



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

Genotipo de *KIR* (*Killer cell Immunoglobulin-like Receptor*) en lesiones gástricas asociadas a *Helicobacter pylori* en población mestiza mexicana

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

ERIC GREGORIO HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ

MÉXICO, D. F.

NOVIEMBRE 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTE PROYECTO SE CONTARON CON LOS SIGUIENTES APOYOS:

BECA DE MAESTRÍA CONACYT: FEBRERO 2006 A FEBRERO DE 2008, NO. DE BECARIO: 203623

BECA DE LA COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD DEL IMSS: FEBRERO DE 2007 A FEBRERO DE 2008, NO. DE MATRÍCULA: 99092924

BECA TESIS DE POSGRADO DEL CONSEJO MEXIQUENSE DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (COMECYT): AGOSTO 2008 A NOVIEMBRE 2008. FOLIO: 08BTM0053.

APOYOS AL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: CONACYT 6957 Y FOFOI IMSS NO. 2006/1A/1/070.

MIEMBROS DEL COMITE TUTORAL:

Dra. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ

Dra. YOLANDA LÓPEZ VIDAL

Dra. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE HISTOCOMPATIBILIDAD DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MEDICA EN INMUNOLOGÍA DEL HOSPITAL DE PEDIATRÍA DEL CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA Dra. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ.

A la memoria de mi abue...

† *Ana María Mateos Rosas*
1930-2008

Muchas gracias... Por siempre

A mi esposa...

...Por tu sacrificio y apoyo, muchas gracias.

ÍNDICE

1.0 Resumen	1
2.0 Abstract	3
3.0 Abreviaturas	5
4.0 Introducción	6
4.1 <i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>)	6
4.1.1 <i>H. pylori</i> un patógeno humano	7
4.1.2 Factores de virulencia	8
4.1.3 Epidemiología	10
4.1.4 <i>H. pylori</i> factor de riesgo para el cáncer gástrico	11
4.1.5 Cáncer gástrico en México	13
4.1.6 La respuesta inmune innata contra <i>H. pylori</i>	13
4.2 Sistema inmune innato	14
4.2.1 La célula <i>NK</i>	15
4.2.2 Genes para receptores KIR	16
4.2.3 Nomenclatura de KIR	18
4.2.4 Las rutas de señalización intracelular coordinan la señal inhibitoria y activadora para la célula <i>NK</i>	19
4.2.5 Haplotipos	19
4.2.6 Genes <i>KIR</i> y su asociación con enfermedad	20
5.0 Planteamiento del problema	22
6.0 Hipótesis	23
7.0 Objetivos	24
7.1 Objetivo general	24
7.2 Objetivos particulares	24

8.0 Material y métodos	25
8.1 Controles	25
8.2 Pacientes	25
8.3 Material biológico	25
8.4 Extracción de DNA	26
8.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa por Secuencia de Iniciadores Específicos (<i>PCR-SSP</i>)	26
8.5.1 Controles	26
8.5.2 Pacientes	26
8.6 Análisis estadístico	27
8.7 Diagrama de flujo	28
9.0 Resultados	29
9.1 Controles	29
9.2 Pacientes	30
9.3 Frecuencias de genes <i>KIR</i> en controles	33
9.4 Frecuencias de genes <i>KIR</i> en pacientes	33
9.5 Genotipos <i>KIR</i> en controles	34
9.6 Genotipos <i>KIR</i> en pacientes	35
9.7 Comparación de frecuencias génicas de <i>KIR</i> en controles, gastritis no atrófica y cáncer gástrico	37
9.7.1 Genes <i>KIR2DL</i>	37
9.7.2 Genes <i>KIR3DL</i>	38
9.7.3 Genes <i>KIR2DS</i>	39
9.7.4 Gen <i>KIR3DS1</i>	40
9.8 Comparación del genotipo 1 (genotipo A) en controles, gastritis no atrófica y cáncer gástrico	40
10.0 Discusión de resultados	42
11.0 Conclusiones	48
12.0 Perspectivas	50
13.0 Bibliografía	51

1.0 Resumen

Son numerosos los estudios enfocados a investigar la respuesta inmune innata de poblaciones celulares específicas del hospedero contra *H. pylori*, principalmente en moléculas de reconocimiento a patógenos. Sin embargo, es probable, que la interacción molecular entre diferentes poblaciones celulares pueda contribuir a la señalización de la respuesta inmune innata contra este patógeno. Se ha demostrado que las células *natural killer* (*NK*, por sus siglas en inglés) están presentes en las mucosas gástrica y duodenal, y pueden ser activadas directa o indirectamente por *H. pylori*. La identificación de los receptores tipo inmunoglobulina de la célula *NK* (*KIR*, por sus siglas en inglés), ha permitido comprender los mecanismos moleculares por los cuales las células *NK* ejercen su función y eliminan células que presentan de forma irregular a moléculas HLA de clase I, a consecuencia de una infección viral o transformación tumoral. En este estudio se analizaron los genes y genotipos de *KIR* en un grupo control de 120 individuos asintomáticos, así como 120 pacientes con gastritis no atrófica y 63 pacientes con cáncer gástrico. Los pacientes fueron diagnosticados por serología, endoscopia e histología; el grupo control solo lo fue por serología. Los 14 genes (*2DL1-2DL5*, *3DL1-3DL3*, *2DS1-2DS5* y *3DS1*) y 2 pseudogenes (*2DP1* y *3DP1*) identificados para *KIR* se amplificaron por *PCR-SSP*. Se encontraron 22 genotipos en el grupo de individuos asintomáticos, 15 y 29 genotipos para pacientes con gastritis no atrófica y cáncer gástrico, respectivamente. Las frecuencias de los genes *KIR* se compararon estadísticamente de manera individual entre los tres grupos, mediante la prueba de χ^2 y la prueba exacta de Fisher, el valor de p fue corregido por el número de especificidades estudiadas ($p < 0.05$). En el gen inhibidor *KIR2DL2* se encontró una asociación positiva (RM 3.7, IC 95% 1.84-7.47) al compararse los pacientes de cáncer gástrico contra los asintomáticos. Mientras que el gen inhibidor *KIR2DL3* presentó una

asociación negativa (RM 0.07, IC 95% 0.02-0.18) al compararse pacientes con cáncer gástrico con el grupo asintomático y entre los pacientes con cáncer gástrico y los de gastritis no atrófica, también se obtuvo una asociación negativa (RM 0.08, IC 95% 0.03-0.20). El gen activador *KIR2DS1* mostró una asociación positiva (RM 8.48, IC 95% 4.42-16.41) cuando se compararon las frecuencias de los pacientes de gastritis no atrófica contra el grupo asintomático, así como en pacientes con cáncer gástrico (RM 8.46, IC 95% 3.72-19.70). En el gen activador *KIR2DS3* se encontró asociación positiva (RM 92.7 IC 95% 35.4-252.7) al comparar a los pacientes de gastritis no atrófica con el grupo asintomático y con los pacientes con cáncer gástrico (RM 17.9 IC 95% 7.84-41.78). Respecto a los diferentes genotipos comparados entre los 3 grupos, se observaron resultados significativos con asociación negativa, solo en el genotipo 1, compuesto principalmente de genes inhibidores, comparando pacientes de cáncer gástrico con asintomáticos (RM 0.08 IC 95% 0.02-0.27) y con pacientes con gastritis no atrófica (RM 0.12 (IC 95% 0.03-0.42). Nuestros resultados pueden sugerir la participación de los genes *KIR* de la célula *NK* en el desarrollo de la enfermedad ocasionada por la infección por *H. pylori*; si bien no de forma directa, pueden estimular e interaccionar con células epiteliales y las células encargadas de la respuesta inmune innata y adaptativa; mediante la producción y secreción de citosinas y quimiocinas, así como su función citolítica determinada por el balance de señales que recibe de sus receptores.

2.0 Abstract

Many studies focused on investigate innate immune response of specific host cell populations to the bacteria *H. pylori*, mainly in recognition of molecules to pathogens. It is likely, however, that the molecular interaction between different cell populations may contribute to the innate immune signaling to this pathogen. It has been shown that natural killer cells (NK) are present in both the gastric and duodenal mucosae, and can be activated directly or indirectly by *H. pylori*. Identification of killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR), has allowed understand the molecular mechanisms by which NK cells exert their function and eliminate cells displaying downregulation of molecules HLA Class I, consequent to viral infection or tumor transformation. This study analyzed the genes and genotypes of *KIR* in a control group of 120 asymptomatic individuals and 120 patients with non-atrophic gastritis and 63 patients with gastric cancer. The patients were diagnosed by serology, endoscopy and histology, the control group it was only by serology. The 14 genes (*2DL1-2DL5*, *3DL1-3DL3*, *2DS1-2DS5* and *3DS1*) and 2 pseudogenes (*2DP1* and *3DP1*) identified for *KIR* were amplified by PCR-SSP. We found 22 genotypes in the group of asymptomatic individuals, 15 and 29 genotypes for patients with non atrophic gastritis and gastric cancer, respectively. The frequency of *KIR* genes were compared statistically between the three groups using χ^2 test and Fisher exact test, then the *p* value was corrected by the number of specificities studied (*pc* <0.05). The inhibitory gene *KIR2DL2* was found a positive association (RM 3.7, 95% CI 1.84-7.47) when compared gastric cancer patients against asymptomatic. While inhibitory gene *KIR2DL3* presented a negative association (RM 0.07, 95% CI 0.02-0.18) when compared gastric cancer patients with asymptomatic group and among patients with gastric cancer and those of non atrophic gastritis, also got an association negative (RM 0.08, 95% CI 0.03-0.20). The activating gene *KIR2DS1* showed a positive

association (RM 8.48, 95% 4.42-16.41) when compared the frequencies of patients non atrophic gastritis against asymptomatic group, as well as, in patients with gastric cancer (RM 8.46, 95% 3.72-19.70). In activating gene *KIR2DS3* was found positive association (RM 92.7, 95% 35.4-252.7) to compare patients non atrophic gastritis with the group and asymptomatic patients with gastric cancer (RM 17.9, 95% 7.84-41.78). Respect to the different genotypes compared between the 3 groups were observed significant results with negative association, only in the genotype 1, mainly composed of genes inhibitors, comparing gastric cancer patients with asymptomatic (RM 0.08, 95% CI 0.02-0.27) and patients with non atrophic gastritis (RM 0.12, 95% CI 0.03-0.42). Our results may suggest the involvement of KIR genes of the NK cell in the development of the disease caused by infection with *H. pylori*. If not directly, can stimulate and interact with epithelial cells and cells responsible for the innate and adaptive immune response, through the production and secretion of chemokines and cytosine, as well as, its role cytolytic determined by the balance of given signals from its receivers.

3.0 Abreviaturas

ASINT	Asintomático
CG	Cáncer gástrico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
GNA	Gastritis no atrófica
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HLA	<i>Human Leucocyte Antigens</i> (Antígenos leucocitarios humanos)
KIR	<i>Killer cell Immunoglobulin-like Receptor</i> (Receptores tipo inmunoglobulina de la célula NK)
NK	<i>Natural Killer cell</i> (célula asesina natural)
<i>pc</i>	<i>p</i> corregida. Valor de <i>p</i> multiplicado por el número de especificidades (genes <i>KIR</i>) estudiadas
PCR-SSP	<i>Polimerase Chain Reaction-Sequence Specific Priming</i> (Reacción en cadena de la polimerasa por secuencias de iniciadores específicos)
RM	Razón de momios

4.0 Introducción

4.1 *Helicobacter pylori*

H. pylori es un patógeno humano altamente adaptado, que coloniza la mucosa gástrica de la mitad de la población mundial, pero existen diferencias sustanciales en la prevalencia de la infección dentro y entre los países. En los países industrializados, el promedio en adultos mayores de 30 años con infección por *H. pylori* es 20 a 50%, comparado contra un 80% o más en países en vías de desarrollo (Frenck *et al.*, 2003; Rothenbacher *et al.*, 2003).

H. pylori (Figura 1) (bacteria conocida previamente como *Campylobacter pyloridis* y luego como *Campylobacter pylori*) (Sleisenger y Fordtran, 1997), fue detectada por patólogos alemanes al observar bajo el microscopio tejido gástrico humano (Cover *et al.*, 2001), pero no fue sino hasta casi 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 (Peek y Blaser 1999). *H. pylori*, es un bacilo gramnegativo en forma espiral ($3 \times 0.5 \mu\text{m}$) que coloniza la mucosa gástrica humana (McNulty, 1999). Esta bacteria es microaerofílica (O_2 5%) y neutralofílica (Marcus y Scott, 2001).

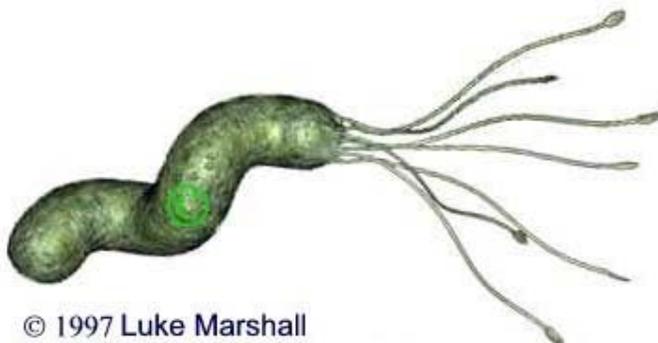


Figura 1. *Helicobacter pylori*, es una bacteria curva gramnegativa, que se ha adaptado al ambiente del estómago humano.

© 1997 Luke Marshall

En 1983, Warren y Marshall fueron los primeros en reportar el cultivo exitoso del patógeno humano, *H. pylori*, a partir de muestras de biopsia gástrica (Warren y Marshall, 1983). Por experimentos de auto inoculación, demostraron que esta bacteria efectivamente causaba desordenes gastroduodenales, cumpliendo de este modo con los postulados de Koch (Marshall, *et al.*, 1985). Este importante descubrimiento, recompensado con el premio Nobel de medicina 2005, ha cambiado la enfermedad ulcera-péptica de una enfermedad crónica de causa incierta a una enfermedad infecciosa curable (Gerrits, *et al.*, 2006).

4.1.1 *H. pylori*: un patógeno humano

Existe evidencia que indica que las especies de *Helicobacter* son biota propia de estómagos de mamíferos y que *H. pylori* es un habitante específico del humano, habiendo estado presente por miles de años (Blaser, 1998). A pesar de su alta diversidad, *H. pylori* muestra una fuerte estructura filogeográfica (Achtman, *et al.* 1999., Falush, *et al.* 2003., Kersulyte, *et al.* 2000., Linz, *et al.* 2007). Nueve poblaciones y subpoblaciones han sido descritas para *H. pylori*, reflejando por completo la estructura poblacional global humana. La distribución geográfica específica para poblaciones de *H. pylori*, permite rastrear antiguas e históricas migraciones de humanos acarreado a la bacteria en el epitelio de sus estómagos. Incluyendo a las que poblaron América vía el Estrecho de Bering hace más de 12,000 años, la colonización de las islas Polinesias así como la expansión de la tribu Bantú en al sur del Sahara en África. La asociación entre el hombre y *H. pylori* es tan antigua, desde que los humanos anatómicamente modernos fueron infectados por *H. pylori* antes de su migración fuera de África hace 60,000 años (Linz, *et al.* 2007).

4.1.2 Factores de virulencia

La primera barrera que la bacteria debe pasar es el bajo pH del lumen del estómago. Para esto, *H. pylori* produce una potente enzima ureasa la cual crea un micro ambiente neutro alrededor de esta (cerca de 6% del contenido de proteína celular) (Marcus y Scott, 2001), catalizando la hidrólisis de urea en amoníaco y bióxido de carbono, lo que incrementa el pH localmente, y le permite colonizar la mucosa gástrica (Peek y Blaser, 1999). Esta bacteria es extremadamente móvil, debido a seis flagelos localizados hacia un polo de esta, que le ayudan a moverse a través de la viscosidad de la capa de moco que cubre al epitelio gástrico (O'Toole *et al.*, 2000). Posteriormente, las adhesinas bacterianas (BabA) median la estrecha interacción con las células epiteliales del hospedero (Montecucco, y Rappuoli, 2001).

La adherencia de la bacteria a los receptores de las células del hospedero, activa cambios celulares que incluyen cascadas de señales de traducción, originando la infiltración de células inflamatorias (neutrófilos y monocitos) y posiblemente a la persistencia del microorganismo (Dubreuil *et al.*, 2002).

El análisis de las regiones de DNA que flanquean al gen asociado a la citotoxina A (*CagA*), llevo al descubrimiento de una región de 40 kb, a la cual se designó como isla de patogenicidad *cag* (*cag-PAI*), este *locus* se localiza en la región cromosomal de gen de la glutamato rasemasa (*glr*). Contiene 31 genes, la presencia de secuencias de inserción 605 (IS605) y de un bajo contenido G+C (35%), el cual es menor que el resto del genoma de *H. pylori* (39%). Se sugiere que la *cag-PAI* se adquirió de otro microorganismo por transferencia horizontal. Adicionalmente, el orden de los genes de la *cag-PAI* se conserva entre las cepas de *H. pylori* (Censini *et al.*, 1996; Alm *et al.*, 1999).

Cag-PAI contiene genes que codifican a un sistema de secreción de proteínas tipo IV (SSTIV) que se encuentra presente en varios patógenos bacterianos. El SSTIV está ancestralmente relacionado a sistemas de conjugación bacteriana y está constituido de al menos 12 proteínas, llamadas VirB1-11 y VirD4 (Christie, 2001).

El SSTIV es capaz de transferir directamente proteínas bacterianas al citoplasma de las células blanco (Covacci *et al.*, 1999); una vez liberada la proteína asociada a la citotoxina (CagA), es fosforilada en sus residuos de tirosina por la familia de proteínas tirosina cinasas, provocando polimerización de actina y rearrreglos del citoesqueleto (Higashi, 2002). CagA también podría estar involucrada en la pérdida de las uniones estrechas entre células epiteliales (Amieva *et al.*, 2003).

Otro factor de virulencia importante que presenta *H. pylori* es, la habilidad de producir una citotoxina vacuolizante (VacA). VacA es responsable de la formación *in vivo* de vacuolas en células epiteliales gástricas, así como *in vitro* en diferentes líneas celulares (*i.e.* HeLa). VacA es liberado dentro del espacio extracelular como homooligómeros consistentes de 6-7 ó 12-14 monómeros de VacA (Reyrat, 1999).

VacA puede alterar el tráfico de la membrana a nivel de endosoma-prelisosoma. Estas alteraciones afectan el tráfico de proteínas y el procesamiento de antígenos, deteriorando la degradación proteolítica dentro de los lisosomas, llevando a una disfunción letal de la célula. Otro mecanismo que involucra la formación de vacuolas por VacA es el incremento en la permeabilidad de células polarizadas, en estudios *in vitro*. Esto lleva a un incremento en el paso de moléculas de bajo peso molecular, el cual incrementa el flujo de nutrientes dentro de la célula a la submucosa favoreciendo la sobrevivencia de *H. pylori* (Tombola, *et al.* 1999).

4.1.3 Epidemiología

La historia natural de la enfermedad causada por la infección con *H. pylori* comienza una vez que la bacteria se ha adquirido en la niñez, ya sea por el contacto cercano con los padres (principalmente de la madre) u otros niños (Rothenbacher, *et al.* 1999). A la fecha el humano continúa siendo el único reservorio conocido para *H. pylori*. La evidencia sugiere que la transmisión de la infección puede ser potencialmente facilitada a través del agua contaminada (Go, 2002., Logan y Walter, 2001). Las vías de transmisión descritas incluyen la fecal-oral, oral-oral y gástrico-oral (Oderda, 1999). Las rutas de transmisión persona a persona parecen darse más fácilmente entre familiares, principalmente de padres a hijos y entre hermanos (Drumm *et al.*, 1990). La vía gástrico-oral se reportó después de la identificación de organismos viables de *H. pylori* en el vomito de adultos infectados y en muestras de aire obtenidas cerca del vomito del sujeto (Allaker, *et al.*, 2002). La prevalencia de la infección por *H. pylori* se relaciona a estándares y prácticas de higiene, así como a condiciones socioeconómicas y de educación (Malaty *et al.*, 1996). La presencia de *H. pylori* en el estómago se asocia con daño al tejido y la observación histológica de gastritis activa (aguda) y crónica. La gastritis crónica se desarrolla persistentemente en todas las personas infectadas, pero un 80 ó 90% de ellas serán asintomáticas. El curso clínico que puede seguir la infección es altamente variable y depende de factores ambientales, de la bacteria y del hospedero. Los pacientes con alta producción de ácido pueden desarrollar una gastritis antral, la cual los predispone a padecer de una úlcera duodenal. Los pacientes con una baja producción de ácido son más susceptibles a desarrollar gastritis en el cuerpo del estómago, que los predispone a úlcera gástrica y puede iniciarse una secuencia de eventos que, en algunos casos, llevará a carcinoma gástrico. La infección por *H. pylori* también induce la formación de tejido linfóide asociado a mucosas (MALT) en la mucosa gástrica (Suerbaum y

Michetti, 2002). Esta aceptado que *H. pylori* es el agente causal de gastritis aguda y crónica, y un factor de mayor predisposición para enfermedades ulcero-péptica, carcinoma y linfoma gástrico (Figura 2).

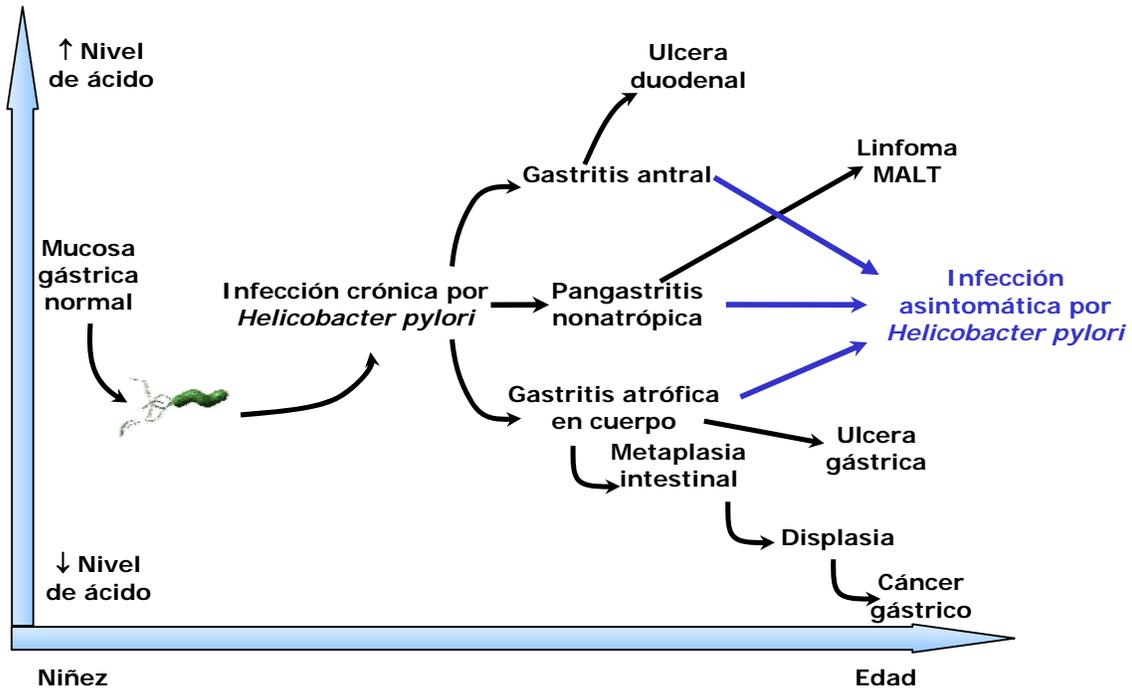


Figura 2. Representación esquemática de la historia natural de la infección por *H. pylori*. La adquisición de *H. pylori* usualmente ocurre durante la niñez. Una vez adquirida y sin tratamiento, la infección persiste de por vida. Después de la fase aguda, la mayoría de los pacientes positivos a *H. pylori* desarrollaran una gastritis crónica sin síntomas. En algunos pacientes, manifestaciones más severas se desarrollaran a mayor edad. Una secreción normal o alta de ácido predispone a úlceras duodenales, mientras una baja secreción predispone a úlceras gástricas y cáncer gástrico. Modificado de Suerbaum y Michetti, 2002.

4.1.4 *H. pylori* factor de riesgo para el cáncer gástrico

En 1994, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) y la Organización Mundial de la Salud (WHO) clasificaron a *H. pylori* como un carcinógeno humano de grupo I (IARC, 1994).

La carcinogénesis gástrica es un proceso multifactorial, ya que la infección por *H. pylori* por si sola no es suficiente para inducir cáncer gástrico (Taylor y Parsonnet, 1995). Los carcinomas gástricos resultan de la interacción de factores relacionados a la dieta, al ambiente, a la susceptibilidad genética del individuo y a la infección por *H. pylori* (Correa, 1992). Únicamente de 10 a 15% de los individuos infectados por *H. pylori* desarrollaran enfermedad ulcero-péptica, y el riesgo de cáncer gástrico se estima aproximadamente en 1 a 3% (Taylor y Parsonnet, 1995). Se ha observado que los pacientes que desarrollan úlceras duodenales asociadas a *H. pylori* de alguna manera no desarrollan cáncer gástrico (Hansson *et al.*, 1996). Dietas ricas en sal, alimentos conservados con alto contenido en nitritos y compuestos N-Nitroso y el decremento en el consumo de frutas frescas y vegetales (antioxidantes) se asocian con un incremento de riesgo a padecer cáncer gástrico (Palli, *et al.*, 1997).

La persistencia de este organismo y la inflamación asociada a largos periodos de infección, permite la acumulación de mutaciones en el genoma de las células epiteliales gástricas, incrementando el riesgo de transformación maligna y progresión a carcinoma (Santos, *et al.*, 1999). Cepas CagA positivas inducen altos niveles de interleucina 8 (IL-8) en comparación con las cepas CagA negativas, resultando en altos niveles de inflamación que produce gran daño en la mucosa gástrica (Crabtree, *et al.*, 1995).

La clasificación de carcinoma gástrico por Lauren, describe dos tipos: el intestinal y el difuso o indeterminado (Lauren, 1965). Los tumores de tipo intestinal se caracterizan por gastritis dominante en cuerpo con atrofia gástrica y metaplasia intestinal, mientras los tumores de tipo difuso se caracterizan por gastritis a través de todo el estómago pero no hay atrofia (Cuello, *et al.*, 1979). Los tumores de tipo intestinal se

encuentran predominantemente en áreas geográficas con alta incidencia de cáncer gástrico, mientras que los tumores de tipo difuso se encuentran uniformemente por todo el mundo (Fox y Wang, 2007).

4.1.5 Cáncer gástrico en México

En México existen zonas que difieren en el riesgo a cáncer gástrico. En el Estado de México el riesgo es de 2.5/100,000 habitantes (bajo), en el D. F. es de 4.5/100,000 habitantes (medio) y en Chiapas: 6.4/100,000 habitantes (alto) (Torres, *et al.*, 1998).

El cáncer gástrico es la segunda causa de muerte en el mundo, contabilizando más de medio millón de muertes, y alrededor del 65% de éstas ocurren en los países menos desarrollados (Ferlay, *et al.*, 2000). El cáncer gástrico es una de las neoplasias malignas más importantes en México por su frecuencia y mortalidad, ya que constituye la segunda causa de muerte por cáncer y es el primero en frecuencia de origen gastrointestinal (De Nicola, *et al.*, 2007).

4.1.6 La respuesta inmune innata contra *H. pylori*.

La clave para evitar la función del sistema inmune contra *H. pylori* se debe probablemente a que la bacteria ha evolucionado junto con su hospedero (Covacci, *et al.*, 1999). Esto debido a que la progresión de la infección a enfermedad es un proceso muy lento (Baldari, *et al.*, 2005).

Una vez que ha arribado al epitelio gástrico, *H. pylori* puede evitar el rápido ataque de las células efectoras (*i.e.* neutrófilos, macrófagos, etc.) de la respuesta inmune innata. En particular, la bacteria debe enfrentar ser devorada por fagocitos y el riesgo de ser destruida por oxígeno reactivo e intermediarios de nitrógeno (ROIs y RNIs, respectivamente) producidos por estas células (Baldari, *et al.*, 2005). *H. pylori* es más

resistente que otras bacterias gramnegativas a ser destruida por macrófagos (Allen, 2001). Esta característica es única en cepas de *H. pylori* virulentas (CagA⁺ y VacA⁺, conocidas como tipo I). Estudios *in vitro* demostraron que la fagocitosis de cepas de *H. pylori* tipo I por macrófagos es retardada y que la bacteria se mantiene viable acumulada en fagosomas grandes y normales, llamados megasomas, los cuales resultan de la fusión homotípica del fagosoma (Allen, *et al.*, 2000). La subsecuente apoptosis del macrófago permite el escape de la bacteria (Chaturvedi, *et al.* 2004). Una pequeña proporción de *H. pylori* se encuentra invadiendo la barrera epitelial, entre las células o dentro de las células epiteliales (Necchi, *et al.*, 2007).

4.2 Sistema inmune innato

La respuesta inmune innata esta diseñada para alertar rápidamente al hospedero de la presencia de patógenos microbianos invasivos que han penetrado al organismo multicelular eucariótico, los elementos humorales y celulares del sistema inmune innato (componentes del complemento, lectinas de unión a manosa, CD14 soluble, defensinas, péptidos antimicrobianos, neutrofilos, macrófagos, células *natural killer* (NK)) son reconocidos como los principales respondedores prematuros a una infección microbiana (Levi y Cate, 1999). Se ha demostrado que las células NK están presentes en las mucosas gástrica y duodenal, y que pueden ser activadas directamente por *H. pylori*, a través de sus antígenos e incluso por lisados de esta bacteria. También la célula NK se activa de manera indirecta, aunque se encuentre aislada de la bacteria por una capa de células epiteliales, indicando que la activación de células NK por *H. pylori* también ocurre *in vivo* (Yun, *et al.*, 2005).

4.2.1 La célula *NK*

Las células *natural killer* (*NK*) son células granulares grandes que conforman el tercer subtipo de linfocitos y constituyen, en promedio, del 10 al 15% de linfocitos de sangre periférica en individuos sanos (Trinchieri, 1989); se desarrollan de un progenitor linfoide común residente en médula ósea, pero divergen de otros linajes de linfocitos muy temprano en su desarrollo (Colucci, *et al.*, 2003). Tienen un citoplasma sustancial que contiene gránulos citotóxicos. La célula *NK* es crítica para la inmunidad del hospedero por su habilidad de mediar rápidamente citotoxicidad contra células infectadas por patógenos o transformadas por tumores, y por producir una amplia variedad de quimiocinas y citocinas que influyen otros compartimientos celulares del sistema inmune (Yokohama, *et al.*, 2004) (Figura 3). La actividad de la célula *NK* es regulada estrechamente por un conjunto de receptores activadores (CD16, CD2, LFA-1, etc) e inhibidores en la superficie de la célula (Raulet *et al.*, 2001). Los receptores inhibitorios reconocen principalmente moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (*MHC*) de clase I (Lanier, 1998; Long, 1999). Estructuralmente, comprenden dos superfamilias distintas, los receptores tipo lectina (CD94/NKG2) y los receptores KIR, estructuralmente relacionados con las inmunoglobulinas (*killer cell immunoglobulin-like receptors*).

Se considera que las células *NK* tienen el papel principal en la defensa no específica del hospedero y tienen la habilidad de eliminar células que han sido infectadas por bacterias, dependiendo de la expresión reducida de moléculas del *MHC* clase I. Se ha demostrado que la interacción entre la célula *NK* y la célula dendrítica puede llevar a una potente activación de la célula *NK*, seguida de la incubación de macrófagos-célula dendrítica con *H. pylori* intacto (Hafsi, *et al.*, 2004).

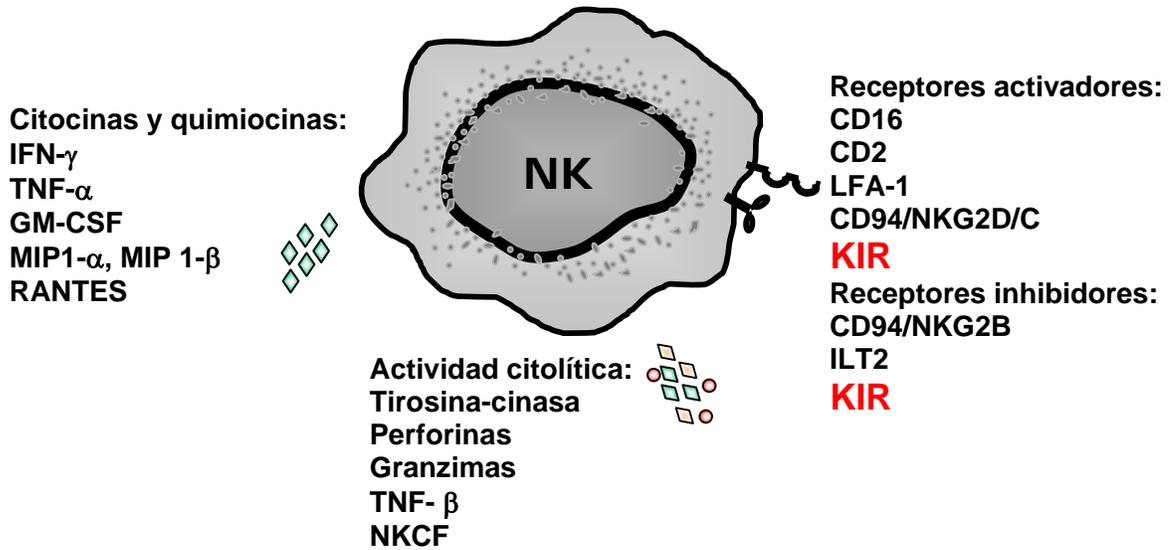


Figura 3. Funciones de la célula *NK*, clasificadas en tres categorías: producción y secreción de citocinas y quimiocinas, citotoxicidad y regulación de estas funciones por receptores activadores e inhibidores, expresados en su superficie.

4.2.2 Genes para receptores KIR

La familia de genes *KIR* humanos se localiza en el cromosoma 19 (19q13.4), dentro de la región del cluster de receptores del linfocito (*LRC* por sus siglas en inglés) (Wilson *et al.*, 1997) (Figura 4).

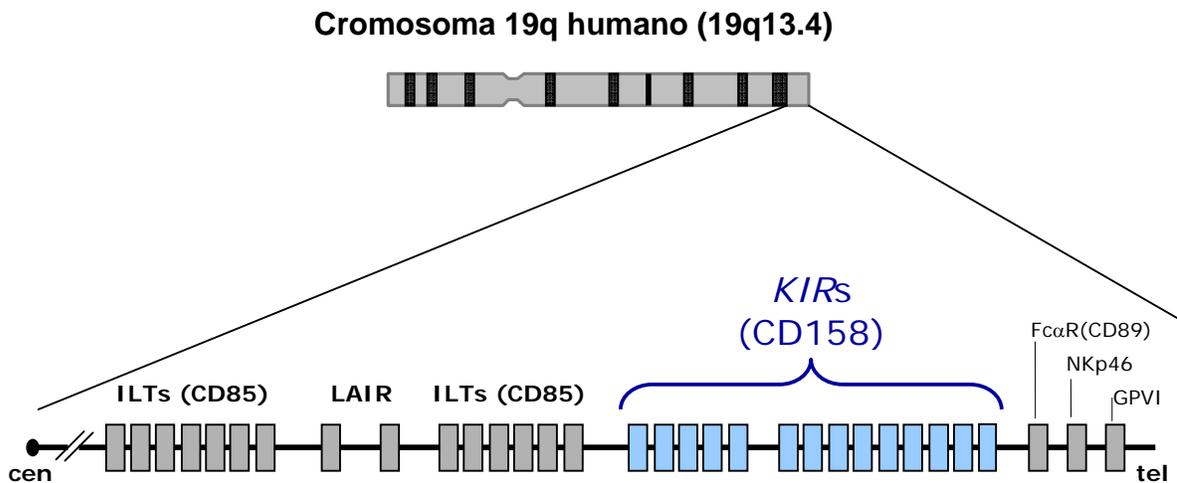


Figura 4. Organización genómica del cluster de receptores del leucocito en el cromosoma 19 humano (Wilson, *et al.* 1997; Hsu, *et al.* 2002).

La región de *KIR* es extremadamente variable y aún así altamente organizada, formada por 14 genes (*3DL1-3DL3*, *3DS1*, *2DL1-2DL4*, *2DL5*, *2DS1-2DS5*) y 2 pseudogenes (*3DP1* y *2DP1*) (Gómez-Lozano *et al.*, 2002). Recientemente, se ha identificado a *KIR3DX1*, y al igual que *KIR3DP1* y *KIR2DP1*, carece de cola citoplasmática (Tabla 1) (Sambrook, *et al.*, 2006). Con excepción de *KIR2DL4*, que se expresa constitutivamente en las células *NK*, los receptores *KIR* se expresan clonalmente. Como si fueran células *NK* individuales, así en una persona se expresaran diferentes combinaciones de genes *KIR* codificados por su DNA (Vilches y Parham, 2002). Aunque *KIR2DL4* puede expresarse en la superficie de la célula, predominantemente se localiza intracelularmente (Gardiner, 2007).

Tabla 1. Genes y pseudogenes *KIR*, tipo de señal y ligandos para sus receptores.

Gene <i>KIR</i>	Señal	Ligando
<i>2DL1</i>	Inhibidor	HLA-C2
<i>2DL2</i>	Inhibidor	HLA-C1
<i>2DL3</i>	Inhibidor	HLA-C1
<i>2DL4</i>	Inhibidor-Activador	HLA-G
<i>2DL5</i>	Inhibidor	?
<i>3DL1</i>	Inhibidor	HLA-Bw4
<i>3DL2</i>	Inhibidor	HLA-A3, A11
<i>2DS1</i>	Activador	HLA-C2
<i>2DS2</i>	Activador	HLA-C1
<i>2DS3</i>	Activador	?
<i>2DS4</i>	Activador	HLA-Cw4
<i>2DS5</i>	Activador	?
<i>3DS1</i>	Activador	HLA-Bw4
<i>3DL3</i>	?	?
<i>3DX1</i>	?	?
<i>2DP1</i>	No se expresa	---
<i>3DP1</i>	No se expresa	---

El signo “?” indica el desconocimiento, hasta el momento, del tipo de señal y el ligando del receptor (Sambrook y Beck, 2007). Los genes en negritas, se conservan a través de los genotipos *KIR*.

La diversidad haplotípica de los genes *KIR* sugiere que estos genes estuvieron bajo una fuerte presión selectiva, debida principalmente a la influencia de patógenos (Khakoo, *et al.*, 2000).

4.2.3 Nomenclatura de KIR

La nomenclatura designada para KIR es la siguiente: los genes *KIR* con dos dominios Ig extracelulares son nombrados *KIR2D*, mientras que los genes con tres dominios Ig extracelulares se designan *KIR3D*. Los genes *KIR* que contienen *ITIMs* se nombran "L" (*Long*) (receptores inhibitorios), los genes *KIR* sin *ITIMs* se nombran "S" (*Short*) (receptores activadores) y una "P" para pseudogenes (Hsu *et al.*, 2002; Marsh *et al.*, 2003) (Figura 5).

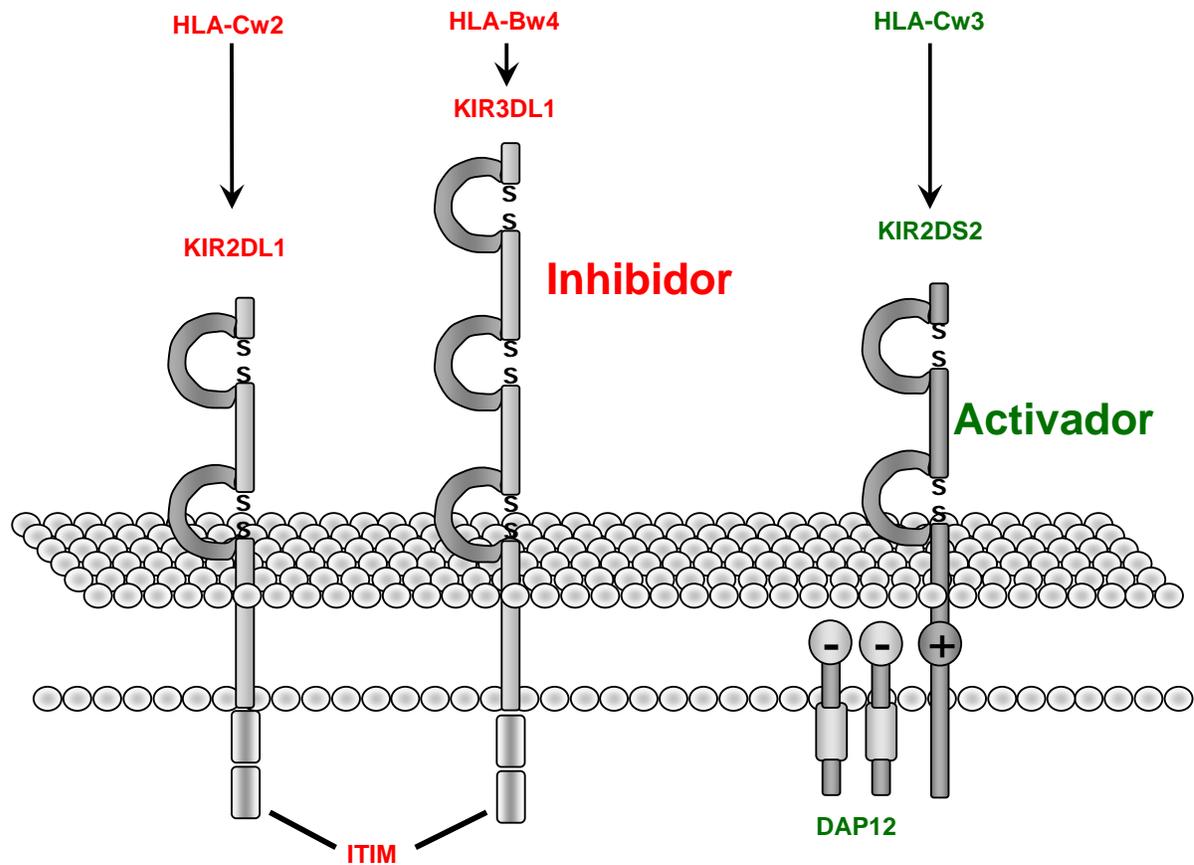


Figura 5. Receptores KIR expresados en la superficie de la célula *NK*. Se ejemplifican la estructura de receptores inhibitorios, KIR2DL1 y 3DL1, así como el activador KIR2DS2 (Modificado de Barao y Murphy, 2003).

4.2.4 Las rutas de señalización intracelular coordinan la señal inhibitoria y activadora para la célula NK

Se piensa que la forma en que la célula *NK* decide efectuar su función citotóxica o bloquearla, depende de la coordinación de rutas de señalización intracelular, y puede involucrar el balance entre señales activadoras e inhibitoras. La forma activadora de KIR actúa por medio de una cola citoplasmática relativamente corta que contiene un residuo carboxilo con carga positiva en la región transmembranal, la cual interactúa con la activación específica de las proteínas adaptadoras (DAP12). El receptor inhibitorio tiene una cola citoplasmática larga que contiene dominios *ITIM* (motivo inmuno-receptor inhibitorio basado en tirosina) (Lanier, 1998., Long, 1999); si el residuo de tirosina de este motivo es fosforilado, recluta fosfatasa (SHP-1 y SHP-2) las cuales des regulan y traducen una señal inhibitoria a la actividad de la célula *NK* (Campbell *et al.*, 1996). En contraste los receptores KIR que carecen de *ITIMs* y que se asocian a DAP12, con dominios *ITAM* (motivo inmuno-receptor activador basado en tirosina) les permiten ser fosforilados y reclutar tirosina cinasa (ZAP-70), que llevan a la activación de la célula *NK* (López-Botet y Bellón, 1999).

4.2.5 Haplotipos

Como resultado de diferentes estudios en población caucásica, dos haplotipos principales han surgido, el haplotipo A y el haplotipo B. El haplotipo A, inhibitorio, se ha definido como: *KIR3DL3*, *-2DL3*, *-2DL1*, *-2DL4*, *-3DL1*, *-2DS4* y *-3DL2* (Martín *et al.*, 2000). El haplotipo B, activador, es variable y se caracteriza por la presencia de más de un gen activador: *KIR2DL5*, *-2DS1*, *-2DS2*, *-2DS3*, *-2DS5* y *-3DS1* (Marsh *et al.*, 2003) (Figura 6).

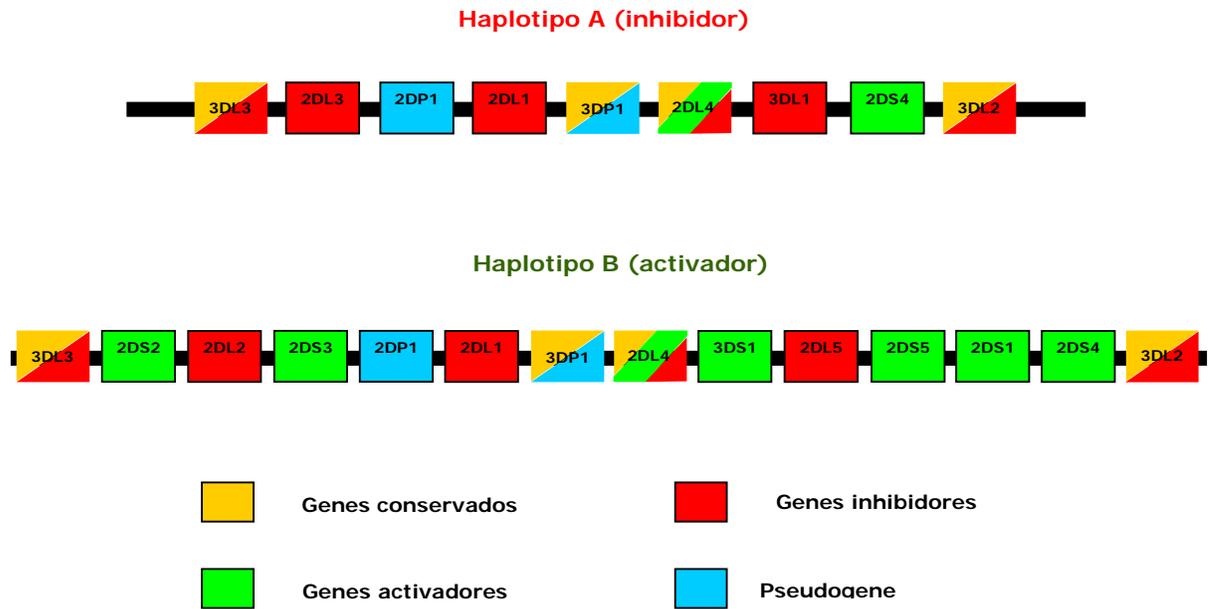


Figura 6. Organización genómica de los haplotipos A y B *KIR*. Los genes estructuralmente conservados: *3DL3* (extremo centromérico), *3DP1*, *2DL4* y *3DL2* (extremo telomérico) están presentes en todos los genotipos humanos (modificado de Wilson, *et al.*, 2000).

4.2.6 Genes *KIR* y su asociación con enfermedad

Existen factores que contribuyen a deducir el papel de los genes *KIR* en enfermedades humanas. Primero, estos genes son diversos en la población, y pueden ser correlacionados con diferentes resultados en enfermedades específicas (infecciones virales, inmunidad contra cáncer, transplantes, autoinmunidad, etc.); además se asocian con desordenes inflamatorios que afectan únicamente a un subconjunto de la población. Segundo, los receptores *KIR* controlan íntimamente las funciones de la célula *NK*, un tipo celular involucrado en una respuesta inmune exitosa a infecciones virales y células tumorales (Khakoo y Carrington, 2006).

Adicionalmente, trabajos recientes han destacado el papel de estas células en controlar la respuesta inmune adaptativa por interacción con células dendríticas y

células T, implicando a los receptores KIR en desordenes inflamatorios más sostenibles (Moretta, 2002). Finalmente, sus ligandos son las moléculas HLA de clase I, las cuales han sido ya implicadas en un gran número de condiciones clínicas (Khakoo y Carrington, 2006). (Tabla 2).

Tabla 2. Asociaciones de genes *KIR* con enfermedades virales, tumorales y autoinmunes.

<i>KIR</i>	Enfermedad	Autor
<i>3DS1</i>	Retarda la progresión a SIDA después de la infección por VIH.	Martin, <i>et al.</i> , 2002a
<i>3DL1</i>	Retarda la progresión a SIDA después de la infección por VIH	López-Vazquez, <i>et al.</i> 2005
<i>2DS2</i>	Prevalece en pacientes con vasculitis reumatoide.	Yen, <i>et al.</i> , 2001
<i>2DS1</i>	Incrementa susceptibilidad a desarrollar artritis psoriática.	Martin, <i>et al.</i> , 2002b
<i>2DL2/3</i>	La ausencia de su ligando (HLA-Cw) incrementa susceptibilidad a artritis psoriática.	Nelson, <i>et al.</i> , 2004
<i>2DL3</i>	Tiene influencia en la resolución de la infección por virus de hepatitis C.	Khakoo <i>et al.</i> , 2004
<i>3DL1</i>	Protección o susceptibilidad, por la ausencia o presencia de su ligando HLA-Bw4 en leucemia	Verheyden y Demanet. 2006
<i>3DS1</i>	La ausencia de los ligandos HLA-C2 y/o HLA-Bw4 confiere susceptibilidad a cáncer cervical	Carrington, <i>et al.</i> , 2005

5.0 Planteamiento del problema

El cáncer gástrico es una de las neoplasias malignas más importantes en México por su frecuencia y mortalidad, ya que constituye la segunda causa de muerte por cáncer y es el primero en frecuencia de origen gastrointestinal. Por otro lado, existen estudios que asocian a genes del *MHC* clase II (*HLA-DQA1*, *-DQB1* y *-DR*) con diversas etapas de la enfermedad causada por *H. pylori*, sin embargo entre los factores del hospedero, destaca la respuesta inmune innata cuya participación es fundamental para activar la respuesta adaptativa. Las células *NK* son una importante defensa en mucosa gástrica contra agentes infecciosos y cáncer, se ha demostrado que la infección por *H. pylori* activa e incrementa la función de estas células, presentes en mucosa gástrica y duodenal. Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado alguna posible asociación de los genes *KIR*, con los diferentes estadios de la enfermedad causados por la infección con *H. pylori*. Por lo que la importancia del presente estudio, radica en encontrar las frecuencias de estos genes en la fase temprana de la enfermedad, gastritis no atrófica, y en el estadio muy avanzado, cáncer gástrico, e identificar si existe alguna asociación de estos genes y de algún genotipo, en el desarrollo de la enfermedad causada por *H. pylori*.

6.0 Hipótesis

Los genotipos *KIR* predominantes en gastritis no atrófica serán aquellos que contengan un mayor número de genes activadores, mientras que en cáncer gástrico lo serán los genotipos *KIR* con más genes inhibidores.

7.0 Objetivos

7.1 Objetivo general

- Analizar los genes y genotipos, del *locus KIR* presentes en sujetos asintomáticos, y en pacientes con gastritis no atrófica y con cáncer gástrico, en la población mestiza mexicana.

7.2 Objetivos particulares

- Identificar los genes del *locus KIR* en el grupo de individuos asintomáticos, en los pacientes con gastritis no atrófica y cáncer gástrico, causados por la infección con *H. pylori*.
- Determinar las frecuencias génicas de *KIR* en cada individuo.
- Comparar las frecuencias de los genes *KIR* de cada enfermedad, con las encontradas en el grupo asintomático.

8.0 Material y métodos

8.1 Controles

Se estudiaron 120 muestras de individuos mestizos mexicanos donadores de sangre de los Bancos de sangre del Hospital General Regional No. 25 y del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (CMN S-XXI, IMSS). Ningún individuo reportó algún diagnóstico de enfermedad gástrica al momento de la toma de muestra.

8.2 Pacientes

Por otro lado, se analizaron las muestras de 183 pacientes mestizos mexicanos mayores de 30 años, provenientes del Hospital General de México SSA y del Hospital de Oncología del CMN S-XXI IMSS, 120 con diagnóstico de gastritis no atrófica (GNA) y 63 con cáncer gástrico (CG) asociados a *H. pylori*. El diagnóstico se realizó mediante serología (Camorlinga *et al.*, 1998), endoscopia e histología, a cargo de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMEIP) del Hospital de Pediatría del CMN S-XXI IMSS (Tanto los controles como los pacientes fueron incluidos previo consentimiento informado).

8.3 Material biológico

Se obtuvieron de 3 a 5 ml de sangre periférica, de cada individuo. Para las muestras del grupo control se utilizó EDTA como anticoagulante y para las muestras de pacientes (obtenidas con anterioridad) se usó heparina. Mediante centrifugación se separó el *buffy coat* (paquete leucocitario) para la extracción del DNA y el plasma para la determinación de anticuerpos IgG contra *H. pylori*.

8.4 Extracción del DNA

Se utilizó el paquete leucocitario obtenido de la centrifugación de la sangre total y la técnica de *salting out* para la extracción de DNA (Miller *et al.*, 1988). El paquete leucocitario se resuspendió en una solución de lisis con sacarosa para lisar los eritrocitos, posteriormente, los leucocitos se lisaron con otra solución de lisis NaCl y EDTA. El DNA se separó de las proteínas con SDS, NaClO₄ y NaCl y se precipitó con isopropanol a -20°C. Después de 12 horas, a la misma temperatura, se lavó con etanol al 70% a -20°C. Se decantó el etanol en el último lavado para dejar secar el DNA a temperatura ambiente y disolverlo, en agua bidestilada. Por espectrofotometría el DNA fue cuantificado, mientras que su integridad se observó al correrlo en un gel de agarosa al 0.8%.

8.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa por Secuencia de Iniciadores Específicos (PCR-SSP)

8.5.1 Controles (Grupo asintomático)

La tipificación del *loci* de *KIR* se realizó con la técnica de *PCR-SSP*. Se identificaron los 14 genes *KIR* conocidos hasta el momento (*KIR2DS1-2DS5*, *2DL1-2DL5*, *3DS1*, *3DL1-3DL3*) y los dos pseudogenes, (*3DP1* y *2DP1*). Se utilizó para las muestras de DNA de los controles un *kit* comercial (*KIR Genotyping PCR-SSP kit*, Invitrogen™). Diseñado para detectar la presencia y ausencia de genes *KIR*.

8.5.2 Pacientes

Debido a que en la toma de muestras de los pacientes (obtenidas años atrás) se utilizó heparina, como anticoagulante, la cual inhibe la función la enzima *Taq polimerasa*, se tuvieron que amplificar los genes *KIR* en forma individual, con la finalidad de hacer más eficiente las condiciones de la reacción de *PCR*. Para ello, se

consiguieron los iniciadores específicos de cada gen *KIR* con base en la bibliografía y en las secuencias génicas de *KIR* indicadas por el fabricante del *kit* (Invitrogen™), utilizado en los individuos asintomáticos (Tabla 3).

Tabla 3. Iniciadores específicos para genes *KIR* obtenidos en la bibliografía y localizados en las secuencias, para el estudio del DNA de los pacientes.

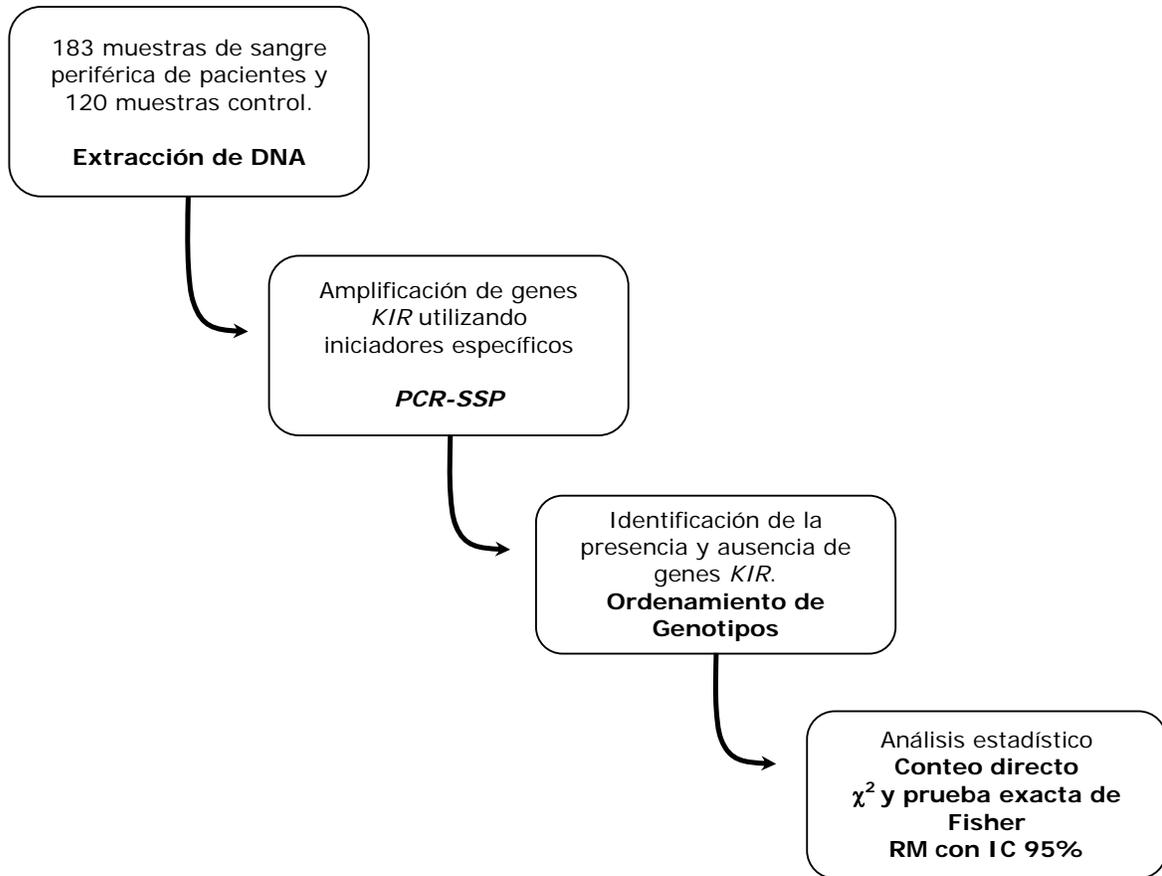
	Alelo específico <i>KIR</i>	Exón	Localización	pb	Referencia
1	<i>2DL1*001-005</i>	4	440-563	145	♦
2	<i>2DL2*001-004</i>	5	673-796	145	♦ Gómez&Vilches. 2002
3	<i>2DL3*001-006</i>	7-8	1092-1137	455	♦
4	<i>2DL4*00101/00102/00201/</i>	5	683-872	230	♦
5	<i>2DL5A*001, 2DL5B*002-004</i>	1-3	1-137	257	♦
6	<i>2DS1*001</i>	4	545-643	100	♦ Uhrberg <i>et al.</i> , 1997
7	<i>2DS2*001-005</i>	4	486-648	207	♦ Uhrberg <i>et al.</i> , 1997
8	<i>2DS3*00101-00103</i>	5	743-885	162	♦ Uhrberg <i>et al.</i> , 1997
9	<i>2DS4*00101/00102/002</i>	5	735-906	215	♦
10	<i>2DS4*003</i>	5	754-933	200	♦
11	<i>2DS5*001-003</i>	4	491-631	179	Hsu <i>et al.</i> , 2002 b
12	<i>3DL1*00101/00102/002/</i>	4	474-572	129	♦
13	<i>3DL2*001-012</i>	3	91-203	133	♦
14	<i>3DL3*001/00201/00202/</i>	4	442-605	203	♦ Gómez&Vilches. 2002
15	<i>3DS1*010-014</i>	3	127-343	250	♦
16	<i>2DP1*001/002</i>	3	154-282	171	♦
17	<i>3DP1*00301/00302</i>	3	UTR 58c-213	344	♦ Hsu <i>et al.</i> , 2002 b

♦ Iniciador localizado en las secuencias de los genes *KIR*, siguiendo las indicaciones del fabricante del *kit* (Invitrogen™).

8.6 Análisis estadístico

El porcentaje de cada gen *KIR* en los tres grupos, se determinó, por conteo directo (individuos positivos para el gen/individuos estudiados dentro de la población X 100). Las frecuencias génicas de *KIR* en los dos grupos de pacientes se compararon con el grupo de individuos asintomáticos. Las diferencias fueron evaluadas estadísticamente mediante la prueba de χ^2 , utilizando tablas de contingencia de 2X2, si el valor en cualquier celdilla era menor a 5 se aplicó la prueba exacta de Fisher. El valor de p fue corregido, multiplicándolo por el número de especificidades estudiadas (pc). Se obtuvo la razón de momios (RM) de cada evento tomándose en cuenta un intervalo de confianza del 95% para estimar el riesgo (Matthews y Farewell, 1985).

8.7 Diagrama de flujo



9.0 Resultados

9.1 Controles (asintomáticos)

Se estudiaron 120 individuos no relacionados como grupo control. Aunque este grupo no reportó ningún síntoma a la infección, presentó un 83.8% de seropositividad a extracto total de *H. pylori*.

Para este grupo se utilizó un *kit* que determina la presencia o ausencia de genes *KIR*. Los productos de PCR se observaron en un gel de agarosa al 2%. La identificación de los genes nos permitió conformar los genotipos A y B (Figuras 7 y 8).

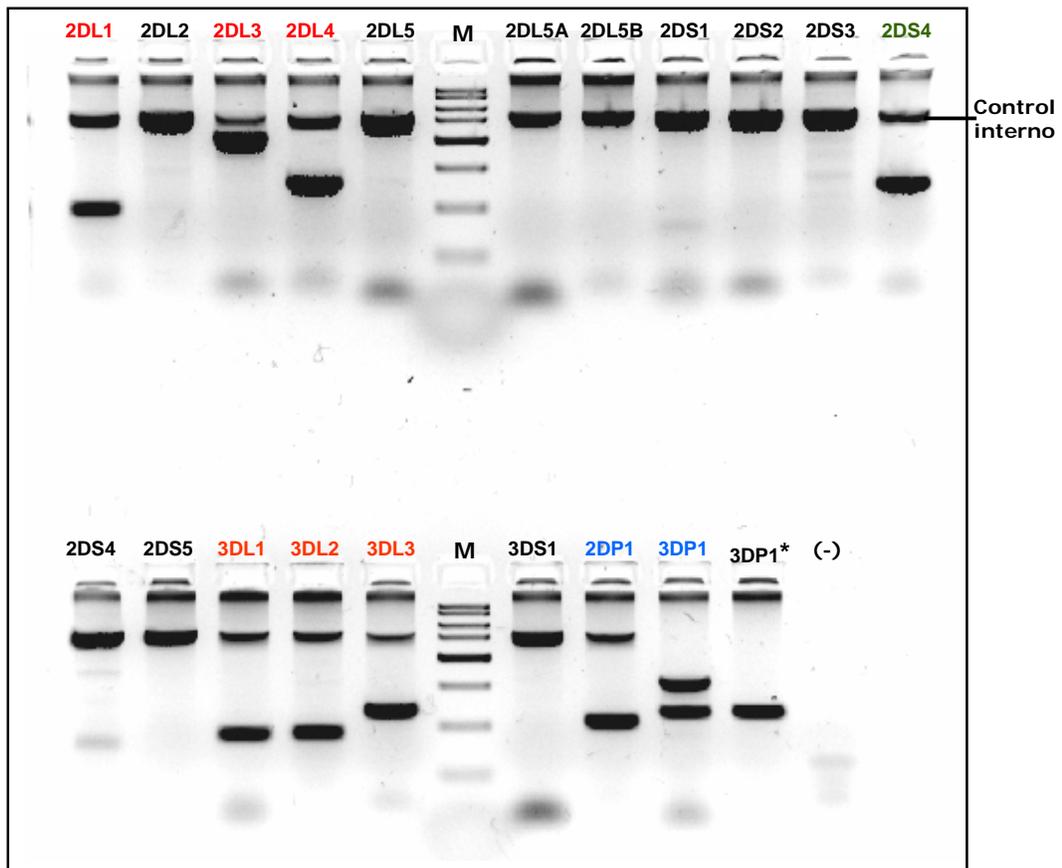


Figura 7. Genotipo A. Prueba de *PCR-SSP* para genes *KIR*. Esta figura corresponde al resultado del genotipo para un solo individuo, determinado con base en la presencia o ausencia de estos genes, se determinó el genotipo A. Los genes en color son los positivos, el genotipo es: *KIR3DL3*, *-2DL3*, *-2DP1*, *-2DL1*, *-3DP1*, *-2DL4*, *-3DL1*, *-2DS4* y *-3DL2*.

3DP1* corresponde a los alelos 001/002.

M Marcador de peso molecular.

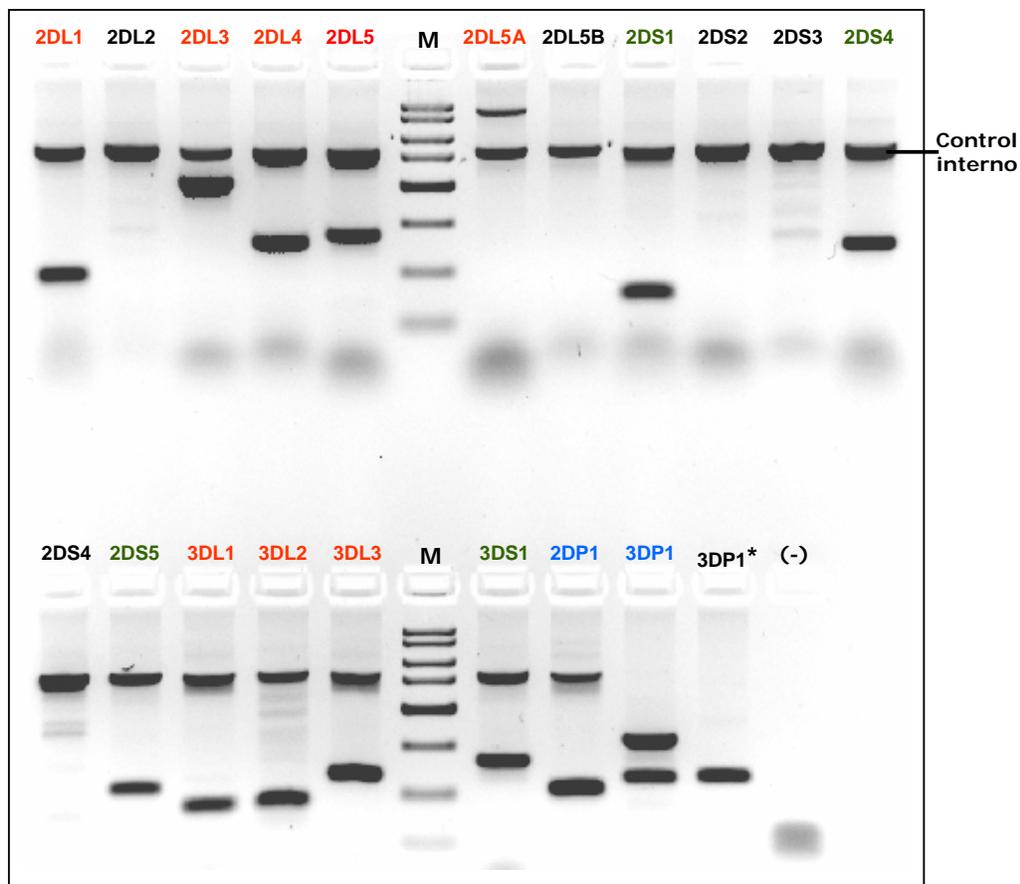


Figura 8. Genotipo B. Prueba de *PCR-SSP* para genes *KIR*. Esta figura corresponde al resultado del genotipo para un solo individuo, determinado con base en la presencia o ausencia de estos genes, se determino el genotipo B. Los genes en color son los positivos, el genotipo es: *KIR3DL3*, *-2DL3*, *-2DP1*, *-2DL1*, *-3DP1*, *-2DL4*, *-3DS1*, *-3DL1*, *-2DL5*, *-2DS5*, *2DS1*, *-2DS4* y *-3DL2*. **3DP1*** corresponde a los alelos 001/002. **M** Marcador de peso molecular.

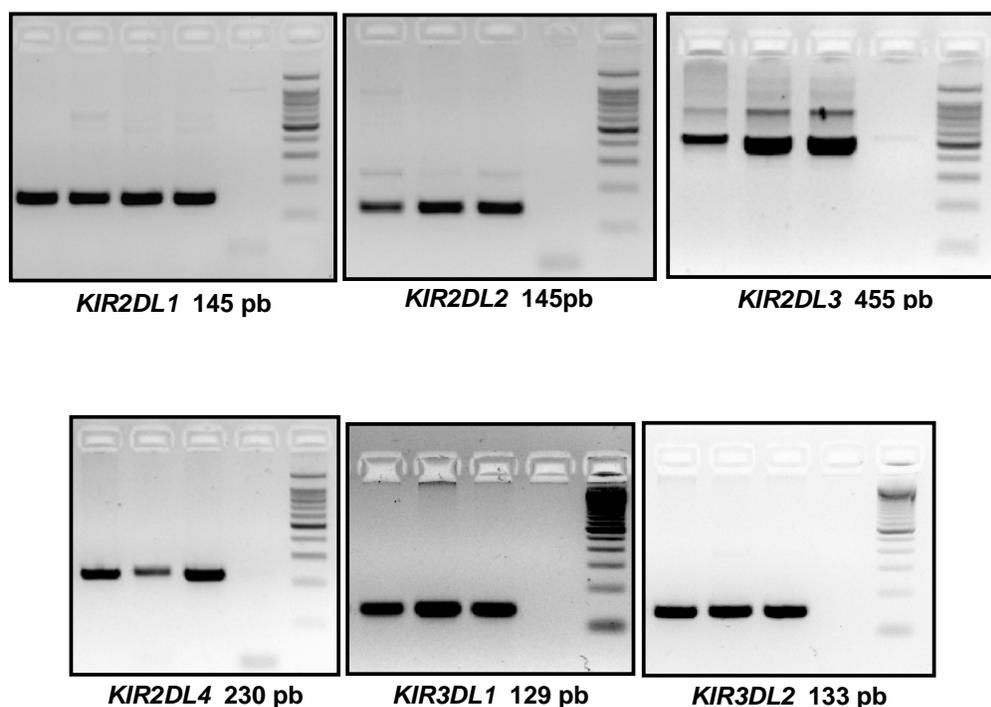
9.2 Pacientes

El grupo de pacientes, conformado por 120 muestras con gastritis no atrófica (GNA) y 63 muestras con cáncer gástrico (CG), fue analizado para conocer su condición de seroprevalencia a *H. Pylori*, los resultados de ELISA se realizaron en colaboración con la UIMEIP del CMN S-XXI IMSS (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentajes de seroprevalencia a extracto total de *H. Pylori*, a la proteína asociada a la citotoxina (CagA) y positivas a ambos antígenos en el grupo de pacientes.

Muestras	Seropositivos a <i>H. pylori</i>	Seropositivos a CagA	<i>H. pylori</i> /CagA
GNA	87/120 (72.5%)	80/120 (66.6%)	65/120 (54.1%)
CG	42/63 (66.6%)	42/63 (66.6%)	30/63 (47.6%)

La amplificación de los genes *KIR* en estos grupos se realizó en forma individual, siguiendo las condiciones de *PCR* previamente estandarizadas. Los pares de cada iniciador de *KIR* se utilizaron para cada una de las muestras de los pacientes, con la finalidad, al igual que el kit, de detectar la presencia o ausencia de los genes *KIR*. Las imágenes que a continuación se muestran son representativas de algunos pacientes que fueron positivos o negativos a los diferentes productos de PCR de genes *KIR* (Figura 9).



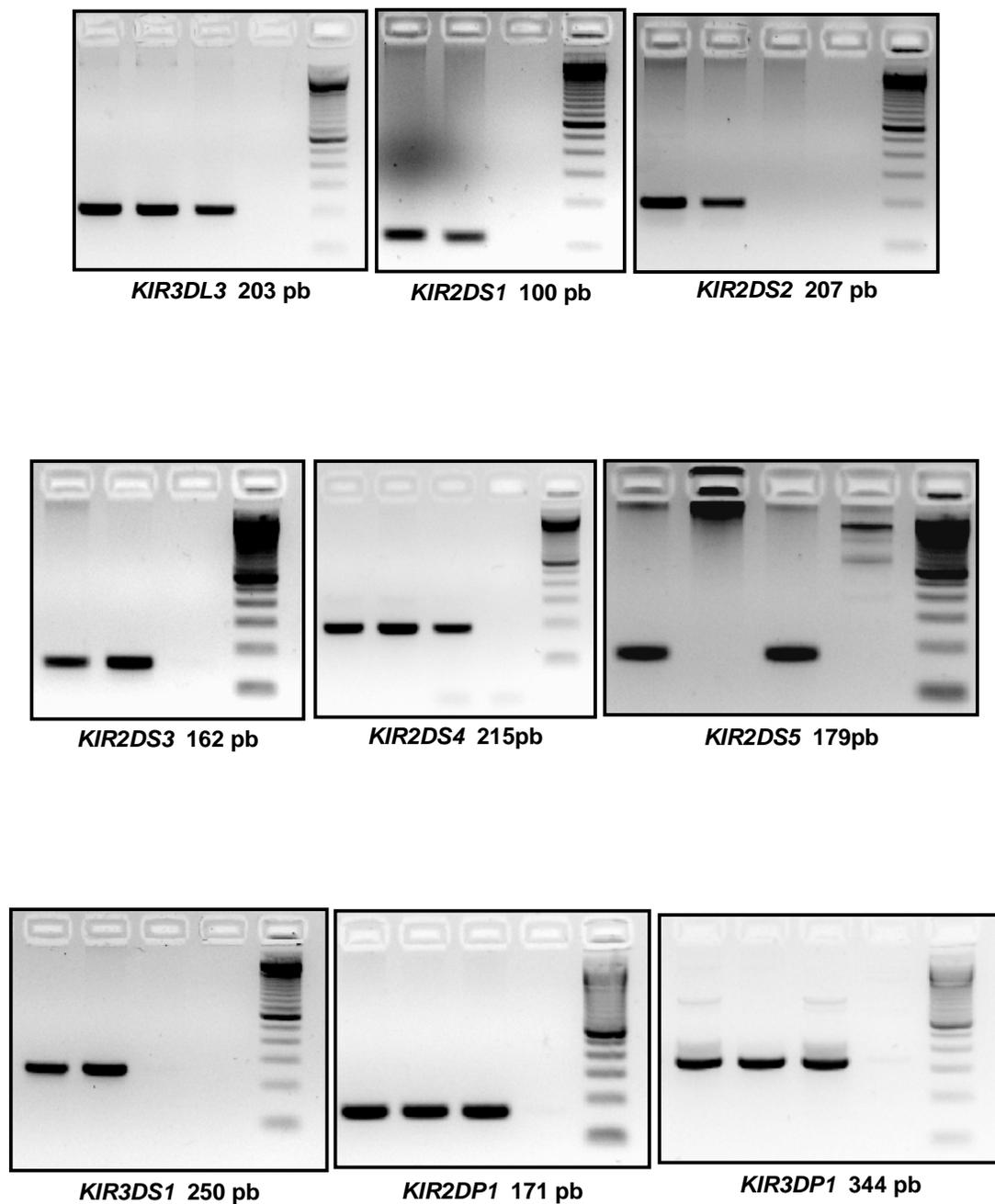


Figura 9. Imágenes representativas de la amplificación de algunas muestras de pacientes que fueron positivas o negativas a los diferentes productos de los genes *KIR*. Se presentan con la finalidad de mostrar la amplificación de cada par de iniciadores para el *locus KIR*.

9.3 Frecuencias de genes *KIR* en controles

Los porcentajes de las frecuencias génicas de los *locus KIR* del grupo asintomático, se determinaron por conteo directo. Los porcentajes más elevados se obtuvieron en los genes inhibitorios *KIR2DL1*, *-2DL3* y *-3DL1*; en el caso de los genes activadores, *KIR2DS4*, fue el más frecuente (Tabla 5). Los genes *KIR2DL4*, *-3DL2* y *-3DL3*, no se tomaron en cuenta, ya que se presentan constitutivamente en todos los genotipos, salvo muy raras excepciones.

Tabla 5. En forma individual se muestran los porcentajes de las frecuencias de los genes *KIR* obtenidos del grupo asintomático (ASINT), estos datos fueron utilizados posteriormente para compararlos con las frecuencias de los pacientes.

<i>KIR</i>	<i>2DL</i>						<i>3DL</i>			<i>2DS</i>					<i>3DS</i>
<i>Gen</i>	1	2	3	4	5A	5B	1	2	3	1	2	3	4	5	1
ASINT	97.5	38.5	94.2	100	36	11.4	93.4	100	100	38.5	38.5	13.1	92.6	33.6	38.5

9.4 Frecuencias de genes *KIR* en pacientes

En pacientes con gastritis no atrófica y cáncer gástrico se obtuvieron los siguientes porcentajes de las frecuencias de genes *KIR* (Tabla 6). Las frecuencias con porcentajes más elevados en GNA fueron en los genes *KIR2DL1*, *-2DL3*, *-3DL1*, *-2DS1*, *-2DS3* y *-2DS4*. En CG los genes *KIR2DL1*, *-3DL1*, *-2DS1* y *-2DS4*, resultaron más frecuentes.

Tabla 6. Porcentaje de frecuencias de genes individuales *KIR* en ambos grupos de pacientes: gastritis no atrófica (GNA) y cáncer gástrico (CG).

<i>KIR</i>	<i>2DL</i>						<i>3DL</i>			<i>2DS</i>					<i>3DS</i>
<i>Gen</i>	1	2	3	4	5A	5B	1	2	3	1	2	3	4	5	1
GNA	97.5	37.5	92.5	100	2.5	2.5	100	100	100	100	32.5	92.5	100	40	45
CG	95	77.5	70	100	5		97.5	97.5	97.5	85	32.5	60	82.5	55	42.5

9.5 Genotipos *KIR* en controles

Al determinar la presencia y ausencia de los genes *KIR* en cada individuo se identificaron un total de 22 genotipos en el grupo de asintomáticos (Figura 10).

Figura 10. Compilación de los 22 genotipos *KIR* en asintomáticos, los cuadros en gris indican la presencia del gen mientras los cuadros en blanco denotan su ausencia. En la columna izquierda (No. Y), se muestra el número del genotipo basado en estudios previos (Yawata *et al.* 2002), el signo “?” indica que el genotipo no se asemeja a los previamente reportados. En la derecha las frecuencias de cada genotipo (FG).

No	No Y	2DL						3DL			2DS					3DS	2DP1	3DP1	FG (%)	
		1	2	3	4	5A	5B	1	2	3	1	2	3	4	5	1				
1	1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	40.5
2	4	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	15.3
3	2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	13.5
4	23	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	2.7
5	8	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	6.3
6	3	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	2.7
7	7	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.9
8	17	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1.8
9	?	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.9
10	?	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.9
11	6	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	3.6
12	5	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.9
13	24	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.9
14	45	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.9
15	?	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.9
16	16	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	1.8
17	?	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.9
18	?	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.9
19	41	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.9
20	13	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.9
21	94	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.9
22	72	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	0.9

El genotipo **1** (*KIR2DL1*, -*2DL3*, -***2DL4***, -*3DL1*, -***3DL2***, -***3DL3***, -*2DS4*, -*2DP1* y -***3DP1***) tiene la mayor frecuencia en nuestro grupo (40.5%). Los genes conservados se representan en negritas.

Los genotipos más heterogéneos (2-22) se encuentran dentro del 59.5% restante, siendo los genotipos **4** (*KIR2DL1*, -*2DL3*, -***2DL4***, -*2DL5*, -*3DL1*, -***3DL2***, -***3DL3***, -*2DS1*, -*2DS4*, -*2DS5*, -*3DS1*, -*2DP1* y -***3DP1***) y **2** (*KIR2DL1*, -*2DL2*, -*2DL3*, -***2DL4***, -

3DL1, -3DL2, -3DL3, -2DS2, -2DS4, -2DP1 y -3DP1) los más frecuentes con **15.3** y **13.5%**, respectivamente.

9.6 Genotipos *KIR* en pacientes

Al estudiarse, por individuo, la presencia o ausencia de genes *KIR* en los grupos de pacientes, se obtuvieron 15 genotipos *KIR* en los de gastritis no atrófica (Figura 11); mientras que en pacientes con cáncer gástrico, se observó una mayor diversidad con 29 genotipos *KIR* (Figura 12).

Figura 11. Compilación de los genotipos *KIR* en pacientes de gastritis no atrófica. 15 genotipos son enlistados, los cuadros en gris indican la presencia del gen mientras los cuadros en blanco denotan su ausencia. En la columna izquierda (No. Y) se muestra el número del genotipo basado en estudios previos (Yawata *et al.* 2002), el signo “?” indica que el genotipo no se asemeja a los previamente reportados. En la derecha las frecuencias de cada genotipo (FG).

No	No Y	2DL					3DL			2DS					3DS	2DP1	3DP1	FG (%)
		1	2	3	4	5A	5B	1	2	3	1	2	3	4	5			
1	1	■		■	■			■	■	■				■				30
2	4					■					■							15
3	?		■	■	■							■						12.5
4	2										■		■					7.5
5	?														■			5
6	?		■	■	■						■		■					5
7	?											■						5
8	?		■	■	■										■			2.5
9	?															■		2.5
10	66																	2.5
11	?		■		■										■			2.5
12	62			■	■								■					2.5
13	?															■		2.5
14	?															■		2.5
15	?		■	■	■													2.5

En este grupo, de gastritis no atrófica, al igual que los individuos asintomáticos el genotipo **1** mantuvo una frecuencia mayor (30%).

Los genotipos más variables con frecuencias menores conformaron el 70% restante.

Nuevamente los genotipos **4** (15%) y **2** (7.5%), fueron frecuentes mientras que un

genotipo no reportado (*KIR2DL1*, *-2DL2*, *-2DL3*, *-2DL4*, *-3DL1*, *-3DL2*, *-3DL3*, *-2DS1*, *-2DS2*, *-2DS3*, *-2DS4*, *-2DS5* y *3DS1*) mostró una frecuencia de 12.5%.

Figura 12. Compilación de los genotipos *KIR* en pacientes con cáncer gástrico. 29 genotipos son enlistados, los cuadros en gris indican la presencia del gen mientras los cuadros en blanco denotan su ausencia. En la columna izquierda (No. Y) se muestra el número del genotipo basado en estudios previos (Yawata *et al.* 2002), el signo “?” indica que el genotipo no se asemeja a los previamente reportados. En la derecha las frecuencias de cada genotipo (FG), los asteriscos indican que el genotipo también se encuentra en el grupo con gastritis no atrófica.

No	No Y	2DL					3DL			2DS					3DS	2DP1	3DP1	FG (%)
		1	2	3	4	5A	5B	1	2	3	1	2	3	4	5			
1	?																	15
2	?																	7.5
3	?																	5*
4	?																	5
5	?																	5
6	1																	5
7	?																	2.5*
8	?																	2.5*
9	?																	2.5*
10	?																	2.5*
11	?																	2.5*
12	?																	2.5
13	?																	2.5
14	?																	2.5
15	?																	2.5
16	?																	2.5
17	?																	2.5
18	?																	2.5
19	?																	2.5
20	?																	2.5
21	?																	2.5
22	?																	2.5
23	?																	2.5
24	?																	2.5
25	?																	2.5
26	?																	2.5
27	?																	2.5
28	?																	2.5
29	?																	2.5

En los pacientes con cáncer gástrico, el genotipo **1** mostró una frecuencia baja de 5%. En estos pacientes destaca lo numeroso de los genotipos, su diversidad y su composición de genes *KIR* activadores.

9.7 Comparación de frecuencias génicas de *KIR* en controles, gastritis no atrófica y cáncer gástrico

9.7.1 Genes *KIR2DL*

Al comparar las frecuencias génicas *KIR2DL*, observamos que *KIR2DL1* no presentó diferencias entre los tres grupos estudiados. En cambio, en los genes *KIR2DL2* y *KIR2DL3*, sí se observaron frecuencias significativas (Figura 13).

ASINT vs GNA y CG *KIR2DL*

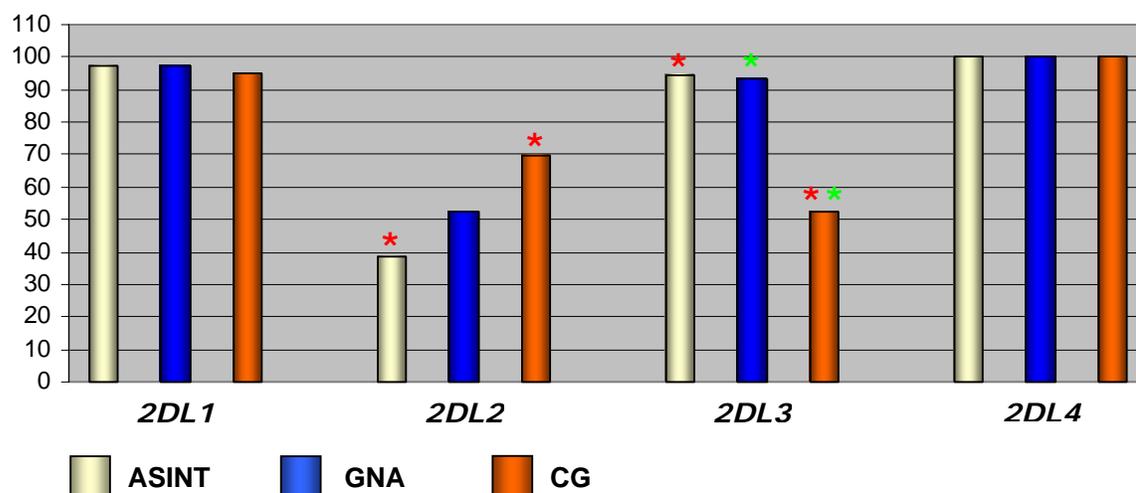


Figura 13. Comparación de las frecuencias de genes *KIR2DL*, entre los grupos de asintomáticos (ASINT), gastritis no atrófica (GNA) y cáncer gástrico (CG).

* <i>KIR2DL2</i> CG vs ASINT	pc (0.001)	RM=3.70 (IC 95% 1.84-7.47)
* <i>KIR2DL3</i> CG vs ASINT	pc (0.0001)	RM=0.07 (IC 95% 0.02-0.18)
* <i>KIR2DL3</i> CG vs GNA	pc (0.0001)	RM=0.08 (IC 95% 0.03-0.20)

En *KIR2DL2* al comparar el grupo de cáncer gástrico contra el de asintomáticos (asterisco en rojo) encontramos una asociación positiva con razón de momios (RM) de 3.70.

El gen *KIR2DL3* mostró una RM de 0.07, asociada a protección, al comparar el grupo de cáncer gástrico contra el de asintomáticos (asterisco en rojo). Finalmente, la comparación entre cáncer gástrico y gastritis no atrófica también resulto con una RM de 0.08 (asteriscos en verde).

Como se esperaba *KIR2DL4* estuvo presente en los tres grupos estudiados, ya que es un gen constitutivo.

9.7.2 Genes *KIR3DL*

En lo que corresponde a la familia de genes *KIR3DL* no hubo ningún resultado estadísticamente significativo, al compararse los resultados entre los grupos de pacientes con gastritis no atrófica y cáncer gástrico y el grupo de asintomáticos (Figura 14).

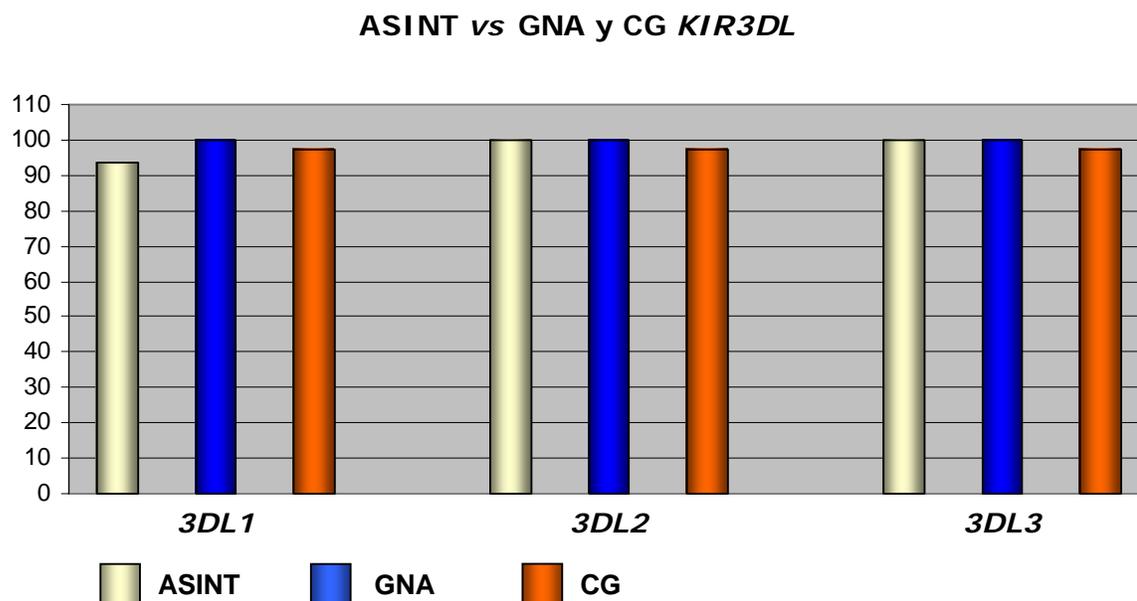


Figura 14. Comparación de los tres grupos con respecto a los genes *KIR3DL*.

Es importante señalar que los genes *KIR3DL2* y *KIR3DL3* son genes constitutivos, que se encuentran presentes en todos los genotipos, salvo muy raras excepciones.

9.7.3 Genes *KIR2DS*

Al estudiar la familia de genes *KIR2DS*, no se encontraron resultados estadísticamente significativos en los genes *KIR2DS2*, *KIR2DS4* y *KIR2DS5*, sin embargo, en este último, puede observarse una tendencia positiva hacia cáncer gástrico. Resultados estadísticamente significativos se obtuvieron en los genes *KIR2DS1* y *KIR2DS3* (Figura 15).

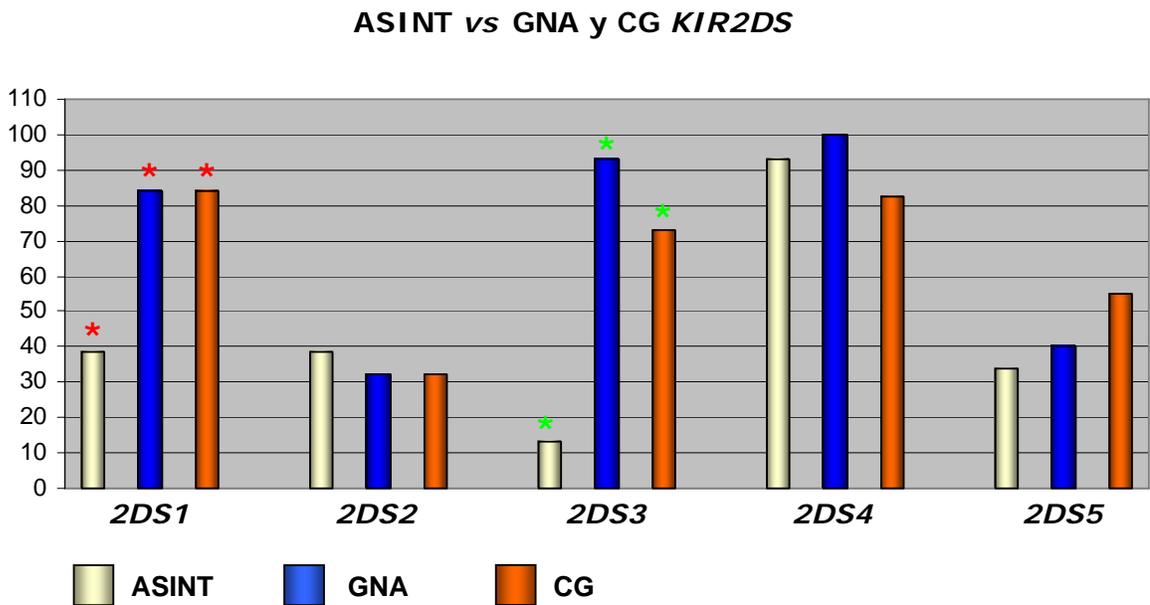


Figura 15. Comparación de los tres grupos para los genes *KIR2DS*.

* <i>KIR2DS1</i> CG vs ASINT	pc (0.0001)	RM=8.46 (IC 95% 3.72-19.70)
* <i>KIR2DS1</i> GNA vs ASINT	pc (0.0001)	RM=8.48 (IC 95% 4.42-16.41)
* <i>KIR2DS3</i> CG vs ASINT	pc (0.0001)	RM=17.93 (IC 95% 7.84-41.78)
* <i>KIR2DS3</i> GNA vs ASINT	pc (0.0001)	RM=92.75 (IC 95% 35.4-252.7)

El gen *KIR2DS1* mostró RMs de 8.48 y 8.46, al compararse las frecuencias de los pacientes con gastritis no atrófica y cáncer gástrico, contra el grupo asintomático, respectivamente (asteriscos en rojo).

El gen *KIR2DS3* resultó con RMs elevadas al comparar, del mismo modo, el grupo de pacientes con gastritis no atrófica (RM=92.75) y los de cáncer gástrico (RM=17.93) contra el grupo de asintomáticos (asteriscos en verde).

9.7.4 Gen *KIR3DS1*

Respecto a la comparación de las frecuencias génicas de *KIR3DS1*, en el grupo de individuos asintomáticos y los pacientes de gastritis no atrófica y cáncer gástrico, no se encontraron resultados estadísticamente significativos (Figura 16).

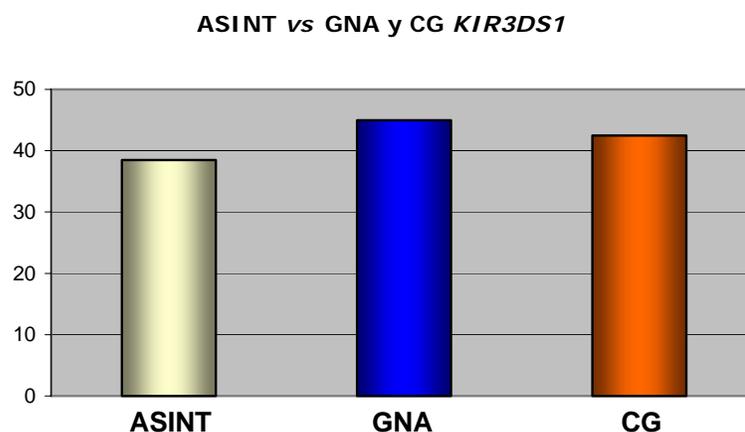


Figura 16. Comparación de las frecuencias génicas de *KIR3DS1*.

9.8 Comparación del genotipo 1 (genotipo A) en controles, gastritis no atrófica y cáncer gástrico

Las diferencias entre los genotipos de *KIR* fueron significativas únicamente en el genotipo 1 (genotipo A), cuya característica es estar conformado en su mayoría por genes inhibidores y sólo un gen activador.

El grupo control tuvo una mayor frecuencia de este genotipo con un 40.5%, mientras que en pacientes con gastritis no atrófica y con cáncer gástrico la frecuencia decreció con un 30 y un 5%, respectivamente (Figura 17).

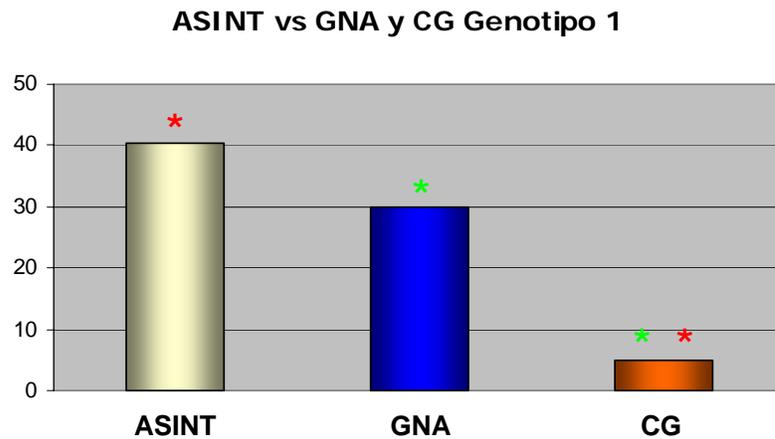


Figura 17. Comparación de las frecuencias del genotipo 1 (genotipo A), entre los tres grupos estudiados

* *Genotipo 1 CG vs GNA* pc (0.0022) RM=0.12 (IC 95% 0.03-0.42)
 * *Genotipo 1 CG vs ASINT* pc (0.0001) RM=0.08 (IC 95% 0.02-0.27)

Al compararse las frecuencias del genotipo 1 entre los tres grupos estudiados, se encontró una asociación negativa al comparar a los pacientes con cáncer gástrico contra los pacientes de gastritis no atrófica (RM=0.12) (asterisco verde) y los asintomáticos (RM=0.08) (asterisco rojo). Lo que muestra que el genotipo 1 protege del desarrollo de cáncer gástrico en los individuos estudiados.

10.0 Discusión de resultados

Varios estudios se han enfocado a investigar la respuesta inmune innata de poblaciones celulares específicas del hospedero contra la bacteria *H. pylori*, principalmente en moléculas de reconocimiento a patógenos (*PRMs* por sus siglas en inglés) que reconocen a patrones moleculares asociados a patógenos (*PAMPs* por sus siglas en inglés). Por ejemplo, la interacción de TLR4 de la célula gástrica epitelial contra el LPS estructural de *H. pylori* (Backhed, *et al.*, 2003; Su, *et al.*, 2003). Es probable que en adición a estas interacciones celulares específicas hospedero-bacteria, la interacción molecular entre diferentes poblaciones celulares pueda contribuir a la señalización inmune innata contra este patógeno. El ejemplo más obvio de tal interacción es la que se da entre las células epiteliales y las poblaciones mieloides y/o linfoides (Ferrero, 2005). La identificación de moléculas KIR ha permitido comprender los mecanismos moleculares (*i.e.* dominios *ITIM* presentes en las regiones citoplasmáticas de los receptores inhibitorios y DAP12 con dominios *ITAM* que interaccionan con aminoácidos de carga positiva en los receptores activadores) por los cuales las células *NK* ejercen su función y eliminan células que muestran una irregular presencia de moléculas HLA de clase I, consecuencia de infección viral o transformación tumoral. La expresión de KIR en la célula *NK* confiere, a estas células de la inmunidad innata, un mecanismo sofisticado que le permite detectar la pérdida de alelos en células blanco potenciales; debido a la distribución clonal de *KIR* en la célula *NK* (Moretta y Moretta, 2004).

La función principal de las células *NK* es la defensa contra la infección, en particular la infección viral (Biron, *et al.*, 1999). También participan en la respuesta hacia otros tipos de infección, incluyendo aquellas causadas por bacterias intracelulares, bacterias patógenas, hongos y ciertos protozoarios (Tay, *et al.* 1998).

Otra importante función de las células *NK* es la eliminación de células tumorales. Así, el papel de las células *NK* contra el cáncer es estar alertas y eliminar células malignas antes de que estas puedan causar un tumor. Muchas células malignas bloquean la expresión de moléculas HLA, lo que las hace susceptibles a la lisis mediada por la célula *NK* (Khong y Restifo, 2002).

El descubrimiento de un nivel inesperado de diversidad entre los receptores *KIR*, ha llevado a investigar su función en enfermedades humanas. Aunque debido a su polimorfismo y a sus ligandos, las moléculas HLA clase I, estos estudios son difíciles de llevarse a cabo y complejos de interpretar (Khakoo y Carrington, 2006).

Se analizaron individualmente los genes de *KIR*, comparando los resultados obtenidos de los pacientes con gastritis no atrófica y cáncer gástrico contra el grupo de asintomáticos.

Al estudiar las frecuencias en el grupo de genes inhibitorios *KIR2DL* en asintomáticos y pacientes; se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en los genes *KIR2DL2* y *KIR2DL3*. El gen *KIR2DL2* resultó tener una asociación de susceptibilidad a desarrollar cáncer gástrico, cuando se le comparó contra los grupos de gastritis no atrófica y de asintomáticos.

En cambio *KIR2DL3*, presentó una asociación de protección a desarrollar cáncer gástrico, cuando se comparó contra los individuos asintomáticos.

El gen inhibitor *KIR2DL2*, más frecuente en pacientes con cáncer gástrico, podría estar bloqueando la función de los genes activadores *KIR2DS*, evitando en la fase temprana la eliminación de células malignas. Por otro lado, el gen inhibitor

KIR2DL3, con frecuencias muy altas, en pacientes con gastritis no atrófica y en individuos asintomáticos, podría conferir protección al desarrollo de cáncer gástrico. Un estudio en las frecuencias de genes y genotipos *KIR*, realizado en 41 individuos japoneses no relacionados y sanos mostró una frecuencia del 100% del gen *KIR2DL3* (Yawata, *et al.*, 2002), aspecto que resalta debido a que esta población presenta una alta incidencia a padecer de cáncer gástrico (Covacci *et al.*, 1999), con 77.9 por 100,000 en hombres y 33.3 en mujeres (Parking *et al.*, 1999). Sin embargo, no existen estudios al respecto que pudieran confirmar esta suposición. Estos receptores inhibitorios (*KIR2DL2* y *KIR2DL3*) comparten el mismo ligando HLA (HLA-Cw1, asparagina en la posición 80) (Kikuchi-Maki, *et al.*, 2003, Du, *et al.*, 2007).

Al analizar los resultados en los genes activadores *KIR2DS*, observamos que los genes activadores *KIR2DS1* y *KIR2DS3* mostraron una asociación de susceptibilidad a padecer gastritis no atrófica y a desarrollar cáncer gástrico cuando se compararon ambos grupos de pacientes con el grupo asintomático.

Respecto a estos genes activadores, sus productos podrían ser bloqueados por los receptores inhibitorios *KIR2DL2*, con una alta frecuencia en los pacientes de cáncer gástrico, o podría también pensarse que la falta de expresión de sus ligandos en células epiteliales mantuvo inactiva su función. El ligando para el receptor activador *KIR2DS1* es la molécula HLA-Cw2 (lisina en la posición 80), mientras que el ligando para *KIR2DS3*, se desconoce aún (Biassoni, *et al.*, 1997, Du, *et al.* 2007).

El gen activador *KIR2DS5* no mostró ningún resultado significativo, pero es de notar, que se observa una tendencia positiva que aumenta del grupo de

asintomáticos, pasando por pacientes con gastritis no atrófica hacia los pacientes con cáncer gástrico.

Los genes inhibitorios *KIR3DL* y el gen activador *KIR3DS1* fueron irrelevantes, pues no mostraron resultados estadísticamente significativos debido a que las frecuencias génicas fueron muy similares entre los tres grupos.

Según nuestra hipótesis, la asociación de susceptibilidad en cáncer gástrico, dada por el gen *KIR2DL2* era de esperarse, sin embargo, *KIR2DL3* mostró protección a desarrollar esta enfermedad cuando los pacientes con cáncer gástrico se compararon con gastritis no atrófica e individuos asintomáticos. Lo mismo ocurrió al analizar a los genes *KIR2DS1* y *KIR2DS3*, los cuales se encontraron en mayor proporción en pacientes con cáncer gástrico y gastritis no atrófica. Lo que nos lleva a suponer que otros receptores de la célula *NK* actúan conjuntamente con *KIR* para llevar a cabo una respuesta inmune adecuada. Es importante señalar que además de la citotoxicidad directa ejercida por la célula *NK*, también genera y secreta citocinas y quimiocinas que activan a la inmunidad adaptativa, dependiendo del balance de señales recibidas por sus receptores activadores e inhibidores.

El número y tipo de genes *KIR* activadores varía enormemente dentro y entre las poblaciones. Un estudio basado en cuatro poblaciones (caucásicos, hispanos, africanos y asiáticos) con un número total de 759 individuos no relacionados, mostró que alrededor del 10% de su grupo de estudio careció de todos los genes *KIR* activadores, sugiriendo que estos genes no son críticos para la inmunidad humana. Los genotipos sin genes *KIR* activadores, variaron de 7 a 17% en las cuatro poblaciones estudiadas, lo que sugiere que el mantenimiento de genes *KIR*

activadores esta influenciado por la presión del medio ambiente. Tener más genes *KIR* activadores podrían dar ventaja al hospedero en montar una respuesta inmune exitosa a la infección (Du, *et al.*, 2007).

Para el análisis de genotipos, los cuales principalmente distinguen la presencia y ausencia de los genes *KIR* y no los diferentes alelos de cada gen, un total de 22 genotipos *KIR* se obtuvieron en el grupo de individuos asintomáticos, a diferencia de un estudio anterior que detectó sólo once en la misma población mestiza mexicana (Gutiérrez-Rodríguez, *et al.*, 2006). Lo que muestra la amplia diversidad de estos genes, adquirida debido al mestizaje, que caracteriza a nuestra población. Cabe mencionar que dentro de estos genotipos identificados cinco no se encuentran en los genotipos reportados, hasta el momento, en la literatura.

Los genotipos 1, 4, 2 y 8 fueron los más frecuentes en individuos asintomáticos con 40.5, 15.3, 13.5 y 6.3%, respectivamente. Comparados contra frecuencias genotípicas de otras poblaciones (Yawata *et al.* 2002), la frecuencia del genotipo 1 es similar a la población japonesa con 40.6%, mientras que la frecuencia del genotipo 2 se acerca a la caucásica (14.9%). Con respecto al genotipo 4, se han reportado frecuencias de 5.5 a 9.8% y de 0 a 2.4% para el genotipo 8, por lo que no comparten similitud con nuestras frecuencias.

En el grupo de pacientes con gastritis no atrófica se observaron 15 genotipos, de los cuales cinco fueron reportados por Yawata *et al.* Y los diez restantes son combinaciones nuevas. El genotipo 1 fue más frecuente con un 30%, mientras que los genotipos 4 y 2 lo fueron con un 15 y 7.5% respectivamente, como se

observó en el grupo de asintomáticos. En este grupo de pacientes se encontró un genotipo con casi todos los genes (excepto *KIR2DL5*) con una frecuencia de 12.5%.

Un mayor número de genotipos B, se encontraron en los pacientes de cáncer gástrico. Un total de 29 genotipos se identificaron, lo que parece indicar que los genotipos con diversos genes *KIR* activadores, provocan que la célula *NK* sea deficiente para eliminar células tumorales que preceden al cáncer gástrico. La mayoría de los genotipos encontrados en este grupo presentaron frecuencias bajas (2.5%).

Es precisamente en la comparación del genotipo 1, entre los tres grupos que se encontró una asociación de protección al desarrollo de cáncer gástrico, ya que este genotipo fue más frecuente entre los grupos de asintomáticos y de gastritis no atrófica, corroborándose que los genotipos compuestos principalmente de más genes *KIR* activadores no son eficientes para eliminar células transformadas que pueden convertirse a tumorales en el cáncer gástrico. Posiblemente los ligandos, para estos receptores, en las células epiteliales no están expresados.

A diferencia de las células T y B, las células *NK* utilizan una estrategia de reconocimiento basada en múltiples receptores, en la cual una célula *NK* individual puede ser activada a través de varios receptores de forma independiente o en combinación, dependiendo de los ligandos presentados por la célula blanco en un encuentro dado.

11.0 Conclusiones

- El gen *KIR2DL2* mostró asociación positiva en pacientes con cáncer gástrico. Mientras que *KIR2DL3*, se asoció con protección a desarrollar cáncer gástrico, pues fue muy frecuente en los pacientes con gastritis no atrófica y los individuos asintomáticos.
- Los genes *KIR2DS1* y *KIR2DS3*, mostraron asociación positiva a padecer gastritis no atrófica y a desarrollar cáncer gástrico, cuando se compararon sus frecuencias con el grupo asintomático.
- En la población estudiada de individuos asintomáticos a la infección por *H. pylori* se identificaron 22 genotipos *KIR*. El genotipo A tuvo una frecuencia de 40.5%, mientras que el genotipo B, conformado por diversos genotipos, fue el más frecuente con el 59.5%.
- En los pacientes de gastritis no atrófica se determinaron 15 genotipos, que mostraron una similitud con las frecuencias, de individuos asintomáticos, con una frecuencia del 30% para el genotipo A y de 70% para los genotipos B.
- Los pacientes con cáncer gástrico, mostraron genotipos y frecuencias diferentes a las del grupo asintomático y algunas similitudes con las de pacientes de gastritis no atrófica, al obtenerse una frecuencia para el genotipo A del 5% y un total de 29 genotipos.
- El genotipo 1 conformado en su mayoría por genes inhibidores y sólo un activador mostró una asociación de protección a desarrollar cáncer gástrico, ya que se encontró más frecuente en el grupo asintomático y los pacientes con gastritis no

atrófica en comparación a los pacientes con cáncer gástrico, con una frecuencia de genotipos B (activadores) del 95%.

- Nuestros resultados pueden sugerir la participación de los genes para receptores KIR de la célula *NK* en el desarrollo de la enfermedad ocasionada por la infección por *H. pylori*. Si no de forma directa, pueden estimular e interactuar con las células encargadas de la respuesta inmune innata y adaptativa; mediante la producción y secreción de citocinas y quimosinas, así como su función citolítica determinada por el balance de señales que recibe de sus receptores.

12.0 Perspectivas

Las perspectivas para corroborar los resultados de este trabajo radican en estudiar no sólo las frecuencias de los genes *KIR*, si no también los productos de estos genes en la superficie de la célula, estudiar la expresión del receptor KIR y su ligando HLA clase I, conocidos para estos receptores, la presencia del receptor y la ausencia de su ligando o viceversa, mostraría si existe una interacción adecuada o no entre las células *NK* y las células epiteliales del hospedero, con enfermedad causada por *H. pylori*.

Ampliar los grupos de estudio a otros estadios de la enfermedad causada por la infección por *H. pylori*, como gastritis crónica atrófica, metaplasma intestinal, displasia gástrica y úlcera duodenal, para observar las frecuencias de estos genes conforme la progresión de la enfermedad avanza hasta un cáncer gástrico.

Otro aspecto importante en este estudio es el extenso polimorfismo, que presentan no sólo las moléculas HLA de clase I, sino también los genes *KIR*, que sin duda influyen en el resultado de una respuesta inmune eficiente. Por lo que deben estudiarse los polimorfismos que se encuentran en los genes *KIR* del grupo asintomático, de gastritis no atrófica y las diferentes enfermedades que preceden al cáncer gástrico, derivado de la infección por *H. pylori*.

Resultaría muy interesante poder llevar a cabo un estudio similar en otras poblaciones con los problemas de salud derivados de la infección por *H. pylori*, como países en vías de desarrollo y población japonesa con altos índices de cáncer gástrico.

13.0 Bibliografía

- Achtman, M., Azuma, T., Berg, D.E., Ito, Y., Morelli, G., Pan, Z.-J., Suerbaum, S., Thompson, S., van der Ende, A., and van Doorn, L.J. 1999. **Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions.** *Mol. Microbiol.* 32,459-470.
- Alm, R. A., Ling, L. S., Moir, D. T., King, B. L., Brown, E. D., Doig, P. C., Smith, D.R., Noonan, B., Guind, B.C., deJonge, B.L., Carmel, G., Tummino, P.J., Caruso, A., Uria-Nickelsen, M., Mills, D.M., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S.D., Jiang, Q., Taylor, D.E., Vovis, G.F. and Trust, T.J. 1999. **Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*.** *Nature.* 397:176-180.
- Allaker, R.P., Young, K.A., Hardie, J.M., Domizio, P. and Meadows, N.J. 2002. **Prevalence of *Helicobacter pylori* at oral and gastrointestinal sites in children: evidence for possible oral to oral transmission.** *J Med Microbiol.* 51: 312-7.
- Allen, L.A. 2001. **The role of the neutrophil and phagocytosis in infection caused by *Helicobacter pylori*.** *Curr. Opin. Infect. Dis.* 14:273–277.
- Allen, L.A., Schlesinger, L.S. and Kang, B. 2000. **Virulent strains of *Helicobacter pylori* demonstrate delayed phagocytosis and stimulate homotypic phagosome fusion in macrophages.** *J. Exp. Med.* 191:115–128.
- Amieva, M. R., Vogelmann, R., Covacci, A., Tompkins, L.S., Nelson, W.J. and Falkow, S. 2003. **Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA.** *Science.* 300(5624):1430-1434.
- Azuma, T., Konishi, J., Tanaka, Y., Hirai, M., Ito, S., Kato, T. and Kohli Y. 1994. **Contribution of HLA-DQA gene to host's response against *Helicobacter pylori*.** *Lancet.* 343(8896):542-543.
- Azuma, T., Ito, Y., Miyaji, H., Dojyo, M., Tanaka, Y., Iria, M., Ito, S., Kato, T. and Kohli, Y. 1995. **Immunogenetic analysis of the human leucocyte antigen DQA1 locus in patients with duodenal ulcer or chronic atrophic**

gastritis harbouring *Helicobacter pylori*. *Eur. J. Gastroenterol Hepatol.* 7(Suppl.1):71-73.

- 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(6):1013-1018.
- Backhed, F., Rokbi, B., Torstensson, E., Zhao, Y., Nilsson, C., Seguin, D., Normark, S., Buchan, A.M. and Richter-Dahlfors, A. 2003. **Gastric mucosal recognition of *Helicobacter pylori* is independent of Toll-like receptor 4.** *J. Infect. Dis.* 187:829–836.
- Baldari, Cosima T., Lanzavecchia, Antonio and Telford, John L. 2005. **Immune subversion by *Helicobacter pylori*.** *Trends immunol.* 26 (4):199-207.
- Barao, I. and Murphy, W.J. 2003. **The immunobiology of natural killer cells and bone marrow allograft rejection.** *Biol. Blood Marrow. Transplant.* 9(12):727-741.
- Biassoni, R., Pessino, A., Malaspina, A., Cantoni, C., Bottino, C., Sivori, S., Moretta, L. and Moretta, A. 1997. **Role of amino acid position 70 in the binding affinity of p50.1 and p58.1 receptors for HLA.Cw4 molecules.** *Eur. J. Immunol.* 27:3095-3099.
- Biron C.A., Nguyen K.B., Pien G.C., Cousens L.P. and Salazar-Mather T.P. 1999. **Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines.** *Annu. Rev. Immunol.* 17:189–220.
- Blaser, Martin J. 1998. **Helicobacters are indigenous to the human stomach: duodenal ulceration is due to changes in gastric microecology in the modern era.** *Gut.* 43:721-727.
- Camorlinga, M., Torres, J., Perez-Perez, G., Leal-Herrera, Y., Gonzalez-Ortiz, B., Madrazo de la Garza, A., Gomez, A. and Muñoz, O. 1998. **Validation of a serologic test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and the**

immune response to urease and CagA in children. *Am J Gastroenterol.* 93(8):1264-1270.

- Campbell, K., Dessing, M., Lopez-Botet, M., Cella, M. y Colonna, M. 1996. **Tyrosine phosphorylation of a human killer inhibitory receptor recruits protein tyrosine phosphatase 1 C.** *J. Exp. Med.*184:93-100.
- Carrington, M., Wang, S., Martin, M. *et al.* 2005. **Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci.** *J. Exp. Med.* 201:1069–1075.
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree J. E., Ghiara, P., Vorodovsky M., *et al.* 1996. **Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I specific and disease-associated virulence factors.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:14648-14653.
- Chaturvedi, R., Cheng, Y., Asim, M., Bussi re, F.I., Xu, H., Gobert, A.P., Hacker, A., Casero, R.A. Jr. and Wilson, K.T. 2004. **Induction of polyamine oxidase 1 by *Helicobacter pylori* causes macrophage apoptosis by hydrogen peroxide release and mitochondrial membrane depolarization.** *J. Biol. Chem.* 279 (38):40161–40173.
- Christie, P. J. 2001. **Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines.** *Mol. Microbiol.* 40:294-305.
- Colucci, F., Caligiuri, M.A. and Di Santo, J.P. 2003. **What does it take to make a natural killer?** *Nat. Rev. Immunol.* 3:413-425.
- Correa, P. 1992. **Human gastric carcinogenesis: a multi-step and multi-factorial process-first.** *Cancer Res.* 52:6735-6740.
- Covacci, A., Telford, J. L., Del Giudice, Parsonnet J., y Rappuoli R. 1999. ***Helicobacter pylori* virulence and genetic geography.** *Science.* 284:1328-1333.

- Cover, T. Blaser, M. 1999. ***Helicobacter pylori* factors associated with disease.** *Gastroenterology.* 117:257-261.
- Cover, T.L., Berg, D.E., Blaser, M.J., and Mobley, H.L.T. 2001. ***Helicobacter pylori* Pathogenesis.** In Eduardo A. Groisman (ed.), Principles of Bacterial Pathogenesis. Academic Press, San Diego. Pp.510-558.
- Crabtree, J.E., Covacci, A., Farmery, S.M., Xiang, Z., Tompkins, D.S., Perry, S., Lindley, I.J. and Rappuoli, R. 1995. ***Helicobacter pylori* induced interleukin 8 expression in gastric epithelial cell is associated with caga-positive phenotype.** *J. Clin. Pathol.* 48:41-45.
- Cuello, C., López, J., Correa, P., Murray, J., Zarama, G. and Gordillo, G. 1979. **Histopathology of gastric dysplasias: correlations with gastric juice chemistry.** *Am. J. Surg. Pathol.* 3 (6):491-500.
- De Incola Delfín, L., Flores Rodríguez, J. y Zamora Varaona, J. 2007. **Tratamiento nutricional del paciente con cáncer gástrico.** *Cancerología* 2:337-344.
- Drumm, B., Perez-Perez, G.I., Blaser, M.J. and Sherman, P.M. 1990. **Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection.** *N Engl J Med.* 322:359-363.
- Du, Z., Gjerdtson, D.W., Reed, E.F. and Rajalingam, R. 2007. **Receptor-ligand analyses define minimal killer cell Ig-like receptor (KIR) in humans.** *Immunogenetics.* 59:1–15.
- Dubreuil, J. D., Giudice, G. D., and Rappuoli, R. 2002. ***Helicobacter pylori* interactions with host serum and extracellular matrix proteins: potential role in the infectious process.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:617-629.
- Falush, D., Wirth, T., Linz, B., Pritchard, J.K., Stephens, M., Kidd, M., Blaser, M.J., Graham, D.Y., Vacher, S., Perez-Perez, G.I., Yamaoka, Y., Megraud, F., Otto, K., Reichard, U., Katzowitsch, E., Wang, X., Achtman, M., and Suerbaum, S. 2003. **Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations.** *Science.* 299:1582-1585.

- Ferlay J, Bray P, Parkin DM. Globocan. 2000. **Cancer incidence mortality and prevalence worldwide**, Version 1.0 IARC Cancer Base No. 5. Lyon, IARC Press.
- Ferrero, R.L. 2005. **Innate immune recognition of the extracellular mucosal pathogen, *Helicobacter pylori***. *Mol. Immunol.* 42:879-885.
- Fox, J.G. and Wang, T.C. 2007. **Inflammation, atrophy, and gastric cancer**. *J. Clin. Invest.* 117:60-69.
- Frenck RW Jr., and Clemens J. 2003. ***Helicobacter* in the developing world**. *Microbes Infect* 5:705-713.
- Gerrits M.M., van Vliet A.H.M., Kuipers E., and Kusters J.G. 2006. ***Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications**. *Lancet Infect Dis.* 6:699-709.
- Go, M.F. 2002. **Natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection**. *Aliment Pharmacol Ther.* 16 (1):3-15.
- Gómez-Lozano, N., Gardiner, C.M., Parham, P., Vilches, C., 2002. **Some humans KIR haplotypes contain two KIR2DL5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B**. *Immunogenetics.* 54:314-319.
- Gómez-Lozano, N. and Vilches, C. 2002. **Genotyping of human killer-cell immunoglobulin-like receptor genes by polymerase chain reaction with sequence-specific primers: an update**. *Tiss. Antigens.* 59:184-193.
- Gutierrez-Rodríguez, M.E., Sandoval-Ramírez, L., Díaz-Flores, M., Marsh, S.G.E., Valladares-Salgado, A., Madrigal, J.A., Mejía-Arangure, J.M., García, C.A., Huerta-Zepeda, A., Ibarra-Cortés B., Ortega-Camarillo, C. and Cruz M. 2006. **KIR gene in ethnic and Mestizo populations from Mexico**. *Hum. Immunol.* 67:85-93.
- Hafsi N, Voland P, Schwendy S, Rad R, Reindl W, Gerhard M, et al. 2004. **Human dendritic cells respond to *Helicobacter pylori*, promoting NK cell and Th1-effector responses in vitro**. *J. Immunol.* 173:1249–1257.

- Hansson, L.E., Nyrén, O., Hsing, A.W., Bergström, R., Josefsson, S., Chow, W.H., Fraumeni, J.F. Jr. and Adami HO. 1996. **The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease.** *N. Engl. J. Med.* 335 (4):242–249.
- Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M. and Hatakeyama, M. 2002. **SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein.** *Science.* 295 (5555):683-686.
- Hsu, Katharine C., Chida, Shohei, Geraghty, Daniel E., Dupont Bo, 2002a. **The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism.** *Immunol. Rev.* 190:40-52.
- Hsu, K.C., Liu, X.R., Selvakumar, A., Mickelson E., O'Reilly, R.J. and Dupont B. 2002b. **Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets.** *J. Immunol.* 169:5118-5129.
- International Agency for Research on Cancer Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 1994. ***Helicobacter pylori*.** In: **Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori* views and expert opinions of an IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans.** *Lyon: IARC.* 61:177-240.
- Kersulyte, D., Mukhopadhyay, A.K., Velapatino, B., Su, W., Pan, Z., Garcia, C., Hernandez, V., Valdez, Y., Mistry, R.S., Gilman, R.H., Yuan, Y., Gao, H., Alarcon, T., Lopez-Brea, M., Balakrish, N.G., Chowdhury, A., Datta, S., Shirai, M., Nakazawa, T., Ally, R., Segal, I., Wong, B.C., Lam, S.K., Olfat, F.O., Boren, T., Engstrand, L., Torres, O., Schneider, R., Thomas, J.E., Czinn, S., and Berg, D.E. 2000. **Differences in genotypes of *Helicobacter pylori* from different human populations.** *J. Bacteriol.* 182:3210-3218.
- Khakoo, S.I., Rajalingam, R., Shum, B.P., Weidenbach, K., Flodin, L., Muir, D.G., Canavez, F., Cooper, S.L., Valiante, N.M., Lanier, L.L., and Parham, P. 2000. **Rapid evolution of NK cell receptor systems demonstrated by comparison of chimpanzees and humans.** *Immunity.* 12:687-698.

- Khakoo, S.I., Thio, C.L., Martin, M.P., Brooks, C.R., Gao, X., Astemborski, J., Cheng, J., Goedert, J.J., Vlahov, D., Hilgartner, M., Cox, S., Little, A.M., Alexander, G.J., Cramp, M.E., O'Brien, S.J., Rosenberg, W.M., Thomas, D.L. and Carrington, M. **HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection.** *Science*. 305:872–874.
- Khakoo, S.I. and Carrington M. 2006. **KIR and disease: a model system or system of models?** *Immunol. Rev.* 214:186-201.
- Khong H.T. and Restifo N.P. 2002. **Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes,** *Nat. Immunol.* 3:999–1005.
- Kikuchi-Maki, A., Yusa, S., Catina, T.L. and Campbell, K.S. 2003. **KIR2DL4 is an IL-2-regulated NK cell receptor that exhibits limited expression in humans but triggers strong IFN- γ production.** *J. Immunol.* 171:3415-3425.
- Lanier, L. L. 1998. **NK cell receptors.** *Ann. Rev. Immunol.* 16:359-393.
- Lauren, P. 1965. **The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification.** *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 64:31-49.
- Lee, J.E., Lowy, A.M., Thompson W.A., Lu, M., Loflin, P.T., Skibber, J.M., Evans, D.B., Curley S.A., Mansfield, P.F. and Reveille, J.D. 1996. **Association of gastric adenocarcinoma with the HLA class II gene *DQB1*0301*.** *Gastroenterology.* 111 (2):426-432.
- Levi, M. and ten Cate, H. 1999. **Disseminated intravascular coagulation.** *N Engl. J. Med.* 341:586-592.
- Linz, B., Balloux, F., Moodley, Y., Manica, A., Liu, H., Roumagnac, P., Falush, D., Stamer, C., Prugnolle, F., Van Der Merwe, S.W., Yamaoka, Y., Graham, D.Y., Perez-Trallero, E., Wadstrom, T., Suerbaum, S., and Achtman, M. 2007. **An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*.** *Nature.* 445:915-918.

- Logan, R.P., Walker, M.M. 2001. **ABC of the upper gastrointestinal tract: epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection.** *Br Med J*; 323:920-922.
- Long, E.O. 1999. **Regulation of immune responses through inhibitory receptors.** *Ann. Rev. Immunol.* 17:875-904.
- López-Botet, M. and Bellón, T. 1999. **Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I.** *Curr. Opin. Immunol.* 11:301-307.
- Lopez-Vazquez, A., Mina-Blanco, A., Martinez-Borra, J., Njobvu, P.D., Suárez-Alvarez, B., Blanco-Gelaz, M.A., González, S., Rodrigo, L. and López-Larrea C. 2005. **Interaction between KIR3DL1 and HLA-B*57 supertype alleles influence the progression of HIV-1 infection in a Zambian population.** *Hum. Immunol.* 66 (3):285–289.
- 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.
- Marcus, E. A., and Scott, D.R. 2001. **Cell lysis is responsible for the appearance of extracellular urease in *Helicobacter pylori*.** *Helicobacter.* 6:93-99.
- Marsh, S.G.E., Parham, P., Dupont, B., Geraghty, D.E., Trowsdale, J., Middleton, D., Vilches, C., Carrington, M., Witt, C., Guethlein L.A., Shilling H., Garcia, C.A., Hsu K C. and Wain H. 2003. **Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR) nomenclature report, 2002.** *J. Imm. Met.* 281:1-8.
- Marshall B.J., Armstrong J.A., McGeachie D.B. and Glancy R.J. 1985. **Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*.** *Med. J. Aust.* 142:436-439.
- Martín, A.M., Freitas, E.M., Witt C.S. and Christiansen, F.T. 2000. **The genomic organization and evolution of the Natural Killer Immunoglobulin-like Receptor (KIR) gene cluster.** *Immunogenetics.* 51:268-280.

- Martin, M., Gao, X. and Lee, J.H. 2002a. **Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS.** *Nat. Genet.* 31:429–34.
- Martin, M.P., Nelson, G., Lee, J.H., Pellett, F., Gao, X., Wade, J., Wilson, M.J., Trowsdale, J., Gladman, D. and Carrington, M. 2002b. **Cutting edge: susceptibility to psoriatic arthritis: influence of activating killer Ig-like receptor genes in the absence of specific HLA-C alleles.** *J. Immunol.* 169 (6):2818–2822.
- Matthews, D.E. and Farewell, V. 1985. **Using and understanding medical statistics.** *S. Karger.* New York. p.39.
- Miller, S.A., Dykes, K.K. and Plesky, H.F. 1988. **A single salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell.** *Nucleic Acid Res.* 16 (3):1215.
- McNulty, C. A. 1999. **The discovery of *Campylobacter*-like organisms.** *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 241:1-9.
- Montecucco, C. y Rappuoli, R. 2001. **Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach.** *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2:457-466.
- Moretta, A. 2002. **Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues.** *Nat. Rev. Immunol.* 2:957-963.
- Moretta, L. and Moretta, A. 2004. **Killer immunoglobulin-like receptors.** *Curr. Opin. Immunol.* 16:626-633.
- Necchi, V., Candusso, M.E., Tava, F., Luinetti, O., Ventura, U., Fiocca, R., Ricci, V. and Solcia, E. 2007. **Intracellular, intercellular, and stromal invasion of gastric mucosa, preneoplastic lesions, and cancer by *Helicobacter pylori*.** *Gastroenterology.* 132 (3):1009–1023.
- Nelson, G.W., Martin, M.P., Galdman, D., Wade, J., Trowsdale, J. and Carrington, M. 2004. **Cutting edge: heterozygote advantage in automimmune disease: hierarchy of protection/ susceptibility conferred**

by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. *J. Immunol.* 173 (7):4273–4276.

- Oderda G. 1999. **Transmission of *Helicobacter pylori* infection.** *Can. J. Gastroenterol.* 13:595-597.
- O'Toole, P. W., Lane, M. C., and Porwollik S. 2000. ***Helicobacter pylori* motility.** *Microbes Infec.* 2:1207-1214.
- Palli, D., Caporaso, N.E., Shiao, Y.H., Saieva, C., Amorosi, A., Masala, G., Rice, J.M. and Fraumeni, J.F. Jr. 1997. **Diet, *Helicobacter pylori*, and p53 mutation in gastric cancer: a molecular epidemiology study in Italy.** *Cancer Epidemio. I Biomarkers Prev.* 6 (12):1065-1069.
- Parkin, D.M., Pisani, P., and Ferlay, J. 1999. **Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990.** *Int. J. Cancer.* 80:827-841.
- Peek Richard M., Blaser Martin J. 1999. ***Helicobacter pylori*: patogenesis of a "slow" bacterial infection.** From: Mechanism of Microbial Disease. Third edition. *Lippincott Williams & Wilkin* USA.
- Raulet, D.H., Vance, R.E., McMahon, C.W. 2001. **Regulation of the natural killer cell receptor repertoire.** *Ann. Rev. Immunol.* 19:291-330.
- Remaut Han y Waksman Gabriel. 2004. **Structural biology of bacterial pathogenesis.** *Curr. Op. Struc. Biol.* 14:161–170.
- Reytrat, J.M., Pelicic, V., Papini, E., Montecuccio, C., Rappuoli, R. and Telford, J.L. 1999. **Towards deciphering the *Helicobacter pylori* cytotoxin.** *Mol. Microbiol.* 34(2):197-204.
- Rothenbacher, D., Bode, G., Berg, G., Knayer, U., Gonser, T., Adler, G. and Brenner, H. 1999. ***Helicobacter pylori* among preschool children and their parents: evidence of parent-child transmission.** *J. Infect. Dis.* 179:398-402.

- Rothenbacher D. and Brenner H. 2003. **Burden of *Helicobacter pylori* and *H pylori*-related diseases in developed countries: recent developments and future implications.** *Microbes infect.* 5:693-703.
- Santos, A.C., Yamaoka, Y., Graham, D.Y. and Sepulveda, A. R. 1999. **Variability in the interpretation of microsatellite patterns with different electrophoretic conditions.** *Mol. Pathol.* 52(5):302-304.
- Sambrook, J.G., Bashirova, A., Adersen, H., Piatak, M., Vernikos, G.S., Coggill, P., Lifson, J.D., Carrington, M. and Beck, S. 2006. **Identification of the ancestral killer immunoglobulin-like receptor gene in primates.** *BMC Genomics.* 7:209.
- Sambrook, J.G. and Beck S. 2007. **Evolutionary vignettes of natural killer cell receptors.** *Curr. Opin. Immunol.* 19:553-560.
- Sleisenger Marvin H. y Fordtran, John S. 1997. **Enfermedades gastrointestinales "fisiopatología, diagnóstico y tratamiento".** 5ª Edición. Ed. *Panamericana.* Buenos Aires Argentina. Pp 563-565.
- Su, B., Ceponis, P.J., Lebel, S., Huynh, H. and Sherman, P.M. 2003. ***Helicobacter pylori* activates Toll-like receptor 4 expression in gastrointestinal epithelial cells.** *Infect. Immun.* 71:3496–3502.
- Suerbaum, S. and Michetti, P. 2002. ***Helicobacter pylori* infection.** *N. Engl. J. Med.* 347:1175-1186.
- Tay C.H., Szomolanyi-Tsuda E. and Welsh R.M. 1998. **Control of infections by NK cells.** *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 230:193–220.
- Taylor, D., and Parsonnet, J. 1995. **Infections of the gastrointestinal tract.** In *infections of the gastrointestinal tract.* M.J. Blaser, P. Smith, J. Ravdin, H. Green-berg, and R. Guerrant, editors. *Raven Press.* New York, NY. USA. 551-563.
- Tombola, F., Carlesso, C., Szabo, I., De Bernard, M., Reytrat, J. M., Telford, J. L., Rappuoli, R., Montecucco, C., Papini, E. and Zoratti, M. 1999. ***Helicobacter***

***pylori* vacuolating toxin forms anion-selective channels in planar lipid bilayers: Possible implications for the mechanism of cellular vacuolation.** *Biophys. J.* 76(3):1401-1409.

- Torres, J., Pérez-Pérez, G.I., Leal-Herrera, Y. and Muñoz, O. 1998. **Infection with CagA+ *Helicobacter pylori* strains as a possible predictor of risk in the development of gastric adenocarcinoma in México.** *Int. J. Cancer.* 78(3):298-300.
- Trinchieri, G. 1989. **Biology of natural killer cell.** *Adv. Immunol.* 47:187.
- Uhrberg, M., Valiante, N.M., Shum, B.P., Shilling, H.G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., Tyan, D., Lanier, L.L. and Parham, P. 1997. **Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes.** *Immunity.* (6):753-763.
- Verheyden, S. and Demanet, C. 2006. **Susceptibility to myeloid and lymphoid leukemia is mediated by distinct inhibitory KIR–HLA ligand interactions.** *Leukemia.* 20:1437–1438.
- Versalovic J. and Fox J. G. 2001. **Taxonomy and phylogeny of *Helicobacter pylori*.** From: ***Helicobacter pylori*: Molecular and Cellular Biology.** *Horizon Scientific Press.* Wymondham, UK Pp 15-28.
- Vilches, C. and Parham, P. 2002. **KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity.** *Ann. Rev. Immunol.* 20:217-251.
- Warren J.R., and Marshall B.J. 1983. **Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis.** *Lancet,* 1:1273-1275.
- Wilson, M.J., Torkar, M. and Trowsdale, J. 1997. **Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene.** *Tiss. Antigens.* 49:574-579.
- Wilson, M.J., Torkar, M., Haude, A., Milne, S., Jones, T., Sheer, D., Beck, S. and Trowsdale, J. 2000. **Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97:4778-4783.
- Yawata, M., Yawata N., Abi-Rached, L., and Parham, P. 2002a. **Variation within the human killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene family.** *Crit. Rev. Immunol.* 22:463.

- Yawata, M., Yawata, N., McQueen, K.L., Cheng, N.W., Guethlein, L.A., Rajalingam, R., Shilling, H.G. and Parham, P. 2002b. **Predominance of group A KIR haplotypes in Japanese associated with diverse NK cell repertoires of KIR expression.** *Immunogenetics* 54:543–550.
- Yen, J.H., Moore, B.E., Nakajima, T., Scholl, D., Schaid, D.J., Weyand, C.M. and Goronzy, J.J. 2001. **Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis.** *J. Exp. Med.* 193 (10):1159–1167.
- Yokoyama, W.M., Kim, S. and French, A.R. 2004. **The dynamic life of natural killer cells.** *Annu. Rev. Immunol.* 22:405–429.
- Yoshitake, S., Okada, M., Kimura, A. and Sasazuki, T. 1999. **Contribution of major histocompatibility complex genes to susceptibility and resistance in *Helicobacter pylori* related diseases.** *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 11(8):875-880.
- Yun, C., Lundgren, A., Azem, J., Sjoling, A., Holmgren, J., Svennerholm, A. M. and Lundin, B.S. 2005. **Natural killer cells and *Helicobacter pylori* infection: bacterial antigens and interleukin-12 act synergistically to induce gamma interferon production.** *Infect. Immun.* 73 (3):1482-1490.