

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado en Biología Experimental

**ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES DE LOS
RECEPTORES TIPO TOLL 2, 4, 5 Y 9 Y SU ASOCIACIÓN CON
ENFERMEDADES CAUSADAS POR *Helicobacter pylori* EN DOS
POBLACIONES LATINOAMERICANAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

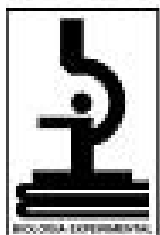
BIOL.EXP. PAULINA HERNÁNDEZ SANCÉN

Comité Tutorial:

Dra. Ma. Del Carmen Maldonado Bernal

Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz

Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez



México, D.F. Abril de 2010.

Con la aprobación de los miembros del Comité Tutorial

Co-Director Externo:

Dra. Ma. del Carmen Maldonado Bernal

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional SXXI, IMSS.

Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, Hospital Infantil de México “Federico Gómez”

cmaldobe@yahoo.com

Co-Director Interno:

Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz

Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana

mcgr@xanum.uam.mx

Asesor:

Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez

Profesor titular C, Escuela Superior de Medicina. IPN.

División en Medicina Genómica, Subdirección de Enseñanza e Investigación, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE

rmcoralv@gmail.com

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la Co-Dirección de la Dra. María del Carmen Maldonado Bernal y la Co-Dirección de la Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz y la Asesoría del Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez.

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, con número de registro 309-0, pertenece al Posgrado en Biología Experimental y forma parte de los programas de PIFOP-CONACYT con clave C/PFPN-2002-35-32.

Durante el transcurso de la Maestría en Biología Experimental, recibí una beca otorgada por el CONACyT con número de registro 230573 en el periodo comprendido de Septiembre del 2007 a Septiembre del 2009.

Los miembros del jurado designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: “**ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES DE LOS RECEPTORES TIPO TOLL 2, 4, 5 Y 9 Y SU ASOCIACIÓN CON ENFERMEDADES CAUSADAS POR *Helicobacter pylori* EN DOS POBLACIONES LATINOAMERICANAS**”, con fecha de examen: 8 de Abril de 2010.

PRESIDENTE

Dr. Rubén Darío Martínez Pérez.
Profesor Titula. Departamento de
Medicina Experimental. Facultad de
Medicina, UNAM

SECRETARIO

Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez.
Profesor titular C, Escuela Superior de
Medicina. IPN.
División en Medicina Genómica,
Subdirección de Enseñanza e
Investigación, CMN 20 de Noviembre,
ISSSTE

VOCAL

Dra. Mina Konigsberg Fainstein.
Profesor Titular. Departamento
Ciencias de la Salud. Universidad
Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

VOCAL

M. en BE. Joaquín Fernando Herrera Muñoz.
Departamento Ciencias de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana.
Unidad Iztapalapa

DEDICATORIA

A mis padres Celia y Cirilo por darme el regalo de la vida, por apoyarme en cada uno de mis días, ya fueran fáciles o difíciles, por enseñarme a no dejarme vencer y ser una mejor persona día con día, por ser mi ejemplo a seguir.... Los amo con todo el corazón.

Carlos, el amor de mi vida, gracias por recordarme la existencia del mundo de lo posible, por las miradas, las palabras, por creer en mí, por siempre estar dispuesto a escucharme, por darme tanto amor y amarme tal cual soy.... Te amo

Octavio e Iván, gracias por ser mis hermanos, por hacerme sentir su apoyo, por compartir momentos importantes para mí, por formar parte de mis días; de mi vida....Los amo

A quienes ya no están conmigo, mi abuelito Ramón; gracias por darme una madre tan única y mi abuelita Chepa: gracias por darme un padre tan maravillo.... Los extraño.

A mi abuelita Teresa, gracias por enseñarme a no darme por vencida, a luchar por mis sueños, a ser fuerte; a no dejarme vencer.... Te quiero

Meche, gracias por ser mi amiga, mi hermana, mi cómplice, por compartir, por reír, por llorar, por enseñar.... Te quiero mensa.

Vare, Ale, Angie... Gracias por compartir tantos momentos, por apoyarme durante esta etapa de mi vida, por sus consejos, por las risas; por ser mis amigas.... Las quiero

Claudia, Hilda y Haydé... Gracias por dejarme formar parte del grupo, por esta amistad que crece día a día, por apoyarme, aconsejarme y siempre tener unos oídos que pudieran escucharme... Las quiero.

A los ojos del cielo que me cuidan y permiten vivir cada día.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Carmen Maldonado por dejarme formar parte de su grupo de trabajo, apoyarme en el ámbito profesional, por guiarme durante mi formación y por darme la oportunidad de terminar una etapa más en mi vida.

A la Dra. Concepción Gutiérrez por apoyarme a lo largo de la maestría y enseñarme como enfrentar los problemas que se me presentaron a lo largo de la realización de este trabajo.

Al Dr. Ramón Coral por los conocimientos y experiencias compartidos que me ayudaron para que este trabajo saliera adelante.

Al Dr. Javier Torres por permitirme formar parte de su equipo, por recibirme en su laboratorio y ayudarme en la realización de este trabajo.

A mi amiga Norma Pernas por compartir conmigo sus conocimientos, por ayudarme cuando me encontraba en aprietos y por hacer mi estancia en el laboratorio mucho más agradable.

A la UAM-Iztapalapa por proporcionarme los conocimientos necesarios para la realización de la tesis.

ABREVIATURAS

| | |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Hp</i> | <i>Helicobacter pylori</i> |
| CagPAI | Isla de Patogenicidad cag |
| CagA | Cytotoxin associated gene A. Citotoxina asociada al gen A |
| VacA | Vacuolating cytotoxin A. Citotoxina vacuolizante A |
| s | Secuencia señal |
| m | Región media |
| IL | Interleucina |
| TNF- α | Tumor necrosis factor-alpha. Factor de necrosis tumoral-alfa |
| IFN | Interferon |
| MHC-II | Major histocompatibility complex-II. Complejo principal de histocompatibilidad-II |
| PRRs | Patogen recognition receptors. Receptores de reconocimiento patrón |
| TLRs | Toll like receptors. Receptores tipo Toll |
| LRR | Leucin rich repeats. Repeticiones ricas en leucina |
| IRAK | IL-1 receptor associated-kinase. Cinasa asociada a receptor de IL-1 |
| NF- κ B | Nuclear factor kappa B. Factor nuclear kappa B |
| IRF | INF regulator factor. Factor regulador de INF |
| AP-1 | Activated protein-1. Proteína activadora-1 |
| VEGF | Vascular endotelial growth factor. Factor de crecimiento endotelial vascular |
| MyD88 | Myeloid differentiation factor-88. Factor de diferenciación mieloide-88 |
| TRIF | Toll/IL-1 receptro (TIR)-domain-containing adaptor inducing IFN-beta. Adaptador inductor de IFN-beta con dominio TIR. |
| PAMP | Pathogen-associated molecular pattern. Patron molecular asociado a patógeno |
| NK | Natural killer. Célula asesina natural |
| Treg | Células T reguladoras |
| aa | Aminoácido |
| D | Ácido aspártico |
| G | Glicina |
| T | Treonina |
| I | Isoleucina |
| R | Gultamina |
| Q | Arginina |
| W | Triptofano |
| N | Asparagina |
| S | Serina |
| C | Citocina |
| T | Timina |
| A | Adenina |
| G | Guanina |
| LPS | Lipopolysacharide. Lipopolisacárido |
| MALT | Mucose-associated lymphoid tissue. Tejido Linfoide Asociado a Mucosa |

RESUMEN

Helicobacter pylori (*Hp*) es un bacilo Gram negativo que infecta al 80% de la población mundial. La infección por *Hp* activa la respuesta inmune tanto innata como adaptativa y está asociada con diferentes patologías gastroduodenales. Sin embargo, solo el 30% de la población desarrolla alguna de las patologías. Los receptores tipo toll (TLRs) son receptores de la respuesta inmune innata capaces de reconocer a *Hp* y en consecuencia activarse e inducir una serie de señales intracelulares que producen la activación de genes inflamatorios como IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-8. Los polimorfismos del gen *TLR4* D299G y T399I y R753Q en *TLR2* se han asociado con un mayor riesgo a desarrollar infecciones. En *TLR5* se han descrito polimorfismos en el aa Arg392 que genera un codón de paro y el N592S se han asociado a un mayor riesgo de infección y una predisposición a desarrollar enfermedades autoinmunes. El polimorfismo en la región promotora del gen de *TLR9* -1237T/C también se ha asociado con enfermedades autoinmunes así como a enfermedades gastroduodenales. Debido a que estos estudios se han realizado en población caucásica y no se conocen las variaciones polimórficas en población latinoamericana, el objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia de estos polimorfismos en dos poblaciones latinoamericanas y su posible asociación a las patologías causadas por *Hp*.

Mediante discriminación alélica por PCR-tiempo real se determinó la presencia de los polimorfismos mencionados en muestras de población paraguaya y colombiana. Los pacientes se agruparon de acuerdo al diagnóstico clínico en: gastritis no atrófica, gastritis atrófica, metaplasia, cáncer y úlcera duodenal, tomando como grupo control a los pacientes con gastritis no atrófica. En ninguna de las dos poblaciones estudiadas, se encontró diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia de los polimorfismos de *TLRs* 2, 4 y 5 y tampoco asociación con las patologías estudiadas. Sin embargo, se observó un incremento de la frecuencia del polimorfismo -1237T/C en *TLR9* en la población paraguaya teniendo una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.04$) en el grupo de úlcera duodenal con un OR de 3.7. Estos resultados sugieren que el polimorfismo -1237T/C en *TLR9* es un factor de riesgo para desarrollar úlcera duodenal en población paraguaya y sería necesario aumentar el número de muestras de pacientes colombianos para saber si el polimorfismo se comporta de igual manera en esta población.

ABSTRACT

Helicobacter pylori (*Hp*) is a Gram negative bacillus that infects 80% of the world population. *Hp* infection activates both the innate and the adaptive immune response and is associated with different gastroduodenal diseases. However, only 30% of the infected population develops some of the associated pathology. Toll-like receptors (TLRs) are receptors of the innate immune system that are able to recognize *Hp* and activate and induce intracellular signals that in turn activates inflammatory genes like IL-1, TNF- α , IL-6 and IL-8. Polymorphisms D299G and T399I in *TLR4* and R753Q in *TLR2* have been associated with an increased risk of developing infections. Similarly, Arg392stop and N592S in *TLR5* are associated with an increased risk of infection and a predisposition to develop autoimmune diseases. The polymorphism in the promoter region of *TLR9* gene -1237T/C has also been associated with autoimmune diseases as well as gastroduodenal diseases. Because these studies have been conducted in Caucasians and don't know polymorphic variations in Latin American population, the objective of these study was to evaluate the presence of these polymorphisms in two Latin American populations and their association to pathologies caused by *Hp*.

Real-time PCR was used to determine allelic discrimination between the polymorphisms above mentioned in samples of a Paraguayan and Colombian population. Patients were grouped according to the clinical diagnosis: non-atrophic gastritis, atrophic gastritis, metaplasia, cancer and duodenal ulcer; taking as a control group patients with non-atrophic gastritis. We found that neither of the two populations studied had statistically significant differences in the frequency of polymorphisms in *TLR 2, 4* and *5* nor association with the pathologies studied. However, we observed an increase in the frequency of the *TLR9* -1237T/C polymorphism in the Paraguayan population with a statistically significant difference ($p=0.04$) in the group of duodenal ulcer with an OR of 3.7. These results suggest that the -1237T/C polymorphism in *TLR9* is a risk factor for developing duodenal ulcer in the Paraguayan population and would require a larger number of samples to conclude whether such polymorphism is similarly important in Colombians.

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

| | | |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Figura 1 | Micrografía electrónica de transmisión de <i>Helicobacter pylori</i> .. | 1 |
| Figura 2 | Factores de colonización de <i>Helicobacter pylori</i> | 2 |
| Figura 3 | Estructura de la superfamilia IL-1R/TLRs..... | 5 |
| Figura 4 | Familia de TLRs y sus ligandos..... | 5 |
| Figura 5 | Vía de señalización de TLRs..... | 6 |
| Figura 6 | Asociación genética entre TLRs y la susceptibilidad a infecciones y enfermedades inflamatorias..... | 9 |
| Tabla 1 | Secuencia de iniciadores y sondas específicas para cada polimorfismo..... | 19 |
| Tabla 2 | Distribución de las variantes alélicas en <i>TLR2/R753Q</i> Paraguay... | 22 |
| Tabla 3 y Figura 7 | Distribución de las variantes alélicas y porcentaje de la frecuencia genotípica de <i>TLR4/D299G</i> | 23, 24 |
| Tabla 4 y Figura 8 | Distribución de las variantes alélicas y porcentaje de la frecuencia genotípica de <i>TLR4/T399I</i> | 25, 26 |
| Tabla 5 y Figura 9 | Distribución de las variantes alélicas y porcentaje de la frecuencia genotípica de <i>TLR5/392^{STOP}</i> | 27, 28 |
| Tabla 6 y Figura 10 | Distribución de las variantes alélicas y porcentaje de la frecuencia genotípica de <i>TLR5/N592S</i> | 29, 30 |
| Tabla 7 y Figura 11 | Distribución de las variantes alélicas y porcentaje de la frecuencia genotípica de <i>TLR9/-1237T/C</i> | 31, 32 |
| Tabla 8 | Distribución de las variantes alélicas en <i>TLR2/R753Q</i> en muestras de Colombia..... | 33 |
| Tabla 9 y Figura 12 | Distribución de las variantes alélicas y porcentaje de la frecuencia genotípica de <i>TLR4/D299G</i> | 35, 36 |
| Tabla 10 y Figura 13 | Distribución de las variantes alélicas y porcentaje de la frecuencia genotípica de <i>TLR4/T399I</i> | 37, 38 |
| Tabla 11 y Figura 14 | Distribución de las variantes alélicas y porcentaje de la frecuencia genotípica de <i>TLR5/392^{STOP}</i> | 39, 40 |
| Tabla 12 | Distribución de las variantes alélicas de <i>TLR5/N592S</i> | 41 |
| Tabla 13 y Figura 15 | Distribución de las variantes alélicas y porcentaje de la frecuencia genotípica de <i>TLR9/-1237T/C</i> | 43, 44 |

| ÍNDICE | PÁGINA |
|------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 1. INTRODUCCIÓN | |
| 1.1 <i>Helicobacter pylori</i> | 1 |
| 1.2 Reconocimiento de agentes infecciosos y respuesta inflamatoria..... | 4 |
| 1.3 Polimorfismos de TLRs..... | 7 |
| 1.4 <i>Helicobacter pylori</i> y TLRs..... | 10 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 13 |
| 3. OBJETIVOS | |
| 3.1 Objetivo General..... | 14 |
| 3.2 Objetivos Particulares..... | 14 |
| 4. HIPÓTESIS | 14 |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS | |
| 5.1 Diseño del estudio..... | 15 |
| 5.2 Lugar de estudio..... | 15 |
| 5.3 Sujetos de estudio..... | 15 |
| 5.3.1 Criterios generales de selección..... | 15 |
| 5.3.1.1 Criterios de inclusión..... | 16 |
| 5.3.1.2 Criterios de no inclusión..... | 16 |
| 5.4 Definición de infección por <i>Helicobacter pylori</i> | 17 |
| 5.4.1 Serología. Anticuerpos contra extracto total de cagA..... | 17 |
| 5.4.2 Histología. Lesiones gástricas..... | 17 |
| 5.4.3 Cultivo..... | 17 |
| 5.5 Tamaño de muestra..... | 17 |
| 5.6 Tipo de muestra..... | 17 |
| 5.7 Extracción de DNA por la técnica de precipitación con sales (Salting-Out)..... | 18 |
| 5.8 Determinación del polimorfismo de TLRs por análisis de | |

| | |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| discriminación Alélica..... | 18 |
| 5.9 Análisis estadístico..... | 20 |
| 6. RESULTADOS | |
| 6.1 Paraguay | |
| 6.1.1 Polimorfismo <i>TLR2/R753Q</i> | 21 |
| 6.1.2 Polimorfismo <i>TLR4/D299G</i> | 22 |
| 6.1.3 Polimorfismo <i>TLR4/T399I</i> | 24 |
| 6.1.4 Polimorfismo <i>TRL5/392^{STOP}</i> | 26 |
| 6.1.5 Polimorfismo <i>TLR5/N592S</i> | 28 |
| 6.1.6 Polimorfismo <i>TLR9/-1237 T/C</i> | 30 |
| 6.2 Colombia | |
| 6.2.1 Polimorfismo <i>TLR2/R753Q</i> | 32 |
| 6.2.2 Polimorfismo <i>TLR4/D299G</i> | 33 |
| 6.2.3 Polimorfismo <i>TLR4/T399I</i> | 36 |
| 6.2.4 Polimorfismo <i>TRL5/392^{STOP}</i> | 38 |
| 6.2.5 Polimorfismo <i>TLR5/N592S</i> | 40 |
| 6.2.6 Polimorfismo <i>TLR9/-1237 T/C</i> | 41 |
| 7. DISCUSIÓN | |
| 7.1 Polimorfismo <i>TLR2/R753Q</i> | 46 |
| 7.2 Polimorfismo <i>TLR4/D299G</i> y <i>T399I</i> | 46 |
| 7.3 Polimorfismo <i>TLR5/392^{STOP}</i> y <i>N596S</i> | 47 |
| 7.4 Polimorfismo <i>TLR9/-1237 T/C</i> | 49 |
| 8. CONCLUSIONES | 51 |
| 9. PERSPECTIVAS | 52 |
| 10. BIBLIOGRAFIA | 53 |

Con la aprobación de los miembros del Comité Tutorial

Co- Director Externo:

Dra. Ma. del Carmen Maldonado Bernal

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional SXXI, IMSS.

Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, Hospital Infantil de México “Federico Gómez”

cmaldobe@yahoo.com

Co-Director Interno:

Dra. Ma. Concepción Gutiérrez Ruiz

Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana

mcgr@xanum.uam.mx

Asesor:

Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez

Profesor titular C, Escuela Superior de Medicina. IPN.
División en Medicina Genómica, Subdirección de Enseñanza e Investigación,
Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE

rmcoralv@gmail.com

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la Co-Dirección de la Dra. María del Carmen Maldonado Bernal y la Co-Dirección de la Dra. María Concepción Gutiérrez Ruiz y la Asesoría del Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez.

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, con número de registro 309-0, pertenece al Posgrado en Biología Experimental y forma parte de los programas de PIFOP-CONACYT con clave C/PFPN-2002-35-32.

Durante el transcurso de la Maestría en Biología Experimental, recibí una beca otorgada por el CONACyT con número de registro 230573 en el periodo comprendido de Septiembre del 2007 a Septiembre del 2009.

Los miembros del jurado designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: “**ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES DE LOS RECEPTORES TIPO TOLL 2, 4, 5 Y 9 Y SU ASOCIACIÓN CON ENFERMEDADES CAUSADAS POR *Helicobacter pylori* EN DOS POBLACIONES LATINOAMÉRICANAS**”, con fecha de examen: 8 de Abril de 2010.

PRESIDENTE

Dr. Rubén Darío Martínez Pérez.
Profesor Titula. Departamento de
Medicina Experimental. Facultad de
Medicina, UNAM

SECRETARIO

Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez.
Profesor titular C, Escuela Superior de
Medicina. IPN.
División en Medicina Genómica,
Subdirección de Enseñanza e
Investigación, CMN 20 de Noviembre,
ISSSTE

VOCAL

Dra. Mina Konigsberg Fainstein.
Profesor Titular. Departamento
Ciencias de la Salud. Universidad
Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

VOCAL

M. en BE. Joaquín Fernando Herrera Muñoz.
Departamento Ciencias de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana.
Unidad Iztapalapa

DEDICATORIA

A mis padres Celia y Cirilo por darme el regalo de la vida, por apoyarme en cada uno de mis días, ya fueran fáciles o difíciles, por enseñarme a no dejarme vencer y ser una mejor persona día con día, por ser mi ejemplo a seguir.... Los amo con todo el corazón.

Carlos, el amor de mi vida, gracias por recordarme la existencia del mundo de lo posible, por las miradas, las palabras, por creer en mí, por siempre estar dispuesto a escucharme, por darme tanto amor y amarme tal cual soy.... Te amo

Octavio e Iván, gracias por ser mis hermanos, por hacerme sentir su apoyo, por compartir momentos importantes para mí, por formar parte de mis días; de mi vida....Los amo

A quienes ya no están conmigo, mi abuelito Ramón; gracias por darme una madre tan única y mi abuelita Chepa: gracias por darme un padre tan maravillo.... Los extraño.

A mi abuelita Teresa, gracias por enseñarme a no darme por vencida, a luchar por mis sueños, a ser fuerte; a no dejarme vencer.... Te quiero

Meche, gracias por ser mi amiga, mi hermana, mi cómplice, por compartir, por reír, por llorar, por enseñar.... Te quiero mensa.

Vare, Ale, Angie... Gracias por compartir tantos momentos, por apoyarme durante esta etapa de mi vida, por sus consejos, por las risas; por ser mis amigas.... Las quiero

Claudia, Hilda y Haydé... Gracias por dejarme formar parte del grupo, por esta amistad que crece día a día, por apoyarme, aconsejarme y siempre tener unos oídos que pudieran escucharme... Las quiero.

A los ojos del cielo que me cuidan y permiten vivir cada día.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Carmen Maldonado por dejarme formar parte de su grupo de trabajo, apoyarme en el ámbito profesional, por guiarme durante mi formación y por darme la oportunidad de terminar una etapa más en mi vida.

A la Dra. Concepción Gutiérrez por apoyarme a lo largo de la maestría y enseñarme como enfrentar los problemas que se me presentaron a lo largo de la realización de este trabajo.

Al Dr. Ramón Coral por los conocimientos y experiencias compartidos que me ayudaron para que este trabajo saliera adelante.

Al Dr. Javier Torres por permitirme formar parte de su equipo, por recibirme en su laboratorio y ayudarme en la realización de este trabajo.

A mi amiga Norma Pernas por compartir conmigo sus conocimientos, por ayudarme cuando me encontraba en aprietos y por hacer mi estancia en el laboratorio mucho más agradable.

A la UAM-Iztapalapa por proporcionarme los conocimientos necesarios para la realización de la tesis.

ABREVIATURAS

| | |
|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Hp</i> | <i>Helicobacter pylori</i> |
| CagPAI | Isla de Patogenicidad cag |
| CagA | Cytotoxin associated gene A. Citotoxina asociada al gen A |
| VacA | Vacuolating cytotoxin A. Citotoxina vacuolizante A |
| s | Secuencia señal |
| m | Región media |
| IL | Interleucina |
| TNF- α | Tumor necrosis factor-alpha. Factor de necrosis tumoral-alfa |
| IFN | Interferon |
| MHC-II | Major histocompatibility complex-II. Complejo principal de histocompatibilidad-II |
| PRRs | Patogen recognition receptors. Receptores de reconocimiento patrón |
| TLRs | Toll like receptors. Receptores tipo Toll |
| LRR | Leucin rich repeats. Repeticiones ricas en leucina |
| IRAK | IL-1 receptor associated-kinase. Cinasa asociada a receptor de IL-1 |
| NF- κ B | Nuclear factor kappa B. Factor nuclear kappa B |
| IRF | INF regulator factor. Factor regulador de INF |
| AP-1 | Activated protein-1. Proteína activadora-1 |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor. Factor de crecimiento endotelial vascular |
| MyD88 | Myeloid differentiation factor-88. Factor de diferenciación mieloide-88 |
| TRIF | Toll/IL-1 receptro (TIR)-domain-containing adaptor inducing IFN-beta. Adaptador inductor de IFN-beta con dominio TIR. |
| PAMP | Pathogen-associated molecular pattern. Patron molecular asociado a patógeno |
| NK | Natural killer. Célula asesina natural |
| Treg | Células T reguladoras |
| aa | Aminoácido |
| D | Ácido aspártico |
| G | Glicina |
| T | Treonina |
| I | Isoleucina |
| R | Gultamina |
| Q | Arginina |
| W | Triptofano |
| N | Asparagina |
| S | Serina |
| C | Citocina |
| T | Timina |
| A | Adenina |
| G | Guanina |
| LPS | Lipopolysacharide. Lipopolisacárido |
| MALT | Mucose-associated lymphoid tissue. Tejido Linfoide Asociado a Mucosa |

RESUMEN

Helicobacter pylori (*Hp*) es un bacilo Gram negativo que infecta al 80% de la población mundial. La infección por *Hp* activa la respuesta inmune tanto innata como adaptativa y está asociada con diferentes patologías gastroduodenales. Sin embargo, solo el 30% de la población desarrolla alguna de las patologías. Los receptores tipo toll (TLRs) son receptores de la respuesta inmune innata capaces de reconocer a *Hp* y en consecuencia activarse e inducir una serie de señales intracelulares que producen la activación de genes inflamatorios como IL-1, TNF- α , IL-6 e IL-8. Los polimorfismos del gen *TLR4* D299G y T399I y R753Q en *TLR2* se han asociado con un mayor riesgo a desarrollar infecciones. En *TLR5* se han descrito polimorfismos en el aa Arg392 que genera un codón de paro y el N592S se han asociado a un mayor riesgo de infección y una predisposición a desarrollar enfermedades autoinmunes. El polimorfismo en la región promotora del gen de *TLR9* -1237T/C también se ha asociado con enfermedades autoinmunes así como a enfermedades gastroduodenales. Debido a que estos estudios se han realizado en población caucásica y no se conocen las variaciones polimórficas en población latinoamericana, el objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia de estos polimorfismos en dos poblaciones latinoamericanas y su posible asociación a las patologías causadas por *Hp*.

Mediante discriminación alélica por PCR-tiempo real se determinó la presencia de los polimorfismos mencionados en muestras de población paraguaya y colombiana. Los pacientes se agruparon de acuerdo al diagnóstico clínico en: gastritis no atrófica, gastritis atrófica, metaplasia, cáncer y úlcera duodenal, tomando como grupo control a los pacientes con gastritis no atrófica. En ninguna de las dos poblaciones estudiadas, se encontró diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia de los polimorfismos de *TLRs* 2, 4 y 5 y tampoco asociación con las patologías estudiadas. Sin embargo, se observó un incremento de la frecuencia del polimorfismo -1237T/C en *TLR9* en la población paraguaya teniendo una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.04$) en el grupo de úlcera duodenal con un OR de 3.7. Estos resultados sugieren que el polimorfismo -1237T/C en *TLR9* es un factor de riesgo para desarrollar úlcera duodenal en población paraguaya y sería necesario aumentar el número de muestras de pacientes colombianos para saber si el polimorfismo se comporta de igual manera en esta población.

ABSTRACT

Helicobacter pylori (*Hp*) is a Gram negative bacillus that infects 80% of the world population. *Hp* infection activates both the innate and the adaptive immune response and is associated with different gastroduodenal diseases. However, only 30% of the infected population develops the some of the associated pathology. Toll-like receptors (TLRs) are receptors of the innate immune system that are able to recognize *Hp* and activate and induce intracellular signals that in turn activates inflammatory genes like IL-1, TNF- α , IL-6 and IL-8. Polymorphisms D299G and T399I in *TLR4* and R753Q in *TLR2* have been associated with an increased risk of developing infections. Similarly, Arg392stop and N592S in *TLR5* are associated with an increased risk of infection and a predisposition to develop autoimmune diseases. The polymorphism in the promoter region of *TLR9* gene -1237T/C has also been associated with autoimmune diseases as well as gastroduodenal diseases. Because these studies have been conducted in Caucasians and don't known polymorphic variations in Latin American population, the objective of these study was to evaluate the presence of these polymorphisms in two Latin American populations and their association to pathologies caused by *Hp*.

Real-time PCR was used to determine allelic discrimination between the polymorphisms above mentioned in samples of a Paraguayan and Colombian population. Patients were grouped according to the clinical diagnosis: non-atrophic gastritis, atrophic gastritis, metaplasia, cancer and duodenal ulcer; taking as a control group patients with non-atrophic gastritis. We found that neither of the two populations studied had statistically significant differences in the frequency of polymorphisms in *TLR 2, 4* and *5* nor association with the pathologies studied. However, we observed an increase in the frequency of the *TLR9* -1237T/C polymorphism in the Paraguayan population with a statistically significant difference ($p=0.04$) in the group of duodenal ulcer with an OR of 3.7. These results suggest that the -1237T/C polymorphism in *TLR9* is a risk factor for developing duodenal ulcer in the Paraguayan population and would require a larger number of samples to conclude whether such polymorphism is similarly important in Colombians.

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

| | | |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Figura 1 | Micrografía electrónica de transmisión de <i>Helicobacter pylori</i> .. | 1 |
| Figura 2 | Factores de colonización de <i>Helicobacter pylori</i> | 2 |
| Figura 3 | Estructura de la superfamilia IL-1R/TLRs..... | 5 |
| Figura 4 | Familia de TLRs y sus ligandos..... | 5 |
| Figura 5 | Vía de señalización de TLRs..... | 6 |
| Figura 6 | Asociación genética entre TLRs y la susceptibilidad a infecciones y enfermedades inflamatorias..... | 9 |
| Tabla 1 | Secuencia de iniciadores y sondas específicas para cada polimorfismo..... | 19 |
| Tabla 2 | Distribución de las variantes alélicas en <i>TLR2/R753Q</i> Paraguay.... | 22 |
| Tabla 3 y Figura 7 | Distribución de las variantes alélicas y porcentaje de la frecuencia genotípica de <i>TLR4/D299G</i> | 23, 24 |
| Tabla 4 y Figura 8 | Distribución de las variantes alélicas y porcentaje de la frecuencia genotípica de <i>TLR4/T399I</i> | 25, 26 |
| Tabla 5 y Figura 9 | Distribución de las variantes alélicas y porcentaje de la frecuencia genotípica de <i>TLR5/392^{STOP}</i> | 27, 28 |
| Tabla 6 y Figura 10 | Distribución de las variantes alélicas y porcentaje de la frecuencia genotípica de <i>TLR5/N592S</i> | 29, 30 |
| Tabla 7 y Figura 11 | Distribución de las variantes alélicas y porcentaje de la frecuencia genotípica de <i>TLR9/-1237T/C</i> | 31, 32 |
| Tabla 8 | Distribución de las variantes alélicas en <i>TLR2/R753Q</i> en muestras de Colombia..... | 33 |
| Tabla 9 y Figura 12 | Distribución de las variantes alélicas y porcentaje de la frecuencia genotípica de <i>TLR4/D299G</i> | 35, 36 |
| Tabla 10 y Figura 13 | Distribución de las variantes alélicas y porcentaje de la frecuencia genotípica de <i>TLR4/T399I</i> | 37, 38 |
| Tabla 11 y Figura 14 | Distribución de las variantes alélicas y porcentaje de la frecuencia genotípica de <i>TLR5/392^{STOP}</i> | 39, 40 |
| Tabla 12 | Distribución de las variantes alélicas de <i>TLR5/N592S</i> | 41 |
| Tabla 13 y Figura 15 | Distribución de las variantes alélicas y porcentaje de la frecuencia genotípica de <i>TLR9/-1237T/C</i> | 43, 44 |

| ÍNDICE | PÁGINA |
|------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 1. INTRODUCCIÓN | |
| 1.1 <i>Helicobacter pylori</i> | 1 |
| 1.2 Reconocimiento de agentes infecciosos y respuesta inflamatoria..... | 4 |
| 1.3 Polimorfismos de TLRs..... | 7 |
| 1.4 <i>Helicobacter pylori</i> y TLRs..... | 10 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 13 |
| 3. OBJETIVOS | |
| 3.1 Objetivo General..... | 14 |
| 3.2 Objetivos Particulares..... | 14 |
| 4. HIPÓTESIS | 14 |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS | |
| 5.1 Diseño del estudio..... | 15 |
| 5.2 Lugar de estudio..... | 15 |
| 5.3 Sujetos de estudio..... | 15 |
| 5.3.1 Criterios generales de selección..... | 15 |
| 5.3.1.1 Criterios de inclusión..... | 16 |
| 5.3.1.2 Criterios de no inclusión..... | 16 |
| 5.4 Definición de infección por <i>Helicobacter pylori</i> | 17 |
| 5.4.1 Serología. Anticuerpos contra extracto total de cagA..... | 17 |
| 5.4.2 Histología. Lesiones gástricas..... | 17 |
| 5.4.3 Cultivo..... | 17 |
| 5.5 Tamaño de muestra..... | 17 |
| 5.6 Tipo de muestra..... | 17 |
| 5.7 Extracción de DNA por la técnica de precipitación con sales (Salting-Out)..... | 18 |
| 5.8 Determinación del polimorfismo de TLRs por análisis de | |

| | |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| discriminación Alélica..... | 18 |
| 5.9 Análisis estadístico..... | 20 |
| 6. RESULTADOS | |
| 6.1 Paraguay | |
| 6.1.1 Polimorfismo <i>TLR2/R753Q</i> | 21 |
| 6.1.2 Polimorfismo <i>TLR4/D299G</i> | 22 |
| 6.1.3 Polimorfismo <i>TLR4/T399I</i> | 24 |
| 6.1.4 Polimorfismo <i>TRL5/392^{STOP}</i> | 26 |
| 6.1.5 Polimorfismo <i>TLR5/N592S</i> | 28 |
| 6.1.6 Polimorfismo <i>TLR9/-1237 T/C</i> | 30 |
| 6.2 Colombia | |
| 6.2.1 Polimorfismo <i>TLR2/R753Q</i> | 32 |
| 6.2.2 Polimorfismo <i>TLR4/D299G</i> | 33 |
| 6.2.3 Polimorfismo <i>TLR4/T399I</i> | 36 |
| 6.2.4 Polimorfismo <i>TRL5/392^{STOP}</i> | 38 |
| 6.2.5 Polimorfismo <i>TLR5/N592S</i> | 40 |
| 6.2.6 Polimorfismo <i>TLR9/-1237 T/C</i> | 41 |
| 7. DISCUSIÓN | |
| 7.1 Polimorfismo <i>TLR2/R753Q</i> | 46 |
| 7.2 Polimorfismo <i>TLR4/D299G</i> y <i>T399I</i> | 46 |
| 7.3 Polimorfismo <i>TLR5/392^{STOP}</i> y <i>N596S</i> | 47 |
| 7.4 Polimorfismo <i>TLR9/-1237 T/C</i> | 49 |
| 8. CONCLUSIONES | 51 |
| 9. PERSPECTIVAS | 52 |
| 10. BIBLIOGRAFIA | 53 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Helicobacter pylori*.

Helicobacter pylori (*Hp*) es una bacteria Gram negativa, capaz de colonizar la mucosa gástrica humana. Es un bacilo curvo de 2.5 a 5 μm de largo por 0.5 a 1 μm de ancho, microaerófilico, productor de ureasa, catalasa y oxidasa y posee de 4 a 5 flagelos peritricos (Hernández, 1994) (Fig. 1). La infección por esta bacteria es el principal determinante de la aparición de gastritis crónica y su progresión a lesiones con potencial maligno, como la atrofia gástrica y la metaplasia intestinal (Correa, 2006). Esta bacteria fue aislada en 1983 (Marshall y Warren, 1984) y desde entonces ha sido estudiada exhaustivamente. Debido a evidencias epidemiológicas que relacionan a *Hp* con el cáncer gástrico, en 1994 la Agencia Internacional para la investigación sobre el Cáncer (Stewart y Kleihues, 2003), clasificó a *Hp* como carcinógeno tipo I en humanos.

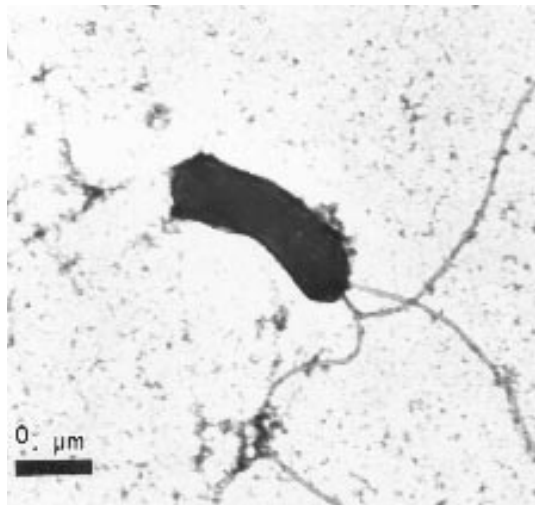


Figura 1. Micrografía electrónica de transmisión. *Helicobacter pylori* aislado a partir de una biopsia de antro gástrico de un paciente con gastritis crónica (Rivas-Traverso, 2000).

Actualmente se sabe que existe una gran variabilidad genética y la capacidad de colonización de *Hp* puede estar dada por la generación de productos bacteriano específicos, entre los cuales, se encuentran la ureasa, la cual hidroliza a la urea y sede iones amonio creando un medio propicio para el crecimiento de *Hp* (Marshall, 1990). Otro factor es la flagelina que le confiere la propiedad de movilidad y posibilidad de penetrar la mucosa gástrica, aunado a estos factores, *Hp* posee diversas proteínas de superficie como BabA,

SabA, AlpA, AlpB y HopZ (Fig. 2), las cuales le permiten adherirse a las células epiteliales gástricas (Scoot y Cover, 2006).

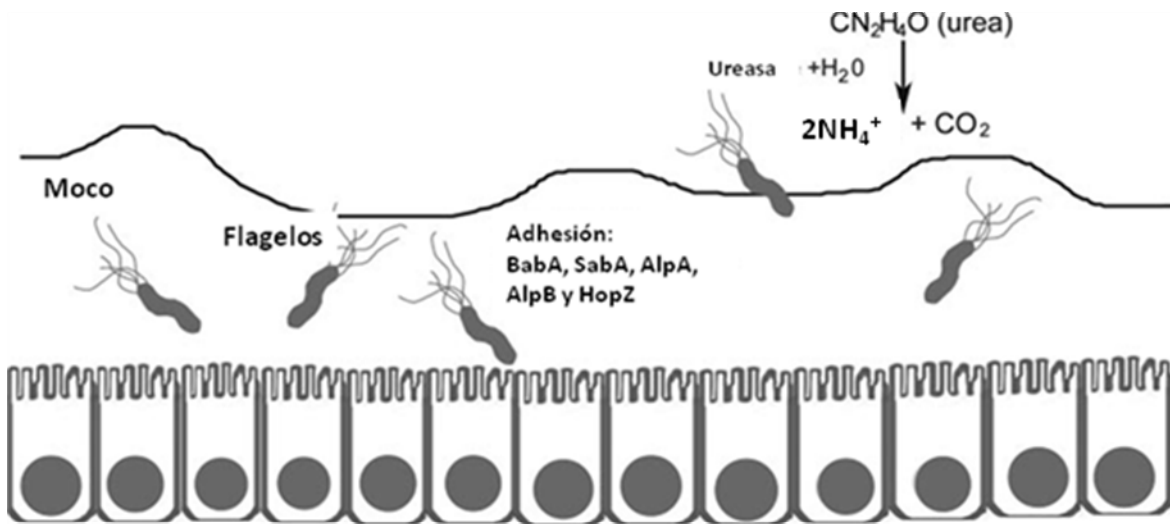


Figura 2. Factores de colonización de *Helicobacter pylori*. (Scoot y Cover, 2006).

Algunas cepas de *Hp* poseen una región cromosomal de 40 kb (31 genes aproximadamente) conocida como la Isla de Patogenicidad *cag* (*cag* PAI) y hay cepas que no la poseen o solo parcialmente (Censini, 1996. Nilson, 2003), esta isla codifica para un sistema de secreción tipo IV el cual transfiere proteínas como la proteína *cagA* (cytotoxin associated gene A) y ADN a otras células (Yamaoka, 1997, Van Doorn, 1998). Existen otros factores que interactúan directamente con células inmunes y modulan la respuesta inmune hacia *Hp*; el gen *vacA* (vacuolating cytotoxin A) codifica para una citotoxina de 87 kDa que *in vitro* causa vacuolización en las células epiteliales (Harris, 1996, Covacci, 1993). El gen *vacA* está presente en todas las cepas de *Hp* sin embargo su expresión depende de las variaciones alélicas de este gen, que presenta dos regiones de gran diversidad; la región de la secuencia señal (s) que ha sido dividida en cuatro grandes grupos: s1a, s1b, s1c y s2 y la región media (m) dividida en m1 y m2. Estas variaciones nos permiten diferenciar entre dos versiones diferentes del gen: s1m1 que induce la síntesis de grandes cantidades de proteína VacA y s2m2 que sintetizan la proteína en bajas concentraciones (Van Door, 1998. Atherton, 1997).

Las cepas de *Hp* que poseen la *cagPAI* y además presentan el alelo *vacA* s1m1 se les considera ser más virulentas y que están asociadas con el desarrollo de úlcera péptica y

cáncer gástrico y las cepas que no poseen la cagPAI y presentan los alelos s2m2 se les considera menos virulentas y se les asocia con el desarrollo de gastritis (Van Door, 1998).

La colonización del estómago por *Hp* induce una respuesta inmune que lleva a un cuadro inflamatorio agudo denominado gastritis. Este proceso puede ser crónico y producir laceración del tejido infectado, predisponiendo a la aparición de otras lesiones asociadas a la respuesta inflamatoria, como gastritis atrófica, metaplasia, displasia y adenocarcinoma gástrico (Correa, 2006). Esta infección se adquiere en la infancia y representa una de las infecciones bacterianas más comunes en el mundo. En países desarrollados la prevalencia en adultos es del 40% y en países en vías de desarrollo entre el 80% y 90% (Pérez, 2004). Aproximadamente de 10 a 20% de los individuos infectados con *Hp* desarrollan úlcera duodenal o gástrica y menos del 3% cáncer gástrico. Las razones para ello no se conocen completamente; pero se sabe que el tipo de respuesta inflamatoria y la virulencia de la cepa infectante son muy importantes para el resultado de la infección.

La respuesta inflamatoria de la mucosa gástrica inducida por *Hp* está dada por la infiltración de leucocitos polimorfo nucleares, macrófagos, linfocitos T y B. Cepas de *Hp*, estimulan al epitelio gástrico a secretar interleucina (IL) 8 (Bamford, 1998), que funciona como un quimioatrayente de neutrófilos y como un activador de neutrófilos y macrófagos. En la mucosa de los individuos infectados, también se detectan concentraciones elevadas de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12, anti-inflamatorias como IL-10 y otras de respuesta tipo Th1, como IFN γ . Esta respuesta provoca cambios importantes en la fisiología del estómago, por daño directo a las células o por regulación de la proliferación celular y la apoptosis. Los neutrófilos y macrófagos liberan especies reactivas del oxígeno (aniones superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo e hidroperoxilo) y del nitrógeno (óxido nítrico, peroxinitrito, dióxido de nitrógeno). Estas especies químicas son mutagénicas y pueden inducir cambios irreversibles en el genoma de las células de la mucosa gástrica. De manera importante se ha observado que los niveles de estas especies químicas disminuyen cuando se elimina la infección por *Hp* (Fuentes-Pananá, 2009 y Ando, 2006). Además de que se ha observado que la ureasa de *Hp* puede unirse al MHC II e inducir la apoptosis de células epiteliales gástricas (Fan, 2000), esta apoptosis también

puede ser inducida por el aumento en la expresión de Fas por citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-1 (Wang, 2001, Rudi, 1998), que además alteran la secreción de moco participando en la lesión de la mucosa gástrica y estimulan a las células parietales incrementando la síntesis de gastrina y por lo tanto la secreción de ácido, dando como resultado un cambio en la homeostasis del estómago. También se ha observado que el TNF- α disminuye el número de células D del antro, lo que lleva a una disminución de la somatostatina, la cual regula la secreción de ácido.

1.2 Reconocimiento de agentes infecciosos y respuesta inflamatoria.

Una forma de interacción entre los agentes infecciosos y las células del hospedero es mediante receptores de la respuesta inmune innata, los cuales identifican antígenos extraños utilizando un número limitado de receptores denominados Receptores de Reconocimiento Patrón (PRRs), son expresados en las superficies celulares, en compartimentos intracelulares o secretados a la circulación sanguínea o a fluidos tisulares. Entre estos PRRs, se encuentran los receptores Tipo Toll (TLRs) (Akira, 2006, Fritz, 2006). La proteína Toll fue identificada inicialmente en *Drosophila melanogaster* como un receptor transmembranal tipo I para el establecimiento de la polaridad dorso-ventral durante las primeras etapas del desarrollo embrionario de este insecto. Estudios posteriores demostraron que además, es de gran importancia en el sistema inmunológico del insecto adulto, principalmente en infecciones por bacterias y hongos (Lemaitre, 1996). En los mamíferos, incluyendo al humano, existe un sistema de receptores que por su semejanza en estructura y función con el sistema Toll de *Drosophila* se denomina receptores tipo Toll (TLRs: Toll Like Receptors) (Carrillo, 2003). Estos receptores se caracterizan por tener un dominio extracelular con regiones repetidas de 24 a 29 aminoácidos ricas en leucina (LRR) y una o dos regiones ricas en cisteínas, además de un dominio intracelular de aproximadamente 200 aminoácidos, este dominio es similar al que presenta la familia de receptores de interleucina 1 (IL-1R), el cual contiene un dominio denominado TIR (Toll/IL-1R), por el cual se lleva a cabo la transducción de señales (Aderem y Ulevitch, 2000, Janeway y Medzhitov, 2001 y Akira y Takeda, 2004). Fig. 3

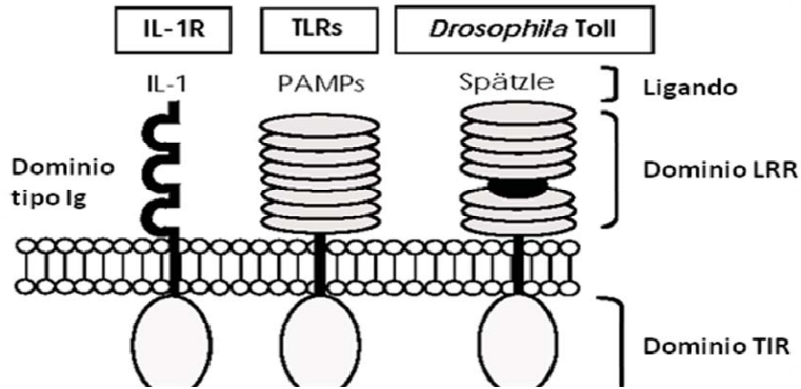


Figura 3. Estructura de la súper familia IL-1R/TLRs. (Modificado de: Montero y Martín, 2008)

A la fecha se han descrito 13 TLRs en humanos y algunos de sus ligandos, pero solamente 11 son funcionales (Fig. 4). Una vez que los TLRs han tenido una interacción con sus los Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs), pueden dimerizar con otros receptores o moléculas e inducir la interacción entre el dominio TIR y el dominio intracelular TIR de las moléculas adaptadoras (O'Neill, 2007).

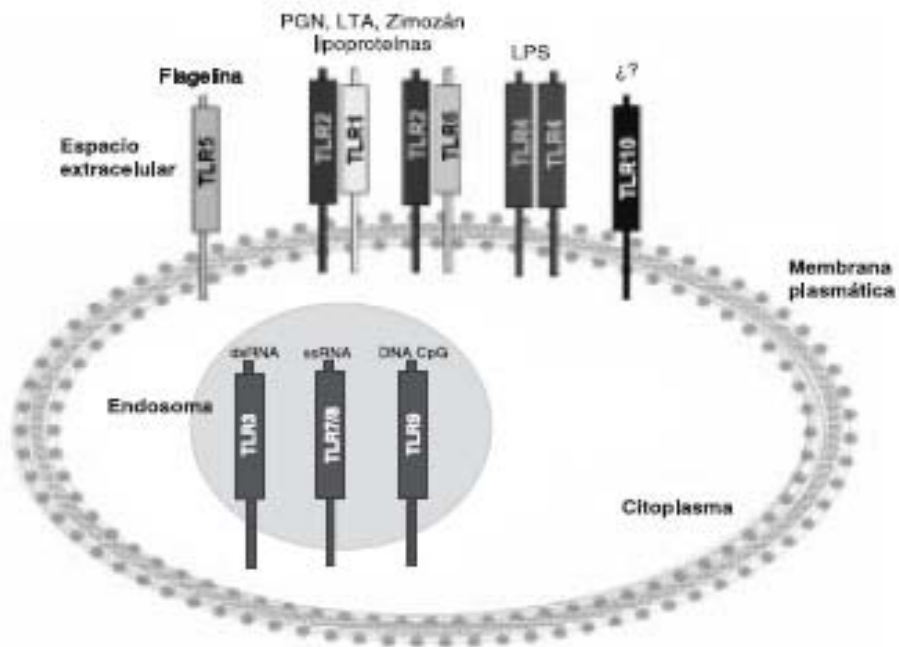


Figura 4. Familia de TLRs y sus ligandos (Akira, 2004)

Esto inicia una cascada de reclutamiento de moléculas que resulta en una activación de diferentes miembros de la familia de cinasa asociada al receptor de IL-1 (IRAK). Estos eventos permiten la activación de factores de transcripción como NF- κ B, factor regulador de IFN (IRF 1/3/5/7) o la proteína activadora-1 (AP-1) que induce la expresión de genes que codifican para citocinas inflamatorias, quimiocinas, IFN tipo I, moléculas coestimuladoras y otros factores de la respuesta inmune como factores angiogénicos tales como VEGF, enzimas inflamatorias como COX2, moléculas de adhesión y de coestimulación (Brikos y O'Neill, 2008, Akira, 2006). Cuatro moléculas adaptadoras intracitoplasmáticas TIR han sido identificadas: factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88), adaptador que contiene un dominio TIR inductor de IFN (TRIF, también conocido TICAM1), proteína adaptadora asociada al dominio TIR (TIRAP) y la molécula adaptadora asociada a TRIF (TRAM, también conocido como TICAM2) (Kawai y Akira, 2007, Brikos y O'Neill, 2008) (Fig. 5).

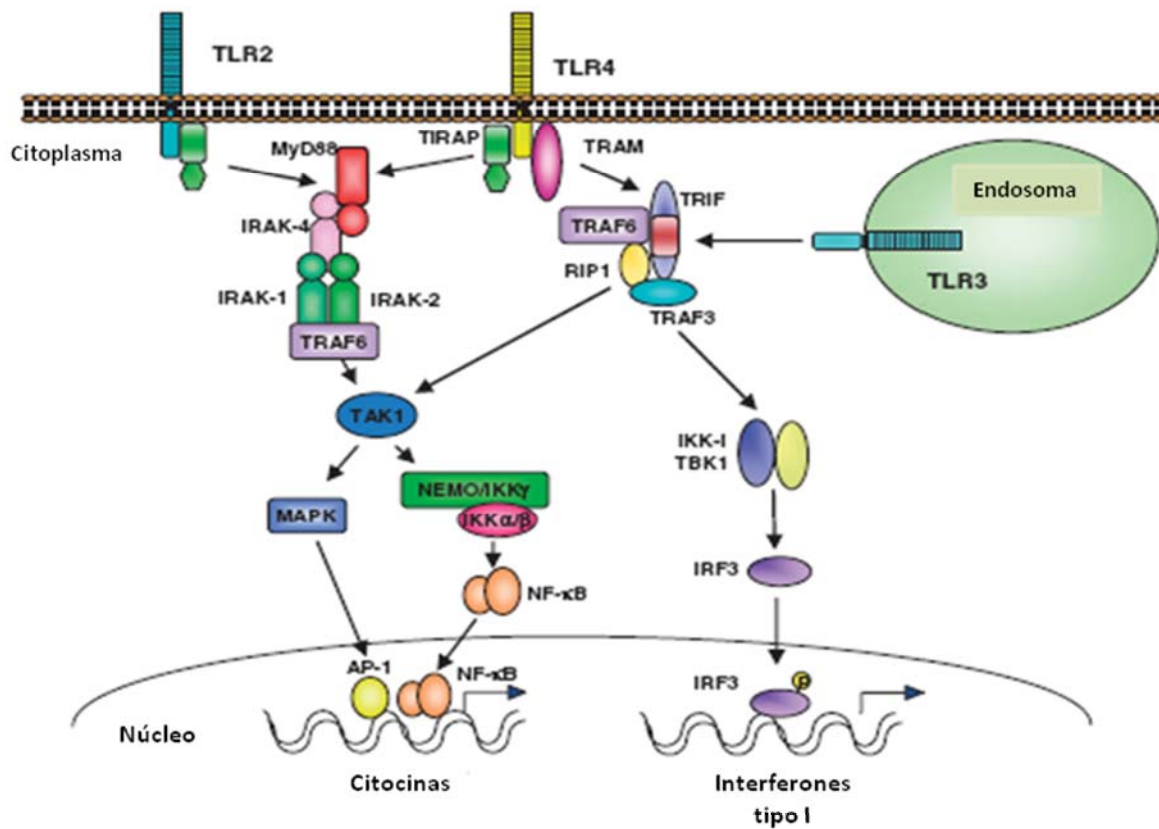


Figura 5. Vía de señalización de TLRs (Akira, 2009)

La interacción entre los PAMPs y los TLRs resulta en la activación de células inflamatorias dirigidas a eliminar a los agentes infecciosos. Sin embargo, en ocasiones el resultado es una inadecuada eliminación del patógeno, una persistencia de las señales pro-inflamatorias y defectos en los mecanismos anti-inflamatorios; que llevan a un estado de inflamación crónica y con ello al desarrollo de diferentes patologías entre ellas el cáncer (Han y Ulevitch, 2005, Tsan, 2004). Además, la activación de la señalización de los TLRs puede favorecer al desarrollo de patologías que pueden volverse crónicas a través de varios mecanismos que dependen principalmente de la producción de citocinas y quimiocinas inflamatorias.

1.3 Polimorfismos de TLRs

La palabra polimorfismo (*poli*, muchas; *morfos*, formas), refiere la variabilidad de un rasgo o característica. El polimorfismo más común en el genoma humano es la diferencia de una sola base conocido como polimorfismo de un solo nucleótido (A, T, G o C) (SNP del inglés, *single nucleotide polymorphism*), el cual ocurre aproximadamente cada 1000 pb. (Guízar-Vázquez, 2001). Dos tercios de los SNP corresponden a la sustitución de una C por una T y estas variaciones en la secuencia del ADN pueden afectar la respuesta de los individuos a enfermedades causadas por bacterias, virus, productos químicos, fármacos, etc. Los SNP que se localizan dentro de una secuencia codificante pueden modificar la estructura de la proteína (SNP sinónimo) o pueden no modificar la proteína que producen (SNP no-sinónimo o mutación silenciosa). Los SNP que se encuentren en regiones no codificantes pueden tener consecuencias en el proceso de traducción, sobre todo en procesos como el splicing, la unión de factores de transcripción o modificando la secuencia de RNA no codificante (Gibson y Muse, 2004).

Los dominios a cargo del reconocimiento de ligandos o de la transducción de señales son generalmente conservados entre diferentes miembros de la misma familia de proteínas. Sin embargo, existen en la población modificaciones a estas estructuras, que por situarse en dominios funcionales importantes, condicionan cualitativa y cuantitativamente la respuesta inmune, de manera que polimorfismos específicos representan factores de riesgo para el desarrollo de diferentes enfermedades; como en el caso de polimorfismos en TLRs,

citocinas y quimiocinas o moléculas que condicionan la respuesta inflamatoria (Fuentes-Pananá, 2009).

En la figura 6 se muestra un resumen de los polimorfismos que se han encontrado en los TLRs y su asociación con diferentes patologías.

Se han encontrado dos sustituciones en la región extracelular, de reconocimiento a ligando, en TLR4: la sustitución de un ácido aspártico (D) por una glicina (G) en el aminoácido (aa) 299 (D299G) y la sustitución de una treonina (T) por una isoleucina (I) en el aa 399 (T399I) (Schmitt, 2003). Ambas sustituciones afectan la respuesta inflamatoria al lipopolisacárido (LPS) (Schmitt, 2003), con impacto en el riesgo de infecciones por bacterias Gram-negativas y choque séptico por inflamación no controlada (Lorenz, 2001). También se ha publicado que en mujeres finlandesas embarazadas que presentan estos polimorfismos, existe un mayor riesgo al nacimiento prematuro, esto puede estar dado por tener una mayor susceptibilidad a contraer infecciones que puedan poner en riesgo el embarazo (Lorenz, 2002). Además se ha encontrado una asociación a desarrollar gastritis, lesiones pre-cancerosas y cáncer gástrico en pacientes que presentan estos polimorfismos (Achyut, 2007, Hold, 2007).

En el gen que codifica para la proteína TLR2 se ha propuesto que la sustitución de una glutamina (R) por una arginina (Q) en el aa 753 (R753Q) está asociada con una respuesta disminuida a lipoproteínas de bacterias Gram positivas en población Caucásica, por lo que también representa un factor de riesgo para desarrollar choque séptico (Lorenz, 2000), así mismo, se ha demostrado que este polimorfismo se asocia a una disminución en la respuesta inducida por péptidos bacterianos de *Borrelia burgdorferi* y *Treponema pallidum* en población Caucásica (Lorenz, 2001). Recientemente se encontró otro polimorfismo en este gen, la sustitución de un Q por un triptofano (W) en el aa 677 (R677W), el cual se asocia con lepra lepromatosa (Kang, 2001).

Más del 10% de la población anglosajona presenta una mutación puntual en la base 1174 del gen de TLR5, lo que genera un codón de terminación en el aminoácido 392 (TLR5^{392STOP}). Esta variante trunca de TLR5 carece de la región de señalización citoplasmática y funciona como un receptor dominante negativo que desorganiza

severamente la señalización celular. Otro polimorfismo se localiza en el par de base 1775, provocando la sustitución de una asparagina (N) por una serina (S) en el aa 592, ambos polimorfismos, se han asociado con susceptibilidad a desarrollar la enfermedad de Legionela (Hawn, 2003) y con una protección a desarrollar lupus eritematoso sistémico (Haw, 2005). También se ha observado la adquisición natural de una respuesta inmune a la flagelina regulada por TLR5, además de que la presencia del polimorfismo TLR5^{392STOP} no está asociado con el desarrollo de enfermedad de Crohn (Gewirtz, 2005)

Se han descrito dos polimorfismos en las regiones promotoras del gen de TLR9, uno de ellos es la sustitución de una timina (T) por una citocina (C) en el par de base -1237 (-1237T/C) y el otro la sustitución de una adenina (A) por una guanina (G) en el par de base 2848 (A2848G), los cuales están asociados con un mayor riesgo a desarrollar asma (Lazarus, 2003) y enfermedad de Crohn (Torok, 2004).

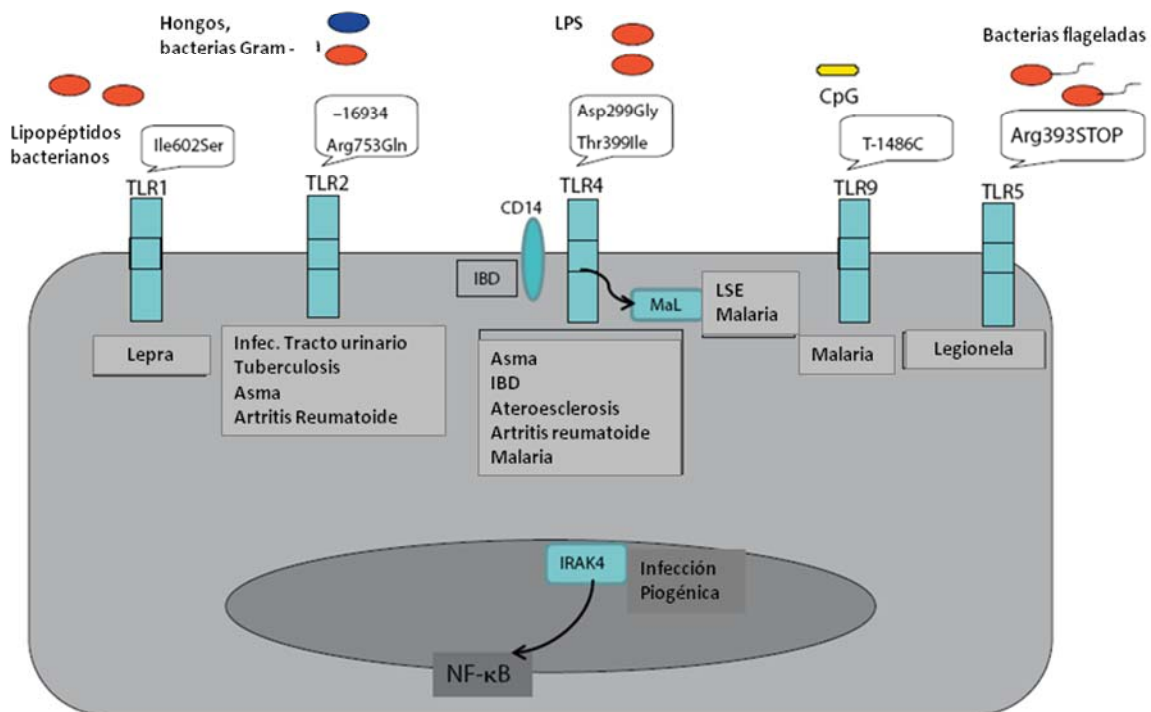


Figura 6. Asociación genética entre TLRs y la susceptibilidad a infecciones y enfermedades inflamatorias (Corr y O'Neill, 2009).

Considerando que los polimorfismos mencionados modifican la respuesta inflamatoria a los agentes infecciosos, es lógico considerar que también modifican el establecimiento de

infecciones crónicas; de esta manera; la respuesta inflamatoria influye significativamente tanto en la aparición como en la evolución de diferentes patologías y estas infecciones crónicas pueden llevar al desarrollo de cáncer. De forma similar, polimorfismos en IL-1 β , IL-8 y TNF- α han sido relacionados con la progresión a cáncer gástrico (Kusters, 2006).

1.4 *Helicobacter pylori* y Receptores Tipo Toll

Existen diversos estudios que demuestran que *Hp* o algunas de sus estructuras son reconocidas por los TLRs, evidencia de esto es la obtenida en el 2001 donde se demostró que el LPS de *Hp* es capaz de activar a TLR4 (Kawahara, 2001), también existen reportes que demuestran que el LPS de *Hp* proveniente de cepas que poseen la cagPAI activan TLR4 en células gástricas, no así aquellas que presentan una mutación en la cagPAI (Maeda, 2001).

La activación del factor de transcripción NF- κ B a través de la interacción de *Hp* con los TLRs se demostró en células HEK293 transfectadas con construcciones de expresión de TLRs específicas y en la línea celular de cáncer gástrico humano MKN45, la cual expresa todos los TLRs, se observó que *Hp* vivo induce la activación de NF- κ B mediante la unión de TLR2 y TLR5, pero no con TLR4 y que el LPS derivado de la cepa 26695 de *Hp* es agonista de TLR2 (Smith, 2003). Con microarreglos de cDNA, se demostró en biopsias de pacientes infectados con *Hp*, que hay una sobre-expresión de TLR1, TLR4, TLR5 y TLR6, lo que apoya su participación en la respuesta inmune de la mucosa (Sicheng, 2004). Recientemente se describió que TLR2 y TLR9 participan en invasión y angiogénesis inducida por *Hp* en células gástricas (Chang, 2005).

Se ha reportado que las flagelinas de *Hp* FlaA y FlaB son capaces de activar a TLR5 en comparación con las flagelinas de otras bacterias Gram negativas como la de *Salmonella typhimurium* (Lee, 2003, Gewirts, 2004).

Se han encontrado diferentes polimorfismos en genes que afectan la evolución de la enfermedad producida por *Hp* y que modifican la respuesta inflamatoria inducida por la infección. Dos polimorfismos en el gen de IL-1 están asociados con el desarrollo de atrofia gástrica y cáncer en población europea (El-Omar, 2000), en respuesta a la colonización

crónica por *Hp* una inhibición de secreción de ácido por niveles elevados de IL-1 β , podrían promover el desarrollo de atrofia gástrica, esto conduce a carcinogénesis gástrica. El polimorfismo de TNF- α está asociado con el desarrollo de cáncer gástrico y úlcera péptica (Li, 2005) así como el polimorfismo de IL-10 (Wu, 2003), este polimorfismo, disminuye la síntesis de IL-10, lo que podría llevar a un cambio en la homeostasis del estómago, promoviendo una respuesta inflamatoria exagerada.

Se han realizado diversos estudios sobre los polimorfismos en los TLRs asociados a las diferentes patologías asociadas a la infección con *Hp*: para los polimorfismos en TLR4 D299G en población Caucásica se ha encontrado asociación con desarrollo de linfoma MALT (Hellming, 2005), gastritis atrófica y cáncer gástrico distal (Hold, 2007). En otro estudio realizado en población Taiwanesa no se encontró asociación con cáncer gástrico (Wu, 2006). Para el polimorfismo en T399I se ha encontrado asociación con gastritis y metaplasia en población Hindú y por el contrario no se ha encontrado asociación con úlcera duodenal y gastritis en población Húngara (Hofner, 2007).

Más recientemente se realizó un estudio en población Caucásica donde no se encontró asociación entre el polimorfismo -1237T/C y el riesgo a desarrollar cáncer gástrico (Hold, 2009).

En poblaciones latinoamericanas se han realizado algunos estudios sobre polimorfismos en los TLRs; uno de ellos se realizó en población Venezolana donde no se encontró asociación del polimorfismo D299G de TLR4 en pacientes con metaplasia (Kato, 2007). En población Brasileña, se encontró una asociación de infección por cepas *cagA*⁺ en niños (Moura, 2008) y en población Mexicana no se encontró asociación del polimorfismo T399I del TLR4 con cáncer gástrico (Garza-González, 2007).

Uno de los estudios más completos que se tienen en población latinoamericana, es el realizado en población mexicana, donde se encontró una mayor frecuencia del polimorfismo TLR4 D299G en pacientes con cáncer gástrico (10.5%) y úlcera duodenal (14.7%) comparado con pacientes con gastritis no atrófica (4.2%), aunque la diferencia fue estadísticamente significativa solamente con el grupo de úlcera duodenal ($p=0.04$). Sin embargo se observó una modificación en el perfil de citocinas inflamatorias y quimiocinas

en la mucosa gástrica. También se buscó el polimorfismo TLR4 T399I, el cual tuvo una mayor frecuencia en pacientes con cáncer gástrico (6.6%) y úlcera duodenal (9.1%) comparado con pacientes con gastritis no atrófica (4.5%). Sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Trejo, 2008).

Con estas investigaciones realizadas, es interesante conocer la frecuencia de estos polimorfismos en población latinoamericana pero de una forma más completa, es decir, conociendo la frecuencia en las patologías que se han asociado a la infección por *Hp*.

JUSTIFICACIÓN

Las modificaciones genéticas en los dominios de reconocimiento y señalización de los TLRs pueden generar diferencias importantes en el reconocimiento y en la respuesta inflamatoria a *Hp* constituyendo factores de riesgo o protección para las diferentes patologías asociadas a la infección.

Sin embargo a la fecha no se conoce la frecuencia de los polimorfismos de los TLRs involucrados en el reconocimiento de *Hp* y en el desarrollo de las diferentes patologías asociadas a la infección en población colombiana y paraguaya, debido a esto, es importante su determinación.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar algunos de los polimorfismos de los TLRs 2, 4, 5 y 9 y su probable asociación con enfermedades causadas por *Hp* en pacientes de dos poblaciones de Latinoamérica.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el genotipo de la región polimórfica de: TLR2/R753Q, TLR4/D299G y T399I, TLR5/392^{STOP} y N592S, TLR9/-1237T/C.
2. Determinar la asociación de los polimorfismos encontrados con las diferentes patologías causadas por *Hp*.

4. HIPÓTESIS

La presencia del polimorfismo en los diferentes TLRs está asociada al desarrollo de las patologías más severas causadas por la infección de *Hp*.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Diseño del estudio.

Estudio de casos y controles, multicéntrico, multidisciplinario y ciego para el evaluador.

5.2 Lugar de estudio

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad-Iztapalapa.

5.3 Sujetos del estudio

Las muestras de este estudio fueron obtenidas de un estudio previo titulado: “Estudio internacional sobre la historia natural de úlcera duodenal y cáncer gástrico asociados a la infección con *H. pylori*. Factores ambientales del huésped y de la bacteria asociados a enfermedad” realizado en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias. Debido a que es un estudio multicéntrico que incluye los países de México, Colombia y Paraguay, durante este estudio se analizaron las muestras provenientes de Colombia y Paraguay debido a que las muestras correspondientes a México se analizaron previamente por otro compañero de la Unidad. Las muestras de ADN se extrajeron a partir del concentrado leucocitario (buffy coat) mediante la técnica de precipitación con sales (Salting-Out) (Nasiri, 2005) y se encontraban conservadas a -70°C .

5.3.1 Criterios generales de selección.

Los sujetos de estudio fueron seleccionados de pacientes con síntomas gastrointestinales protocolizados para endoscopia y biopsia gástrica. El número de hombres y mujeres fue definido considerando la frecuencia aproximada de los diferentes diagnósticos por sexo. Los grupos de diagnóstico fueron integrados de la siguiente forma:

1. *Cáncer*: Se incluyeron sujetos con carcinoma invasor de estómago, todos los subtipos y localizaciones y que no hubieran recibido tratamiento previo.

2a. *Gastritis Crónica Atrófica* (GCA): Se incluyeron sujetos con GCA diagnosticados como el cambio histológico más severo en las biopsias, sin úlcera péptica asociada.

2b. *Metaplasia intestinal* (MI): Se incluyeron sujetos en los cuales la MI fue el diagnóstico más severo, no importando la presencia de GCA, sin úlcera péptica asociada.

2c. *Displasia Gástrica* (DG): Sujetos con un diagnóstico de DG en cualquiera de las biopsias, sin úlcera péptica asociada.

3. *Gastritis no atrófica*: Incluye pacientes con mucosa gástrica normal o aquellos con gastritis crónica no atrófica o superficial. Para este grupo, los sujetos con antecedentes o presencia de úlcera péptica fueron excluidos. Este grupo, figuro como control, debido a que presentan un fenómeno inflamatorio crónico por la infección con *Hp*, aunque no presenten ninguna sintomatología asociada a la infección.

4. *Úlcera duodenal* (UD): Incluye úlcera péptica con localización duodenal, basado en el diagnóstico endoscópico. Los sujetos fueron incluidos sin importar el tipo de gastritis que presentaron en el estómago.

5.3.1.1 Criterios de inclusión

- a. Tener 18 años de edad o más al momento del diagnóstico
- b. Género masculino o femenino
- c. Ser colombiano o paraguayo con ascendencia de dos generaciones o más

5.3.1.2 Criterios de no inclusión

- a. Tener menos de 18 años de edad al momento del diagnóstico.
- b. Diagnóstico de alguna enfermedad autoinmune, diabetes u otro tipo de cáncer.
- c. Sujetos quienes hayan tomado tratamiento previo en las últimas dos semanas con antibióticos, antiinflamatorios no esteroideos, compuestos de bismuto e inhibidores de la bomba de protones.

- d. Pacientes con várices esofágicas o cualquier otra condición a criterio del endoscopista.
- e. Ser colombiano o paraguayo con ascendencia de solo una generación.

5.4 Definición de Infección con *H. pylori*

Un paciente infectado fue aquel que resultó positivo para *Hp* en dos de cualquiera de las tres siguientes pruebas:

5.4.1 Serología. Anticuerpos contra extracto total de cagA

Para medir anticuerpos contra antígeno de extracto total se usó la técnica de ELISA previamente descrita (Camorlinga-Ponce, 1999).

5.4.2 Histología. Lesiones gástricas

Las biopsias fueron teñidas con hematoxilina-eosina. El diagnóstico se estableció con base en la presencia de inflamación crónica y cambios morfológicos (Price, 1991).

5.4.3 Cultivo.

Los extractos fueron cultivados en medio gelosa-sangre durante 7 días a 37 °C y 9% de CO₂. Pasado el tiempo debieron ser positivos para las pruebas de catalasa, oxidasa y peroxidasa.

5.5 Tamaño de muestra

El tamaño de la muestra fue de 217 y 278 ADNs obtenidos de pacientes de Paraguay y Colombia respectivamente.

5.6 Tipo de muestra

De cada paciente previamente se tomaron 5 mL de sangre con heparina como anticoagulante para aislar el ADN y 2 biopsias de antro y cuerpo para diagnóstico de infección con *Hp* por cultivo e histología.

5.7 Extracción de ADN por la técnica de precipitación con sales 8Salting-Out).

Se extrajo ADN genómico a partir de células mononucleares de sangre periférica utilizando 5 mL de sangre contenida en tubos con heparina como anticoagulante, de los pacientes y controles.

La sangre total se centrifugó a 3500 rpm durante 7 minutos para recolectar la capa correspondiente a las células blancas y se transfirieron a un tubo Eppendorf® de 1.5 mL estéril. Se realizaron 3 lavados con 800 µL de solución de lisis 1 (Sucrosa 0.3M, Tris-HCl 2M (pH 7.5), MgCl₂ 5Mm, Triton 100X 1%), se agitó en vortex y centrifugó a 12000 rpm durante 1 minuto. Una vez realizados los lavados, se añadieron 400 µL de la solución de lisis 2 (NaCl 0.075M, Na-EDTA 0.024M) y se agitó en vortex. Se añadieron 10 µL de la solución de SDS al 20%, 100 µL de NaClO₂ 5M y se agitó durante 5 minutos suavemente colocando los tubos en una gradilla de agitación. Transcurrido este tiempo, se añadieron 200 µL de NaCl 5M y se agitó en vortex, se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se añadieron 700 µL de isopropanol y se incubó a -20°C durante 1 hora. Se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó y se agregó 1 mL de etanol al 70% y se mezcló vigorosamente, se centrifugó a 12000 rpm durante 2 minutos y se decantó el sobrenadante. El ADN contenido en el tubo, se secó mediante evaporación y finalmente se realizó la elución en 100 µL de agua y se dejó hidratando durante toda la noche.

La concentración y pureza se verificaron mediante espectrofotometría y la integridad en gel de agarosa al 1%. Las muestras de ADN genómico se diluyeron a una concentración de 10 ng/µL.

5.8 Determinación de polimorfismos de TLRs por análisis de discriminación alélica.

Este análisis se realizó a partir del ADN proveniente de los leucocitos determinando el polimorfismo de TLR2/R753Q, TLR4/D299G y T399I, TLR5/TLR5^{392STOP} y N592S y TLR9/-1237T/C, mediante el método de discriminación alélica utilizando sondas TaqMan® marcadas con los fluorocromos VIC y FAM específicas para cada genotipo buscado. Las dos sondas TaqMan® presentes en el ensayo son cada una de ellas

complementarias para cada uno de los SNPs. Cada una posee un fluorocromo diferente en el extremo 5' y un quencher (apagador) en el extremo 3'. Durante la fase de extensión de la reacción de PCR la ADN polimerasa rompe la sonda (as) hibridada con el ADN, separando el fluorocromo del quencher y detectándose emisión de fluorescencia de una de las sondas o de ambas. También se necesitó la secuencia de “primers” (cebadores) específicos para cada gen (Tabla 1). Para la reacción de PCR se preparó una mezcla de reacción añadiendo 5 µL de Master Mix (TaqMan® Universal PCR Master Mix, No Amperase® UNG), para una concentración final 1X (Applied Biosystems®, Foster City, Estados Unidos) y 0.124 µl de las sondas e iniciadores específicos para una concentración final de 5 nM y 1 nM respectivamente. A esta mezcla de reacción se le añadieron 1 µL de ADN con una concentración de 10 ng/µL para llegar a un volumen total de reacción de 10 µl. La amplificación se realizó en un equipo ABIPRISM 7000 PCR (Applied Biosystems®, Foster City, Estados Unidos) con el siguiente programa de reacción: 50°C durante 1 min, 95°C durante 10 min y 45 ciclos a 95°C durante 15 seg y 60°C durante 1 min, la fluorescencia se leyó en el detector de secuencias ABI7000 (Applied Biosystems®, Foster City, Estados Unidos). Los iniciadores y las sondas se diseñaron utilizando el *software Primer Express*® (Applied Biosystems®, Foster City, Estados Unidos), los cuales se enlistan en la tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de “primers” (cebadores) y sondas específicas para cada polimorfismo

| Polimorfismo | Secuencia de “primers” | Sonda |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| TLR2 /R753Q | F' CCATTCCCCAGCGCTTCT R' CCAGGTAGGTCTTGGTGTTCATT | VIC AAGCTGCGGAAGAT FAM AAGCTGCAGAAGAT |
| TLR4/ D299G | F' TGACCATTGAAGAATTCCGATTAGCA R' CACCAGGGAAAATGAAGAAACATTTGT | VIC TACCTCGATGATATTATT FAM CCTCGATGGTATTATT |
| TLR4/ T399I | F' CAAAGGTTGCTGTTCTCAAAGTGAT R' GTAATAACACCATTGAAGCTCAGATCTA | VIC CTTTAGGCTGGTTGTCC FAM TTTAGGCTGATTGTCC |
| TLR5 ^{STOP392} | F' CAAGACCAAACATTCAAATTCCTGGAA R' GGGTATGCTTGAATAAAAATGAATGGT | VIC ATTGTCTCGGAGATCC FAM TTGTCTCAGAGATCC |
| TLR5/ N592S | F' CCAGGATGTTGGCTGGTTTCT R' GCAACGGAATGTTATTGTCTTTCTTCTTT | VIC TCTGTTGAGAGAGTTTATGA FAM TGTTGAGAGAGCTTATGA |
| TLR9/ -1237T/C | F' CAGAGACATAATGGAGGCAAAGGA R' GCCTTGGGATGTGCTGTTC | VIC TGCCTGGAAACTC FAM TGCCTGAAACTC |

5.9 ANALISIS ESTADÍSTICO

Las frecuencias alélicas de los genes de TLRs 2, 4, 5 y 9 en los pacientes y controles se compararon entre sí mediante la prueba de p de Fisher y empleando tablas de contingencia de 2 x 2. El vigor de asociación se determinó calculando el OR con un IC del 95%. En todos los casos, la significancia estadística debió ser $p \leq 0.05$.

6. RESULTADOS

Las muestras fueron colectadas durante el periodo de 1999-2003 y en un principio se almacenó el concentrado leucocitario (buffy coat) en los países de origen (Colombia y Paraguay) para después trasladarse a la Ciudad de México en hielo seco para realizar la extracción de ADN. Debido a este manejo de las muestras y por consiguiente la calidad del ADN es posible que la amplificación de las muestras no fuera la adecuada.

6.1 PARAGUAY

6.1.1 POLIMORFISMO TLR2/R753Q

Se analizaron 217 muestras para el polimorfismo de TLR2/R753Q de las cuales 119 se genotipificaron. De las 119 muestras genotipificadas; 118 (99.16%) presentaron el genotipo R/R; 1 (0.84%) presentó el cambio de una arginina (R) por una glutamina (Q) en uno de los alelos (R/Q). El cambio de R por Q en ambos alelos (Q/Q) no se encontró en ninguna de las 118 muestras analizadas (Tabla 2).

Cuando se analizó la frecuencia del polimorfismo en cada una de las patologías estudiadas, se observó que en el grupo de gastritis no atrófica (grupo control), la muestra fue heterocigota y presentó el genotipo R/Q (2.7%). Para el resto de las patologías, no se detectó ninguna muestra heterocigota (Tabla 2). No se observó diferencia estadísticamente significativa y no hubo asociación del polimorfismo con ninguna de las patologías.

Tabla 2. Distribución de las variantes alélicas en TLR2/R753Q en muestras de Paraguay con diferentes patologías asociadas a la infección con *Hp*.

| Grupo de Estudio (# pacientes) | R/R (%) | R/Q (%) | Q/Q (%) | p ^a | OR (95% IC) |
|-----------------------------------|----------------|-------------|------------|----------------|----------------|
| Gastritis no atrófica (38) | 37 (97.3) | 1 (2.7) | 0 | | |
| Metaplasia (25) | 25 (100) | 0 | 0 | 1 | -- |
| Cáncer (26) | 26 (100) | 0 | 0 | 1 | -- |
| Úlcera duodenal (30) | 30 (100) | 0 | 0 | 1 | -- |
| Total (119) | 118 (99.16) | 1 (0.84) | | | |

6.1.2 POLIMORFISMO TLR4/D299G

Se analizaron 217 muestras para el polimorfismo de TLR4/D299G, de las cuales 98 se genotipificaron. De las 98 muestras genotipificadas; 92 (93.8%) presentaron el genotipo D/D; 6 (6.1%) presentaron el cambio de un ácido aspártico (D) por una glicina (G) en uno de los alelos (D/G) y el cambio de D por una G en ambos alelos (G/G) no se encontró en ninguna de las 98 muestras analizadas (Tabla 3).

Cuando se analizó la frecuencia del polimorfismo en cada una de las patologías estudiadas, se observó que en el grupo de gastritis no atrófica (grupo control), 4 muestras fueron heterocigotas y presentaron el genotipo D/G, siendo este el 13.7% del total de las muestras analizadas para este grupo, mientras que 25 (86.2%) presentaron el genotipo silvestre D/D. En el grupo de metaplasia, 19 muestras (95%) presentaron el genotipo D/D, mientras que 1 muestra (5%) fue heterocigota presentando el genotipo D/G. En el caso del grupo de cáncer, 21 muestras (95.4%) presentaron el genotipo D/D, mientras que 1 muestra (4.5%) fue heterocigota presentando el genotipo D/G. Finalmente en el grupo de úlcera duodenal, 27 muestras (100%) presentaron el genotipo D/D. No se encontraron muestras que fueran

homocigotas y presentaran el genotipo G/G en ninguna de las patologías asociadas a la infección con *Hp*. (Tabla 3 y Figura 7).

Como puede observarse en la figura 7, la frecuencia del polimorfismo es menor que en el grupo control (gastritis no atrófica). No se encontró diferencia estadísticamente significativa ni asociación del polimorfismo con alguna de las patologías.

Tabla 3. Distribución de las variantes alélicas en TLR4 D299G en muestras de Paraguay con diferentes patologías asociadas a la infección con *Hp*.

| Grupo de Estudio (# pacientes) | D/D (%) | D/G (%) | G/G (%) | p^a | OR (95% IC) |
|-------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|------------------------|
| Gastritis no atrófica (29) | 25 (86.2) | 4 (13.7) | 0 | | |
| Metaplasia (20) | 19 (95) | 1 (5) | 0 | 0.636 | 0.32 (0.006-3.7) |
| Cáncer(22) | 21 (95.4) | 1 (4.5) | 0 | 0.375 | 0.29 (0.005-3.3) |
| Úlcera duodenal (27) | 27 (100) | 0 | 0 | 0.122 | 0 (0-1.1) |
| Total (98) | 92 (93.8) | 6 (6.1) | | | |

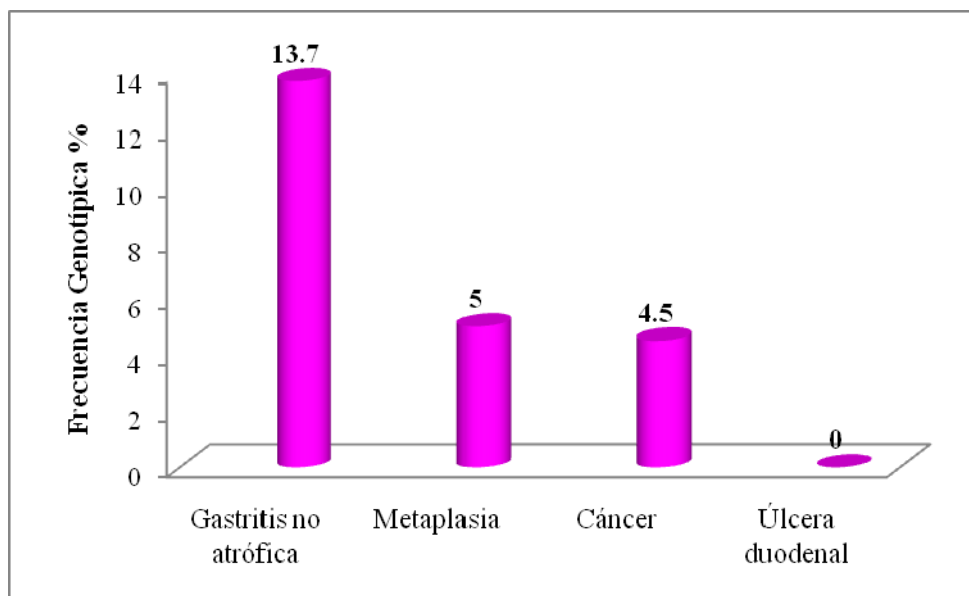


Figura 7. Porcentaje de la frecuencia genotípica diferente a la versión *wild type* de TLR4 (D299G) en población infectada con *Hp* con diversas patologías: gastritis no atrófica, metaplasia, cáncer y úlcera duodenal.

6.1.3 POLIMORFISMO TLR4/T399I

Se analizaron 217 muestras para el polimorfismo de TLR4/T399I de las cuales 137 se genotipificaron. De las 137 muestras genotipificadas; 130 (94.8%) presentaron el genotipo T/T; 7 (5.1%) presentaron el cambio de una treonina (T) por una isoleucina (I) en uno de los alelos (T/I) y el cambio de una T por una I en ambos alelos (I/I) no se encontró en ninguna de las 137 muestras analizadas (Tabla 4).

Cuando se analizó la frecuencia del polimorfismo en cada una de las patologías estudiadas se observó que en el grupo de gastritis no atrófica (grupo control), 3 muestras fueron heterocigotas y presentaron el genotipo T/I, siendo este el 6.6% del total de las muestras analizadas para este grupo, mientras que 42 muestras (93.3%) presentaron el genotipo T/T. En el grupo de metaplasia, 25 muestras (92.6%) presentaron el genotipo T/T, mientras que 2 muestras fueron heterocigotas, presentando el genotipo T/I. En el caso del grupo de cáncer, 29 muestras (96.6%) presentaron el genotipo T/T y 1 muestra (3.3%) fue heterocigota dando el genotipo T/I. Finalmente, en el grupo de úlcera duodenal, 34 muestras (97.1%) presentaron el genotipo T/T, mientras que 1 muestra (2.8%) fue heterocigota, presentando el

genotipo T/I. No se tuvo ninguna muestra homocigota y que presentara el genotipo I/I en ninguna de las patologías asociadas a la infección por *Hp* (Tabla 4 y Figura 8).

Como puede observarse en la figura 8, la frecuencia del polimorfismo en el grupo de metaplasia es mayor comparada con la del grupo de gastritis no atrófica (grupo control), aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa. La frecuencia en el grupo de cáncer y úlcera duodenal fue menor comparada con el grupo control. No se encontró asociación del polimorfismo con alguna de las patologías.

Tabla 4. Distribución de las variantes alélicas en T399I de TLR4 en muestras de Paraguay con diferentes patologías asociadas a la infección por *Hp*.

| Grupo de Estudio (# pacientes) | T/T (%) | T/I (%) | I/I (%) | p ^a | OR (95% IC) |
|-----------------------------------|---------------|------------|------------|----------------|---------------------|
| Gastritis no atrófica (45) | 42 (93.3) | 3 (6.6) | 0 | | |
| Metaplasia (27) | 25 (92.6) | 2 (7.4) | 0 | 1 | 1.1 (0.08-10.4) |
| Cáncer(30) | 29 (96.6) | 1 (3.3) | 0 | 0.646 | 0.48 (0.008-6.4) |
| Úlcera duodenal (35) | 34 (97.1) | 1 (2.8) | 0 | 0.645 | 0.48 (0.008-6.4) |
| Total (137) | 130 (94.8) | 7 (5.1) | | | |

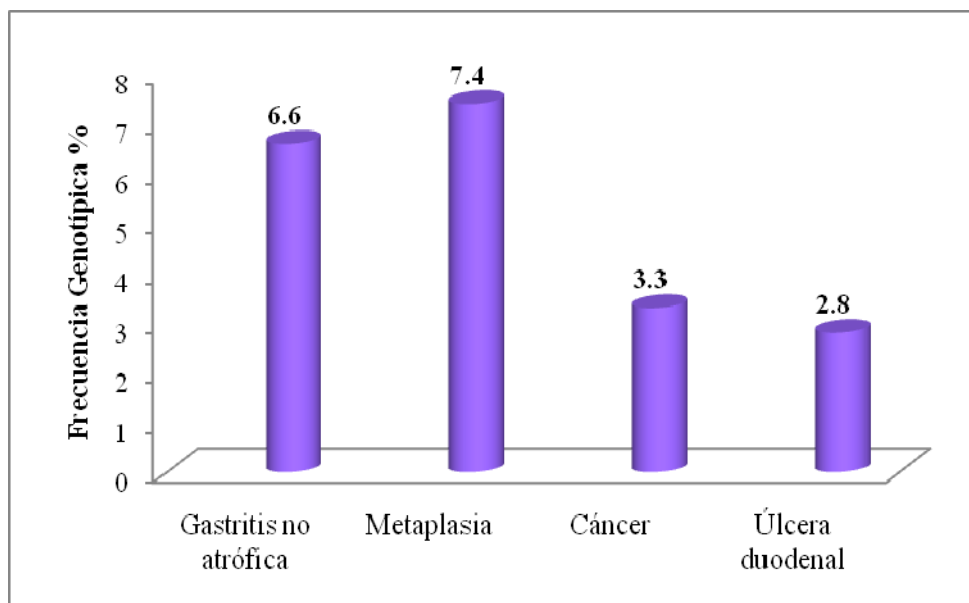


Figura 8. Porcentaje de la frecuencia genotípica diferente a la versión *wild type* de TLR4 (T399I) en población infectada con *Hp* con diversas patologías: gastritis no atrófica, metaplasia, cáncer y úlcera duodenal.

6.1.4 POLIMORFISMO TLR5/392^{STOP}

Se analizaron 217 muestras para el polimorfismo de TLR5/392^{STOP} de las cuales 121 se genotipificaron. De las 121 muestras genotipificadas; 117 (96.6%) presentaron el genotipo R/R; 4 (3.3%) presentaron el cambio de una R por un codón de paro en uno de los alelos (R/*). El cambio de una R por un codón de paro en ambos alelos (*/*) no se encontró en ninguna de las 121 muestras analizadas (Tabla 5).

Cuando se analizó la frecuencia del polimorfismo en cada una de las patologías estudiadas, se encontró que en el grupo de gastritis no atrófica (grupo control), 2 muestras fueron heterocigotas presentando el genotipo R/*, siendo este el 5.4% del total de las muestras analizadas mientras que 35 pacientes (94.6%) presentaron el genotipo R/R. En el grupo de metaplasia, 23 muestras (95.8%) presentaron el genotipo R/R, mientras que 1 muestra fue heterocigota, presentando el genotipo R/*. En el caso del grupo de cáncer, 26 muestras (93.6%) presentaron el genotipo R/R y 1 muestra (3.7%) fue heterocigota presentando el genotipo R/*. Finalmente, en el grupo de úlcera duodenal, 33 muestras (100%) presentaron el genotipo R/R, y no se encontró ninguna muestra que presentara el genotipo R/*. No se

encontró ninguna muestra homocigota y que presentara el genotipo */* en ninguna de las patologías asociadas a la infección por *Hp* (Tabla 5 y Figura 9).

Como puede observarse en la figura 9, la frecuencia del polimorfismo es menor con respecto al grupo control (gastritis no atrófica) en cada una de las patologías estudiadas, además de que no se encontró diferencia estadísticamente significativa ni asociación del polimorfismo con alguna de las patologías.

Tabla 5. Distribución de las variantes alélicas en 392^{STOP} de TLR5 en muestras de Paraguay con diferentes patologías asociadas a la infección por *Hp*.

| Grupo de Estudio (# pacientes) | R/R (%) | R/* (%) | */* (%) | p^a | OR (95% IC) |
|-------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|------------------------|
| Gastritis no atrófica(37) | 35 (94.6) | 2 (5.4) | 0 | | |
| Metaplasia (24) | 23 (95.8) | 1 (4.1) | 0 | 1 | 0.76 (0.01-15.4) |
| Cáncer(27) | 26 (93.6) | 1 (3.7) | 0 | 1 | 0.67 (0.01-13.6) |
| Úlcera duodenal (33) | 33 (100) | 0 | 0 | 0.513 | 0 (0-2.5) |
| Total (121) | 117 (96.6) | 4 (3.3) | | | |

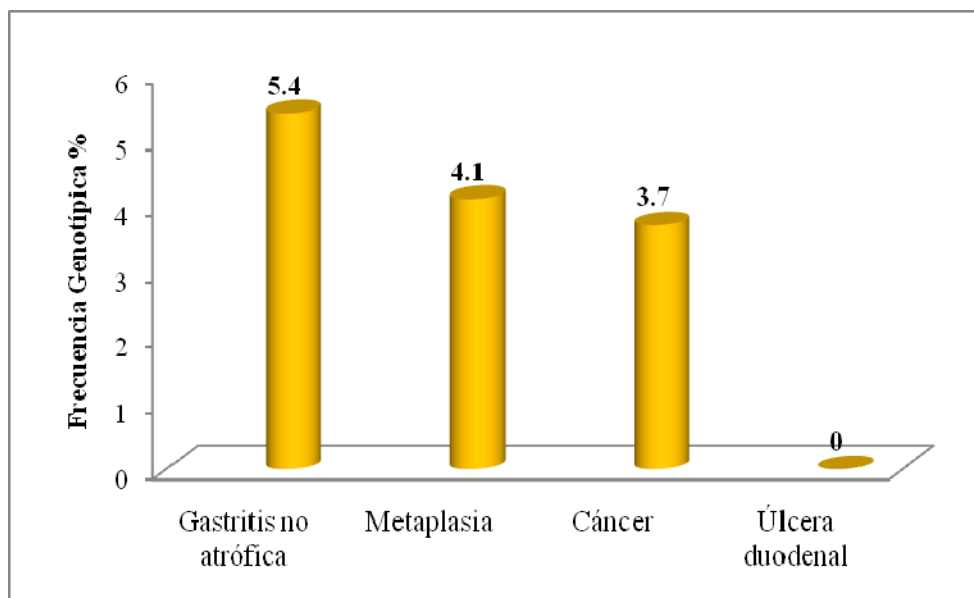


Figura 9. Porcentaje de la frecuencia genotípica diferente a la versión *wild type* de TLR5 (392^{STOP}) en población infectada con *Hp* con diversas patologías: gastritis no atrófica, metaplasia, cáncer y úlcera duodenal.

6.1.5 POLIMORFISMO DE TLR5/N592S

Se analizaron 217 muestras para el polimorfismo de TLR5/N592S de las cuales 129 se genotipificaron. De las 129 muestras genotipificadas; 126 (97.6%) presentaron el genotipo N/N; 3 (2.3%) presentaron el cambio de una asparagina (N) por una serina (S) en uno de los alelos (N/S) y el cambio de una N por una S en ambos alelos (S/S) no se encontró en ninguna de las 129 muestras analizadas (Tabla 6).

Cuando se analizó la frecuencia del polimorfismo en cada una de las patologías estudiadas, se encontró que en el grupo de gastritis no atrófica (grupo control), 1 muestra fue heterocigota presentando el genotipo N/S, siendo este el 2.5% del total de las muestras analizadas mientras que 39 muestra (97.5%) presentaron el genotipo N/N. En el grupo de metaplasia, 24 muestras (96%) presentaron el genotipo N/N, mientras que 1 muestra (4%) fue heterocigota, presentando el genotipo N/S. En el caso del grupo de cáncer, 31 muestras (100%) presentaron el genotipo N/N y no se encontró ninguna muestra con el genotipo N/S. Finalmente, en el grupo de úlcera duodenal, 32 muestras (96.9%) presentaron el genotipo N/N, y 1 muestra (3%) presentó el genotipo N/S. No se encontró ninguna muestra

homocigota y que presentara el genotipo S/S en ninguna de las patologías asociadas a la infección por *Hp* (Tabla 6 y Figura 10).

Como puede observarse en la figura 10, la frecuencia del polimorfismo en el grupo de metaplasia es mayor con respecto al grupo control (gastritis no atrófica) y disminuye en los grupos de cáncer y úlcera duodenal. No se encontró diferencia estadísticamente significativa ni asociación del polimorfismo con alguna de las patologías.

Tabla 6. Distribución de las variantes alélicas en N592S de TLR5 en muestras de Paraguay con diferentes patologías asociadas a la infección por *Hp*.

| Grupo de Estudio (# pacientes) | N/N (%) | N/S (%) | S/S (%) | p^a | OR (95% IC) |
|-------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|------------------------|
| Gastritis no atrófica (40) | 39 (97.5) | 1 (2.5) | 0 | | |
| Metaplasia (25) | 24 (96) | 1 (4) | 0 | 1 | 1.6 (0.01-130.7) |
| Cáncer (31) | 31 (100) | 0 | 0 | 1 | -- |
| Úlcera duodenal (33) | 32 (96.9) | 1 (3.0) | 0 | 1 | 1.4 (0.017-112) |
| Total (129) | 126 (97.6) | 3 (2.3) | | | |

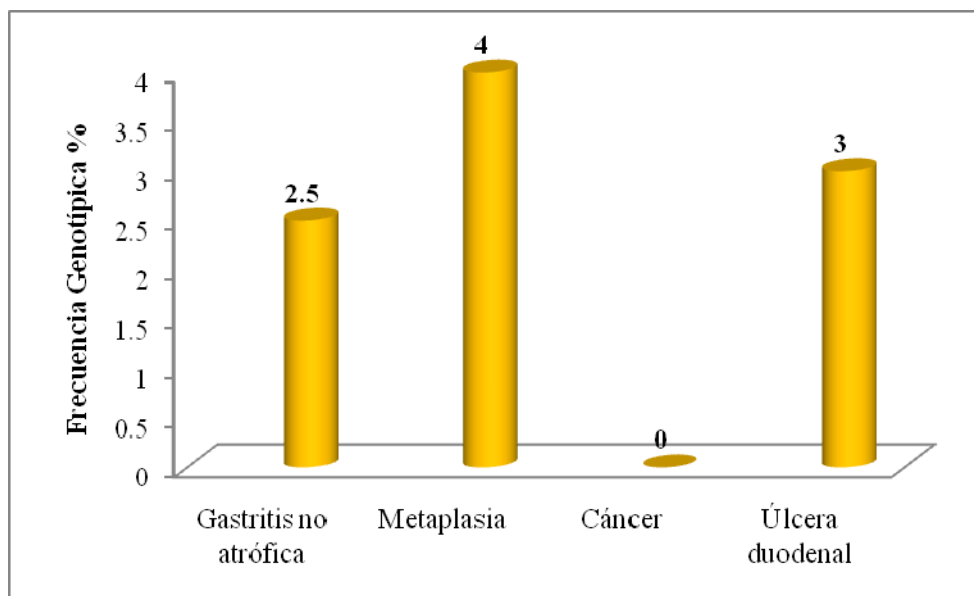


Figura 10. Porcentaje de la frecuencia genotípica diferente a la versión *wild type* de TLR5 (N592S) en población infectada con *Hp* con diversas patologías: gastritis no atrófica, metaplasia, cáncer y úlcera duodenal.

6.1.6 POLIMORFISMO TLR9/-1237 T/C

Se analizaron 217 muestras para el polimorfismo de TLR9/-1237T/C de las cuales 108 se genotipificaron. De las 108 muestras genotipificadas; 72 (66.6%) presentaron el genotipo T/T; 36 (33.3%) presentaron el cambio de una timina (T) por una citocina (C) en uno de los alelos (T/C) y el cambio de una T por una C en ambos alelos (C/C) no se encontró en ninguna de las 108 muestras analizadas (Tabla 7).

Cuando se analizó la frecuencia del polimorfismo en cada una de las patologías estudiadas, se encontró que en el grupo de gastritis no atrófica (grupo control), 8 muestras fueron heterocigotas presentando el genotipo T/C, siendo este el 22.8% del total de las muestras analizadas mientras que 27 muestras (77.1%) presentaron el genotipo T/T. En el grupo de metaplasia, 16 muestras (69.5%) presentaron el genotipo T/T, mientras que 7 muestras (30.4%) fueron heterocigotas presentando el genotipo T/C. En el caso del grupo de cáncer, 14 muestras (58.3%) presentaron el genotipo T/T, mientras que 10 muestras (41.6%) fueron heterocigotas, presentaron el genotipo T/C. Finalmente, en el grupo de úlcera duodenal, 15 muestras (57.7%) presentaron el genotipo T/T, y 11 muestras (42.3%) fueron heterocigotas,

presentando el genotipo T/C. No se encontró ninguna muestra homocigota (genotipo C/C) en ninguna de las patologías asociadas a la infección por *Hp* (Tabla 7 y Figura 11).

Como puede observarse en la figura 11, la frecuencia del polimorfismo en cada una de las patologías fue mayor con respecto al grupo control (gastritis no atrófica), observándose una frecuencia mayor en el grupo de úlcera duodenal con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.04$), con un OR de 3.7, lo que indica el riesgo a desarrollar úlcera duodenal en pacientes infectados con *Hp* en nuestra población de estudio y esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p=0.0239$) (Tabla 7).

Tabla 7. Distribución de las variantes alélicas en -1237T/C de TLR9 en muestras de Paraguay con diferentes patologías asociadas a la infección por *Hp*.

| Grupo de Estudio (# pacientes) | T/T (%) | T/C (%) | C/C (%) | p ^a | OR (95% IC) |
|-----------------------------------|--------------|--------------|------------|----------------|-----------------------------|
| Gastritis no atrófica (35) | 27 (77.1) | 8 (22.8) | 0 | | |
| Metaplasia (23) | 16 (69.5) | 7 (30.4) | 0 | 0.553 | 1.4 (0.37-5.6) |
| Cáncer (24) | 14 (58.3) | 10 (41.6) | 0 | 0.156 | 2.4 (0.67-8.7) |
| Úlcera duodenal (26) | 15 (57.7) | 11 (42.3) | 0 | 0.04 | 3.7 (1.1-13.9) 0.0239 |
| Total (108) | 72 (66.6) | 36 (33.3) | | | |

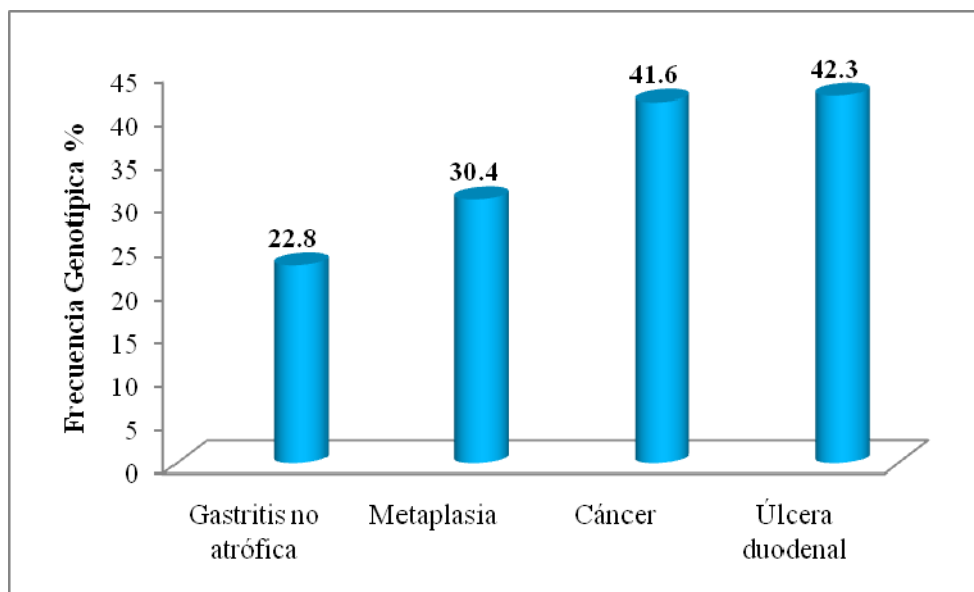


Figura 11. Porcentaje de la frecuencia genotípica diferente a la versión *wild type* de TLR9 (-1237 T/C) en población infectada con *Hp* con diversas patologías: gastritis no atrofica, metaplasia, cáncer y úlcera duodenal.

6.2 COLOMBIA

6.2.1 POLIMORFISMO TLR2 R753Q

Se analizaron 278 muestras para el polimorfismo de TLR2/R753Q de las cuales 247 se genotificaron. De las 247 muestras genotificadas; 246 (99.60%) presentaron el genotipo R/R; 1 (0.40%) presentó el cambio de una R por una Q en uno de los alelos (R/Q) y el cambio de R por Q en ambos alelos (Q/Q) no se encontró en ninguna de las 247 muestras analizadas (Tabla 8).

Cuando se analizó la frecuencia del polimorfismo en cada una de las patologías estudiadas, se encontró que en el grupo de cáncer, 1 muestra fue heterocigota y presentó el genotipo R/Q (2.5%). Para el resto de las patologías, no se detectó ninguna muestra heterocigota (Tabla 8). No se encontró diferencia estadísticamente significativa y no hubo asociación del polimorfismo con ninguna de las patologías.

Tabla 8. Distribución de las variantes alélicas en TLR2 R753Q en muestras de Colombia con diferentes patologías asociadas a la infección con *Hp*.

| Grupo de Estudio (# pacientes) | R/R (%) | R/Q (%) | Q/Q (%) | P ^a | OR (95% IC) |
|-----------------------------------|---------------|-------------|------------|----------------|----------------|
| Gastritis no atrófica (49) | 49 (100) | 0 | 0 | | |
| Atrofia (42) | 42 (100) | 0 | 0 | | -- |
| Metaplasia (62) | 62 (100) | 0 | 0 | | -- |
| Cáncer (39) | 38 (97.4) | 1 (2.5) | 0 | | -- |
| Úlcera duodenal (55) | 55 (100) | 0 | 0 | | -- |
| Total (247) | 246 (99.6) | 1 (0.40) | | | |

6.2.2 POLIMORFISMO TLR4 D299G

Se analizaron 278 muestras para el polimorfismo de TLR4/D299G de las cuales 213 se genotipificaron. De las 213 muestras genotipificadas; 204 (95.7%) presentaron el genotipo D/D; 9 (4.2%) presentaron el cambio de un D por una G en uno de los alelos (D/G) y el cambio de D por una G en ambos alelos (G/G) no se encontró en ninguna de las 213 muestras analizadas (Tabla 9).

Cuando se analizó la frecuencia del polimorfismo en cada una de las patologías estudiadas, se encontró que en el grupo de gastritis no atrófica (grupo control), 3 muestras fueron heterocigotas y presentaron el genotipo D/G, siendo este el 6.6% del total de las muestras analizadas para este grupo, mientras que 42 (93.3%) presentaron el genotipo D/D. En el

grupo de gastritis atrófica, 35 muestras (97.2%) presentaron el genotipo D/D, mientras que 1 muestra (2.7%) fue heterocigota presentando el genotipo D/G. En el caso del grupo de metaplasia, 55 muestras (94.8%) presentaron el genotipo D/D, mientras que 3 muestras (5.1%) fueron heterocigotas presentando el genotipo D/G. En el grupo de cáncer, 31 muestras (96.8%) presentaron el genotipo D/D, mientras que 1 muestra (3.1%) fue heterocigota presentando el genotipo D/G. Finalmente en el grupo de úlcera duodenal, 41 muestras (97.6%) presentaron el genotipo D/D y 1 muestra fue heterocigota presentando el genotipo D/G. No se encontraron muestras que fueran homocigotas y presentaran el genotipo G/G en ninguna de las patologías asociadas a la infección con *Hp*. (Tabla 9 y Figura 12).

Como puede observarse en la figura 12, la frecuencia del polimorfismo es mayor en el grupo control (gastritis no atrófica) con respecto a cada una de las patologías estudiadas, y aunque se observa una frecuencia mayor en el grupo de metaplasia, con respecto al grupo de gastritis atrófica, cáncer y úlcera duodenal, no se encontró diferencia estadísticamente significativa ni asociación del polimorfismo con alguna de las patologías (Tabla 9 y Figura 12).

Tabla 9. Distribución de las variantes alélicas en TLR4 D299G en muestras de Colombia con diferentes patologías asociadas a la infección con *Hp*.

| Grupo de Estudio (# pacientes) | D/D (%) | D/G (%) | G/G (%) | p^a | OR (95% IC) |
|-------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|------------------------|
| Gastritis no atrófica (45) | 42 (93.3) | 3 (6.6) | 0 | | |
| Atrofia (36) | 35 (97.2) | 1 (2.7) | 0 | 0.42 | 0.40 () |
| Metaplasia (58) | 55 (94.8) | 3 (5.1) | 0 | 0.59 | 1.6 () |
| Cáncer(32) | 31 (96.8) | 1 (3.1) | 0 | 0.73 | 0.65 () |
| Úlcera duodenal (42) | 41 (97.6) | 1 (2.3) | 0 | 0.48 | 0.43 () |
| Total (213) | 204 (95.7) | 9 (4.2) | | | |

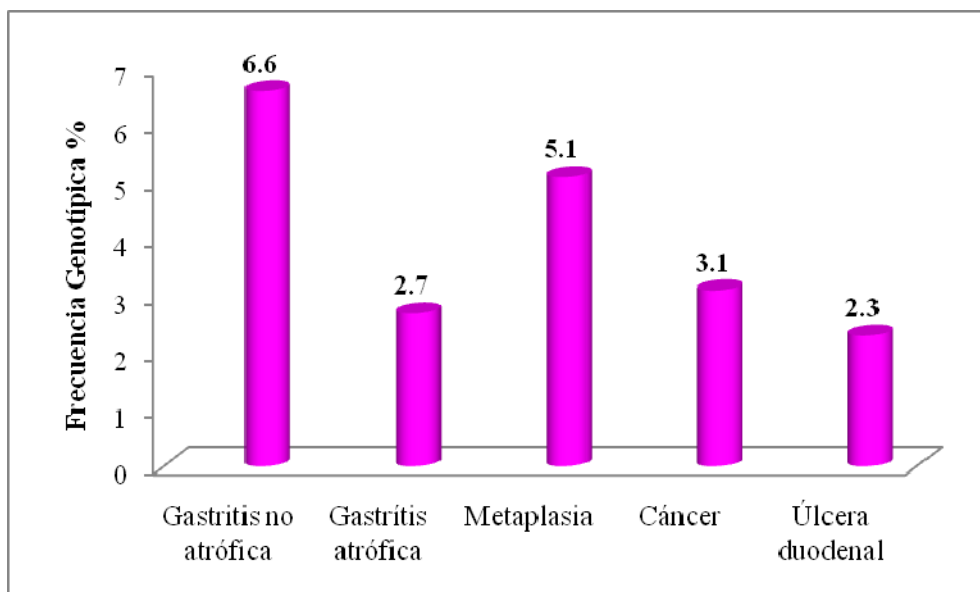


Figura 12. Porcentaje de la frecuencia genotípica diferente a la versión *wild type* de TLR4 (D299G) en población infectada con *Hp* con diversas patologías: gastritis no atrófica, gastritis atrófica, metaplasia, cáncer y úlcera duodenal.

6.2.3 POLIMORFISMO TLR4 T399I

Se analizaron 278 muestras para el polimorfismo de TLR4/T399I de las cuales 258 se genotipificaron. De las 258 muestras genotipificadas, 249 (96.5%) presentaron el genotipo T/T; 9 (3.41%) presentaron el cambio de una T por una I en uno de los alelos (T/I) y el cambio de una T por una I en ambos alelos (I/I) no se encontró en ninguno de las 258 muestras analizadas (Tabla 10).

Cuando se analizó la frecuencia del polimorfismo en cada una de las patologías estudiadas se encontró que en el grupo de gastritis no atrófica (grupo control), 2 muestras fueron heterocigotas y presentaron el genotipo T/I, siendo este el 4% del total de las muestras analizadas para este grupo, mientras que 48 muestras (96%) presentaron el genotipo T/T. En el grupo de gastritis atrófica, 40 muestras (95.2%) presentaron el genotipo T/T, mientras que 2 muestras (4.7%) fueron heterocigotas, presentando el genotipo T/I. En el grupo de metaplasia, 66 muestras (96.6%) presentaron el genotipo T/T, mientras que 3 muestras (84.3) fueron heterocigotas, presentando el genotipo T/I. En el caso del grupo de cáncer, 39 muestras (97.5%) presentaron el genotipo T/T y 1 muestra (2.5%) fue heterocigota presentando el genotipo T/I. Finalmente, en el grupo de úlcera duodenal, 56 muestras

(98.2%) presentaron el genotipo T/T, mientras que 1 muestra (1.7%) fue heterocigota, presentando el genotipo T/I. No se encontró ninguna muestra homocigota y que presentara el genotipo I/I en ninguna de las patologías asociadas a la infección por *Hp* (Tabla 10 y Figura 13).

Como puede observarse en la figura 13, la frecuencia del polimorfismo en el grupo de gastritis atrófica es un poco mayor comparada con el grupo control (gastritis no atrófica) y los demás grupos de estudio, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. En ninguna de las otras patologías se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa y no se encontró asociación del polimorfismo con alguna de las patologías estudiadas.

Tabla 10. Distribución de las variantes alélicas en T399I de TLR4 en muestras de Colombia con diferentes patologías asociadas a la infección por *Hp*.

| Grupo de Estudio (# pacientes) | T/T (%) | T/I (%) | I/I (%) | p ^a | OR (95% IC) |
|-----------------------------------|---------------|------------|------------|----------------|----------------|
| Gastritis no atrófica (50) | 48 (96) | 2 (4) | 0 | | |
| Gastritis Atrófica (42) | 40 (95.2) | 2 (4.7) | 0 | 0.96 | 1.06 () |
| Metaplasia (69) | 66 (96.6) | 3 (4.3) | 0 | 0.41 | 2.25 () |
| Cáncer(40) | 39 (97.5) | 1 (2.5) | 0 | 0.62 | 0.52 () |
| Úlcera duodenal (57) | 56 (98.2) | 1 (1.7) | 0 | 0.64 | 0.56 () |
| Total (258) | 249 (96.5) | 9 (3.4) | | | |

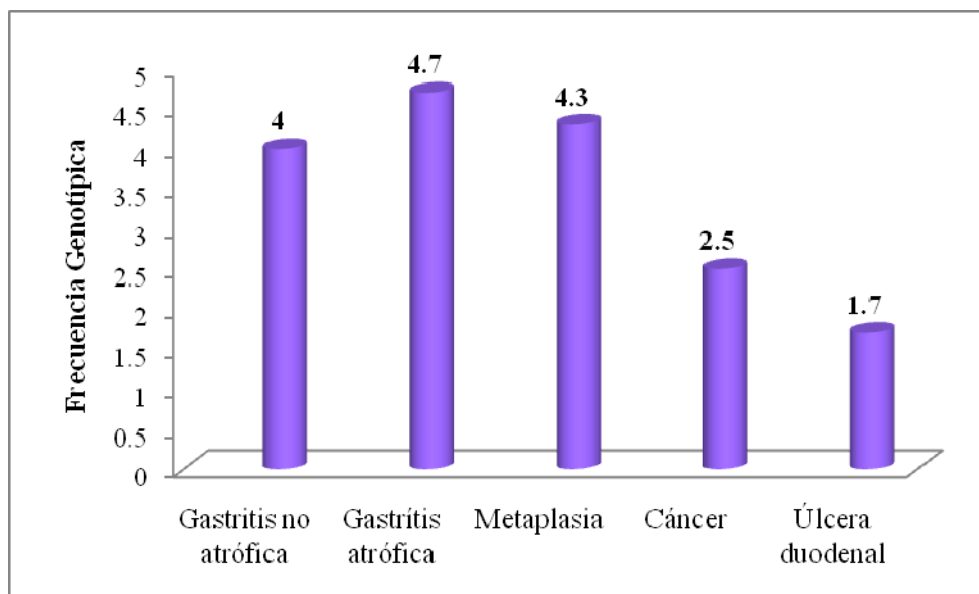


Figura 13. Porcentaje de la frecuencia genotípica diferente a la versión *wild type* de TLR4 (T399I) en población infectada con *Hp* con diversas patologías: gastritis no atrófica, gastritis atrófica, metaplasia, cáncer y úlcera duodenal.

6.2.4 POLIMORFISMO TLR5 392^{STOP}

Se analizaron 278 muestras para el polimorfismo de TLR5/392^{STOP} de las cuales 218 se genotipificaron. De las 218 muestras genotipificadas 207 (94.9%) presentaron el genotipo R/R; 11 (5.1%) presentaron el cambio de una R por una T formando un codón de paro en uno de los alelos (R/*) y el cambio de una R por una T en ambos alelos (*/*) no se encontró en ninguno de las 218 muestras analizadas (Tabla 11).

Cuando se analizó la frecuencia del polimorfismo en cada una de las patologías estudiadas, se encontró que en el grupo de gastritis no atrófica (grupo control), 2 muestras fueron heterocigotas presentando el genotipo R/*, siendo este el 4.3% del total de las muestras analizadas mientras que 44 muestras (95.6%) presentaron el genotipo R/R. En el grupo de gastritis atrófica, 33 muestras (89.1%) presentaron el genotipo R/R, mientras que 4 muestras (10.8%) fueron heterocigotas presentando el genotipo R/* y por lo tanto la formación del codón de paro. En el grupo de metaplasia, 55 muestras (96.4%) presentaron el genotipo R/R, mientras que 2 muestras fueron heterocigotas, presentando el genotipo R/* y la formación del codón de paro. Para el grupo de cáncer, 32 muestras (94.1%) presentaron el genotipo R/R y 2 muestras (5.8%) fueron heterocigotas presentando el genotipo R/* y la

formación del codón de paro. Finalmente, en el grupo de úlcera duodenal, 43 muestras (97.7%) presentaron el genotipo R/R, y 1 muestra (2.2%) fue heterocigota presentando el genotipo R/* y la formación del codón de paro. No se encontró ninguna muestra homocigota y que presentara el genotipo */* en ninguna de las patologías asociadas a la infección por *Hp* (Tabla 11 y Figura 14).

Como puede observarse en la figura 14, la frecuencia del polimorfismo en el grupo de gastritis atrófica es mayor comparada con el grupo control (gastritis no atrófica) y con los grupos de metaplasia, cáncer y úlcera duodenal, además de que la frecuencia en el grupo de cáncer es mayor que en el grupo control (gastritis no atrófica) y en metaplasia y úlcera duodenal aunque estos cambios no fueron estadísticamente significativos. No se encontró asociación del polimorfismo con alguna de las patologías estudiadas.

Tabla 11. Distribución de las variantes alélicas en 392^{STOP} de TLR5 en muestras de Colombia con diferentes patologías asociadas a la infección por *Hp*.

| Grupo de Estudio (# pacientes) | R/R (%) | R/* (%) | */* (%) | p ^a | OR (95% IC) |
|-----------------------------------|---------------|-------------|------------|----------------|----------------|
| Gastritis no atrófica (46) | 44 (95.6) | 2 (4.3) | 0 | | |
| Gastritis Atrófica (37) | 33 (89.1) | 4 (10.8) | 0 | 0.29 | 2.63 () |
| Metaplasia (57) | 55 (96.4) | 2 (3.5) | 0 | 0.85 | 0.82 () |
| Cáncer(34) | 32 (94.1) | 2 (5.8) | 0 | 0.66 | 1.35 () |
| Úlcera duodenal (44) | 43 (97.7) | 1 (2.2) | 0 | 0.49 | 0.39 () |
| Total (218) | 207 (94.9) | 11 (5.1) | | | |

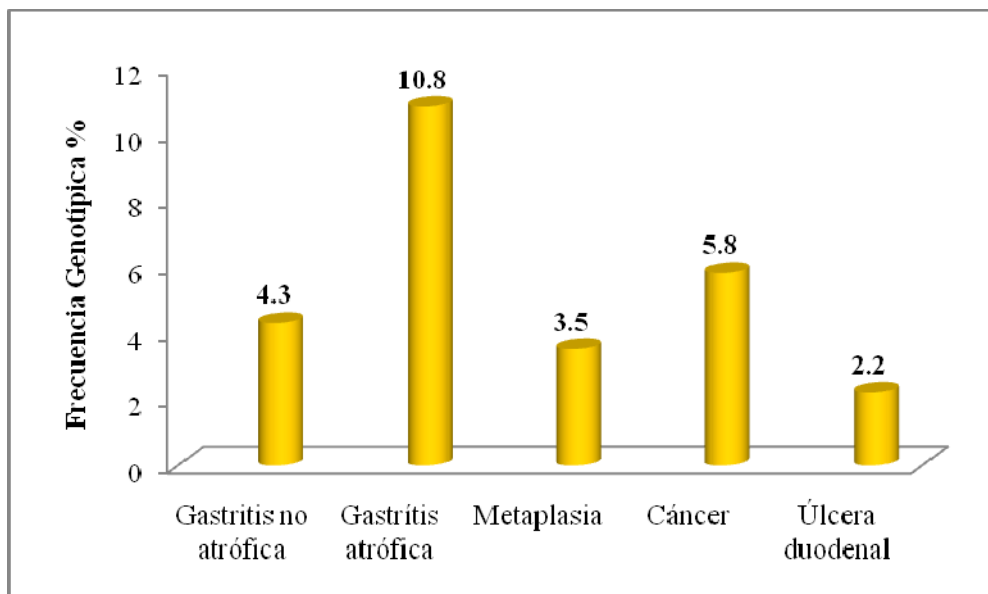


Figura 14. Porcentaje de la frecuencia genotípica diferente a la versión *wild type* de TLR5 (392^{STOP}) en población infectada con *Hp* con diversas patologías: gastritis no atrófica, gastritis atrófica, metaplasia, cáncer y úlcera duodenal.

6.2.5 POLIMORFISMO DE TLR5 N592S

Se analizaron 278 muestras para el polimorfismo de TLR5/N592S de las cuales 239 se genotipificaron. De las 239 muestras genotipificadas 238 (99.5%) presentaron el genotipo N/N; 1 muestra (0.5%) presentó el cambio de una N por una S en uno de los alelos (N/S) y el cambio de una N por una S en ambos alelos (S/S) no se encontró en ninguna de las 239 muestras analizadas (Tabla 12).

Cuando se analizó la frecuencia del polimorfismo en cada una de las patologías estudiadas, se encontró que en el grupo úlcera duodenal, 1 muestra fue heterocigota presentando el genotipo N/S, siendo este el 2% del total de las muestras analizadas mientras que 48 muestras (98%) presentaron el genotipo N/N. Para el resto de las patologías, no se detectó ninguna muestra heterocigota (Tabla 8) además de no encontrarse diferencia estadísticamente significativa. No se encontró asociación del polimorfismo con ninguna de las patologías.

Tabla 12. Distribución de las variantes alélicas en N592S de TLR5 en muestras de Colombia con diferentes patologías asociadas a la infección por *Hp*.

| Grupo de Estudio (# pacientes) | N/N (%) | N/S (%) | S/S (%) | p^a | OR (95% IC) |
|-------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|------------------------|
| Gastritis no atrófica (47) | 47 (100) | 0 | 0 | | |
| Gastritis Atrófica (42) | 42 (100) | 0 | 0 | 0.625 | -- |
| Metaplasia (63) | 63 (100) | 0 | 0 | 0.563 | -- |
| Cáncer (38) | 38 (100) | 0 | 0 | 0.634 | -- |
| Úlcera duodenal (49) | 48 (97.96) | 1 (2.0) | 0 | | -- |
| Total (239) | 238 (99.5) | 1 (0.42) | | | |

6.2.6 POLIMORFISMO TLR9 -1237 T/C

Se analizaron 278 muestras para el polimorfismo de TLR9/-1237T/C de las cuales 221 genotipificaron. De las 221 muestras genotipificadas 186 (84.1%) presentaron el genotipo T/T; 34 (15.3%) presentaron el cambio de una T por una C en uno de los alelos (T/C) y el cambio de una T por una C en ambos alelos (C/C) se encontró en 1 muestra (0.41%) de las 221 muestras analizadas (Tabla 13).

Cuando se analizó la frecuencia del polimorfismo en cada una de las patologías estudiadas, se encontró que en el grupo de gastritis no atrófica (grupo control), 7 muestras fueron heterocigotas presentando el genotipo T/C, siendo este el 17% del total de las muestras analizadas mientras que 33 muestras (80.4%) presentaron el genotipo T/T. En el grupo de

gastritis atrófica, 26 muestras (74.2%) presentaron el genotipo C/C, mientras que 9 muestras (25.7%) fueron heterocigotas presentando el genotipo T/C. En el grupo de metaplasia, 55 muestras (88.7%) presentaron el genotipo T/T, mientras que 7 muestras (11.2%) fueron heterocigotas presentando el genotipo C/T. En el caso del grupo de cáncer, 30 muestras (83.3%) presentaron el genotipo T/T, mientras que 6 muestras (16.6%) fueron heterocigotas, presentaron el genotipo T/C. Finalmente, en el grupo de úlcera duodenal, 42 muestras (89.3%) presentaron el genotipo T/T, y 5 muestras (10.6%) fueron heterocigotas, presentando el genotipo T/C. Se encontró una sola muestra homocigota y que presentó el genotipo C/C (2.4%) la cual estuvo en el grupo control (gastritis no atrófica). Para el resto de las patologías asociadas a la infección por *Hp*, no se encontró homocigocidad (Tabla 13 y Figura 15).

Como puede observarse en la figura 15, la frecuencia del polimorfismo T/C en el grupo de gastritis atrófica es mayor comparada con el grupo control (gastritis no atrófica). Para el resto de las patologías, se observa una variación entre cada grupo pero ninguna de estas variaciones fue estadísticamente significativa y no se encontró asociación del polimorfismo con ninguna de las patologías (Tabla 13 y figura 15). Como sólo se encontró un paciente homocigoto (C/C) y se localiza en el grupo control (gastritis no atrófica), se necesita un mayor número de muestras para tener una diferencia estadísticamente significativa y por lo tanto una asociación.

Tabla 13. Distribución de las variantes alélicas en -1237T/C de TLR9 en muestras de Colombia con diferentes patologías asociadas a la infección por *Hp*.

| Grupo de Estudio (# pacientes) | T/T (%) | T/C (%) | C/C (%) | p^a | OR (95% IC) |
|-------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|------------------------|
| Gastritis no atrófica (41) | 33 (80.4) | 7 (17.0) | 1 (2.4) | | |
| Gastritis Atrófica (35) | 26 (74.2) | 9 (25.7) | 0 | 0.73 | 1.21 () |
| Metaplasia (62) | 55 (88.7) | 7 (11.2) | 0 | 0.26 | 0.52 () |
| Cáncer (36) | 30 (83.3) | 6 (16.6) | 0 | 0.7 | 0.78 () |
| Úlcera duodenal (47) | 42 (89.3) | 5 (10.6) | 0 | 0.2 | 0.45 () |
| Total (221) | 186 (84.1) | 34 (15.3) | 1 (0.45) | | |

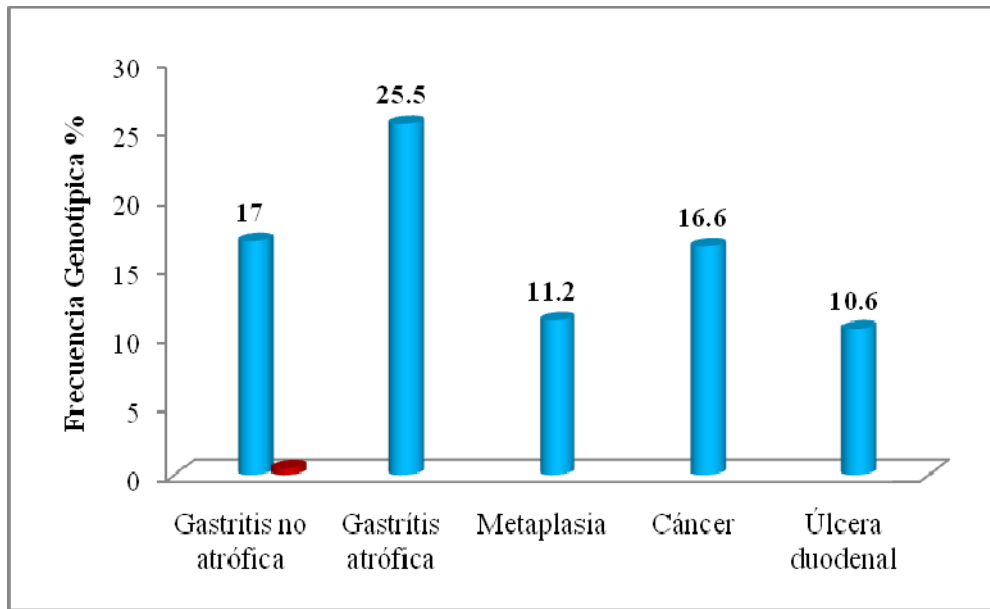


Figura 15. Porcentaje de la frecuencia genotípica diferente a la versión *wild type* de TLR9 (-1237 T/C) en población infectada con *Hp* con diversas patologías: gastritis no atrófica, metaplasia, cáncer y úlcera duodenal.

7. DISCUSION

Hp es una bacteria que infecta alrededor del 50% de la población mundial y solamente del 10 al 20% desarrollan alguna patología, la infección por este bacilo, se ha asociado a un fenómeno inflamatorio crónico y las consecuencias clínicas son el desarrollo de úlcera duodenal, atrofia gástrica y cáncer gástrico (Perez-Perez, 2004 y Sipponen, 1992). La manera en la que una infección crónica puede llevar a desarrollar estas patologías puede estar dada por la diversidad genética de la bacteria y por sus diferentes factores de virulencia que hasta la fecha ha sido lo más estudiado. Otra manera, es la variabilidad genética del hospedero la cual puede modificar la respuesta inmune durante la infección con *Hp*, y tener como consecuencia una insuficiencia en el control de la infección o debido a la desregulación de la respuesta inflamatoria el daño crónico en la mucosa gástrica (El-Omar, 2000 y Li, 2005)

Los TLRs son receptores que participan en la respuesta inmune innata y tienen la capacidad de reconocer estructuras de microorganismos patógenos como es el caso de *Hp*, induciendo la activación de varios genes provocando la producción de mediadores inflamatorios que son los principales causantes del daño inducido en las patologías asociadas a *Hp*.

Las modificaciones que pueden sufrir cualquiera de los componentes de la respuesta inflamatoria están asociados con las patologías causadas por la infección, un ejemplo de esto es lo que se encontró en población asiática y europea donde se observó que los polimorfismo en IL-1 y TNF- α están asociados a un mayor riesgo a desarrollar cáncer gástrico y úlcera péptica (El-Omar, 2000 y Li, 2005). Se ha demostrado que los TLRs tienen la capacidad de reconocer estructuras de *Hp* como son el LPS, la flagelina y ADN (Maeda, 2004, Smith, 2003, Gewirtz, 2004, Pérez-Pérez, 1995, Torok 2005) y así poder inducir la activación de NF- κ B para iniciar la síntesis de citocinas como IL-1 β , TNF- α , IL-8 e IL-10.

Debido a que los TLRs son componentes de la respuesta inmune innata y participan en la dirección de la respuesta inmune adaptativa, se considera que la variación genética de estos receptores puede causar alteraciones en el reconocimiento de sus ligandos, en las vías de

señalización y por consiguiente en la síntesis de mediadores de la respuesta inflamatoria. Algunos autores han considerado que puede ser un factor de riesgo para desarrollar sépsis (Schwartz, 2002, Schmitt, 2002, Arbour, 2000, Lorenz, 2000, Lorenz, 2001, Lorenz, 2002). Se considera que los polimorfismos en esos receptores pueden tener un papel importante en el aumento de las patologías causadas por la infección de *Hp*, así como en la evolución de la enfermedad.

7.1 POLIMORFISMO TLR2 R753Q

En los resultados obtenidos durante este trabajo, se observó que solamente un paciente presentaba la variación genética en uno de los alelos (753Q). La frecuencia de este polimorfismo en otras poblaciones es menor al 3%, en nuestro estudio en población paraguaya y en población colombiana la frecuencia fue similar 2.7% y 0.4% respectivamente, lo que demuestra que hay poca variación genética en nuestros grupos de estudio. Para poder confirmar esto, es necesario aumentar el número de muestras de ambas poblaciones.

7.2 POLIMORFISMO TLR4 D299G Y T399I

La sustitución de una D por una G en el aa 299 se ha asociado a un mayor riesgo de contraer infecciones por bacterias Gram negativas y a una respuesta inflamatoria disminuida (Schwartz, 2002, Schmitt, 2007), además de que se ha asociado con linfoma MALT (Hellming, 2005), atrofia y cáncer gástrico (Hold, 2007) y en niños a infecciones por bacterias *cagA+* de *Hp* (Moura, 2008). En este trabajo en la población paraguaya analizada, se encontró una mayor frecuencia del polimorfismo en pacientes con gastritis no atrófica (grupo control), comparada con pacientes con metaplasia, cáncer gástrico y úlcera duodenal. En la población colombiana analizada, igualmente la frecuencia más alta se encontró en el grupo control (gastritis no atrófica) seguida del grupo de metaplasia, cáncer, gastritis atrófica y finalmente la frecuencia más baja en el grupo de úlcera duodenal, lo que no concuerda con los estudios previamente publicados. Consideramos que se requiere aumentar el tamaño de muestra para corroborar estos hallazgos..

Los resultados encontrados para TLR4 T399I en la población paraguaya, muestran una mayor frecuencia del polimorfismo en el grupo de metaplasia comparado con el grupo de gastritis no atrófica (grupo control) y una frecuencia menor en cáncer gástrico y úlcera duodenal; lo que podría provocar que los pacientes que poseen este polimorfismo presenten una protección a desarrollar estas patologías, aun cuando las diferencias no fueron estadísticamente significativas ni se encontró asociación. En la población colombiana analizada, la mayor frecuencia se encontró en el grupo de gastritis atrófica y metaplasia comparada con el grupo control y una disminución en los grupos de cáncer y úlcera duodenal. Dado que este polimorfismo se ha asociado con una disminución de la respuesta inflamatoria, también se podría asociar a una mayor susceptibilidad a infección por las cepas más virulentas de *Hp*, que en aquellas que no presentan el polimorfismo. Es probable que puedan erradicarse este tipo de cepas porque su respuesta inmune es normal, y en las personas que presentan el polimorfismo como su respuesta inmune este modificada, puede haber una falla en el control de la infección, permitiendo el establecimiento de la bacteria en el epitelio gástrico, llevando así a una mayor exposición de los factores de virulencia de la bacteria y por lo tanto al desarrollo de las patologías más severas.

Una respuesta inadecuada debida a los cambios en el dominio extracelular de TLR4 donde se localizan las regiones 299 y 399 pueden alterar la capacidad del epitelio gástrico de interactuar con *Hp*, induciendo daño y predisposición al desarrollo de las diferentes enfermedades gastroduodenales asociadas a *Hp* (Trejo, 2008).

7.3 POLIMORFISMO TLR5 392^{STOP} Y N592S

Se ha demostrado que *Hp* necesita de sus flagelos para una colonización eficiente y para mantener la infección en el epitelio gástrico (Eaton, 1996). Existen diferentes estudios y hay controversia sobre el reconocimiento de *Hp* vía TLR5, debido a que algunos autores dicen que TLR5 es capaz de reconocer la flagelina de *Hp* y otros dicen lo contrario, uno de estos estudios demostró que la flagelina de *Hp* juega un papel muy importante en la progresión de la enfermedad mediante la producción de IL-8 cuando se estimularon células con diferentes fragmentos de flagelina de *Hp* (Hayashi, 2001). Otro estudio, demostró que las células

epiteliales gástricas expresan TLR5 y responden a *Hp* a través de este receptor (Smith, 2003).

No se tiene mucha evidencia sobre cómo afectan los polimorfismos estudiados en la progresión de las enfermedades asociadas a la infección por *Hp*, pero uno de estos estudios demostró que no existe asociación de los polimorfismos en este gen con el desarrollo de úlcera duodenal en niños con infección de *Hp* (Moura, 2008). Las investigaciones que se tienen sobre estos polimorfismos son con fiebre tifoidea (Dunstan, 2005), Neumonía (Haw, 2003) y lupus eritematoso (Hawn, 2005); donde el polimorfismo con mayor frecuencia y mayor impacto en estas enfermedades es el que forma el codón de paro (392^{STOP}). Si extrapolamos nuestros resultados teniendo como base los anteriormente mencionados, en la población de Paraguay estudiada, encontramos una mayor frecuencia en el grupo control (gastritis no atrófica) y ésta disminuye en el grupo de metaplasia y cáncer y no se encontraron muestras polimórficas en el grupo de úlcera duodenal y por el contrario, en la población de Colombia analizada, la mayor frecuencia se localizó en el grupo de gastritis atrófica y una baja frecuencia en el grupo control (gastritis no atrófica), metaplasia, cáncer y úlcera duodenal.

El polimorfismo N592S presenta una baja frecuencia en las poblaciones estudiadas, además de que no presenta una función relevante cuando se transfectaron células CHO-K1 (Merx, 2005). En la población de Paraguay estudiada la mayor frecuencia se encontró en el grupo de metaplasia. En el grupo de cáncer y úlcera duodenal, no se encontraron pacientes polimórficos. En la población de Colombia estudiada, solo se tuvo un paciente polimórfico localizado en el grupo de úlcera duodenal; estos resultados de ambas poblaciones, podrían sugerirnos que la presencia de este polimorfismo no altera la progresión de la enfermedad, para poder confirmar esto, es necesario aumentar el número de muestras de ambas poblaciones para tener un mejor resultado.

7.4 POLIMORFISMO TLR9 -1237T/C

TLR9 es parcialmente responsable de iniciar la respuesta inmune inducida por bacterias mediante la unión de motivos CpG no metilados, los cuales son abundantes en las bacterias. El polimorfismo -1237T/C localizado dentro del promotor de este receptor está asociado con una variedad de desordenes inflamatorios, como son el asma y enfermedad de Crohn. El análisis *in silico* del promotor de TLR9 ha demostrado que la variante alélica 'C' en la posición -1237 crea una potente unión de NF- κ B la cual puede incrementar la actividad transcripcional del gen (Ng, 2009). Esta unión aumenta la actividad transcripcional de *TLR9* y afecta la unión CpG-ADN, induciendo la activación de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias y la respuesta inmune adaptativa (Hamann, 2006). En la población de Paraguay estudiada, encontramos un aumento de la frecuencia del polimorfismo en cada una de las patologías estudiadas de forma comparativa con gastritis no atrófica y en úlcera duodenal, esta frecuencia fue estadísticamente significativa ($p=0.04$). También se encontró que la población estudiada presenta un OR de 3.7 (95% IC 1.1-13.9) por lo que pueden tener mayor riesgo a desarrollar úlcera duodenal cuando se tiene el polimorfismo, esto podría indicarnos que las personas que presentan el cambio de una T por una C en la posición -1237 del promotor del *tlr9* pueden presentar una respuesta exacerbada, y esto puede estar dado por el aumento de la actividad transcripcional de *TLR9* impulsada principalmente por la activación de NF- κ B (Ng, 2009), provocando que se rompa el equilibrio en la mucosa gástrica, lo que llevaría al desarrollo de úlcera duodenal. Un estudio realizado en el 2009 (Hold, 2009), mostró que no se observó asociación de este polimorfismo y el desarrollo de cáncer gástrico y en nuestros resultados obtenidos con la población de Paraguay encontramos un aumento de la frecuencia del polimorfismo en el grupo de cáncer, sin embargo no fue estadísticamente significativa. Esto puede ser porque la presencia del polimorfismo solo puede ser un factor de riesgo en los estadios tempranos del desarrollo de la enfermedad y en la progresión a úlcera duodenal, además de ser importante en definir la respuesta inmune del hospedero hacia la infección por *Hp*.

En la población colombiana analizada, observamos un aumento de la frecuencia en el grupo de gastritis atrófica y cáncer comparadas con el grupo control (gastritis no atrófica) y una

disminución en el grupo de metaplasia y úlcera duodenal, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo de acuerdo a los resultados obtenidos por Hold, podríamos sugerir que en esta población, la presencia del polimorfismo puede llevar desarrollar cáncer, para poder confirmar esto, es necesario aumentar el número de muestras. Por otro lado, solo se detectó un solo paciente que presentó el cambio -1237C/C (tabla 13) el cual se localizó en el grupo control (gastritis no atrófica), es necesario aumentar el número de muestras para identificar un número mayor de casos.

Se sabe que *Hp* puede inducir tanto una respuesta humoral, como una celular y con las investigaciones se ha demostrado que *Hp* puede invadir células epiteliales *in vitro* (Amieva, 2002) e *in vivo* en el estómago de humanos y monos (Semino-Mora, 2003). Las células dendríticas, las cuales expresan una variedad de TLRs, incluyendo TLR9, son un grupo importante de células presentadoras de antígeno dentro de la lámina propia gástrica. Una vez estimuladas, las células dendríticas direccionan la respuesta inmune y la estimulación de células dendríticas humanas ha demostrado que responden directamente hacia *Hp* (Guiney, 2003). Se cree que una expresión alta de TLR9 incrementa la sensibilidad del hospedero hacia CpG-ADN de *Hp* y esto amplifica el efecto del fenotipo inflamatorio Th-1 durante la infección (Krug, 2001). Además, la activación de TLR9 estimula la producción de IL-12/IFN- γ , la cual inhibe la expresión del receptor de IgE en células dendríticas (Krug, 2001) y por el contrario, se ha observado que la expresión de la variante 'C' en TLR9 -1237 que también incrementa la expresión de TLR9 no tiene efecto en los niveles de IgE en suero (Berghofer, 2005 y Noguchi, 2004). Con estos antecedentes, es posible que el alelo 'C' de TLR9 -1237 pueda ser un factor de riesgo durante el estado de inflamación crónica que llevaría al desarrollo de cáncer gástrico y úlcera duodenal inducido por la infección de *Hp*.

8. CONCLUSIONES

- La frecuencia del polimorfismo -1237 T/C de TLR9 fue mayor en los pacientes con úlcera duodenal en la población estudiada de Paraguay, presenta un riesgo de 3.7 veces al desarrollo de úlcera duodenal cuando presentan el cambio de una T/C en la región -1237 del promotor de TLR9.
- En la población estudiada de Colombia, la frecuencia del polimorfismo -1237 T/C de TLR9 no presentó diferencia estadísticamente significativa ni asociación con las patologías asociadas a la infección con *Hp*
- La frecuencia de los polimorfismos en los genes de los receptores TLR2, TLR4 y TLR5 fue baja en las poblaciones de Paraguay y Colombia estudiadas y no se observó asociación de los polimorfismos en los receptores con ninguna de las patologías producida por la infección de *Hp* en ninguna de las dos poblaciones estudiadas.

9. PERSPECTIVAS

1. Con los resultados obtenidos consideramos que es necesario aumentar el tamaño de muestra para poder observar diferencias significativas.
2. Será conveniente estudiar el efecto que tienen los diferentes polimorfismos en la respuesta inflamatoria a través del estudio del patrón de citocinas que se inducen.

10. BIBLIOGRAFIA

- Achyut BR, Goshal UC, Moorchung N, Mittal B. Association of Toll-like receptor 4 (Asp299Gly and Thr399Ileu) gene polymorphisms with gastritis and precancerous lesions, *Hum Immunol*, 2007; 68:901–907.
- Aderem A, Ulevitch R. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response, *Nature*, 2000; 406; 782-787.
- Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling, *Nature Reviews*, 2004; 4:499-511.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124(4):783-801.
- Akira S. Pathogen recognition by innate immunity and its signaling, *Proc Jpn Acad*, 2009; 85:143-156.
- Amieva MR, Salama NR, Tompkins LS, Falkow S. *Helicobacter pylori* enter and survive within multivesicular vacuoles of epithelial cells. *Cell. Microbiol*, 2002; 4:677-690.
- Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness, *Nat Genet*, 2000; 25:187-191.
- Atherton JC, Peek RM, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathologic importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 1997; 112:92-99.
- Bamford KB, Fan X, Crowe SE, Leary JF, Gourley WK, Luthra GK, Brooks EG, Graham DY, Reyes VE, Erns PB. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology*, 1998; 114(3):482-492.

- Berghofer B, Frommer T, König IR, Ziegler A, Chakraborty T, Bein G, Hackstein H. Common human toll-like receptor 9 polymorphisms and haplotypes: Association with atopy and functional relevance, *Clin. Exp. Allergy*, 2005; 35:1147-1154.
- Brikos C, O'Neill LA. Signalling of toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol*, 2008; 183:21-50.
- Camorlinga-Ponce M, Torres J, Pérez-Pérez G, Leal-Herrera Y, González-Ortiz B, Madrazo de la Garza A, Gomez A, Muñoz O. Validation of a serologic test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and the immune response to ureasa and CagA in children, *Am. J Gastroenterology*, 1999, 93(8);1264-1270.
- Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. CagA Pathogenicity Island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1996; 93:14648–14653.
- Chang YJ, Wu MS, Lin JT, Chen CC. Helicobacter pylori-Induced invasion and angiogenesis of gastric cells is mediated by cyclooxygenase-2 induction through TLR2/TLR9 and promoter regulation. *J Immunol*, 2005; 175(12):8242-8252.
- Corr SC, O'Neill LAJ. Genetic variation in Toll-like receptor signalling and the risk of inflammatory and immune diseases, *J Innate Immun*, 2009; 1:350–357
- Correa P, Piazzuelo MB, Camargo MC. Etiopathogenesis of gastric cancer. *Scand J Surg*, 2006; 95(4):218-224.
- Correa P. Helicobacter pylori and gastric cancer: state of the art. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1996; 5(6):477-481.
- Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burrone D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N, et al. Molecular characterization of the 128-kD immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad*, 1993; 90:5791-5795.

- Dunstan SJ, Hawn TR, Hue NT, Parry CP, Ho VA, Vinh H, Diep TS, House D, Wain J, Aderem A, Hien TT, Farrar JJ. Host susceptibility and clinical outcomes in Toll-like receptor 5-deficient patients with typhoid fever in Vietnam, 2005, *J Infect Dis*; 191:1068–1071.
- Eaton KA, Dewhirst FE, Paster BJ, Tzellas N, Coleman BE, Paola J, Sherding R. Prevalence and varieties of *Helicobacter* species in dogs from random sources and pet dogs: animal and public health implications, 1996; 34(12):3165-3170.
- El-Omar EM, Crignton MM, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Matin M, Fraumeni JF Jr, Rabkin CS. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer, *Nature*, 2000; 404:398-402.
- Fan X, Gunasena H, Cheng Z. *Helicobacter pylori* urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis. *J Immunol*, 2000; 165:1918-1924.
- Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol*, 2006;7(12):1250-1257.
- Fuentes-Pananá E, Camorlinga-Ponce M, Maldonado-Bernal C. Infection, Inflammation and gastric cáncer, *Salud Pública Mex*, 2009; 51(5):427-433.
- Garza-Gonzalez E, Bosques-Padilla FJ, Mendoza-Ibarra SI, Flores-Gutierrez JP, Maldonado-Garza HJ, Perez-Perez GI. Assessment of the toll-like receptor 4 Asp299Gly, Thr399Ile and interleukin-8 -251 polymorphisms in the risk for the development of distal gastric cancer, *BMC Cancer*. 2007; (26):7-70.
- Gewirtz AT, Yu Y, Krishna US, Israel DA, Lyons SL, Peek RM. *Helicobacter pylori* flagellin evades Toll-like receptor 5-mediated innate immunity, *J Infect Dis*, 2004; 189:1914-1920.

- Gibson and Muse. A primer of genome science, 2nd edition, Sanauer Associates, 2002.
- Guiney DG, Hasegawa P, Cole SP. *Helicobacter pylori* preferentially induces interleukin 12 (IL-12) rather than IL-6 or IL-10 in human dendritic cells. *Infect. Immun*, 2003; 71:4163-4166.
- Guízar-Vázquez JJ. *Genética Clínica: Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias*. 3^a ed. México: El Manual Moderno; 2001.
- Hamann LC, Glaeser A, Hamprecht M, Gross A, Gomma, Schumann RR, Toll-like receptor (TLR)-9 promoter polymorphisms and atherosclerosis, *Clin. Chim. Acta*, 2006;364:303-307.
- Han J, Ulevitch RJ. Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. *Nat Immunol*, 2005; 6(12):1198-1205.
- Harris PR, Cover TL, Crowe DR, Orenstein JM, Graham MF, Blaser MJ, Smith PD. *Helicobacter pylori* cytotoxin induces vacuolation of primary human mucosal epithelial cells. *Infect Immun*, 1996; 64:4867-4871.
- Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, Laws RJ, Skerrets J, Beutler B, Schroeder L, Nachlan A, Olinsky A, Smith KD, Aderem A. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med*, 2003; 198(10):1563-1572.
- HawnT, Wu H, Grossman J, Hahn B, Tsao B, Aderem A. A stop codon polymorphism of Toll-like receptor 5 is associated with resistance to systemic lupus erythematosus, *PNAS*, 2005; 102(30):10593–10597.
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A, *Nature*, 2001; 410:1099–1103.

- Hellmig S, Fischbach W, Goebeler-Kolve ME, Folsch UR, Hampe J, Schreiber S. Association study of a functional Toll-like receptor 4 polymorphism with susceptibility to gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 2005; 46(6):869-872.
- Hernández F, Moge-Najera J. Ultrastructure of the bacteria *Campylobacter* and *Helicobacter*: implication for the phylogeny of mammal gastric bacteria. *Rev Biol Trop*, 1994; 42:S85-S92.
- Hofner P, Gyulai Z, Kiss ZF, Tiszai A, Tiszlavicz L, Tóth G, Szőke D, Molnár B, Lonovics J, Tulassay Z, Mándi Y. Genetic polymorphisms of NOD1 and IL-8, but not polymorphisms of TLR4 genes, are associated with *Helicobacter pylori*-induced duodenal ulcer and gastritis, *Helicobacter*. 2007; 12(2):124-131.
- Hold GL, Rabkin CS, Chow WH, Smith MG, Gammon MD, Risch HA, Vaughan TL, McColl KE, Lissowska J, Zatonski W, Schoenberg JB, Blot WJ, Mowat NA, Fraumeni JF Jr, El-Omar EM. A functional polymorphism of toll-like receptor 4 gene increases risk of gastric carcinoma and its precursors. *Gastroenterology*, 2007; 132(3):905-912.
- Hold GL, Rabkin CS, Gammon MD, Berry SH, Smith MG, Lissowska J, Risch HA, Chow WH, Mowat NA, Vaughan TL, El-Omar EM. CD14-159C/T and TLR9-1237T/C polymorphisms are not associated with gastric cancer risk in Caucasian populations, *Eur J Cancer Prev*. 2009; 18(2):117-119.
- Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition, *Anu Rev Immunol*, 2002; 20:197-216.
- Kang TJ, Lee SB, Chae GT. A polymorphisms in the Toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in the lepromatous leprosy, *Cytokine*, 2001; 20:56-62.

- Kato I, Canzian F, Plummer M, Franceschi S, van Doorn LJ, Vivas J, Lopez G, Lu Y, Gioia-Patricola L, Severson RK, Schwartz AG, Muñoz N. Polymorphisms in genes related to bacterial lipopolysaccharide/peptidoglycan signaling and gastric precancerous lesions in a population at high risk for gastric cancer, *Dig Dis Sci.* 2007; 52(1):254-261.
- Kawahara T, Teshima S, Oka A, Sugiyama T, Kishi K, Rokutan K. Type I *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide stimulates toll-like receptor 4 and activates mitogen oxidase 1 in gastric pit cells. *Infect Immun*, 2001; 69(7):4382-4389.
- Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol*, 2007; 19(1):24-32.
- Krug AA, Towarowski S, Britsch S, Rothenfusser V, Hornung R, Bals T, Giese H, Engelmann S, Endres A, Krieg M, Hartmann G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur. J. Immunol*, 2001; 31:3026-3037.
- Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev*, 2006; 19(3):449-490.
- Lazarus R, Klimecki WT, Raby BA, Vercelli D, Palmer LJ, Kwiatkowski DJ, Silverman EK, Martinez F, Weiss ST. Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics*, 2003; 81(1):85-91.
- Lee SK, Stack A, Katzowitsch E, Aizawa SI, Suerbaum S, Josenhans C. *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5, *Microbes Infect*, 2003; 15:1345-1356.

- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults, *Cell*, 1996; 86:973–983.
- Li C, Xia B, Yang Y, Li J, Xia HH. TNF gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection in gastric carcinogenesis in Chinese population, *Am J Gastroenterol*, 2005; 100:290-294.
- Lorenz E, Hallman M, Marttila R, Haataja R, Schwarts S. Association between the Asp299Gly polymorphisms in the Toll-like receptor 4 and premature births in the Finnish population, *Pediatr Res*, 2002; 52:373-376.
- Lorenz E, Mira J, Cornish K, Arbour N, Schwartz D. A novel polymorphism in the Toll-like receptor 2 gene and its potential association with Staphylococcal infection, *Infect Immune*, 2000; 68:6398-6401.
- Lorenz E, Schwartz DA, Martin PJ, Gooley T, Lin MT, Chien JW, Hansen JA, Clark JG. Association of TLR4 mutations and the risk for acute GVHD after HLA-matched-sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2001; 7(7):384-7.
- Maeda S, Otsuaka M, Hirita Y, Mitsuno Y, Yoshida H, Shiratori Y, Mashuo Y, Maramtsu M, Seki N, Omata M. Cdna microarray analysis of *Helicobacter pylori*-mediated alteration of gene expression gastric cancer cells, *Biochem Biophys Res*, 2001; 284:443-449.
- Marshall BJ, Barrett LJ, Prakash C, McCallum RW, Guerrant RL. Urea protects *Helicobacter (Campylobacter) pylori* from the bactericidal effect of acid, *Gastroenterology*, 1990; 99:697–702.
- Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1984; I: 1311-1315.

- Merx S, Zimmer W, Neumaire M, Ahmad.-Nejad P. Characterization and Functional Investigation of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in the Human TLR5 Gene, Hum Mutant, 2006; 27(3):293-299.
- Montero-Vega MT, de Andrés-Martín A. Toll-like receptors: a family of innate sensors of danger that alert and drive immunity, Allergol et Immunopathol, 2008; 36(6):347-357.
- Moura SB, Almeida LR, Guerra JB, Rocha GA, Camargos Rocha AM, Melo FF, Corrêa-Oliveira R, Bittencourt P, Carvalho SD, Magalhães Queiroz DM. Toll-like receptor (TLR2, TLR4 and TLR5) gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection in children with and without duodenal ulcer, Microbes Infect. 2008; 10(14-15):1477-1483.
- Nasiri H., Forouzandeh M., Rasae M.J., Rahbarizadeh F. Modified salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. J Clin. Lab Anal. 2005. 19:229-232
- Ng M, Hof R, Crockett J, Hope, Berry S, Thomson J, McLean M, McColl K , El-Omar E, Hold G. Increase in NF- κ B binding affinity of the C allelic variant of the Toll-like receptor 9 -1237T/C polymorphism is associated with *Helicobacter pylori* induced gastric disease, Infect Immun. 2010; 78(3):1345-1352.
- Nilsson C, Sillen A, Eriksson L, Strand ML, Enroth H, Normark S, Falk P, Engstrand L. Correlation between *cag* pathogenicity island composition and *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal disease. Infect. Immun, 2003; 71:6573–6581.
- Noguchi E, Nishimura F, Fukai H, Kim J, Ichikawa K, Shibasaki M, Arinami T. An association study of asthma and total serum immunoglobulin E levels for toll-like receptor polymorphisms in a Japanese population. Clin. Exp. Allergy, 2004;34:177-183.

- O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 2007; 7(5):353-364.
- Perez-Perez G, Rothernbacher D, Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 2004; 9:1-6.
- Perez-Perez G, Shepherd VL, Morrow JD, Blaser MJ. Activation of human THP-1 cells and rat bone marrow-derived macrophages by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide, *Infect Immun*, 1995; 63:1183-1187.
- Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*, 2004; 4(1):71-78.
- Price A.B. The Sydney System: histological division. *J Gastroenterology. Hepatology*, 1991; 6:254-261
- Rivas-Traverso F, Hernández F. *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico, *Rev Biomed*, 2000; 11:187-205.
- Rudi J, Kuck D, Strand S. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand system in *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial apoptosis, *J Clin Invest*, 1998; 102:1506-1514.
- Schmitt C, Humeny A, Becker CM, Brune K, Pahl A. Polymorphisms of TLR4: rapid genotyping and reduced response to lipopolysaccharide of TLR4 mutant alleles. *Clin Chem*, 2003; 48(10):1661-1667.
- Schottenfeld D, Beebe-Dimmer J. Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. *CA Cancer J Clin*, 2006; 56(2):69-83.
- Schwartz DA. TLR4 and LPS hyporesponsiveness in humans. *Int J Hyg Environ Health*, 2002; 205(3):221-227.

- Scoot, H. Cover, T. *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. Clin. Microbiol. Rev, 2006; 19:597-613.
- Semino-Mora C, Doi SQ, Marty A, Simko V, Carlstedt I, Dubois A, Intracellular and interstitial expression of helicobacter pylori virulence genes in gastric precancerous intestinal metaplasia and adenocarcinoma J. Infect. Dis, 2003; 187:1165-1177.
- Sicheng W, Felley CP, Bouzourena H, Reimers M, Michetti P. Inflammatory Gene Profiles in Gastric Mucosa during *Helicobacter pylori* Infection in Humans. J Immunol, 2004; 172:2595-2606.
- Sipponen P. Natural history of gastritis and its relationship to peptic ulcer disease, Digestion, 1992; 51:S70-S75.
- Smith MF, Jr., Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for Helicobacter pylori-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. J Biol Chem, 2003; 278(35):32552-32560.
- Stewart BW, Kleihues P. World Cancer Report. IARC Press, Lyon. Takada, K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. Mol Pathol, 2003; 53:255-261.
- Torok AM, Bouton AH, Goldberg JB. *Helicobacter pylori* induces interleukin-8 secretion by Toll-like receptor 2- and Toll-like receptor 5-dependent and independent pathways, Infect Immun, 2005; 73:1523-1531.
- Torok HP, Glas J, Tonenchi L, Bruennler G, Folwaczny M, Folwaczny C. Crohn's disease is associated with a toll-like receptor-9 polymorphism. Gastroenterology, 2004; 127(1):365-366.

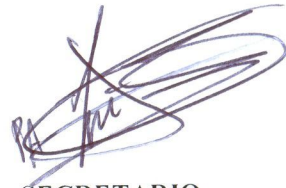
- Tovar-Guzman V, Hernandez-Giron C, Barquera S, Rodriguez-Salgado N, Lopez-Carrillo L. Epidemiologic panorama of stomach cancer mortality in Mexico. Arch Med Res, 2001; 32(4):312-317.
- Trejo-de la O A, Torres J, Pérez-Rodríguez M, Camorlinga-Ponce M, Luna LF, Abdo-Francis JM, Lazcano E, Maldonado-Bernal C. TLR4 single-nucleotide polymorphisms alter mucosal cytokine and chemokine patterns in Mexican patients with *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal diseases, Clin Immunol, 2008; 129(2):333-340.
- Tsan MF, Gao B. Cytokine function of heat shock proteins. Am J Physiol Cell Physiol, 2004; 286(4):C739-C744.
- Van Doorn LJ, Figueredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer W, Quint W. Clinical relevance of CagA, VacA and IceA status of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology, 1998; 115:58-66.
- Wang J, Brooks EH, Bamford KB, Denning TL, Pappo J, Ernst PB. Negative selection of T cells by *Helicobacter pylori* as a model of bacterial strain selection by immune evasion, J Immuno, 2001; 167:926-934.
- Wu MS, Cheng TY, Shun CT, Lin MT, Chen LC, Lin JT. Functional polymorphisms of CD14 and toll-like receptor 4 in Taiwanese Chinese with *Helicobacter pylori*-related gastric malignancies. Hepatogastroenterology. 2006; 53(71):807-810.
- Wu MS, Wu CY, Chen CJ, Lin MT, Shun CT. Interleukin-10 genotypes associated with the risk of gastric carcinoma in Taiwanese Chinese, Int J Cancer, 2003; 104:617-623.
- Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Kashima K, Imanishi J. Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by cagA gene positive *Helicobacter pylori* isolates, Gut, 1997; 41:442-451.

Los miembros del jurado designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada: “**ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES DE LOS RECEPTORES TIPO TOLL 2, 4, 5 Y 9 Y SU ASOCIACIÓN CON ENFERMEDADES CAUSADAS POR *Helicobacter pylori* EN DOS POBLACIONES LATINOAMÉRICANAS**”, con fecha de examen: 8 de Abril de 2010.



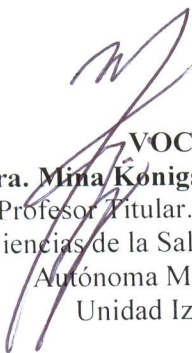
PRESIDENTE

Dr. Rubén Darío Martínez Pérez.
Profesor Titula. Departamento de
Medicina Experimental. Facultad de
Medicina, UNAM



SECRETARIO

Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez.
Profesor titular C, Escuela Superior de
Medicina. IPN.
División en Medicina Genómica,
Subdirección de Enseñanza e
Investigación, CMN 20 de Noviembre,
ISSSTE



VOCAL

Dra. Mina Königsberg Fainstein.
Profesor Titular. Departamento
Ciencias de la Salud. Universidad
Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa



VOCAL

M. en BE. Joaquín Fernando Herrera Muñoz.
Departamento Ciencias de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana.
Unidad Iztapalapa