTOXIN. *Infect. Immun.* 63:94-98.
- Yung Yu C. Yang Zhenyu, Blanchong Carol A. and Miller Webb.2000. THE HUMAN AND MOUSE MHC CLASS III REGION: A PARADE OF 21 GENES AT THE CENTROMERIC SEGMENT. *Immunology Today* Vol.21 No.7 pp320-338.
- Zuñiga J., Herrera-Goepfert R., Hernández Guerrero A., Rodríguez T., Osnaya N., Ruíz J., Vargas-Alarcón G., Flores C., Mohar-Betancourt., Hernández Pando R. And Granados J. 2000. ASSOCIATION OF THE HLA-DQB1*0501 GENE WITH GASTRIC CANCER IN MEXICAN MESTIZO PATIENTS. *Hum. Imm.* Vol.26, suppl. 2. pp. 69.

APENDICES

APÉNDICE I. EXTRACCIÓN DE DNA

Reactivos:

a) TTS

Tris 10mM pH 7.4

Triton X-100 al 1%

Sacarosa (Sucrose) 300mM

b) SDS 10%

Dodecil Sulfato de Sodio 1 gr

Agua bidestilada 10 ml

c) SEVAG

Cloroformo 49 ml

Alcohol Isoamilico 1 ml

d) NaCl 5 mM

e) NaCl saturado

f) Etanol absoluto a -70 °C

PROCEDIMIENTO:

Colocar 1 ml de sangre periférica en un tubo eppendorf y añadirle TTS (lisa eritrocitos).

Centrifugar y decantar y el boton celular se resuspende en TTS. Repetir estos pasos para un total de cuatro lavados.

Una vez decantado el TTS del último lavado, se resuspende el boton en NaCl 5mM. Se adiciona SDS (lisa leucocitos) al 10% y NaCl saturado; es recomendable en este punto mezclar ligeramente componentes para ayudar a lisar el botón. Centrifugar y recuperar sobrenadante, pasarlo a otro tubo eppendorf nuevo. Adicionar SEVAG.

Agitar en forma vigorosa; hasta que la solución tenga un color blanco. Centrifugar

Sacar el tubo de la centrifuga con mucho cuidado para no mezclar las fases.

Recuperar la fase superior y dejar la media y la inferior. Transferir la fase superior a otro tubo eppendorf nuevo y adicionar a este un volumen de etanol absoluto frío (-70°C, esto precipitará el DNA). Mover el tubo despacio para mezclar. Centrifugar y decantar el alcohol absoluto. (En caso de existir un exceso de sales, lavar el DNA con etanol al 70%).

Ssecar el DNA. Resuspender y disolver muy bien el DNA en agua Milli Q estéril. Guardar indefinidamente a -35°C.

APÉNDICE II GEL DE AGAROSA PARA ELECTROFORESIS

Preparación de TBE 1X:

TBE 10X 1L

108g Tris base (890 mM)

55.18 g Ácido Bórico (890 mM)

40 ml EDTA 0.5 M pH 8.0

Para preparar 1L de TBE 1X se diluyen 100ml de TBE 10X en 900ml de agua milli Q.

PREPARACIÓN DE GELES DE AGAROSA

Se pesan en balanza analítica 0.8g (ver presencia de DNA) o 2g (ver producto de PCR) de agarosa para 100ml y se disuelve en TBE 1X con calor en un horno de microondas por 25 segundos, se agita bien, y se procede a dejarlo enfriar un poco para teñirlo con bromuro de etidio. A continuación se vierte en la cámara de electroforesis con los peines puestos y se deja enfriar, aproximadamente 20 minutos, para finalmente sumergirlo en TBE 1X, cargar las muestras (5 μ l de muestra más 1 o 5 μ l de buffer de carga), colocar tapa con electrodos e iniciar la electroforesis.

APÉNDICE III. MONTAJE DE PCR PARA AMPLIFICAR *locus* DQB1 DE LINEAS CELULARES Y MUESTRAS DE DNA

Para un volumen final de 25 μ l, agregar al tubo de reacción:

REACTIVO	CONCENTRACION
Agua Milli Q	
Buffer (NH ₄) 10X	160mM
dNTP's	2mM
MgCl ₂	50mM
Primer 5'	25 pmol/ μ l
Primer 3'	25 pmol/ μ l
Taq polimerasa	5U/ μ l

Se homogeniza esta mezcla, se agrega a cada tubo 22.5 μ l de la mezcla de reacción, para agregar 2.5 μ l del DNA y al control negativo 2.5 μ l de agua para llegar al volumen de 25 μ l, se llevan a el termociclador para su amplificación por medio del siguiente programa:

Paso 1	95°C por 4 min
Paso 2	95°C por 30 seg
Paso 3	63°C por 50 seg
Paso 4	72°C por 30 seg
Paso 5	Ir a 2, 32 veces
Paso 6	72°C por 8 min
Paso 7	15°C por siempre
Paso 8	Fin

Se deben dejar las muestras en el paso 7 al menos 15 minutos antes de ser sacadas del termociclador para su almacenamiento a -35°C o preparación para por medio de electroforesis horizontal, observar su amplificación sobre un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

APÉNDICE IV PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS A TIPIFICAR POR LA TÉCNICA DE RSCA

Se montaron las *ladders* dividiéndose en dos grupos, para DQB1*0603 Y DQB1*0604 de la siguiente manera:

DQB1*0603

DQB1*0604, *0201, *0502, *050301, *060101, *0302, *0602, *0402, *050101, *030101 y *030302.

DQB1*0604

DQB1*0603, *0502, *050301, 060101, *0302, *0402, *050101, *030101, *0202 y *030302
Se marcaron los tubos (200 μ l) para cada una y se agregaron a todos estos tubos 1 μ l de FLR WT47 más 3 μ l del producto de PCR DQB1 de estas líneas celulares.

Ya con su respectivo volumen de 4 μ l, los tubos se centrifugaron e introdujeron al termociclador para su desnaturalización y anillamiento, con el siguiente programa:

Paso 1	95°C	por 4 min
Paso 2	55°C	por 5 min
Paso 3	15°C	por siempre
Paso 4	Fin	

Antes de sacar las muestras, se deben dejar en el paso 3 al menos 15 minutos.

Para cargar las muestras en el gel vertical de polyacrilamida, se añade a cada tubo buffer de carga para RSCA, se centrifuga nuevamente, para bajar la muestra y se carga en el gel 1 μ l de las muestras a tipificar.

Al finalizar con la carga de muestras en el gel (1 μ l), se colocan los electrodos, se cubre el láser y se cierra la tapa del aparato para iniciar con la lectura de este.

Para comenzar la electroforesis se deben tener las siguientes condiciones:

Run time: 400 minutos

Voltaje: 1000V

Current: 80 A

Power: 30W

Temp: 40°C

Sampling interval: 2s

Se baja la tapa del secuenciador y en el programa se da la orden de iniciar.

Para analizar los resultados se abre en el programa *allele locator*[™] el electroferograma con los picos obtenidos de la electroforesis, asignándole a todos los primeros un valor de 1 (iniciador) y al segundo pico relevante el valor de 1000, correspondiente al homodúplex formado por la referencia. Posteriormente se da inicio al análisis de los picos formados después de cada referencia, ya que, conociéndose el alelo de la línea celular se puede localizar este por el tamaño del pico y el valor asignado por el programa.

Los picos que no son relevantes son descartados.

PREPARACIÓN DEL GEL DE POLIACRILAMIDA

Antes de preparar el gel los platos son bien lavados y al secarse limpiados con isopropanol. A ambos platos se les aplica en su parte superior *bind silane* y en el plato principal se colocan los espaciadores y se coloca sobre este el segundo plato fijándose a ambos con clips.

Gel:

MD Gel solution (Bio-Whittaker) con concentración final de 0.25X

TBE 10X buffer

H₂O Milli Q

Persulfato de amonio al 10% (0.05g diluidos en 500 µl de agua Milli Q)

TEMED (comienza a polimerizar al gel).

Con una jeringa de 50ml se toma un poco de la solución y se mezcla, rápidamente se llena y se inyecta a los platos evitándose formar burbujas. El gel polimerizará en 45 minutos.