

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Análisis de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) C2029T en TLR2 y A896G
en TLR4 en pacientes con infección con *Helicobacter pylori***

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas

BERNARDO DAVID CASTRO RODRÍGUEZ

Quito, 2011

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del candidato Bernardo David Castro Rodríguez ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Oscar Pérez

Director de la Disertación

26 de abril de 2011

A mis padres y hermanos,

a mis abuelos,

a mi familia

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por el amor, la paciencia y la confianza.

A mis hermanos y hermanas por los consejos, el cariño y mis sobrinos.

A mi gran familia, por los momentos gratos y el apoyo incondicional.

Al Dr. César Paz y Miño por recibirme en el laboratorio, darme una oportunidad para aprender y poner en práctica mis conocimientos, además de enseñarme el ambiente científico ecuatoriano.

Al Dr. Oswaldo Rodríguez y la Lcda. María José Tamariz por facilitarme las muestras de ADN necesarias para la realización de este estudio.

Al Dr. Oscar Pérez por la dirección en la elaboración de esta investigación.

A la Dra. Iliana Alcocer y MSc. Alexandra Narváez por su ayuda en las correcciones y consejos para el documento final de la disertación.

A Melissa Arévalo por sus consejos e ideas para concretar la realización de este estudio.

A todos los amigos del laboratorio: Andrés, Alejandro, Nadia, Emilia, Majo M., Jorge, Mariu, Mairita, Carmen, Janeth, José, Carla, Majo G., Pato, Xime, Dani y Majo C. por su amistad, su confianza y su apoyo.

A mis amigos y compañeros de Biología, en especial a Daniel, Luna, Jackie, Dolo, Andrea, Nina, Panchar, Andresito, Pepe Lucho, Cris y Chavo.

A mis amigos Oscar, Andrés R., Andrés L., Vinicio, Pancho, Marco, Diego V. y Ceci.

Agradezco de manera especial a Gaby por su amor incondicional, su apoyo y su paciencia en todos los momentos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABLAS.....	X
LISTA DE ANEXOS.....	XI
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1. EPIDEMIOLOGÍA DE <i>Helicobacter pylori</i>	3
3.2. MICROBIOLOGÍA DE <i>Helicobacter pylori</i>	5
3.3. INTERACCIÓN DE <i>Helicobacter pylori</i> CON EL SER HUMANO.....	8
3.3.1. <i>Helicobacter pylori</i> Y LAS PATOLOGÍAS GÁSTRICAS.....	8
3.3.2. <i>Helicobacter pylori</i> Y LA RESPUESTA INMUNE EN HUMANOS.....	10
3.4. EL SISTEMA INMUNE Y LOS RECEPTORES SIMILARES A TOLL (TLRs)...	10
3.5. JUSTIFICACIÓN.....	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4.1. MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	19
4.2. TIPO DE DAÑO GÁSTRICO.....	20
4.3. ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DEL ADN.....	20
4.4. DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO (GENOTYPING).....	21
4.4.1. AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES QUE CONTIENEN LOS POLIMORFISMOS R677W EN TLR2 Y D299G EN TLR4.....	21
4.4.2. ANÁLISIS DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DE LONGITUD POLIMÓRFICA (RFLP): VARIANTES R677W EN TLR2 CON <i>AciI</i> Y D299G EN	

TLR4 CON <i>BccI</i>	23
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	25
5. RESULTADOS.....	27
5.1. PARÁMETROS BIOPATOLÓGICOS.....	27
5.2. TIPO DE DAÑO GÁSTRICO.....	27
5.3. ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTIFICATIVO DEL ADN.....	29
5.4. GENOTIPO.....	29
5.4.1. PCR DE LOS FRAGMENTOS QUE CONTIENEN LOS POLIMORFISMOS R677W DEL GEN TLR2 Y D299G DEL GEN TLR4.....	29
5.4.2. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA CON <i>AciI</i> EN EL POLIMORFISMO R677W EN TLR2 Y CON <i>BccI</i> EN EL POLIMORFISMO D299G EN TLR4.....	30
5.5. FRECUENCIAS ALÉLICAS DE LOS POLIMORFISMOS R677W EN TLR2 Y D299G EN TLR4.....	31
5.6. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DE LOS POLIMORFISMOS R677W EN TLR2 Y D299G EN TLR4 EN COMPARACIÓN AL TIPO DE DAÑO GÁSTRICO.....	32
5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	33
5.7.1. CHI CUADRADO PARA EL POLIMORFISMO R677W EN TLR2 Y D299G EN TLR4 EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	33
5.7.2. PRUEBA DE ODDS RATIO (OR) PARA EL RIESGO DE INFECCIÓN CON <i>Helicobacter pylori</i> : SNP R677W EN TLR2 Y D299G EN TLR4.....	34
5.7.3. RIESGO DE DESARROLLO DE GASTRITIS EN INDIVIDUOS PORTADORES DE LOS ALELOS POLIMÓRFICOS DEL SNP D299G DE TLR4	35
5.7.4. RIESGO DE INFECCIÓN CON <i>Helicobacter pylori</i> DE ACUERDO AL SEXO.....	37
6. DISCUSIÓN.....	38

7. LITERATURA CITADA	49
8. FIGURAS	61
9. TABLAS	67
10. ANEXOS	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Detalle de las muestras de ADN utilizadas en el estudio.....	62
Figura 2. Amplificación de la región que contiene el polimorfismo R677W en TLR2.....	63
Figura 3. Amplificación de la región que contiene el polimorfismo D299G en TLR4.....	64
Figura 4. Digestión de amplificadores R677W de TLR2 con la enzima de restricción <i>AclI</i> .	65
Figura 5. Digestión de amplificadores D299G de TLR4 con la enzima de restricción <i>BclI</i> .	66

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Sexo, tipo de daño gástrico y genotipo de muestras de ADN extraído de pacientes infectados con <i>Helicobacter pylori</i> e individuos controles.....	68
Tabla 2. Parámetros bio-patológicos en individuos diagnosticados con <i>Helicobacter pylori</i> y controles.....	73
Tabla 3. Distribución de la población estudiada de acuerdo al diagnóstico histopatológico y el género.....	74
Tabla 4. Frecuencia y distribución de los alelos del polimorfismo R677W en el gen TLR2.....	75
Tabla 5. Frecuencia y distribución de los alelos del polimorfismo D299G en el gen TLR4.....	76
Tabla 6. Frecuencia y distribución de los polimorfismos R677W en el gen TLR2 y D299G en el gen TLR4 según el diagnóstico histopatológico.....	77
Tabla 7. Análisis de Chi cuadrado (χ^2) para determinar el nivel de significación de la variante R677W en el gen TLR2.....	78
Tabla 8. Análisis de Chi cuadrado (χ^2) para determinar el nivel de significación de la variante D299G en el gen TLR4.....	79
Tabla 9. Análisis de Odds Ratio (OR) para determinar el riesgo relativo de infección con <i>Helicobacter pylori</i> para los individuos que presenten el alelo W en el gen TLR2 y G en el gen TLR4.....	80
Tabla 10. Análisis de Odds Ratio (OR) para determinar el riesgo relativo de desarrollar patologías gástricas en los individuos portadores del alelo G en TLR4	81

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Localización de los diferentes TLRs en el tracto gastrointestinal.....	83
Anexo 2. Componentes del desarrollo de patologías gástricas asociadas a la infección con <i>H. pylori</i>	84
Anexo 3. Cascada de reacciones general de los TLRs para la activación de factores de transcripción.....	85
Anexo 4. Localización de SNPs conocidos en TLR2 y TLR4.....	86
GLOSARIO	87

1. RESUMEN

La bacteria *Helicobacter pylori* es uno de los organismos patógenos más exitosos que coloniza el estómago del ser humano. La infección con la bacteria está asociada con el desarrollo de una variedad de patologías gástricas que corresponden a cuadros inflamatorios graves que podrían originar cáncer gástrico. El sistema inmune del ser humano es una maquinaria compleja que ha evolucionado en conformidad a los organismos patógenos que el huésped está expuesto. Los Toll-like Receptors (TLRs) son receptores de membrana que se encargan de reconocer PAMPs para la activación de la respuesta inmune; TLR2 y TLR4 son los encargados de reconocer lipopolisacáridos (LPS) de *H. pylori*. Los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) R677W en TLR2 y D299G en TLR4 provocan cambios estructurales que producen una disminución en la responsividad a los LPS y una disrupción en la estimulación de factores de transcripción que activarán la respuesta inmune respectiva. Se analizaron 102 muestras de ADN de individuos infectados con *H. pylori* y 89 individuos controles provenientes del Hospital del día de Quito No. 1 de la Policía Nacional, Hospital Eugenio Espejo, Hospital Vozandes, Instituto de Gastroenterología Quito y Hospital Pedro Vicente Maldonado. No se encontraron diferencias significativas entre los individuos infectados con *H. pylori* y los individuos control al relacionar el polimorfismo R677W en TLR2 ($\chi^2= 2,01$; $p>0,005$), sin embargo en el polimorfismo D299G en TLR4 presentó diferencias altamente significativas ($\chi^2= 12,966$; $p>0,001$), aunque no se encontró una relación del polimorfismo con el riesgo de infección bacteriana (OR=0,48; $p>0,05$), sin embargo, la presencia del polimorfismo D299G es crucial para el desarrollo de gastritis no atrófica (OR=1,8; $p>0,05$) y atrófica (OR=3,9; $p>0,05$), a pesar de no presentar diferencias significativas entre individuos afectados y controles.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, sistema inmune, TLR2, TLR4, patología gástrica.

2. ABSTRACT

Helicobacter pylori is one of the most successful pathogens which colonizes the human stomach. The infection with the bacteria is associated with the development of various gastric pathologies which correspond to severe inflammatory conditions that could end in gastric cancer. The human immune system is a complex machinery that has evolved according to invading pathogens in the host. The Toll-like Receptors (TLRs) are membrane receptors that are in charge of pathogen associated molecular patterns (PAMPs) recognition for the activation of the immune response. TLR2 and TLR4 recognize lipopolysaccharide (LPS) expressed in *H. pylori*. The single nucleotide polymorphism (SNPs) R677W in TLR2 and D299G in TLR4 cause structural changes that diminish responsiveness to LPS and a disruption in the stimulation of transcription factors which will activate the associated immune response. 102 DNA samples from individuals infected with *H. pylori* and 89 samples from individuals with no infection were obtained from Hospital del día de Quito No. 1 de la Policía Nacional, Hospital Eugenio Espejo, Hospital Vozandes, Instituto de Gastroenterología Quito and Hospital Pedro Vicente Maldonado. Significant differences were found between *H. pylori* infected individuals and control individuals when the D299G polymorphism in TLR4 was analyzed ($\chi^2= 12.966$; $p>0.001$). The R677W polymorphism in TLR2 presented no significant differences between groups ($\chi^2= 2.01$; $p>0.005$). There is no relation between the D299G polymorphism and the risk of *H. pylori* infection (OR=0.48; $p>0.05$), but the presence of the variant is crucial for the development of non-atrophic gastritis (OR=1.8; $p>0.05$) and atrophic gastritis (OR=3.9; $p>0.05$), despite no significance between infected individuals and control individuals.

Key words: *Helicobacter pylori*, immune system, TLR2, TLR4, gastric pathologies.

3. INTRODUCCIÓN

Una de las bacterias patógenas más exitosas es *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Es responsable de una alta tasa de morbilidad y mortalidad como consecuencia de condiciones gástricas como úlceras, linfomas de tejido linfoide asociado a mucosas y, la complicación más peligrosa de la infección con *H. pylori*, adenoma gástrico (Suerbaum y Josenhans, 2007). Dentro de los factores del huésped se encuentran receptores de iniciación de respuesta inmune, citoquinas y quimioquinas que controlan la respuesta inmune contra *H. pylori*. Una familia de receptores ligados a la membrana denominada receptores similares a Toll (Toll-like Receptors o TLRs) provee la primera línea de defensa contra varias condiciones infecciosas, incluyendo *H. pylori*. Los TLRs son moléculas de señalización que reconocen patrones moleculares de estructuras patógenas de agentes infecciosos e inducen la activación de la respuesta inflamatoria y el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. TLR2 y TLR4 son receptores que se expresan en una amplia variedad de células y son particularmente importantes para la defensa contra la infección bacteriana, ya que reconocen factores asociados a la membrana de bacterias Gram negativas (TLR2 y TLR4) y Gram positivas (TLR2). Los polimorfismos que se presentan en los TLRs pueden inducir a una disminución en la capacidad de reconocimiento o una pérdida de función, lo que derivaría en un aumento en la susceptibilidad para el desarrollo de infecciones y dolencias asociadas, como por ejemplo *H. pylori* y las enfermedades relacionadas con su infección (Kraehenbuhl y Corbett, 2004; Achyut *et al.*, 2007; Moura *et al.*, 2008).

3.1. EPIDEMIOLOGÍA DE *Helicobacter pylori*

Aproximadamente el 50% de la población mundial está infectada con el

microorganismo, sin embargo los posibles síntomas y las secuelas de la infección difieren drásticamente entre países desarrollados y países en vías de desarrollo (Frenck y Clemens, 2003). En países en vías de desarrollo, como por ejemplo en la mayoría de países de América Latina, la prevalencia de infección de *H. pylori* se encuentra entre el 70% y el 90% de la población (Castro y Coelho, 1998). En Ecuador, un estudio realizado en niños presentó un 42,4% de afectos con *H. pylori* y su prevalencia tuvo un incremento en el 71,4% en niños con condiciones socioeconómicas bajas (Cabrera *et al.*, 2002). A pesar de la alta prevalencia de individuos con *H. pylori*, solo una minoría de individuos afectos desarrollan una patología maligna severa (García *et al.*, 2006; Debets-Ossenkopp *et al.*, 2003).

En los estratos socio-económicos bajos la infección se adquiere con frecuencia en la infancia debido a sistemas sanitarios pobres y bajos estándares de condiciones de vida, lo que podría determinar el desarrollo posterior de una patología digestiva (Chávez *et al.*, 1998; Castro y Coelho, 1998). La salubridad y la calidad del agua juegan un rol determinante en la adquisición temprana y la transmisión de *H. pylori*. Las rutas de transmisión principales para el contagio son de persona a persona por vías oral-oral o fecal-oral (Frenck y Clemens, 2003; Bruce y Maroos, 2008). La transmisión fecal-oral tiene una implicación más importante que la transmisión oral-oral, ya que la bacteria puede existir en las fuentes de comida y agua que presentan contaminación con heces (Quaglia *et al.*, 2006).

Varios estudios sugieren que la capacidad de la bacteria para infectar el tracto digestivo puede ser reversible. En adultos provenientes de países en vías de desarrollo la infección puede llegar a ser crónica, sin embargo en los niños parece que se da una serie de ciclos de adquisición y pérdida de la infección hasta que la misma sea crónica (Frenck y Clemens, 2003).

3.2. MICROBIOLOGÍA DE *Helicobacter pylori*

H. pylori es un bacilo curvo, Gram negativo que tiene una medida de 2 a 4 μm de longitud y 0,5 a 1 μm de ancho. A pesar de que usualmente tiene forma de bacilo curvo, en condiciones ambientales adversas puede presentar forma de coco (Kusters *et al.*, 2006; Goodman, 1997).

El organismo posee flagelos lofótricos de aproximadamente 3 μm de longitud. La composición general de la envoltura celular de *H. pylori* es similar al de otras bacterias Gram negativas. Consiste de una membrana interna, periplasma con péptidoglicano y una membrana externa. Esta membrana exterior comprende fosfolípidos y lipopolisacáridos (LPS). Adicionalmente, *H. pylori* posee cinco familias de proteínas en la membrana externa. La familia más grande incluye adhesinas, mientras que las otras cuatro comprenden porinas, transportadores de hierro, proteínas asociadas al flagelo y proteínas con función desconocida (Kusters *et al.*, 2006).

A pesar de que el hábitat natural es la mucosa gástrica ácida, la bacteria es considerada como neutro-halófila. *H. pylori* puede sobrevivir breves exposiciones a pHs menores de 4,0 pero el crecimiento óptimo ocurre a pH neutro (Kusters *et al.*, 2006; Olson y Maier, 2002). Una de las características más importantes de *H. pylori* es la capacidad de colonizar el medio gástrico ácido a pesar de que no es una bacteria acidófila. La mucosa gástrica tiene un pH entre 4,0 y 6,5, pero ocasionalmente existen shocks ácidos, por lo que la bacteria requiere de mecanismos para protegerse y desarrollarse a un pH de alrededor de 5,5 (Schade *et al.*, 1994; Stingl *et al.*, 2002).

Para evitar ser arrastrada al lumen, *H. pylori* siente el gradiente de pH dentro de la capa de mucosa y por quimiotaxis nada lejos de los contenidos ácidos del lumen hacia un ambiente con pH neutro, como la superficie de células epiteliales (Schreiber *et al.*, 2004).

H. pylori se puede encontrar en la superficie interna de las células epiteliales estomacales y ocasionalmente dentro de las mismas (Petersen y Krogfelt, 2003).

La distribución intragástrica y la severidad de la infección bacteriana depende de una variedad de factores tales como las características de la cepa colonizadora, la genética del huésped, su sistema inmune, dieta y nivel de producción de ácido. Los primeros estudios acerca de las propiedades patogénicas diferenciales de las cepas de *H. pylori* indican que el incremento en la patogenicidad está correlacionada con la habilidad de las cepas más virulentas en inducir cambios morfológicos celulares, vacuolización y degeneración celular sucesiva. Esta habilidad está relacionada con una serie de factores bacterianos que determinan la virulencia de la bacteria y permiten su supervivencia dentro del huésped (Kusters *et al.*, 2006).

La proteína denominada CagA, o citotoxina asociada al gen A, es una proteína altamente inmunogénica codificada por el gen *cagA*, que se encuentra en alrededor del 50% al 70% de cepas de *H. pylori*. Este gen funciona como un marcador de la presencia de la isla de patogenicidad *cag* PAI (Akopyants *et al.*, 1998; Covacci *et al.*, 1993). Los pacientes infectados con cepas CagA⁺ presentan una respuesta inflamatoria mayor y más riesgo de desarrollar ulcera péptica o cáncer gástrico (Kusters *et al.*, 2006).

Aproximadamente el 50% de las cepas de *H. pylori* secretan una proteína altamente inmunogénica que induce la vacuolización masiva de células epiteliales, denominada VacA. Esta proteína juega un rol muy importante en el desarrollo de úlcera péptica y cáncer gástrico (Cover y Blaser, 1992). Las actividades de VacA incluyen formación de canales en la membrana, disrupción de la actividad lisosomal y endosomal, señalización celular, interferencia en las actividades en las funciones celulares, inducción a la apoptosis y modulación inmune (Cover y Blanke, 2005).

H. pylori debe sobrevivir el pH ácido del estómago y entrar en la mucosa para

alcanzar su nicho (Ottemann y Lowenthal, 2002). El componente principal para la resistencia al ácido de *H. pylori* es la enzima ureasa, la que convierte urea en amoníaco, carbamato y CO₂, lo que resulta en un incremento del pH (Burne y Chen, 2000).

H. pylori se adhiere a las células epiteliales humanas usando glicoproteínas fucosiladas y glucolípidos sialisados como receptores celulares. Esta adhesión está mediada por dos componentes denominados BabA y SabA (Suerbaum y Josenhans, 2007). BabA tiene un rol importante en la virulencia de la bacteria, ya que está fuertemente asociado con el desarrollo de úlceras pépticas y adenocarcinoma gástrico (Gerhard *et al.*, 1999). Por otro lado, SabA está involucrada durante los estadios de inflamación crónica y gastritis atrófica (Kusters *et al.*, 2006).

Una de las moléculas de señalización más importantes para el desarrollo de la respuesta inflamatoria es el lipopolisacárido (LPS) (Scott y Cover, 2006). La mayoría de las cepas de *H. pylori* expresan LPS que contienen antígenos (LPS-O) compuestos por oligosacáridos fucosilados que son, estructuralmente e inmunológicamente, cercanamente relacionados con el grupo de antígenos sanguíneos humanos Lewis. La similitud estructural que existe entre los LPS de *H. pylori* y los antígenos humanos Lewis representa una forma de mímica molecular o tolerancia inmune que permite que los LPS de *H. pylori* se protejan del reconocimiento inmune. La expresión de los LPS mejora la internalización bacteriana en las células epiteliales, lo que sugiere que afecta la respuesta inmune innata (Scott y Cover, 2006; Kusters *et al.*, 2006). La expresión de LPS está controlada por tres genes que codifican fucosiltransferasas, *futA*, *futB* y *futC*, cuya expresión puede ser activada o desactivada por cambios en el marco de lectura, creando poblaciones de bacterias con patrones de LPS muy diversos (Suerbaum y Josenhans, 2007).

Los LPS de *H. pylori* estimulan la producción de factores de transcripción, como NF-κB, e interleucinas, como IL-8, en las células epiteliales y en las células de respuesta

inmune. No es claro si la capacidad de imitar un amplio rango de antígenos sanguíneos del huésped por parte de los LPS promueve la respuesta autoinmune gástrica o atenúa los efectos inmuno-estimulantes de los LPS (Kusters *et al.*, 2006).

3.3. INTERACCIÓN DE *Helicobacter pylori* CON EL SER HUMANO

Los seres humanos ingieren muchos microorganismos cada día, pero la mayoría no logra colonizar exitosamente el estómago. Después de ingresar al estómago, *H. pylori* normalmente no atraviesa la barrera epitelial, y se clasifica como organismo bacteriano no invasivo. La mayoría de bacterias *H. pylori* viven libremente dentro de la capa de moco, pero algunas logran adherirse a la superficie apical de las células epiteliales y, ocasionalmente, pueden penetrar dentro de las mismas (Scott y Cover, 2006). Los receptores similares a Toll (TLRs) se encuentran en la superficie de las células epiteliales gástricas y reconocen patrones de moléculas asociadas a patógenos (PAMPs) (Backhed *et al.*, 2003). Si la bacteria invade y penetra la barrera gástrica epitelial, se activa el sistema de reconocimiento y protección, atacando la bacteria con macrófagos y neutrófilos. Ya que la mayoría de bacterias de *H. pylori* se encuentran dentro de la capa de moco gástrico, el contacto de *H. pylori* con células fagocíticas ocurre infrecuentemente a menos de que exista disrupción en la barrera del epitelio gástrico (Scott y Cover, 2006).

3.3.1. *Helicobacter pylori* Y LAS PATOLOGÍAS GÁSTRICAS

La colonización de *H. pylori* no es una enfermedad en sí, sin embargo es una condición que afecta el riesgo relativo de desarrollar varios desórdenes clínicos del tracto gastrointestinal superior y, posiblemente, el tracto hepatobiliar (Kusters *et al.*, 2006).

Las úlceras gástricas y duodenales, comúnmente referidas como úlceras pépticas, son defectos en la mucosa que presentan un diámetro de casi 0,5 cm que penetran a través de la mucosa muscular. Las complicaciones que pueden surgir incluyen sangrado, perforación y formación de constricciones. Los dos tipos de úlceras presentan una fuerte relación con *H. pylori*, por lo que los pacientes infectados con la bacteria tienen un riesgo de tres a diez veces mayor de desarrollar úlceras que los pacientes no infectados (Kusters *et al.*, 2006).

Los estudios realizados en pacientes infectados con *H. pylori* han establecido que la bacteria es una de las causas del desarrollo de gastritis crónica y de úlcera péptica en la etiología del cáncer gástrico (Goodman, 1997). Por esta razón es considerado por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer que la bacteria es un carcinógeno tipo I (IARC, 1994). Varios niveles de daño en el estómago son identificados antes de que la neoplasia se presente: la gastritis crónica no atrófica, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia y la neoplasia en sí, presentan un orden ascendente y se clasifican de acuerdo al daño tisular y el grado de invasión de la enfermedad (Houghton y Wang, 2005; Roukus *et al.*, 2002).

La inflamación crónica inducida por *H. pylori* puede eventualmente llevar a la pérdida de la arquitectura normal de la mucosa gástrica junto con la destrucción de las glándulas gástricas (Kusters *et al.*, 2006). El mecanismo de la pérdida de la arquitectura celular está directamente relacionado con los efectos de los productos bacterianos y las citoquinas en la mucosa gástrica. Las cepas bacterianas más virulentas junto con una respuesta inmune permisiva, están fuertemente relacionados con la gastritis y la progresión a enfermedades más severas, ya que combina los efectos de la constitución genética del huésped, los factores de virulencia bacterianos y la exposición ambiental al patógeno (Correa y Houghton, 2007; Hold *et al.*, 2007).

3.3.2. *Helicobacter pylori* Y LA RESPUESTA INMUNE EN HUMANOS

La inflamación gástrica se desarrolla en un período corto de tiempo después de la infección con *H. pylori*. La colonización en el estómago resulta en síntomas en las regiones superiores del tracto gastrointestinal, por lo que la respuesta inmune innata y adaptativa tempranas se involucran en el desarrollo de la respuesta inflamatoria de la mucosa gástrica y los síntomas que acompañan la infección aguda (Scott y Cover, 2006).

La respuesta inflamatoria de la mucosa gástrica en humanos puede ser modulada por características de la cepa de *H. pylori* colonizadora (Blaser, 2005). Las cepas que presentan factores de virulencia, como proteínas extramembranales y LPS, están asociados a una respuesta inflamatoria incrementada (Scott y Cover, 2006).

Las características genéticas del huésped modulan la respuesta inflamatoria contra *H. pylori*. La inflamación gástrica asociada a la bacteria en adultos es caracterizada por infiltración de células mononucleares y neutrófilos, mientras que en niños la respuesta inflamatoria es predominantemente linfocítica con pocos neutrófilos (Whitney *et al.*, 2000). Muchos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en varios genes que regulan la respuesta inmune pueden influenciar la infección de *H. pylori*. Estos polimorfismos pueden predisponer a los individuos para el desarrollo de atrofia gástrica y cáncer gástrico por vías que involucren el incremento en la severidad de la inflamación gástrica y la reducción de la secreción de ácido gástrico (Scott y Cover, 2006).

3.4. EL SISTEMA INMUNE Y LOS RECEPTORES SIMILARES A TOLL (TLRs)

Todos los organismos multicelulares han desarrollado varios mecanismos de defensa que tienen la capacidad de ser activados por infecciones y proteger el huésped

destruyendo los organismos invasores y neutralizando sus factores de virulencia. Mientras la mayoría de los otros tipos de reconocimiento molecular involucran productos de un mismo genoma (por ejemplo: hormonas y sus receptores, factores de transcripción y su promotor específico), el reconocimiento inmune está mediado por los productos codificados en diferentes genomas (Medzhitov y Janeway, 1997).

Dentro del sistema de defensa podemos diferenciar dos tipos de respuestas inmunes: una innata inespecífica y una adquirida específica, las cuales poseen características celulares y humorales específicas propias (Janeway y Medzhitov, 2002; Medzhitov y Janeway, 1997). La diferencia principal entre estos dos tipos de respuestas inmunes son los tipos de receptores usados para el reconocimiento de patógenos. El reconocimiento en el sistema inmune innato está mediado por receptores que se encuentran codificados en la línea germinal y que tienen especificaciones generales para identificar características conservadas e invariables de los microorganismos. En contraste, el reconocimiento en el sistema inmune adaptativo está mediado por receptores de antígenos. Los genes que codifican estos receptores son ensamblados a partir de segmentos localizados en la línea germinal; la recombinación somática de estos segmentos permite la generación de un repertorio diverso de receptores con especificaciones aleatorias y más concretas (Medzhitov, 2007).

El sistema inmune innato es un mecanismo filogenético de defensa antiguo para la protección contra infecciones microbianas. En mamíferos y otros vertebrados, controla la activación de la respuesta inmune adaptativa y determina la naturaleza de los efectores (Wolff, 2008). La respuesta del sistema inmune innato está mediada primariamente por células fagocíticas y células presentadoras de antígenos (antigen presenting cells o APCs), como granulocitos, macrófagos y células dendríticas (dendritic cells o DC), y es considerado como inespecífico (Mogensen, 2009).

El reconocimiento en el sistema inmune adaptativo está mediado por receptores de antígenos. Los linfocitos circulan por los nódulos linfáticos y el bazo hasta encontrar un antígeno para el que sean específicos. La diferenciación de los linfocitos a una célula efectora determinada y la localización de la misma en el sitio de infección están reguladas por instrucciones provistas por el sistema inmune innato, generalmente en forma de citoquinas y quimioquinas (Medzhitov, 2007).

Las DC son APC potentes y juegan un rol decisivo en la inducción de la respuesta inmune adaptativa contra patógenos. Varios estudios demuestran que los ligandos de los TLRs, mediados por la acción del factor de diferenciación mieloide-88 (MyD88), estimulan la maduración de las DC. Es así como los TLRs juegan un rol significativo en el proceso autoinmune, formando un puente entre la identificación de microbios del sistema inmune innato y la proliferación celular de linfocitos del sistema inmune adaptativo (Wolff, 2008).

Los TLRs son receptores de reconocimiento de patrones (PAMP recognition receptors o PRRs) que tienen una única y esencial función en la inmunidad animal. Hasta el momento se han identificado alrededor de diez componentes de la familia de los TLRs en mamíferos (de TLR1 a TLR10). Cada uno de los TLRs reconoce un componente estructural distinto de los patógenos (Takeda y Akira, 2003; Akira *et al.*, 2006).

Los TLRs comprenden una familia de receptores de transmembrana que se caracterizan por un dominio extracelular de repeticiones rico en leucinas (LRR) y un dominio intracelular Toll/IL-1R (dominio TIR) (Medzhitov, 2001). Los dominios LRR presentan una forma de herradura, cuya superficie cóncava está directamente involucrada en el reconocimiento de varios patógenos. El dominio TIR es una región conservada presente en las colas citoplasmáticas de los TLR. Dentro del dominio, las regiones de homología comprenden tres cajas conservadas que son cruciales para la señalización

(Akira *et al.*, 2006).

Todos los TLRs funcionan mediante las mismas moléculas de señalización. Estas incluyen MyD88, la quinasa asociada al receptor IL-1 (IL-1 receptor associated kinase o IRAK), el factor asociado al receptor de TNF (TNF receptor associated factor o TRAF), MAPK y NF- κ B (Takeda y Akira, 2003).

La interacción de la flora intestinal con la mucosa gástrica se da por medio de los TLRs, los cuales son necesarios para mantener la homeostasis intestinal por medio de vías de señalización que resultarán en un aumento en la proliferación epitelial, sanación de heridas y reclutamiento de células para la inflamación aguda (Fukata y Abreu, 2008). En el estómago humano se expresan los TLR2, TLR4, TLR5 y TLR9 en las células epiteliales, mientras que en el intestino delgado, incluyendo duodeno, yeyuno e íleo, y el intestino grueso se expresan la mayoría de los TLRs (Abreu *et al.*, 2005; Fukata y Abreu, 2008).

Los TLRs pueden dividirse en subfamilias dependiendo el tipo de PAMP que reconocen. Los TLR1, TLR2, TLR4 y TLR6 reconocen lípidos, mientras que los TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 reconocen ácidos nucleicos. Entre los TLRs que reconocen bacterias Gram negativas, algunos de los más caracterizados incluyen TLR2, TLR4, TLR5 y TLR9 (Takeda y Akira, 2003; Mogensen, 2009).

TLR2 está encargado del reconocimiento de una amplia variedad de productos bacterianos que incluyen: peptidoglicano de bacterias Gram positivas, lipoproteínas bacterianas, lipoarabinomanano de la pared celular micobacteriana y la pared celular de levaduras (Medzhitov, 2001). Los LPS de *H. pylori* son reconocidos por TLR2, lo que lleva a la activación de la respuesta inmune. Además TLR2 se une a la proteína activadora de neutrófilos de *H. pylori* gatillando una respuesta inmune de Th1 mediante la producción de IL-12 e IL-23 (Moura *et al.*, 2008). La respuesta inmune mediada por TLR2 depende de correceptores TLR1 y TLR6, por lo que la transducción de señales en TLR2 requiere de la

formación heterodímeros de TLR2 con TLR1 o TLR6. La constitución del heterodímero TLR1/TLR2 tiene la capacidad de reconocer una gran cantidad de lipoproteínas bacterianas, incluyendo lipoproteínas micobacterianas y lipoproteínas de meningococos. El heterodímero TLR6/TLR2 reconoce la lipoproteína activadora de micoplasma-2 (MALP-2) y péptidoglicano (Wolff, 2008).

TLR4 funciona como un receptor transductor de señales de LPS de bacterias Gram negativas. El reconocimiento de LPS por parte de TLR4 es complejo y requiere la acción de muchas moléculas accesorio. Los LPS se unen en primera instancia a una proteína de unión de LPS (LPS binding protein o LBP) (Medzhitov, 2001). Los componentes de la matriz extracelular, como fibronectinas, oligosacáridos del ácido hialurónico y heparan sulfato que se producen en respuesta al daño tisular y modulan la inflamación inducida por el remodelamiento tisular, activan las células del sistema inmune vía TLR4, por lo que se asocia a TLR4 con el reconocimiento de varios ligandos endógenos involucrados en la respuesta inflamatoria (Takeda y Akira, 2003).

La transducción de señales es mediada inicialmente por una familia de moléculas adaptadoras que determinan, en parte, la especificidad de la respuesta (O'Neill y Bowie, 2007). El reclutamiento de una o varias moléculas adaptadoras a un TLR determinado es seguido por la activación de vías de transducción de señales por medio de fosforilación, ubiquitinación o interacciones proteína-proteína, lo que eventualmente culminará en la activación de factores de transcripción que regulan la expresión de genes involucrados en la inflamación y defensa antimicrobiana (Akira *et al.*, 2006). Las vías de señalización inducidas por TLR pueden ser ampliamente clasificadas en base a la utilización de diferentes moléculas adaptadoras, siendo las más importantes NF- κ B, MAPK y factores reguladores de IFN (IFN regulator factor o IRFs) (Mogensen, 2009).

Después de la unión con los ligandos, los TLRs se dimerizan y sufren cambios

conformacionales que son requeridos para el subsecuente reclutamiento de las moléculas adaptadoras que contiene el dominio TIR. MyD88 es una molécula adaptadora involucrada en la señalización iniciada por todos los TLRs, a excepción de TLR3 (O'Neill y Bowie, 2007). Estudios realizados en ratones muestran la existencia de vías dependientes de MyD88 e independientes de MyD88/dependientes de TRIF, lo que permitió el descubrimiento de moléculas adaptadoras adicionales, como la proteína adaptadora similar a MyD88 (Mal), TRIF y la molécula adaptadora relacionada a TRIF (TRIF related adaptor molecule o TRAM) (Mogensen, 2009).

MyD88 es usada por TLR2 en su heterodimerización con TLR1 o TLR6, pero también Mal parece ser requerida para la unión de TLR2 con MyD88. En el caso de TLR4, existen cuatro adaptadores (MyD88, Mal, TRIF y TRAM) que están involucrados en la transducción de señales, lo que refleja la complejidad de la señalización de este receptor. La existencia de esta familia de adaptadores tiene una implicación importante en el uso selectivo de moléculas adaptadoras individuales o combinaciones de moléculas para la activación NF- κ B, usando componentes de señalización diferentes como MAPKs e IRFs (Mogensen, 2009).

Cientos de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) han sido identificados en los TLRs, sin embargo sus consecuencias funcionales de muchos no ha sido comprendida. Se han reportado muchas asociaciones entre los polimorfismos de TLR y enfermedades infecciosas o cáncer. Esta interacción entre infección e inflamación crónica media el incremento en el riesgo de desarrollo del cáncer (El-Omar y Hold, 2008).

El gen humano TLR2 se localiza en el cromosoma 4q32 y está compuesto por tres exones. Los primeros dos exones no son codificantes y el marco de lectura completo se localiza en el exón III (Haehnel *et al.*, 2002). Se han encontrado seis SNPs no sinónimos en la región citosólica del receptor, incluyendo cinco SNPs que se encuentran dentro del

dominio TIR (aminoácidos 643-784) que son críticos para la señalización y la dimerización de TLR2. Dos de estos han sido relacionados con una activación reducida de NF- κ B y un incremento en el riesgo de infección. Los modelos animales confirman que la señalización defectiva de TLR2 es un factor causal de un incremento en la susceptibilidad a enfermedades bacterianas (Texereau *et al.*, 2005).

Uno de estos dos polimorfismos consiste en una sustitución C/T en el nucleótido 2029 desde el codón de inicio de TLR2, por lo que se produce un reemplazo de arginina (Arg; R) con triptófano (Trp; W) en la posición 677. Este polimorfismo se encuentra en las poblaciones de Asia y África, sin embargo parece estar ausente en la población caucásica. El polimorfismo inhibe la activación y producción de NF- κ B. Además, los pacientes afectados con *Mycobacterium leprae* que presentan el polimorfismo tienen niveles bajos de IL-12. Debido a que IL-12 es necesario para la activación de la vía IFN- γ y la inducción de Th1, esta variante está relacionada con lepra lepromatosa en población coreana y la susceptibilidad a tuberculosis en población tunecina (Texereau *et al.*, 2005).

El gen humano TLR4 se encuentra localizado en el cromosoma 9q32-q33 y está compuesto por cuatro exones (Santini *et al.*, 2008). Existen dos SNPs no sinónimos en el exón IV, A/G en el nucleótido 896 y C/T en el nucleótido 1196, que producen sustituciones de aminoácidos del ácido aspártico (Asp; D) con glicina (Gly; G) en la posición 299 y treonina (Thr; T) con isoleucina (Ile; I) en la posición 399, respectivamente. Estas variaciones producen una hiporesponsividad a LPS, reducción en la densidad de TLR4 en el epitelio gástrico y en la respuesta de citoquinas inflamatorias (Achyut *et al.*, 2007). La mutación A896G altera la estructura del dominio extracelular del receptor, además está relacionada con un incremento en el riesgo de infecciones relacionadas con bacterias Gram negativas y shock séptico. Se ha reportado entre adultos caucásicos que el polimorfismo está asociado no solamente con anormalidades gástricas premalignas, sino también con el

incremento en el riesgo de carcinoma gástrico (Schmitt *et al.*, 2002; Moura *et al.*, 2008). Los últimos estudios muestran que la señalización defectuosa de TLR4 desarrolla una respuesta inflamatoria exagerada con destrucción tisular severa, a pesar de que la respuesta inmune inicial sea mitigada (Hold *et al.*, 2007).

3.5. JUSTIFICACIÓN

Los receptores similares a Toll o Toll-like Receptors (TLR) son primordiales para la mediación de la respuesta inmune iniciada por la interacción de la bacteria *H. pylori* con la mucosa gástrica del huésped. En el presente estudio se analizarán las frecuencias de los polimorfismos de nucleótidos simples (SNP) en dos de los genes que codifican receptores de membrana que reconocen lipopolisacáridos de *H. pylori*, el SNP R677W en el gen TLR2 y el SNP D299G en TLR4, en una población ecuatoriana determinada. Debido a que la incidencia de la bacteria en países en vías de desarrollo es elevada, la interacción de la genética inmune del huésped y la bacteria es fundamental para el desarrollo de las colonias bacterianas, así como para el desarrollo de condiciones gástricas graves que pueden originar cáncer, debido a la reacción inflamatoria del huésped en la mucosa gástrica ocasionada por la presencia de *H. pylori*.

Los resultados obtenidos permitirán identificar si la interacción de la bacteria con un genotipo determinado favorece o no la colonización bacteriana y el desarrollo de lesiones gástricas, permitiendo comprender la etiología de la bacteria bajo determinadas condiciones gástricas y controlar el desarrollo de la misma en pacientes. Los objetivos del estudio comprenden:

General:

Analizar los polimorfismos de nucleótido simple R677W en el gen TLR2 y D299G en el gen TLR4 en pacientes infectados con *H. pylori*, relacionando la presencia de los mismos con la infección bacteriana en la mucosa gástrica.

Específicos:

- Determinar la frecuencia de los polimorfismos de un solo nucleótido R677W en TLR2 y D299G en TLR4 en individuos infectados con *H. pylori*, así como la población control.
- Determinar la relación de las variantes polimórficas con la infección de *H. pylori* mediante el uso de enzimas de restricción.
- Determinar si el riesgo de desarrollo de condiciones gástricas adversas incrementa en individuos infectados con *H. pylori* de acuerdo a la presencia de los polimorfismos estudiados en TLR2 y TLR4.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MUESTRAS BIOLÓGICAS

El ADN usado para el presente estudio, al igual que las historias clínicas de cada paciente, fueron proporcionados por el Laboratorio de Diagnóstico Molecular de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de la Américas, donde se realizaron los procedimientos para la genotipificación por medio de PCR-RFLP en cada una de las muestras.

Las muestras usadas en el estudio se obtuvieron a partir de biopsias gástricas recolectadas en el Hospital del día de Quito No. 1 de la Policía Nacional, Hospital Eugenio Espejo, Hospital Vozandes, Instituto de Gastroenterología Quito y Hospital Pedro Vicente Maldonado. El Laboratorio de Diagnóstico Molecular de la PUCE informó a los pacientes acerca de la participación en el proyecto, y previo a un examen endoscópico, cada individuo firmó un consentimiento informado escrito, previamente aprobado por el Comité de Bioética de cada centro de salud mencionado. Los individuos incluidos en el estudio no debieron recibir un tratamiento antimicrobiano para *H. pylori* por lo menos seis meses antes de la biopsia recolectada, además de no presentar esofagitis ni cáncer gástrico (Tamariz, 2010).

El tamaño total de la muestra consistió en 191 individuos ecuatorianos de sexo masculino y femenino. Se determinaron dos grupos en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular de la PUCE para la genotipificación: uno de ellos corresponde a individuos no infectados con la bacteria *H. pylori*, denominados grupo control, mientras que el segundo corresponde a individuos infectados con *H. pylori*. Los individuos controles y afectos fueron agrupados de acuerdo a la presencia o ausencia de la bacteria dentro de las muestras

analizadas, por lo que se realizó una PCR específica del gen 16S rRNA (Rodicio y Mendoza, 2004; Sislema, 2008; Tamariz, 2010).

Se entregaron 102 muestras de individuos que comprenden el grupo que presentó infección con *H. pylori*, así como 89 muestras de individuos que corresponden al grupo control. Junto con cada muestra de individuos afectados y controles se presentó una historia clínica completa y el resultado de los exámenes histopatológicos aplicados en cada uno de los centros de salud.

4.2. TIPO DE DAÑO GÁSTRICO

Las biopsias analizadas fueron obtenidas mediante endoscopías, agrupadas de acuerdo a la lesión gástrica presente en cada individuo y categorizadas de acuerdo al resultado histopatológico. La clasificación se determinó de acuerdo al Taller Internacional sobre Histopatología de la Gastritis que evaluó y revisó la clasificación del Sistema Sidney para el reporte de gastritis (Dixon *et al.*, 1997). Los estadios de la gastritis fueron categorizados en cinco grupos de acuerdo a la gravedad del daño observado: 1) gastritis no atrófica con presencia de úlcera, 2) gastritis crónica atrófica, 3) metaplasia intestinal, 4) displasia y, 5) cáncer gástrico (Tamariz, 2010).

4.3. ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DEL ADN

La calidad y cantidad de ADN de cada una de las muestras fueron analizadas para el genotipaje correspondiente, ya que los contaminantes en el producto disminuyen la eficiencia y los resultados de la reacción de PCR, así como la digestión con enzimas de restricción (Budowle *et al.*, 2000; Paz-y-Miño y Leone, 2002; Cabrera, 2010).

La pureza y concentración de ADN en solución se obtuvo mediante espectrofotometría usando diluciones de 6/3000 μL (1:500). Se midió la absorción de luz en longitudes de onda de 230, 260 y 280 nm para establecer la cantidad de proteínas presentes en la solución (230 y 280 nm) y la cantidad de ADN (260 nm). La relación entre densidades ópticas (por sus siglas en inglés: OD) OD260/OD230 fue calculada para determinar la contaminación de las muestras, considerando que es un buen producto si el valor calculado se encuentra entre 1,8 y 2,0 (Werman *et al.*, 1996; Cabrera, 2010).

La calidad del ADN fue determinada por medio de electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% de concentración y teñidos con bromuro de etidio a una concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los geles fueron sumergidos en solución tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X y sometidos a un campo eléctrico constante de 35 mA durante una hora (Cabrera, 2010). Una vez que las muestras migraron dentro de los geles, fueron observadas bajo luz ultravioleta (UV) de 302 nm de longitud de onda y comparadas con un marcador de peso molecular y concentración de ADN (Cabrera, 2010).

4.4. DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO (GENOTYPING)

Para determinar el genotipo de los individuos estudiados se realizó el método de PCR-RFLP que se basa en el corte directo de los productos de PCR usando enzimas de restricción. Los resultados de los cortes enzimáticos fueron verificados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 5% y comparados con marcadores moleculares de peso de 10 y 50 pares de bases (TrackITTM 10bp DNA Ladder y TrackITTM 50 bp DNA Ladder de InvitrogenTM), visualizados en un transiluminador con luz ultravioleta.

4.4.1. AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES QUE CONTIENEN LOS POLIMORFISMOS R677W EN TLR2 Y D299G EN TLR4

Para la amplificación de la región que contiene el SNP R677W del gen TLR2 se obtuvo un volumen final de reacción de PCR de 50 μL , la cual estuvo compuesta por 37,3 μL de H_2O milli Q, 5 μL de buffer de PCR 10X a una concentración final de 1X, 1,5 μL de solución de MgCl_2 a una concentración final de 1,5mM, 1 μL de solución de dNTPs (deoxinucleótido trifosfato) a una concentración final de 0,2 mM de cada uno de ellos (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 0,5 μL de cebador FW +5' CTG GGT GGA GAA CCT TAT GG 3' a una concentración final de 0,1 μM , 0,5 μL de RV +5' CTG GCA AGT GGA TCA TTG AC 3' a una concentración final de 0,1 μM , 0,2 μL de Taq polimerasa (InvitrogenTM) a una concentración final de 1 U/ μL y 4 μL de muestra de ADN a una concentración de 200 ng en reacción.

Una vez realizada la mezcla para la reacción de PCR, las muestras fueron colocadas en el termociclador Multigene® (Labnet International, Inc.) para su procesamiento. El programa de PCR comprende: 1) denaturación inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 2) denaturación a 95°C por 45 segundos, anillamiento a 55°C por 45 segundos, extensión a 72°C por 1 minuto y 3) extensión final a 72°C por 5 minutos. El tamaño del fragmento amplificado que contiene el polimorfismo R677W de TLR2 es de 103 pares de bases.

Asimismo, para la amplificación de la región que contiene el SNP D299G del gen TLR4 se obtuvo un volumen final de reacción de PCR de 50 μL , la cual estuvo compuesta por 32 μL de H_2O milli Q, 5 μL de buffer de PCR 10X a una concentración final 1X, 2,5 μL de solución de MgCl_2 a una concentración final de 2,5 mM, 1 μL de solución de dNTPs a una concentración final de 0,2 mM, 2,5 μL de cebador FW +5'CTG TGC AAT TTG ACC

ATT G 3' a una concentración final de 0,5 μ M, 2,5 μ L de RV +5'CTG GTG AGT GTG
ACT ATT G 3' a una concentración final de 0,5 μ M, 0,5 μ L de Taq polimerasa
(InvitrogenTM) a una concentración final de 2,5 U/ μ L y 4 μ L de muestra de ADN a una
concentración de 200 ng en reacción.

Una vez realizada la mezcla para la reacción de PCR, las muestras fueron colocadas
en el termociclador Multigene® (Labnet International, Inc.) para su procesamiento. El
programa de PCR comprende: 1) denaturación inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por
35 ciclos de 2) denaturación a 95°C por 45 segundos, anillamiento a 55°C por 45
segundos, extensión a 72°C por 1 minuto y 3) extensión final a 72°C por 5 minutos. El
tamaño del fragmento amplificado que contiene el polimorfismo D299G de TLR4 es de
124 pares de bases.

El diseño de los cebadores para las regiones que contienen los polimorfismos
estudiados de TLR2 y TLR4 se realizó usando el programa PerlPrimer v1.1.19 (Marshall,
2004) y las secuencias de los mismos fueron comprobadas en la base de datos de NCBI
para determinar que existe un solo sitio de anillamiento. Después de las respectivas
reacciones de PCR, los productos fueron verificados junto con marcadores de peso
moleculares de 50 bp y 100 bp (TrackITTM 50bp DNA Ladder de InvitrogenTM y 100bp
Ladder DNA marker de AxygenTM) en geles de agarosa a 2% teñidos con bromuro de
etidio y visualizados en un transiluminador UV.

4.4.2. ANÁLISIS DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DE LONGITUD POLIMÓRFICA (RFLP): VARIANTES R677W EN TLR2 CON *Acil* Y D299G EN TLR4 CON *BccI*

La técnica de PCR-RFLP consiste en marcadores genéticos bialélicos que tienen

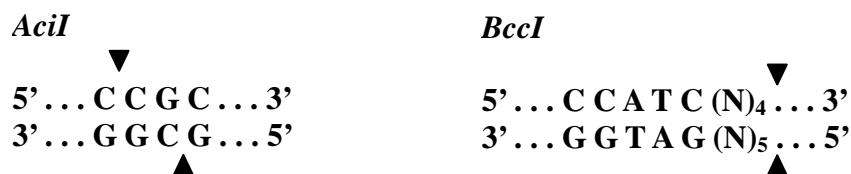
como base la presencia o ausencia de una secuencia determinada, generalmente debido a un cambio en una sola base, por lo tanto discriminar entre individuos homocigotos y heterocigotos. El análisis de RFLP genera fragmentos de ADN de distintas longitudes mediante una digestión endonucleotídica (Budowle *et al.*, 2000). La digestión es gracias al uso de enzimas de restricción que poseen la capacidad de detectar y cortar secuencias específicas cortas en el ADN; es decir, las enzimas de restricción pueden reconocer sitios específicos donde difieren las secuencias (Cossman, 1990, Yunis y Yunis, 2002). Las diferencias en las secuencias analizadas entre individuos estudiados pueden presentar fragmentos de restricción de distintas longitudes que pueden ser usados para comparaciones poblacionales (Budowle *et al.*, 2000). Es así como deleciones en un área del ADN pueden producir fragmentos más cortos, inserciones pueden producir fragmentos más largos y cambios en un solo nucleótido puede ocasionar ganancia o pérdida de una secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción (Cossman, 1990).

La determinación de las enzimas adecuadas para la digestión de los fragmentos se realizó mediante la correlación de las secuencias de los mismos con la base de datos de enzimas de restricción de New England Biolabs® Inc., usando la aplicación web NEBcutter V2.0 de esta casa fabricante (New England Biolabs, 2010). La digestión de los productos de PCR de la región que contiene la variante R677W en el gen TLR2 se realizó con la enzima de restricción *AciI*, provista por New England Biolabs® Inc. El volumen de reacción de digestión consistió de 30 µL, compuesto de 4.6 µL de H₂O milli Q, 5 µL de buffer de digestión NEBuffer 3 10X a una concentración final de 1X, 20 µL de producto de PCR y 0,4 µL de enzima *AciI* a una concentración final de 0.25 U/µL. Las muestras fueron incubadas en el termociclador Multigene® (Labnet International, Inc.) durante 3 horas a 37 °C.

La digestión de los productos de PCR de la región que contiene la variante D299G

en el gen TLR4 se realizó con la enzima de restricción *BccI* provista por New England Biolabs® Inc. El volumen de reacción de digestión consistió de 50 µL, compuesto de 11,5 µL de H₂O milli Q, 5 µL de buffer de digestión NEBuffer 1 10X a una concentración final de 1X, 0,5 µL de BSA purificado 100X (albúmina de suero bovino) a una concentración final de 100 µg/mL, 30 µL de producto de PCR y 3 µL de enzima *BccI* a una concentración final de 0.6 U/µL. Las muestras fueron incubadas en el termociclador Multigene® (Labnet International, Inc.) usando el mismo programa de incubación de la enzima *AciI*.

Los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *AciI* y *BccI* son:



4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Una vez determinado el genotipo de los individuos estudiados se calculó la frecuencia de los alelos de los individuos afectados y los individuos control. Para esto se dividió el número de alelos alterados para el número total de alelos estudiados en el grupo, siendo el doble de individuos estudiados debido a que cada individuo posee dos copias de un mismo alelo. Asimismo se obtuvo la frecuencia genotípica para los grupos afectados y control. Este cálculo se realizó dividiendo el número de individuos con cada genotipo (homocigoto dominante, heterocigoto y homocigoto recesivo) para el número total de individuos. Para determinar si la población se encuentra en equilibrio, la suma de las frecuencias genotípicas para un solo locus debe ser igual a 1,00.

Las frecuencias genotípicas esperadas se obtienen a partir de las frecuencias alélicas mediante la ecuación de Hardy-Weinberg (Stephenson, 2003). De este modo, las

frecuencias de los individuos homocigotos consiste en la frecuencia de cada alelo elevado al cuadrado (p^2 y q^2), mientras que la frecuencia de los individuos heterocigotos es dos veces la frecuencia determinada para cada alelo ($2pq$) (Stephenson, 2003).

Para determinar si existen diferencias significativas entre los individuos afectos y los individuos control para los polimorfismos estudiados se realizó el análisis estadístico mediante la prueba de Chi cuadrado (χ^2) usando el programa SPSS© 17.0 para Windows®. En el caso de variables muy pequeñas se aplicó la prueba exacta de Fisher para tablas 2 x 2, cuando la frecuencia esperada en alguna casilla de la tabla es menor a 5. La prueba de Odds Ratio fue usada para determinar el riesgo de infección con *H. pylori* para cada genotipo estudiado, además del sexo del grupo de estudio, usando tablas de contingencia de 2x2 (Ponce *et al.*, 2001).

5. RESULTADOS

5.1. PARÁMETROS BIOPATOLÓGICOS

Del total de 191 individuos analizados en el estudio, 103 (53,9%) corresponden a mujeres y 88 (46,1%) son hombres. Dentro del grupo de individuos mujeres se encontraron 56 (54,4%) infectadas con *H. pylori* y 47 (45,6%) mujeres que no presentaron la infección. En el grupo de varones se encontraron 46 (52,3%) individuos que presentaron la infección con la bacteria y 42 (47,7%) que no presentaron la infección (Tabla 1 y Tabla 2).

Al momento de la toma de la muestra, la edad promedio de todos los individuos estudiados fue de 47,3 años dentro de un rango de 15 a 86 años. Dentro de los individuos afectados la edad promedio es de 45,8 años en el rango de 15 a 82 años. 56 (54,9%) individuos afectados se encuentran debajo del promedio de edad y 46 (45,1%) sobre el promedio.

En el caso de los individuos control, el promedio de edad fue de 49 años dentro de un rango de 17 y 86 años. En este grupo se encontró que 40 (44,9%) individuos se encuentran por debajo del promedio de edad, mientras que 49 (55,1%) están sobre el promedio. Relacionando la edad con el sexo, se obtuvo que el rango de edad fue de 17 a 86 años con un promedio de 51 años en mujeres, mientras que en varones el rango de edad es de 15 a 82 años con un promedio de edad de 43,1 años (Tabla 2).

5.2. TIPO DE DAÑO GÁSTRICO

Usando la clasificación del Sistema Sidney para el reporte de gastritis se catalogaron los individuos estudiados de acuerdo a la escala de gravedad de afecciones

gastrointestinales donde (0) corresponde a individuos con mucosa gástrica normal, (1) a individuos con gastritis crónica no atrófica, (2) a individuos con gastritis crónica atrófica, (3) individuos con metaplasia intestinal, (4) individuos con displasia y (5) pacientes con cáncer gástrico. Del total de individuos estudiados, 117 presentaron gastritis crónica no atrófica, de los cuales 53 (45,3%) corresponden a individuos afectados y 64 (54,7%) a individuos controles. Dentro de los individuos afectados se encontraron 24 (45,3%) hombres y 29 (54,7%) mujeres, mientras que en los individuos control se encontraron 32 (50%) mujeres y 32 (50%) hombres (Tabla 1).

Los individuos que presentaron gastritis crónica atrófica son 43, de los cuales 33 (76,7%) son individuos infectados con *H. pylori* y diez (23,3%) son individuos no infectados. En el grupo de afectados, 16 (48,5%) son de sexo masculino y 17 (51,5%) de sexo femenino. En el grupo control, 4 (40%) son individuos varones y 6 (60%) mujeres (Tabla 10). En el caso de los 28 sujetos con metaplasia intestinal, 16 (57,1%) corresponden a individuos afectados y 12 (42,9%) a individuos del grupo control. En el grupo de afectados seis (37,5%) son varones y diez (62,5%) son mujeres, mientras que en el grupo control cinco (41,7%) son varones y siete (58,3%) son mujeres (Tabla 1).

El grupo con displasia presenta un solo individuo varón que pertenece al grupo de individuos controles y que tenía 36 años de edad. En el caso de los individuos con cáncer gástrico existen dos sujetos de sexo femenino que pertenecen al grupo de individuos control y tenían 76 y 83 años de edad (Tabla 3).

El promedio de edad en los individuos afectados con *H. pylori* y que presentan gastritis crónica no atrófica es de 43,6 años, mientras que en los sujetos del grupo control con la misma afección gástrica es de 44,7 años. En el caso de los sujetos afectados que presentan gastritis crónica atrófica, el promedio de edad es de 45,8 años; en los individuos controles con el mismo tipo de gastritis el promedio es de 53,2 años. En el grupo que

presenta metaplasia intestinal, los individuos afectos presentan un promedio de edad de 53,2 años y el grupo de individuos controles tienen un promedio de edad de 64,6 años.

En relación a los grupos de displasia y cáncer gástrico no se calculó la edad promedio debido a que los tamaños de muestra son muy pequeños, por lo que no tendrán mucha importancia al momento de la discusión de resultados (Tabla 3).

5.3. ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTIFICATIVO DEL ADN

El ADN de las 191 biopsias gástricas de los respectivos individuos fue probado en geles de agarosa al 1% con un marcador molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen™) para determinar la calidad del ADN. La calidad del ADN entregado fue apta para los procedimientos moleculares posteriores (Figura 1).

La concentración de ADN en el grupo de afectos presenta un rango de 27,6 ng/μL a 851 ng/μL con un promedio de 185,91 ng/μL, mientras que en las muestras de ADN de los individuos del grupo control presentan un rango de 36,7 ng/μL a 3598,4 ng/μL con un promedio de concentración de 252,9 ng/μL.

5.4. GENOTIPO

5.4.1. PCR DE LOS FRAGMENTOS QUE CONTIENEN LOS POLIMORFISMOS R677W DEL GEN TLR2 Y D299G DEL GEN TLR4

Los cebadores diseñados para la amplificación de los fragmentos que contienen los polimorfismos R677W y D299G de los genes TLR2 y TLR4 respectivamente, mostraron un solo sitio de anillamiento en la secuencia genómica del ser humano publicada en la

página de internet del NCBI.

Se obtuvo un fragmento de 103 pb, tanto de individuos controles como afectados, el mismo que fue observado como una sola banda en el gel de agarosa al 2% (Figura 2).

Asimismo, los fragmentos obtenidos de las muestras de ADN de individuos control y afectados tienen un peso de 124 pb que fueron observados como una única banda en los geles de agarosa al 2% (Figura 3).

5.4.2. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA CON *AciI* EN EL POLIMORFISMO R677W EN TLR2 Y CON *BccI* EN EL POLIMORFISMO D299G EN TLR4

La digestión enzimática de los fragmentos de 103 pb con *AciI* dio como resultado 2 fragmentos de 70 y 33 pares de bases, respectivamente.

- Los individuos homocigotos para el alelo arginina (*arg/arg* o R/R) presentan una digestión del fragmento amplificado, lo que dio como resultado dos bandas de 70 pb y 33 pb. No existen cambios de bases en la secuencia.
- Los individuos heterocigotos para el polimorfismo R677W (*arg/trp* o R/W) presentaron tres bandas de 103 pb, 70 pb y 33 pb respectivamente.
- Los individuos homocigotos para el alelo triptófano (*trp/trp* o W/W), que es la variante alélica del polimorfismo R677W, presentó una sola banda de 103 pb (Figura 4).

La digestión enzimática de los fragmentos de 124 pb con *BccI* dio como resultado dos fragmentos de 75 y 49 pares de bases, respectivamente.

- Los individuos homocigotos para el alelo ácido aspártico (*asp/asp* o D/D), que es la variante alélica del polimorfismo D299G, presentó una sola banda de 124 pb. No existe corte enzimático porque no existe el sitio de reconocimiento de la enzima en

el ADN blanco.

- Los individuos heterocigotos para el polimorfismo D299G (*asp/gly* o D/G) presentaron tres bandas de 124 pb, 75 pb y 49 pb respectivamente.
- Los individuos homocigotos para el alelo arginina (*gly/gly* o G/G) presentaron una digestión del fragmento amplificado, lo que da como resultado dos bandas de 75 pb y 49 pb (Figura 5).

5.5. FRECUENCIAS ALÉLICAS DE LOS POLIMORFISMOS R677W EN TLR2 Y D299G EN TLR4

Dentro del grupo de individuos infectados con *H. pylori* se encontraron dos sujetos homocigotos para el alelo arginina (*arg/arg* o R/R), 64 individuos presentaron heterocigosis (*arg/trp* o R/W) y 36 presentaron homocigosis para el alelo triptófano (*trp/trp* o W/W). En el grupo control se observaron cinco individuos homocigotos para R/R, 51 presentaron heterocigosis R/W y 33 individuos homocigotos W/W. En cuanto a la frecuencia del alelo arginina en individuos afectados fue de 0,33, mientras que en el grupo de individuos control la frecuencia fue de 0,34. Las frecuencias para el alelo triptófano en individuos afectados y controles fueron de 0,67 y 0,66, respectivamente (Tabla 1 y Tabla 4).

En relación con el polimorfismo estudiado en TLR4, en el grupo de afectados se encontraron 20 sujetos homocigotos para el alelo ácido aspártico (*asp/asp* o D/D), 57 individuos heterocigotos (*asp/gly* o D/G) y 25 sujetos homocigotos para el alelo glicina (*gly/gly* o G/G). En el grupo de sujetos control, los individuos homocigotos para el alelo D/D fueron 30, los individuos heterocigotos D/G fueron 53 y se encontraron seis sujetos homocigotos para el alelo G/G. En cuanto a la frecuencia de los alelos dentro del grupo de afectados, el alelo ácido aspártico presentó un valor de 0,48, mientras que el alelo glicina

presentó un valor de 0,52. La frecuencia de los alelos en el grupo de individuos controles fue de 0,63 para el alelo ácido aspártico y de 0.37 para el alelo glicina (Tabla 1 y Tabla 5).

5.6. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DE LOS POLIMORFISMOS R677W EN TLR2 Y D299G EN TLR4 EN COMPARACIÓN AL TIPO DE DAÑO GÁSTRICO

En el grupo de individuos afectados que presentaron gastritis crónica no atrófica (53 individuos), un solo sujeto presentó R/R, mientras que 35 individuos presentaron la condición R/W y 17 sujetos la condición W/W. Asimismo, los individuos del grupo control que presentaron este tipo de gastritis fueron catalogados de acuerdo a su genotipo. Se encontraron dos individuos con la condición R/R, 37 sujetos con la condición R/W y 25 individuos con la condición W/W.

En el grupo de individuos con gastritis crónica atrófica, un sujeto afecto presentó homocigosis para el alelo R, mientras que 20 individuos afectados con *H. pylori* presentaron la condición R/W y 12 afectados presentaron la condición W/W. Los individuos controles con esta afección gástrica no presentaron individuos con la condición R/R, sin embargo se encontraron siete sujetos con la condición R/W y tres con la condición W/W.

Dentro de los individuos afectados que presentan metaplasia, ninguno presentó la condición R/R, mientras que nueve individuos presentaron heterocigosis R/W y siete sujetos presentaron la condición W/W. En el caso de los individuos controles, tres sujetos presentaron la condición R/R, seis presentaron la condición R/W y tres la condición W/W.

El único individuo que presentó displasia corresponde al grupo control y presenta la condición R/W. Asimismo, los únicos individuos que tienen cáncer gástrico pertenecen al grupo control y presentan la condición W/W (Tabla 1 y Tabla 6).

Del total de individuos afectados que presentan gastritis crónica no atrófica siete presentaron la condición D/D, 32 la condición D/G y 14 la condición G/G. En cuanto a los individuos controles, cinco presentaron la condición D/D, 35 individuos la condición D/G y 24 la condición G/G.

En el grupo de individuos con gastritis crónica atrófica, diez individuos afectados presentaron homocigosis D/D, 15 presentaron heterocigosis D/G y ocho individuos presentaron homocigosis G/G. En el caso de los individuos controles, un individuo presentó la condición D/D, nueve son heterocigotos D/G y ninguno presentó la condición G/G.

En el caso de los individuos con metaplasia gástrica, existieron tres individuos afectados con la condición D/D, diez presentaron heterocigosis D/G y tres presentaron la condición G/G. En el caso de individuos controles, ninguno presentó homocigosis D/D, pero se encontraron siete individuos con heterocigosis D/G y cinco individuos con la condición G/G.

El único individuo que presentó displasia corresponde al grupo control y presenta la condición D/G. En el caso de los dos individuos con cáncer gástrico, ambos pertenecen al grupo control. Uno de ellos presentó una condición D/G y el otro presentó la condición G/G (Tabla 1 y Tabla 6).

5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

5.7.1. CHI CUADRADO PARA EL POLIMORFISMO R677W EN TLR2 Y D299G EN TLR4 EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Para establecer si existen diferencias entre individuos afectados y controles, se realizó

la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) para la variante R677W en el gen TLR2. Los resultados de la prueba no mostraron diferencias significativas en las frecuencias entre casos y controles. Es decir, tanto el alelo R como el alelo W se pueden presentar en individuos afectados y controles ($p=0,366$; $p>0,05$) (Tabla 7).

Asimismo la prueba de χ^2 fue usada para la variante D299G para determinar diferencias entre las frecuencias de los grupos afectados y controles. Se encontraron diferencias altamente significativas entre los dos grupos. Esto quiere decir que la presencia del alelo D se da con mayor frecuencia en los individuos controles, mientras que el alelo G se encuentra con mayor frecuencia en los individuos afectados ($p=0,002$, $p<0,01$) (Tabla 8).

5.7.2. PRUEBA DE ODDS RATIO (OR) PARA EL RIESGO DE INFECCIÓN CON *Helicobacter pylori*: SNP R677W EN TLR2 Y D299G EN TLR4

El riesgo para la infección con *H. pylori* fue determinado mediante la prueba de Odds Ratio (OR) en los individuos que presentaron el alelo polimórfico W, tanto individuos heterocigotos (R/W) como individuos homocigotos (W/W). Se realizaron tablas de contingencia 2x2 de los resultados obtenidos en individuos afectados y controles para su respectiva comparación.

Dentro del grupo de individuos afectados, dos individuos presentaron la condición R/R, 64 la condición R/W y 36 la condición W/W (100 individuos entre homocigotos W/W y heterocigotos R/W). En el caso de individuos controles, cinco individuos presentaron la condición R/R, 51 la condición R/W y 33 presentaron la condición W/W (84 individuos entre homocigotos W/W y heterocigotos R/W). Entre individuos homocigotos R/R versus individuos R/W no se encontraron diferencias significativas ($\chi^2= 1,949$; $p>0,05$), además se obtuvo un OR de 0,319 usando un intervalo de confianza (IC) del 95% entre 0,059 y 1,711

(OR=0,319 IC95%=0,059-1,711; $p>0,05$). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre individuos R/R versus individuos W/W ($\chi^2=1,416$; OR=0,367 IC95%=0,067-2,02; $p>0,05$); asimismo en individuos R/R versus el grupo conformado por individuos R/W y W/W no se encontraron diferencias significativas ($\chi^2=1,801$; OR=0,336 IC95%=0,064-1,776; $p>0,05$) (Tabla 9).

El grupo de afectos consistió de 20 individuos D/D, 57 individuos heterocigotos D/G y 25 individuos G/G (82 individuos en total entre homocigotos G/G y heterocigotos D/G), mientras que en el grupo de sujetos controles, 30 presentaron la condición D/D, 53 son heterocigotos D/G y seis la condición G/G. No se encontraron diferencias significativas entre individuos homocigotos D/D versus individuos heterocigotos D/G ($\chi^2=1,923$; OR=0,62 IC95%=0,315-1,221; $p>0,05$), sin embargo al momento de comparar entre individuos homocigotos D/D y G/G se encontraron diferencias significativas ($\chi^2=12,803$; OR=0,16 IC95%=0,056-0,46; $p<0,001$), al igual que en los individuos homocigotos D/D y el grupo compuesto por heterocigotos D/G y homocigotos G/G ($\chi^2=4,89$; OR=0,48 IC95%=0,249-0,926; $p<0,01$). A pesar de que las diferencias son significativas en los dos últimos análisis, los valores de OR son menores a uno, por lo que no se puede relacionar la presencia del alelo polimórfico G con el riesgo de infección con la bacteria *H. pylori* (Tabla 9).

5.7.3. RIESGO DE DESARROLLO DE GASTRITIS EN INDIVIDUOS PORTADORES DE LOS ALELOS POLIMÓRFICOS DEL SNP D299G DE TLR4

El riesgo de desarrollar algún tipo de gastritis en relación con la presencia del alelo polimórfico G en individuos afectos y controles fue determinado mediante χ^2 , mientras que

en el caso de frecuencias menores a 5, se usó la prueba exacta de Fisher. La prueba de OR fue necesaria para determinar el riesgo de desarrollo de gastritis. Dentro del grupo de individuos que presentaron gastritis crónica no atrófica, gastritis crónica atrófica y metaplasia se tomó como referencia el alelo D. En todos los grupos de gastritis se relacionó individuos homocigotos D/D e individuos portadores del alelo G (suma de heterocigotos D/G y homocigotos G/G).

Dentro del grupo de individuos que presentaron gastritis crónica no atrófica se obtuvieron 53 individuos afectados de los cuales siete presentaron la condición D/D y 46 portadores del alelo G (32 individuos D/G y 14 individuos G/G), mientras que de los 64 individuos control, cinco presentaron la condición D/D y 59 portan el alelo polimórfico G (35D/G y 24G/G). Se obtuvieron valores de $\chi^2=0,917$; OR=1,796 IC95%=0,535-6,026; $p>0,05$. Las diferencias no son significativas, sin embargo la prueba de OR indica que las personas que presentaron el alelo polimórfico G tienen 1,8 veces más riesgo de desarrollar gastritis crónica no atrófica que los individuos que no presentaron el alelo polimórfico.

En el grupo de individuos que presentaron gastritis crónica atrófica, se procedió con el test exacto de Fisher. Se analizaron 33 individuos afectados de los cuales diez presentaron la condición D/D, mientras que 23 son portadores del alelo G (15D/G y 8G/G); dentro del grupo de individuos control que padecían esta condición patológica, un individuo presentó homocigosis D/D, mientras que nueve individuos presentaron el alelo polimórfico (9 D/G y ningún G/G). Se obtuvo un valor de $p=0,409$; $p>0,05$ y un OR=3,913 con un intervalo de confianza (IC95%) entre 0,436 y 35,151. A pesar del ajuste, no existen diferencias significativas, pero el valor de OR indica que los individuos que presentaron el alelo polimórfico tienen 3,9 veces más riesgo de desarrollar gastritis crónica atrófica.

Para los individuos que padecen metaplasia intestinal se obtuvo que en los individuos afectados tres presentaron la condición D/D y 13 portan el alelo G (diez D/G y

tres G/G), mientras que en el grupo control ningún individuo presentó la condición D/D y 12 sujetos portan el alelo G (siete D/G y cinco G/G). Se calculó el valor de p mediante la prueba exacta de Fisher ($p=0,238$; $p>0,05$) y no se encontraron diferencias significativas. No se pudo calcular el valor de OR ya que dentro de las frecuencias se encontró un valor igual a cero, por lo que es estadísticamente invisible para los análisis respectivos.

No se pudo realizar el análisis estadístico para los individuos con displasia y con cáncer gástrico, ya que solamente se encontró un individuo control con displasia (condición D/G) y dos individuos con cáncer gástrico (ambos controles, D/G y G/G) (Tabla 10).

5.7.4. RIESGO DE INFECCIÓN CON *Helicobacter pylori* DE ACUERDO AL SEXO

La prueba de OR fue utilizada para determinar si el sexo es un factor que influencia la infección con la bacteria *H. pylori*. Del total de individuos estudiados, 88 son varones, de los cuales 46 son individuos afectados y 42 son individuos control; 103 son mujeres de las cuales 56 presentaron infección con la bacteria y 47 son sujetos control. Se realizó la prueba de χ^2 y se obtuvo los siguientes valores: $\chi^2=0,084$; OR=0,919 IC95%=0,52-1,626; $p>0,05$. Estos valores indican que no existen diferencias significativas así como tampoco existe riesgo entre hombres y mujeres para infectarse con *H. pylori*.

6. DISCUSIÓN

Actualmente, las infecciones de *H. pylori* son responsables de una elevada tasa de mortalidad y morbilidad como causa de una variedad de enfermedades gástricas (Suerbaum y Josenhans, 2007). La alta tasa de incidencia está ligada a los factores sociales, económicos y culturales de cada región, ya que las condiciones de higiene, calidad y manejo deficientes de alimentos y de reservas de agua juegan un rol primordial en la adquisición temprana, las rutas de transmisión y mecanismos de reinfección de la bacteria (Cabrera *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2002).

A pesar de que existe una variedad de publicaciones acerca de la etiología de la bacteria, el comportamiento de la misma fuera del huésped no ha sido investigado a profundidad (Cabrera *et al.*, 2002). Las rutas exactas de transmisión y la supervivencia de la bacteria fuera de su nicho deben ser estudiadas y correlacionadas con la genética del patógeno y del huésped para determinar una etiología bacteriana correcta. El rol que presenta la bacteria en las enfermedades gastrointestinales es muy importante, sin embargo no es el único factor. El desarrollo de las diferentes complicaciones gástricas resulta de una interacción entre los factores ambientales, bacterianos y del huésped. Así como la variabilidad entre cepas bacterianas y la interacción continua con el huésped permite una adaptación al ambiente por medio de mutaciones y re arreglos genéticos dando a lugar nuevos genotipos bacterianos, el huésped puede presentar una variabilidad a diferentes niveles del sistema inmunológico debido a la presencia crónica de *H. pylori*, lo que tiene un impacto directo en la producción de elementos gástricos importantes, afectando la localización y densidad de la bacteria en el tracto gastrointestinal. Los diversos estudios epidemiológicos y análisis genéticos realizados han determinado con certeza que las variaciones genéticas de la bacteria y del huésped influyen la frecuencia y el curso de

las enfermedades infecciosas (Schröder y Schumann, 2005; Kusters *et al.*, 2006).

En países en vías de desarrollo, como es el caso de Ecuador, el estudio de los genes que se encuentran involucrados en la identificación y activación del sistema inmune no ha sido exhaustivo, así como las implicaciones que tienen los diferentes polimorfismos en los pacientes que presentan la infección con *H. pylori*. Debido a la importancia de la bacteria en el desarrollo de las diferentes enfermedades gástricas, la documentación de la acción de varias alteraciones genéticas que incluyen cambios, ganancias y pérdidas en secuencias cuya importancia está relacionada con la capacidad de *H. pylori* de ocasionar infecciones persistentes, resulta de interés el análisis de los factores genéticos ligados al huésped para la diagnosis, tratamiento y erradicación de la bacteria (Suerbaum y Josenhans, 2007).

La edad es un dato importante en la relación de la infección de *H. pylori* y el huésped. Los datos encontrados en diferentes publicaciones indican que la infección con la bacteria ocurre a edades tempranas en individuos de países en vías de desarrollo y presenta una alta incidencia en las poblaciones con niveles socioeconómicos bajos (Castro y Coelho, 1998). Hasta los 5 años de edad el 50% de los individuos presentan la infección y el índice tiene un repunte drástico conforme la edad es mayor hasta alcanzar, y en ciertas regiones sobrepasar, el 90% de la población en edad adulta, lo que refiere que la bacteria presenta fases de adquisición y pérdida de la bacteria hasta cuando la colonización de la misma es crónica en la adultez (Castro y Coelho, 1998; Frenck y Clemens, 2003; Tamariz, 2010). En el grupo de estudio se observó un promedio de edad de 47 años. Estos datos presentan una relación con el tiempo de la infección y la cronicidad de la misma, ya que al comparar los datos de la edad de los individuos estudiados versus la condición gástrica (sólo en los grupos de gastritis crónica no atrófica, atrófica y metaplasia) se determina que los individuos que presentan la infección de la bacteria tienen menor edad en comparación con los individuos del grupo control (Tabla 3). Estudios realizados en el Ecuador muestran

que la rápida aparición de la bacteria en la infancia y las altas tasas de reinfección determinan que los individuos presenten mayor probabilidad de desarrollar condiciones clínicas gástricas adversas, con mayor frecuencia y más rápidamente, en poblaciones más jóvenes de países con altas tasas de infección en comparación con poblaciones jóvenes de países donde las tasas de infección son muy bajas (Gómez *et al.*, 2004; Sempértegui *et al.*, 2007; Egorov *et al.*, 2010). La edad promedio de los individuos afectados va aumentando en relación directa al nivel de daño gástrico que padecen; esto indica que los individuos que presentan condiciones gástricas más complicadas han estado expuestos a la bacteria por más tiempo, lo que ha dado la posibilidad de que el sistema inmune actúe por más tiempo y se produzca un daño más profundo, y en algunos casos crónico, en las células gastrointestinales. Cuando la infección de *H. pylori* es persistente en el individuo pueden darse eventos en los que la bacteria adquiera características que le facilite la adaptación a un huésped determinado, o que el individuo presente una variante polimórfica en los genes involucrados en la respuesta inmune, teniendo un impacto positivo en la colonización de la bacteria y determinar el desarrollo de una patología gástrica, ocasionando el deterioro celular gastrointestinal (Suerbaum y Josenhans, 2007; Hold *et al.*, 2007). A pesar de la alta incidencia de la infección bacteriana con *H. pylori* en países en vías de desarrollo y de las condiciones gástricas crónicas que se presentan, muchos de los individuos infectados con la bacteria no presentan síntomas (Cabrera, 2010).

La infección con *H. pylori* no difiere entre hombres y mujeres. Este aspecto fue corroborado en el análisis estadístico respectivo que determinó que no existen diferencias significativas, así como no existe riesgo entre hombres y mujeres para infectarse con la bacteria. Está documentado que la transmisión se realiza de persona a persona por vías oral-oral o fecal-oral, y que las prácticas culturales, además del nivel de educación y socioeconómico de los padres, están fuertemente ligadas a la transmisión de la bacteria de

madres a hijos, sin importar el sexo (Frenck y Clemens, 2003; Gómez *et al.*, 2004; Pérez-Pérez *et al.*, 2004; Kusters *et al.*, 2006).

Existen varios estudios que sugieren que la infección con *H. pylori* es una condición necesaria para el desarrollo del cáncer gástrico, ya que se han encontrado pacientes que presentan la neoplasia que en algún momento de su vida estuvieron infectados con la bacteria pero que perdieron la infección (Pérez-Pérez *et al.*, 2004). Dentro del grupo analizado en el estudio se encontraron dos individuos con cáncer gástrico que no presentaron infección con la bacteria, lo que permite suponer que a pesar de que *H. pylori* es el factor principal, no es el único para el desarrollo de la neoplasia. La genética del huésped, el estilo de vida, el déficit nutricional y las características de la cepa invasora, además de la interacción continua con el sistema inmune y sus productos, pueden influir en el desarrollo del cáncer gástrico, definiéndolo como una enfermedad de carácter multifactorial (Pérez-Pérez *et al.*, 2004; Hold *et al.*, 2007; Azevedo *et al.*, 2009).

El gen TLR2 codifica una proteína de membrana que se encuentra involucrada en la identificación de patrones moleculares asociados a patógenos Gram positivos y Gram negativos. En el caso de *H. pylori*, la proteína TLR2 reconoce los lipopolisacáridos de la bacteria y la proteína activadora de neutrófilos para activar la respuesta inmune mediada por las interleuquinas IL-12 e IL-23 (Haehnel *et al.*, 2002; Moura *et al.*, 2008). La variante R677W estudiada se encuentra en el dominio TIR que está involucrado en la señalización y dimerización de la proteína para el reconocimiento de patógenos, y el polimorfismo está relacionado con la inhibición de los factores de transcripción necesarios para la activación de una respuesta inmune adecuada (Texereau *et al.*, 2005). La frecuencia del alelo W es alta tanto en el grupo de individuos control como en el grupo de individuos afectados (0,66 y 0,67 respectivamente). Los altos valores de frecuencia de W están relacionados con la gran cantidad de individuos heterocigotos en los dos grupos (64 afectados y 51 controles), cuyos

números de integrantes son más altos que los que presentan homocigosis para la variante W en ambos grupos (Tabla 4). El análisis estadístico entre individuos casos y controles para el polimorfismo R677W de TLR2 muestra que no existen diferencias significativas entre estos dos grupos, por lo que la presencia del alelo W y la respuesta inmune alterada que se observaría a causa del alelo se da tanto en los individuos afectados como en los individuos control ($\chi^2=2,010$; $p=0,336$; $p>0,05$) (Tabla 7). Sin embargo, al momento de realizar el análisis de riesgo para la infección con la bacteria *H. pylori* se observa que no existe asociación entre la predisposición del huésped de presentar la variante W y la colonización de la bacteria en el estómago ($\chi^2=1,801$; OR=0,336 IC95%=0,064-1,776; $p>0,05$) (Tabla 9). A pesar de que los análisis estadísticos no muestran una relación entre TLR2, la variante R677W y la infección con *H. pylori*, varios autores identifican a TLR2 como el receptor principal de LPS de *H. pylori*, ya que se ha comprobado que, en cultivos celulares, activa el factor de transcripción NF- κ B e induce la producción de citoquinas, interleuquinas y quimioquinas, promoviendo la inflamación localizada (Yang *et al.*, 1998; Maeda *et al.*, 2001; Mandell *et al.*, 2004; Lepper *et al.*, 2005; Ding *et al.*, 2005). En realidad, debido a que TLR2 es un receptor que se expresa en las células epiteliales del estómago humano, está involucrado en el reconocimiento de muchos componentes moleculares diversos asociados a bacterias que invaden el tracto gastrointestinal humano (Medzhitov, 2001; Fukata y Abreu, 2008). Este amplio espectro de reconocimiento de factores patógenos está relacionado con la formación de heterodímeros con correceptores de membrana como TLR1 y TLR6. Cada conformación de dímeros tiene la capacidad de identificar una molécula asociada a un tipo de patógeno determinado, por lo que los patrones moleculares de los mismos deben poseer estructuras altamente conservadas para que puedan ser identificados por los receptores. En el caso de *H. pylori* se conoce que puede desarrollar una variabilidad genética en la colonia que infecta el individuo,

permitiendo que se alteren ciertos componentes de los factores de virulencia, como proteínas extramembranales y LPS, lo que puede producir una infección mixta de cepas en el individuo. Estas condiciones dificultan el reconocimiento por parte de TLR2, evadiendo así la activación de la respuesta inmune humana y mejorando su adaptación al medio (Scott y Cover, 2006; Kusters *et al.*, 2006; Medzhitov, 2007; Wolff, 2008; Tamariz, 2010). Por esta razón, a pesar de ser considerado como un receptor de LPS, varios autores sugieren que TLR2 puede no jugar un rol crucial en la identificación de estas estructuras en *H. pylori*, ya que los estudios realizados para determinar su papel en la respuesta inmune activada por *H. pylori* fueron realizados *in vitro* con componentes celulares purificados, lo que sugiere que de acuerdo a la especie del huésped, la identificación de los LPS dependerá de un tipo diferente de TLR, por lo que TLR4 jugaría un papel más importante que TLR2 en el reconocimiento de estos patrones moleculares *in vivo* en los seres humanos (Takeuchi *et al.*, 1999; Moura *et al.*, 2008).

TLR4 es una proteína de membrana en las células epiteliales del estómago, intestino delgado e intestino grueso, donde juega roles importantes en la identificación de patógenos y recuperación de tejidos epiteliales intestinales (Medzhitov, 2001; Takeda *et al.*, 2003; Fukata y Abreu, 2008). El análisis de las frecuencias alélicas de la variante G muestra que el valor es casi similar al de la variante A dentro de los individuos afectos (0,52 y 0,48, respectivamente), mientras que en los individuos control el valor de la frecuencia alélica de G es un poco más bajo (0,37). Las frecuencias alélicas para la variante G dentro de los individuos infectados con *H. pylori* está relacionada con la cantidad de individuos homocigotos D/D y G/G que es casi la misma (20 y 25 individuos, respectivamente), lo que no sucede en el grupo control donde la cantidad de individuos homocigotos G/G es mucho menor a la de los individuos D/D (6 y 30 individuos, respectivamente), sin embargo el valor de la frecuencia alélica de G dentro de este grupo es

representativo debido al elevado número de individuos heterocigotos (53 individuos) (Tabla 5). El análisis estadístico muestra que existen diferencias altamente significativas entre grupos casos y controles, lo que determina que la presencia de la variante G es marcada en los individuos afectos, a diferencia de los individuos controles ($\chi^2=12,966$; $p=0,002$; $p<0,001$) (Tabla 8). Esta condición presente en los individuos afectos se corrobora con el análisis de riesgo de desarrollar la infección obteniendo diferencias significativas, sin embargo la tasa de riesgo es muy baja, determinando que el riesgo de desarrollar la infección con *H. pylori* es el mismo entre individuos afectos y controles ($\chi^2=4,89$; OR=0,48 IC95%=0,249-0,926; $p<0,01$) (Tabla 9). Tomando en cuenta que la infección con *H. pylori* es un agente causal para el desarrollo de patologías gástricas, la interacción entre la bacteria y el huésped es una vía de doble sentido, por lo que tanto el patógeno como el huésped pueden adaptarse por medio de mutaciones y variaciones genéticas produciendo un impacto directo en las células del tracto digestivo y en el sistema inmune del huésped, al igual que en las de la colonia bacteriana (Schröder y Schumann, 2005; Kusters *et al.*, 2006). La localización de las colonias bacterianas en el tracto digestivo es un factor importante, ya que a lo largo del mismo se observan diferentes tipos celulares con diferentes características estructurales y funcionales que influyen en el reconocimiento de patógenos gástricos. La sensibilidad a los LPS es muy diferente entre células de la mucosa gástrica y células del epitelio intestinal a pesar de expresar los mismos receptores. Las células epiteliales del intestino prácticamente son insensibles a los LPS, haciéndolas tolerantes debido a la exposición constante a la microflora residente. Por otro lado, las células epiteliales estomacales presentan una elevada sensibilidad a los LPS debido a que las condiciones ácidas del estómago no permiten que muchas bacterias aparte de *H. pylori* puedan colonizarlo (Kawahara *et al.*, 2001; Schröder y Schumann, 2005; Kusters *et al.*, 2006). Se ha encontrado que una vez que los mecanismos de neutralización

de los niveles de ácido de *H. pylori* han entrado en acción, muchas bacterias oportunistas pueden colonizar el estómago, por ejemplo *Sarcina ventriculi* (Leser y Mølbak, 2009). El genoma de la bacteria no es conocido en su totalidad, sin embargo se conoce que la plasticidad genómica de la misma puede alterar factores importantes ligados a su mecanismo de adhesión y supervivencia dentro del huésped, como el complejo proteico de la membrana externa y las enzimas involucradas en la síntesis de LPS, dando a lugar a una amplia diversidad de cepas bacterianas (Kawahara *et al.*, 2001; Suerbaum y Josenhans, 2007; Hold *et al.*, 2007). La estructura básica de los LPS comprende polisacáridos y un componente lipídico denominado lípido A. Se ha establecido que el lípido A es esencial para la endotoxicidad de las bacterias Gram negativas, sin embargo pequeñas modificaciones en la arquitectura del lípido, como la pérdida de un componente o la distribución diferente de sus constituyentes, resulta en la disminución de la actividad biológica y en una activación deficiente de la respuesta inmune (Muotiala *et al.*, 1992; Scott y Cover, 2006; Kusters *et al.*, 2006). Por otro lado, la expresión de componentes fucosilados en los LPS que se asemejan al grupo de antígenos Lewis en los humanos, confiere una capacidad de mimica molecular que permite que *H. pylori* evada el reconocimiento inmune (Scott y Cover, 2006; Kusters *et al.*, 2006). Es así que a pesar de que el factor de riesgo es igual en los grupos casos y controles, las mutaciones presentes en TLR4 deben actuar en conjunto con otros cambios genéticos y factores adquiridos para influenciar la respuesta inmune a los LPS de *H. pylori*.

La interacción continua del medio gástrico del huésped con la bacteria promueve el desarrollo de condiciones gástricas adversas que pueden terminar en el desarrollo de cáncer gástrico. En la literatura se describe que tanto como TLR2 y TLR4 están involucrados en la identificación de la bacteria; sin embargo, existe una competencia entre los receptores para la identificación de componentes específicos de la membrana de *H. pylori*, donde el

receptor TLR4 tiene mayor afinidad que TLR2 a los LPS de la bacteria, a pesar de que las variaciones polimórficas de TLR4 presentes no influyen en el riesgo de la adquisición y desarrollo de la infección (Takeuchi *et al.*, 1999; Kawahara *et al.*, 2001; Gay y Gangloff, 2007; Moura *et al.*, 2008, Garza-González *et al.*, 2008). Por esta razón el análisis estadístico de la variante polimórfica D299G de TLR4 para el riesgo de desarrollo de gastritis es pertinente. Dentro de los individuos que presentaron gastritis no atrófica y atrófica no se encontraron diferencias significativas, por lo que la presencia del alelo polimórfico G es igual en individuos controles y afectados. Sin embargo los individuos afectados que presentan el alelo G presentaron alrededor de 1,8 veces mayor riesgo de desarrollar gastritis no atrófica y 3,9 veces mayor riesgo de desarrollar gastritis atrófica (Tabla 10). La acción del polimorfismo D299G en TLR4 predispone al huésped a presentar condiciones inflamatorias severas, reducción en la producción de ácido estomacal y atrofia gástrica, las mismas que están relacionadas directamente con las anomalías precancerosas más importantes (Hold *et al.*, 2007). Por otro lado, la relación del polimorfismo con la hiporesponsividad a LPS indica que existe un fallo en el reconocimiento bacteriano que puede llevar a un desbalance en la producción de factores pro- y antiinflamatorios, lo que facilitaría la creación de un ambiente dentro del estómago en la que una combinación de factores, como citoquinas y receptores de respuesta inmune, mantienen en un estado crónico de inflamación y acidez reducida. Estas condiciones ambientales permiten la proliferación de bacterias, manteniendo la inflamación y ocasionando un estrés genotóxico, facilitando el desarrollo de gastritis y, eventualmente, cáncer gástrico (Hold *et al.*, 2007; El-Omar y Hold, 2008).

La bacteria *H. pylori* es uno de los organismos patógenos conocidos con mayor éxito. La relación simbiótica que tiene con su huésped, desarrollada a lo largo de muchos miles de años, le ha permitido especializarse mediante la selección de propiedades

bacterianas específicas originando varios tipos y subtipos de cepas, colonizando una variedad de poblaciones humanas específicas. La bacteria se ha acoplado con mucha facilidad al medio estomacal mediante la adaptación continua de sus características genéticas a las condiciones que presente el huésped, así como la manipulación del medio donde se desarrolla para poder sobrevivir, lo que ha permitido que las diferencias que existen en las diferentes poblaciones humanas puedan determinar una cepa colonizadora específica de *H. pylori* (Suerbaum y Josenhans, 2007; Kusters *et al.*, 2006; Rad *et al.*, 2004). Es por esta razón que la caracterización de una variante genética que esté relacionada con la respuesta inmune del huésped y la colonización de la bacteria no puede ser generalizada, ya que la respuesta inmune de la mucosa gástrica puede ser modulada por la cepa de *H. pylori* que la coloniza, es decir, existen ciertos componentes bacterianos, como los LPS o el factor de virulencia *cag* PAI, que pueden estimular una respuesta inflamatoria mayor o menor (Blaser, 2005; Scott y Cover, 2006). Esta plasticidad genética radica en que la bacteria ha acompañado al ser humano desde sus inicios, hace unos 70 000 años atrás, y ha co-evolucionado en conjunto, adaptándose a los cambios que se han dado en la mucosa gástrica humana permitiendo su supervivencia (Linz *et al.*, 2007).

La investigación conjunta de la genética del huésped y el tipo de cepa que coloniza el estómago permitiría un mejor entendimiento de la etología de la bacteria en países en vías de desarrollo. La investigación de la expresión de los genes involucrados en la respuesta inmune en sitios específicos del estómago y del intestino facilitaría la comprensión de la interacción huésped-bacteria, lo que permitiría desarrollar programas de diagnóstico y tratamiento de enfermedades gástricas ligadas a la infección con *H. pylori*, así como programas de prevención e higiene para disminuir las tasas de infección y reinfección en el Ecuador y otros países en vías de desarrollo (Castro y Coelho, 1998).

Para comprender mejor la acción de los receptores similares a Toll involucrados en

la identificación de *H. pylori* debe realizarse un estudio de la expresión de mRNA de los genes de TLR en puntos exactos del aparato gastrointestinal para el análisis de la acción de los polimorfismos y su relación con *H. pylori*, debido a que la interacción de los receptores con la bacteria varía de acuerdo a la región gastrointestinal donde se están expresando, así como las características virulentas de la cepa, facilitando la comprensión de la etiología de las lesiones precancerosas, su diagnóstico y tratamiento (Kawahara *et al.*, 2001; Schröder y Schumann, 2005; Garza-González *et al.*, 2008). Por otro lado, debido a que la infección de la bacteria y las condiciones gástricas que produce presentan un carácter multifactorial, el estudio de los diferentes sistemas de defensa del huésped en contra de la colonización de *H. pylori* es recomendable. El sistema inmune gastrointestinal trabaja en conjunto con un sistema físico de defensa provisto por las mucinas. Como la primera línea de defensa, estas proteínas confieren una resistencia mecánica mediante la formación de un gel que detiene y mantiene lejos a los patógenos del contacto con las células epiteliales gastrointestinales. La correcta interacción entre estas dos familias de proteínas permite mantener un medio gástrico óptimo, además de una flora intestinal apropiada, por lo que la variabilidad genética de las mucinas y los TLRs determinaría una cierta susceptibilidad para el desarrollo de infecciones (Moncada *et al.*, 2003).

7. LITERATURA CITADA

- Abreu, M.T., Fukata, M., Arditi, M. 2005. TLR signaling in the gut in health and disease. *Journal of Immunology* 174: 4453-4460.
- Achyut, B.R., Ghoshal, U.C., Moorchung, N., Mittal, B. 2007. Association of Toll-like receptor 4 (Asp299Gly and Thr399Ileu) gene polymorphisms with gastritis and precancerous lesions. *Human Immunology* 68: 901-907.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783-801.
- Akopyants, N. S., Clifton, S. W., Kersulyte, D., Crabtree, J. E., Youree, B. E., Reece, C. A., Bukanov, N. O., Drazek, E. S., Roe, B. A., Berg, D. E. 1998. Analyses of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Molecular Microbiology* 28: 37–53.
- Azevedo, N. F., Huntington, J., Goodman, K. 2009. The epidemiology of *Helicobacter pylori* and Public Health Implications. *Helicobacter* 14 (1): 1-7.
- Backhed, F., Rokbi, B., Torstensson, E., Zhao, Y., Nilsson, C., Seguin, D., Normark, S., Buchan, A. M., Richter-Dahlfors, A. 2003. Gastric mucosal recognition of *Helicobacter pylori* is independent of Toll-like receptor 4. *Journal of Infectious Diseases* 187: 829-836.
- Blaser, M. J. 2005. The biology of cag in the *Helicobacter pylori*-human interaction. *Gastroenterology* 128: 1512-1515.
- Bruce, M.G., Maroos, H.I. 2008. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 13 (1): 1-6.
- Budowle, B., Smith, J., Moretti, T., DiZinno, J. 2000. DNA Typing Protocols: Molecular

Biology and Forensic Analysis. Eaton Publishing. Natick-USA.

Burne, R. A., Chen, Y. M. 2000. Bacterial ureases in infectious diseases. *Microbes and Infection* 2: 533-542.

Cabrera, A., Tobar, W., Vega F., Villacís, P. 2002. Prevalencia de *Helicobacter pylori* en pediatría y su relación con las condiciones socioeconómicas. *Revista Ecuatoriana de Pediatría del Ecuador* 3 (2): 8-11.

Cabrera, R. A. 2010. Estudio de los polimorfismos -56C/T del gen IFNGR1 y -336A/G en CD209 en población infectada con *Helicobacter pylori*. Disertación previa a la obtención del Título de Licenciado en Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Castro, L. P., Coehlo, L. G. V. 1998. *Helicobacter pylori* in South America. *Canadian Journal of Gastroenterology* 12 (7): 509-512.

Chávez, E., Sarmiento, F., López, M., Kakarieka, E., Vial, M., Gotteland, M. 1998. Niveles de Interleuquina-8 en biopsias gástricas de niños colonizados por *Helicobacter pylori*. *Revista Médica de Chile* 126 (2): 139-143.

Correa, P., Houghton, J. 2007. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 133: 659-672.

Cossman, J. 1990. *Molecular Genetics in Cancer Diagnosis*. Elsevier Science Publishing. New York-USA.

Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burroni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N., Rappuoli, R. 1993. Molecular characterization of the

128 kDa immunodominant antigen of *H. pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. Proceedings of the National Academy of Sciences 90: 5791-5795.

Cover, T. L., Blanke, S. R. 2005. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. Nature Reviews Microbiology 3: 320-332.

Cover, T. L., Blaser, M. J. 1992. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. Journal of Biological Chemistry 267: 10570-10575.

Debets-Ossenkopp, Y., Reyes, G., Mulder, J., aan de Steege, B. M., Peters, J. T. A. M., Savelkoul, P. H. M., Tanca, J., Peña, A. S., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. 2003. Characteristics of clinical *Helicobacter pylori* strains from Ecuador. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. The British Society for Antimicrobial Chemotherapy 51: 141-145.

Ding, S.Z., Torok, A.M., Smith, M.F., Goldberg, J. 2005. Toll-like receptor 2-mediated gene expression in epithelial cells during *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 10 (3): 193-204.

Dixon, M.F., Genta, R.M., Yardley, J.H., Correa, P. 1997. Histological classification of gastritis and *Helicobacter pylori* infection: an agreement at last? The International Workshop on the Histopathology of Gastritis. Helicobacter 2 (suppl. 1): 17-24.

Egorov, A., Sempértegui, F., Estrella, B., Egas, J., Naumova, E., Griffiths, J. 2010. The effect of *Helicobacter pylori* on growth velocity in young children from poor urban communities in Ecuador. International Journal of Infectious Diseases doi:10.1016/j.ijid.2010.03.013.

El-Omar, E.M., Ng, M.T., Hold, G.L. 2008. Polymorphisms in Toll-like receptor genes and

risk of cancer. *Oncogene*. 27: 244-252.

Frenck, R., Clemens, J. 2003. *Helicobacter* in the developing World. *Microbes and Infection* 5: 705-713.

Fukata, M., Abreu, M. T. 2008. Role of Toll-like receptors in gastrointestinal malignancies. *Oncogene*. Nature Publishing Group 27: 234-243.

García, A., Barra, R., Delgado, C., Kawaguchi, F., Trabal, N., Montenegro, S., González, C. 2006. Genotipificación de aislados clínicos de *Helicobacter pylori* en base a genes asociados a virulencia *cagA*, *vacA* y *babA2*. Primer aislamiento de una cepa *babA2* positiva en pacientes chilenos. *Revista Médica de Chile* 134: 981-988.

Garza-González, E., Bocanegra-García, V., Bosques-Padilla, F.J., Flores-Gutiérrez, J.P., Moreno, F., Pérez-Pérez, G.I. 2008. mRNA levels of TLR4 and TLR5 are independent of *H. pylori*. *World Journal of Gastroenterology* 14 (34): 5306-5310.

Gay, N.J., Gangloff, M. 2007. Structure and Function of Toll Receptors and their Ligands. *Annual Review of Biochemistry* 76: 141-165.

Gerhard, M., Lehn, N., Neumayer, N., Boren, T., Rad, R., Schepp, W., Miehle, S., Classen, M., Prinz, C. 1999. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 12778-12783.

Gómez, N., Salvador, A., Vargas, P., Zapater, J., Álvarez, J. 2004. Seroprevalencia de *Helicobacter pylori* en la población infantil Ecuatoriana. *Revista de Gastroenterología del Perú* 24: 230-233.

- Goodman, K. 1997. Implications of *Helicobacter pylori* infection for stomach cancer prevention. *Cadernos de Saúde Pública*, 13 (Supl. 1). Rio de Janeiro, Brasil.
- Haehnel, V., Schwarzfischer, L., Fenton, M.J., Rehli, M. 2002. Transcriptional regulation of the human toll-like receptor 2 gene in monocytes and macrophages. *Journal of Immunology* 168: 5629-5637.
- Hold, G., Rabkin, C., Chow, W.H., Smith, M.G., Gammon, M.D., Risch, H.A., Vaughan, T.L. McColl, K.E.L., Lissowska, J., Zatonski, W., Schoenberg, J.B., Blot, W.J., Mowat, N.A.G., Fraumeni, J.F., El-Omar, E.M. 2007. A Functional Polymorphism of Toll-like Receptor 4 Gene Increases Risk of Gastric Carcinoma and Its Precursors. *Gastroenterology* 132: 905-912.
- Houghton, J., Wang, T. 2005. *Helicobacter pylori* and gastric cancers: a new paradigm for inflammation-associated epithelial cancer. *Gastroenterology* 128 (6): 1567-1578.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1994. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 61: 1-241.
- Janeway, C.A, Medzithov, R. 2002. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* 20: 197-216.
- Kawahara, T., Kuwano, Y., Teshima-Kondo, S., Kawai, T., Nikawa, T., Kishi, K., Rokutan, K. 2001. Toll-like receptor 4 regulates gastric pit cell responses to *Helicobacter pylori* infection. *The Journal of Medical Investigation* 48: 190-197.
- Kawahara, T., Teshima, S., Oka, A., Sugiyama, T., Kishi, K., Rokutan, K. 2001. Type I *Helicobacter pylori* Lipopolisaccharide Stimulates Toll-like Receptor 4 and Activates

Mitogen Oxidase 1 in Gastric Pit Cells. *Immunity* 69 (7): 4382-4389.

Kraehenbuhl, J. P., Corbett, M. 2004. Keeping the gut microflora at bay. *Science* 303 (5664): 1624-1625.

Kormann, M. S. D. 2007. Toll-like receptor heterodimer variants influence Th1/Th2 signaling and protect from the development of childhood asthma. Disertación para el grado de Doctor en Ciencias Naturales. Universidad Técnica de München. München, Alemania.

Kusters, J. G., van Vliet, A. H., Kuipers, E. J. 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews* 19 (3): 449-490.

Lepper, P., Triantafilou, M., Schumann, C., Schneider, E. M., Triantafilou, K. 2005. Lipopolysaccharides from *Helicobacter pylori* can act as antagonist for Toll-like receptor 4. *Cellular Microbiology* 7 (4): 519-528.

Leser, T. D., Mølbak L. 2009. Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environmental Microbiology* 11 (9): 2194-2206.

Linz, B., Balloux, F., Moodley, Y., Manica, A., Liu, H., Roumagnac, P., Falush, D., Stamer, C., Prugnolle, F., van der Merwe, S.W., Yamaoka, Y., Graham, D.Y., Perez-Trallero, E., Wadstrom, T., Suerbaum, S., Achtman, M. 2007. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 445 (7130): 915-918.

Lu, Y., Redlinger, T.E., Avitia, R., Galindo, A., Goodman, K. 2002. Isolation and Genotyping of *Helicobacter pylori* from Untreated Municipal Wastewater. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (3): 1436-1439.

- Maeda, S., Akanuma, M., Mitsuno, Y., Hirata, Y., Ogura, K., Yoshida, H., Shiratori, Y., Omata, M. 2001. Distinct mechanism of *Helicobacter pylori*-mediated NF- κ B activation between gastric cancer cells and monocytic cells. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (48): 44856-44864.
- Mandell, L., Moran, A. P., Cocchiarella, A., Houghton, J. M., Taylor, N., Fox, J. G., Wang, T. C., Kurt-Jones, E. A. 2004. Intact Gram-Negative *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and *Helicobacter hepaticus* bacteria activate innate immunity via Toll-like receptor 2 but not Toll-like receptor 4. *Infection and Immunity* 72 (11): 6446-6454.
- Marshall, O. J. 2004. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* 20 (15): 2471-2472.
- Medzhitov, R., Janeway C. A. 1997. Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition *Cell* 91: 295-298.
- Medzhitov, R. 2001. Toll-like Receptors and innate immunity. *Nature Reviews – Immunology* 1: 135-145.
- Medzhitov, R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449: 819-826.
- Mogensen, T. 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews* 22 (2): 240-273.
- Moncada, D. M., Kammanadiminti, S. J., Chadee, K. 2003. Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. *Trends in Parasitology* 19 (7): 305-311.
- Moura, S. B., Ramos, A., Becattini, J., Aguiar, G., Camargos, A. M., Freire, F., Corrêa-

- Oliveira, R., Bittencourt, P., Diniz, S., Magalhães, D. M. 2008. Toll-like receptor (TLR2, TLR4 and TLR5) gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection in children with and without duodenal ulcer. *Microbes and Infection* 10: 1477-1483.
- Muotiala, A., Helander, I. M., Pyhåla, L., Kosunen, T. U., Moran, A. P. 1992. Low Biological Activity of *Helicobacter pylori* Lipopolisaccharide. *Infection and Immunity* 60 (4): 1714-1716.
- NCBI. Entrez Gene. 2008. TLR4 Toll-like Receptor 4 [*Homo sapiens*]. [en línea]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=7099>. Consulta: 22-10-2008
- New England Biolabs. 2010. NEBcutter V2.0. [en línea]. <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>. Consulta: 28-07-2010.
- O'Neill, L. A., Bowie, A. G. 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews – Immunology* 7: 353-364.
- Olson, J. W., Maier, R. J. 2002. Molecular hydrogen as an energy source for *Helicobacter pylori*. *Science* 298 (5599): 1788-1790.
- Ottemann, K. M., Lowenthal, A. C. 2002. *Helicobacter pylori* use motility for initial colonization and to attain robust infection. *Infectious Immunology* 70 (4): 1984-1990.
- Paz-y-Miño, C., Leone, P. E. 2002. Técnicas utilizadas en el análisis de la mutagenicidad y carcinogénesis. En: *Genética Toxicológica y Carcinogénesis* (C. Paz-y-Miño, A. Creus, O. Cabré y P.E. Leone, eds) pp. 245-253. Edición del Laboratorio de Genética Molecular y Citogenética Humana. Quito-Ecuador.

- Pérez-Pérez, G., Rothenbacher, D., Brenner, H. 2004. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 9 (1): 1-6.
- Petersen, A. M., Krogfelt, K. A. 2003. *Helicobacter pylori*: an invading microorganism? A review. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 36 (3): 117-126.
- Ponce, E., Martínez, E., Ávila, M. 2001. Estudios epidemiológicos de casos y controles. Fundamento teórico, variantes y aplicaciones. *Salud Pública de México* 43 (2): 135-150.
- Quaglia, N. C., Dambrosio, A., Normanno, G., Parisi, A., Firinu, A., Lorusso, V., Celano, G. V. 2006. Survival of *Helicobacter pylori* in artificially contaminated ultrahigh temperature and pasteurized milk. *Food Microbiology* 24: 296-300.
- Rodicio, M. R., Mendoza, M. C. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 22: 238-245.
- Roukus, D., Agnantis, N., Fatouros, M., Kappas, A. 2002. Gastric Cancer: Introduction, Pathology, Epidemiology. *Gastric & Breast Cancer* 1 (1): 1-3.
- Santini, D., Angeletti, S., Ruzzo, A., Dicuonzo, G., Galluzzo, S., Vincenzi, B., Calvieri, A., Pizzagalli, F., Graziano, N., Ferraro, E., Lorino, G., Altomare, A., Magnani, M., Graziano, F., Tonini, G. 2008. Toll-like receptor Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms in gastric cancer of intestinal and diffuse histotypes. *Clinical and Experimental Immunology* 154: 360-364.
- Schade, C., Flemstrom, G., Holm, L. 1994. Hydrogen ion concentration in the mucus layer on top of acid-stimulated and -inhibited rat gastric mucosa. *Gastroenterology* 107:

180-188.

Schmitt, C., Humeny, A., Becker, C. M., Brune, K., Pahl, A. 2002. Polymorphisms of TLR4: Rapid Genotyping and Response to Lipopolysaccharide of TLR4 Mutant Alleles. *Clinical Chemistry* 48 (10): 1661-1667.

Schreiber, S., Konradt, M., Groll, C., Scheid, P., Hanauer, G., Werling, H. O., Josenhans, C., Suerbaum, S.. 2004. The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *The Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 101 (14): 5024-5029.

Schröder, N. W. J., Schumann, R. R. 2005. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors susceptibility to infectious disease. *The Lancet – Infectious Disease* 5: 156-164.

Scott, H. M., Cover, T. L. 2006. *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews* 19 (4): 597-613.

Sislema, F. 2008. Optimización de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de *Helicobacter pylori* en muestras de mucosa gástrica de pacientes ecuatorianos, y comparación con el método de histopatología, Tesis previa a obtención del Título de Ingeniera en Biotecnología, ESPE.

Stephenson, F. H. 2003. *Calculations for molecular biology and biotechnology*. Academic Press. San Diego. California-USA.

Stingl, K., Altendorf, K., Bakker, E. P. 2002. Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis? *Trends in Microbiology*

10:70–74.

Suerbaum, S., Josenhans, C. 2007. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nature Reviews Microbiology* 5: 441-452.

Takeda, K., Akira, S. 2003. Toll receptors and pathogen resistance. *Cellular Microbiology* 5 (3): 143-153.

Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S. 2003. Toll-like Receptors. *Annual Reviews of Immunology* 21: 335-376.

Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S. 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell walls components. *Immunity* 11: 443-451.

Tamariz, M. J. 2010. Detección de la Resistencia antimicrobiana de *Helicobacter pylori* a la claritromicina por medio de métodos moleculares. Disertación previa a la obtención del Título de Licenciada en Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Texereau, J., Chiche, J. D., Taylor, W., Choukroun, G., Comba, B., Mira, J. P. 2005. The importance of Toll-like Receptor 2 Polymorphisms in Severe Infections. *Clinical Infectious Diseases* 41: 408-415.

Werman, S. D., Springer, M. S., Britten, R. J. 1996. Nucleic Acids I: DNA-DNA Hybridization. En: *Molecular Systematics* (D. Hillis, C. Moritz y B. Mable, eds) pp. 169-197. Sinauer Associates, Inc. Sunderland-USA.

Whitney, A. E., Guarner, J., Hutwagner, L., Gold, B. D. 2000. *Helicobacter pylori* gastritis

in children and adults: comparative histopathologic study. *Annals of Diagnostic Pathology* 4: 279-285.

Wolff, V. J. 2008. Untersuchung des Einflusses von Mutationen des Toll-Like Rezeptors 2 auf die Inzidenz und den Verlauf von Parodontalerkrankungen. Disertación previa para el grado de Doctor en Medicina Dental. Universidad de Berlín. Berlín. Alemania.

Yunis, E. J., Yunis, J. J. 2002. El ADN en la identificación humana. Editorial Temis S.A. Bogotá-Colombia.

8. FIGURAS



Figura 1. Detalle de las muestras de ADN utilizadas en el estudio corridas en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. El marcador de peso molecular es Low Mass DNA Ladder de InvitrogenTM que se encuentra en el primer carril. Del carril 2 al 5 son muestras de ADN del grupo control (carril 2: muestra 39, carril 3: muestra 48, carril 4: muestra 79 y carril 5: muestra 133) y del carril 6 al 9 son muestras de ADN del grupo de individuos afectados con *Helicobacter pylori* (carril 6: muestra 28, carril 7: muestra 42, carril 8: muestra 54, carril 9: muestra 108). El gel fue observado en luz UV con una longitud de onda de 302nm.

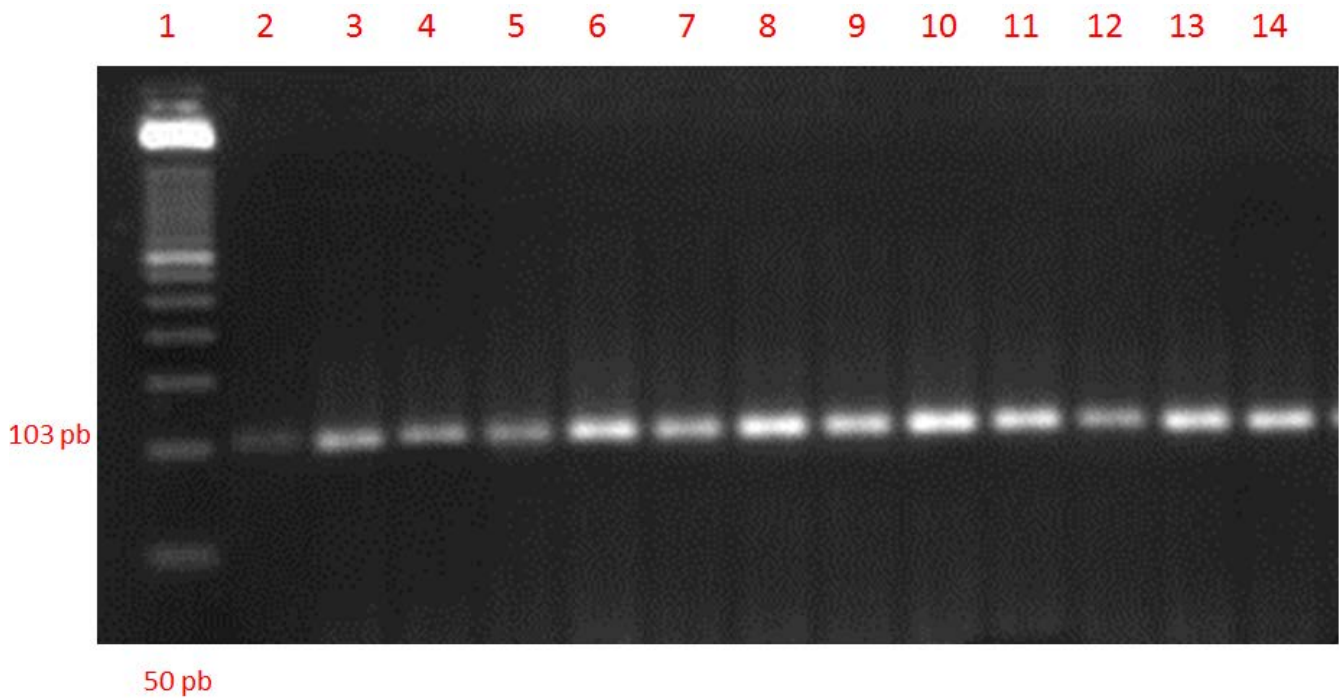


Figura 2. Amplificación de la región que contiene el polimorfismo R677W en TLR2.

Se usó un marcador de peso de 50pb. Los carriles que corresponden a individuos afectados son del 2 al 6 (carril 2: muestra 10, carril 3: muestra 11, carril 4: muestra 31, carril 5: muestra 75, carril 6: muestra 89), mientras que los individuos control corresponden a los carriles 7 al 14 (carril 7: muestra 2, carril 8: muestra 35, carril 9: muestra 51, carril 10: muestra 71, carril 11: muestra 96, carril 12: muestra 100, carril 13: muestra 132, carril 14: muestra 140). Se corrió en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en luz UV a una longitud de onda de 302nm.

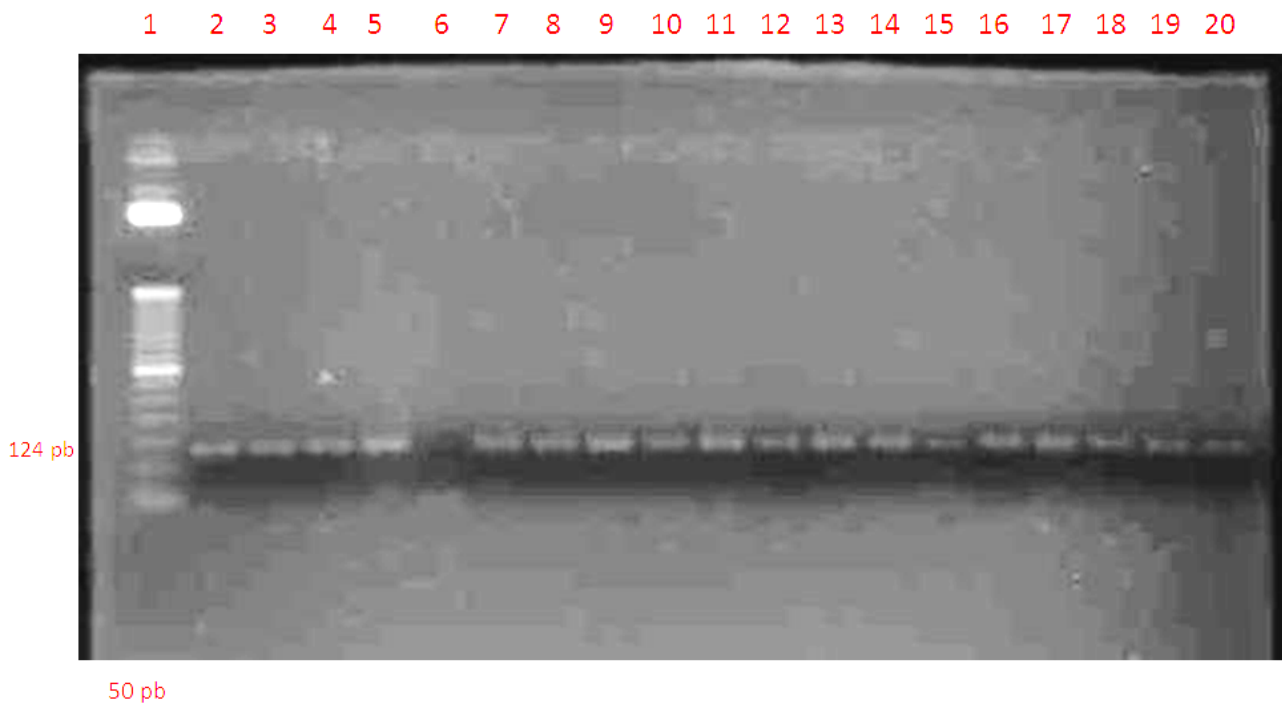


Figura 3. Amplificación de la región que contiene el polimorfismo D299G en TLR4.

Se usó un marcador de peso de 50pb. Los carriles que corresponden a individuos controles son del 2 al 5 (carril 2: muestra 13, carril 3: muestra 17, carril 4: muestra 37, carril 5: muestra 42), el carril 6 corresponde a un control negativo y los carriles 7 al 20 corresponden a individuos afectados (carril 7: muestra 24, carril 8: muestra 50, carril 9: muestra 58, carril 10: muestra 80, carril 11: muestra 90, carril 12: muestra 132, carril 13: muestra 147, carril 14: muestra 163, carril 15: muestra 190, carril 16: muestra 176, carril 17: muestra 169, carril 18: muestra 148, carril 19: muestra 133, carril 20: muestra 100). Se corrió en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en luz UV a una longitud de onda de 302nm.

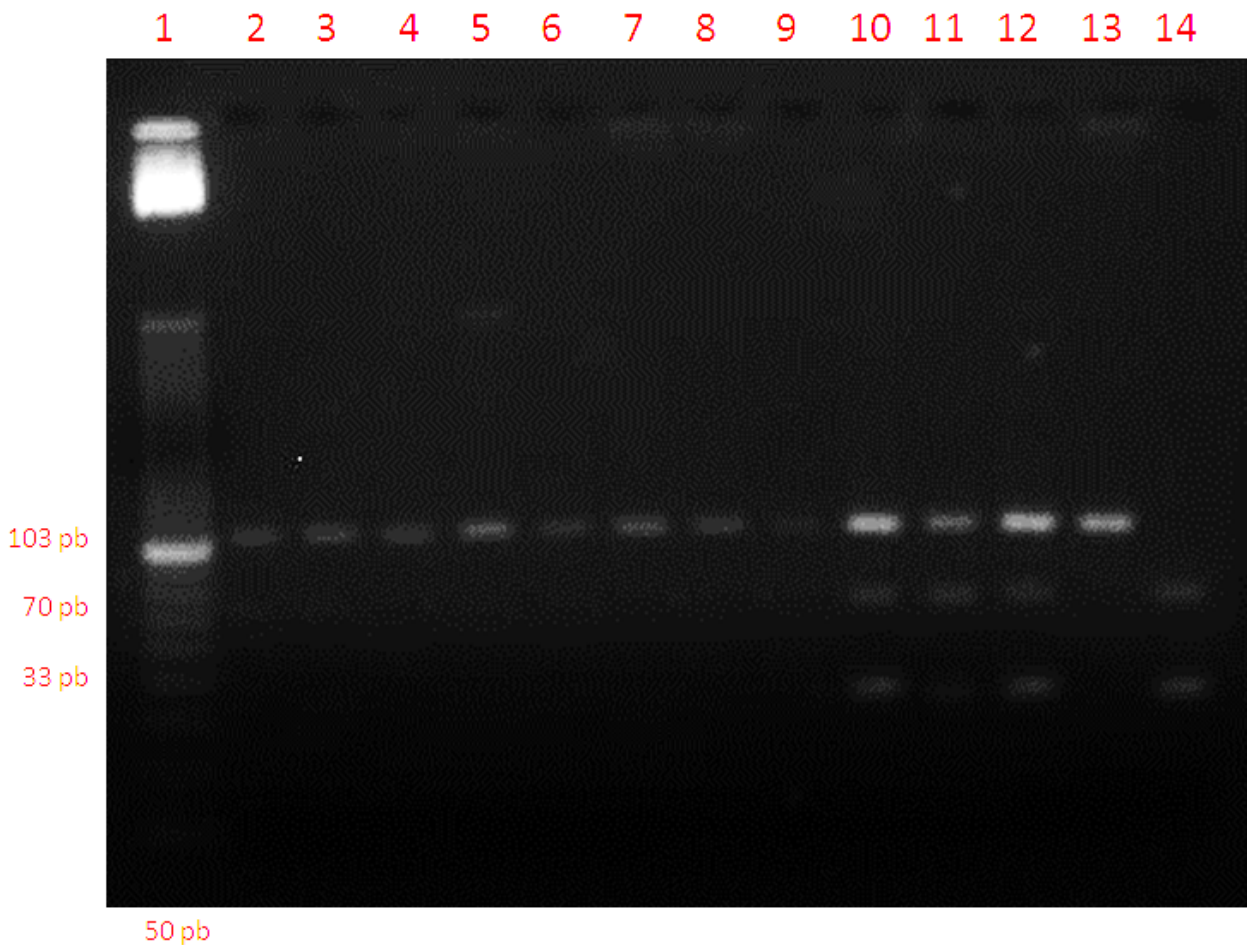


Figura 4. Digestión de amplificadores R677W de TLR2 con la enzima de restricción *AclI*. El primer carril corresponde a un marcador de peso molecular de 10pb. Los carriles 2 al 9 y 13 corresponden a individuos con el genotipo R/R (carril 2: muestra 21, carril 3: muestra 96, carril 4: muestra 63, carril 5: muestra 42, carril 6: muestra 59, carril 7: muestra 87, carril 8: muestra 88, carril 9: muestra 125, carril 13: muestra 69), mientras que los carriles 10 al 12 corresponden a individuos con el genotipo R/W (carril 10: muestra 23, carril 11: muestra 26, carril 12: muestra 88). El carril 14 corresponde a un individuo con el genotipo W/W (carril 14: muestra 4). Se corrió en geles de agarosa al 5%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en luz UV a una longitud de onda de 302nm.

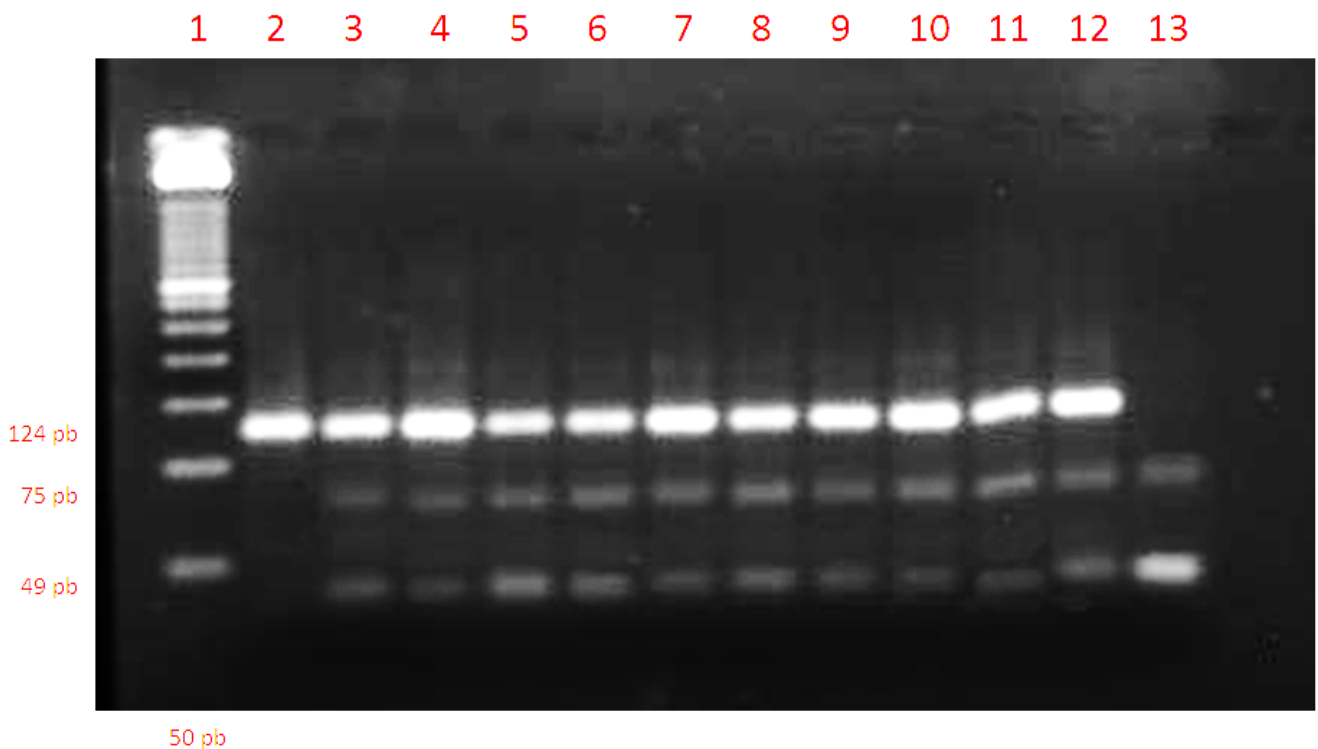


Figura 5. Digestión de amplificadores D299G de TLR4 con la enzima de restricción *BccI*. El primer carril corresponde a un marcador de peso molecular de 50pb. El carril 2 corresponde al individuo con genotipo D/D (carril 2: muestra 8), mientras que los carriles 3 al 12 corresponden a individuos con genotipo D/G (carril 3: muestra 54, carril 4: muestra 64, carril 5: muestra 57, carril 6: muestra 76, carril 7: muestra 191, carril 8: muestra 12, carril 9: muestra 55, carril 10: muestra 97, carril 11: muestra 167, carril 12: muestra 53). El carril 13 corresponde a un individuo con el genotipo G/G (carril 13: muestra 142). Se corrió en geles de agarosa al 5%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en luz UV a una longitud de onda de 302nm.

9. TABLAS

Tabla 1. Sexo, tipo de daño gástrico y genotipo de muestras de ADN extraído de pacientes infectados con *Helicobacter pylori* e individuos controles

Número de muestra	Sexo	Condición de Infección (1=positivo; 0=negativo)	Tipo de daño Gástrico	Genotipo TLR2 SNP R677W	Genotipo TLR4 SNP D299G
1	F	1	1	TT	AA
2	F	0	2	CT	AA
3	M	1	1	CT	AA
4	F	1	2	CT	AA
5	F	1	2	TT	AA
6	F	1	3	CT	AA
7	F	0	1	CT	AA
8	F	1	1	CT	AA
9	F	1	2	CT	AA
10	F	1	2	CT	AA
11	F	1	1	CT	AG
12	M	1	1	CT	AG
13	F	1	2	CT	AA
14	M	1	2	CT	AG
15	F	0	3	CC	AG
16	F	0	2	CT	AG
17	F	1	2	CT	AA
18	F	0	2	CT	AG
20	F	1	2	CT	AG
21	F	1	1	CC	AG
22	F	1	1	CT	AG
23	M	1	3	CT	AG
24	F	0	3	CT	AG
25	F	0	1	TT	AG
26	F	1	3	CT	AG
27	F	0	1	CT	AG
28	F	1	1	CT	AG
29	M	1	2	CT	AG
30	M	0	2	TT	AG
31	M	1	2	CT	AG
32	M	1	1	CT	AG
33	F	1	2	CT	AG
34	F	1	1	TT	AG
35	F	0	3	CT	AG
36	F	0	2	TT	AG
37	F	1	3	TT	AG
38	F	1	1	TT	AG
39	F	0	5	TT	AG

Tabla 1. Sexo, tipo de daño gástrico y genotipo de muestras de ADN extraído de pacientes infectados con *Helicobacter pylori* e individuos controles (Continuación...)

Número de muestra	Sexo	Condición de Infección (1=positivo; 0=negativo)	Tipo de daño gástrico	Genotipo TLR2 SNP R677W	Genotipo TLR4 SNP D299G
40	M	1	1	CT	AG
41	F	1	1	CT	AA
42	F	1	2	CT	AA
43	F	1	1	CT	AA
44	M	1	3	TT	AA
45	F	1	3	TT	AA
46	F	1	1	TT	AA
47	M	1	2	TT	AA
48	F	0	1	TT	AA
49	M	1	2	TT	AA
50	F	0	1	TT	AA
51	M	0	1	TT	AA
52	F	0	1	TT	AG
53	F	1	1	TT	AG
54	M	1	1	TT	AG
55	F	1	1	CT	AG
56	M	1	3	CT	AG
57	M	1	1	CT	AG
58	F	0	1	TT	AG
59	F	0	1	CT	AG
60	M	1	1	CT	AG
61	F	1	2	CT	AG
62	F	1	3	CT	AG
63	F	1	3	TT	AG
64	M	1	1	TT	AG
65	M	1	2	TT	AG
66	F	1	2	TT	AG
67	F	1	3	TT	AG
68	M	1	1	TT	AG
69	F	1	2	CC	AG
70	F	0	1	CT	AA
71	F	0	2	CT	AG
72	F	0	2	CT	AG
73	F	0	1	CT	AG
74	M	1	3	CT	AG
75	M	1	3	TT	AG
76	M	1	1	TT	AG
77	F	1	1	TT	AG
78	M	0	1	TT	AG

Tabla 1. Sexo, tipo de daño gástrico y genotipo de muestras de ADN extraído de pacientes infectados con *Helicobacter pylori* e individuos controles (Continuación...)

Número de muestra	Sexo	Condición de Infección (1=positivo; 0=negativo)	Tipo de daño gástrico	Genotipo TLR2 SNP R677W	Genotipo TLR4 SNP D299G
79	M	0	2	TT	AG
80	M	0	1	TT	AG
81	M	0	3	TT	AG
82	M	0	2	CT	AG
83	M	0	1	CT	AG
84	M	1	2	CT	AG
85	M	1	2	TT	AA
86	F	0	1	CT	AG
87	F	0	1	CT	GG
88	M	0	1	CT	GG
89	M	1	1	CT	AA
90	M	0	1	CT	AG
91	M	1	2	TT	AG
92	F	1	1	CT	AG
93	F	1	1	CT	AG
94	F	1	1	CT	AG
95	F	1	2	TT	AG
96	F	0	3	CT	AG
97	F	1	1	TT	AG
98	F	0	1	TT	AG
99	M	1	1	TT	AG
100	M	0	1	TT	GG
101	M	0	1	CT	GG
102	F	1	3	CT	GG
103	M	0	1	CT	GG
104	F	1	1	CT	GG
105	M	1	1	CT	GG
107	M	1	1	CT	GG
108	M	1	2	TT	GG
109	F	1	1	CT	GG
110	M	1	2	TT	GG
111	F	0	1	CT	GG
112	F	1	1	CT	GG
113	F	0	1	CT	GG
114	F	1	1	CT	GG
115	M	1	1	TT	GG
116	M	1	1	TT	GG
117	M	1	1	CT	GG
118	F	0	5	TT	GG

Tabla 1. Sexo, tipo de daño gástrico y genotipo de muestras de ADN extraído de pacientes infectados con *Helicobacter pylori* e individuos controles (Continuación...)

Número de muestra	Sexo	Condición de Infección (1=positivo; 0=negativo)	Tipo de daño gástrico	Genotipo TLR2 SNP R677W	Genotipo TLR4 SNP D299G
119	M	1	2	TT	GG
120	F	1	3	CT	GG
121	M	1	2	CT	GG
122	F	0	1	CT	AG
123	F	1	2	CT	GG
124	M	1	3	CT	GG
125	F	0	1	CT	GG
126	F	1	2	TT	GG
127	M	1	2	CT	GG
128	F	1	1	CT	GG
129	F	0	1	CT	GG
130	F	0	3	CT	GG
131	F	0	1	CC	GG
132	F	0	3	CC	GG
133	M	0	1	CT	GG
134	M	0	1	CT	GG
135	M	1	1	CT	GG
136	M	0	1	CT	GG
137	M	0	1	CT	GG
138	M	0	1	CT	GG
139	F	0	1	CT	GG
140	F	0	1	TT	GG
141	M	0	3	TT	GG
142	M	1	1	TT	GG
143	M	1	1	TT	GG
144	M	0	3	TT	GG
145	F	0	1	TT	GG
146	M	0	1	TT	GG
147	F	0	1	TT	GG
148	M	0	1	CT	GG
149	F	1	2	CT	GG
150	M	0	1	TT	GG
151	M	0	4	CT	AG
152	M	0	1	CT	AG
153	F	1	1	CT	AG
154	M	0	1	CC	AG
155	F	1	3	TT	AG
156	M	0	1	TT	AG
157	M	0	1	CT	AG

Tabla 1. Sexo, tipo de daño gástrico y genotipo de muestras de ADN extraído de pacientes infectados con *Helicobacter pylori* e individuos controles (Continuación)

Número de muestra	Sexo	Condición de Infección (1=positivo; 0=negativo)	Tipo de daño gástrico	Genotipo TLR2 SNP R677W	Genotipo TLR4 SNP D299G
158	F	0	1	TT	AG
159	F	0	1	TT	AG
160	M	0	1	TT	AG
161	F	0	1	CT	AG
162	F	1	1	CT	AG
163	F	0	1	CT	AG
164	F	0	1	TT	AG
165	M	0	1	CT	AG
166	M	0	1	CT	AG
167	F	1	1	CT	AG
168	F	0	1	TT	AG
169	M	0	1	TT	AG
170	M	0	1	CT	AG
174	M	0	1	TT	AG
175	F	1	1	TT	AG
176	F	0	1	CT	GG
177	M	1	1	CT	GG
178	M	0	1	CT	AG
179	M	0	1	TT	AG
180	F	0	1	TT	AG
181	M	0	1	CT	GG
182	M	0	1	CT	AG
183	F	1	1	CT	AG
184	M	0	3	CT	AG
185	M	1	1	CT	AG
186	F	0	3	CC	AG
187	F	1	1	CT	AG
188	F	0	1	CT	AG
189	M	0	2	CT	AG
190	M	0	1	CT	AG
191	M	1	1	CT	AG
192	M	1	1	CT	AG
193	M	1	2	CT	AG
194	M	1	2	CT	AG
196	F	1	2	CT	AG
200	M	0	3	CT	GG

Tabla 2. Parámetros bio-patológicos en individuos diagnosticados con *Helicobacter pylori* y controles

PARÁMETRO	AFECTOS		CONTROLES	
	Grupo	Total <i>n</i> (%)	Grupo	Total <i>n</i> (%)
EDAD	15 – 46 años	56 (55%)	17 – 49 años	40 (45%)
	46 – 86 años	46 (45%)	49 – 86 años	49 (55%)
SEXO	Hombres	46 (45%)	Hombres	42 (47%)
	Mujeres	56 (55%)	Mujeres	47 (53%)
TOTAL		102 (100%)		89 (100%)

n, tamaño de muestra; %, porcentaje.

Tabla 3. Distribución de la población estudiada de acuerdo al diagnóstico histopatológico y el género

	Daño Histopatológico	Hombres <i>n</i> (%)	Mujeres <i>n</i> (%)	TOTAL	Edad Media
Afectos	1	24 (45,30)	29 (54,70)	53	43,60
	2	16 (48,50)	17 (51,50)	33	45,85
	3	6 (37,50)	10 (62,50)	16	53,19
	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
TOTAL		46	56		
Controles	1	32 (50,00)	32 (50,00)	64	44,73
	2	4 (40,00)	6 (60,00)	10	53,20
	3	5 (41,70)	7 (58,30)	12	64,58
	4	1 (100,0)	-	1	36,00
	5	-	2 (100,0)	2	79,50
TOTAL		42	47		

n, tamaño de muestra; %, porcentaje.

Tabla 4. Frecuencia y distribución de los alelos del polimorfismo R677W en el gen TLR2

Grupo	Genotipo	No. de individuos	No. de alelos	Frecuencia Observada	Frecuencia Genotípica Esperada	Frecuencia alélica
Afectos	R/R	2	4	0,02	0,11	0,33
	R/W	64	128	0,63	0,44	
	W/W	36	72	0,35	0,44	
	TOTAL	102				
Controles	R/R	5	10	0,06	0,12	0,34
	R/W	51	102	0,57	0,45	
	W/W	33	66	0,37	0,43	
	TOTAL	89				

**Tabla 5. Frecuencia y distribución de los alelos del polimorfismo D299G en el gen
TLR4**

Grupo	Genotipo	No. de individuos	No. de alelos	Frecuencia Observada	Frecuencia Genotípica Esperada	Frecuencia alélica
Afectos	D/D	20	40	0,20	0,22	0,48
	D/G	57	114	0,56	0,50	
	G/G	25	50	0,24	0,28	
	TOTAL	102				
Controles	D/D	30	60	0,34	0,40	0,63
	D/G	53	106	0,60	0,46	
	G/G	6	12	0,07	0,13	
	TOTAL	89				

Tabla 6. Frecuencia y distribución de los polimorfismos R677W en el gen TLR2 y D299G en el gen TLR4 según el diagnóstico histopatológico

		Afectos <i>n</i> (frecuencia)					Control <i>n</i> (frecuencia)				
		Tipo de daño gástrico					Tipo de daño gástrico				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
TLR2	R/R	1 (0,02)	1 (0,03)	-	-	-	2 (0,03)	-	3 (0,25)	-	-
	R/W	35 (0,66)	20 (0,60)	9 (0,56)	-	-	37 (0,58)	7 (0,70)	6 (0,50)	1 (1,00)	-
	W/W	17 (0,32)	12 (0,36)	7 (0,44)	-	-	25 (0,39)	3 (0,30)	3 (0,25)	-	2 (1,00)
	TOTAL	53 (1,00)	33 (1,00)	16 (1,00)	-	-	64 (1,00)	10 (1,00)	12 (1,00)	1 (1,00)	2 (1,00)
TLR4	D/D	7 (0,13)	10 (0,30)	3 (0,19)	-	-	5 (0,08)	1 (0,10)	-	-	-
	D/G	32 (0,60)	15 (0,45)	10 (0,62)	-	-	35 (0,54)	9 (0,90)	7 (0,58)	1 (1,00)	1 (0,50)
	G/G	14 (0,26)	8 (0,24)	3 (0,19)	-	-	24 (0,38)	-	5 (0,42)	-	1 (0,50)
	TOTAL	53 (1,00)	33 (1,00)	16 (1,00)	-	-	64 (1,00)	10 (1,00)	12 (1,00)	1 (1,00)	2 (1,00)

n, tamaño de muestra; 1, gastritis no atrófica; 2, gastritis atrófica; 3, metaplasia intestinal; 4, displasia; 5, cáncer gástrico.

Tabla 7. Análisis de Chi cuadrado (χ^2) para determinar el nivel de significación de la variante R677W en el gen TLR2

TLR2 R677W	Genotipo <i>n</i> (frecuencia)		
	R/R	R/W	W/W
Afectos	2 (0,02)	64 (0,63)	36 (0,35)
Controles	5 (0,06)	51 (0,57)	33 (0,37)

$\chi^2=2,010$ $p>0,05^{NS}$

n, tamaño de muestra; NS, no significativo.

Tabla 8. Análisis de Chi cuadrado (χ^2) para determinar el nivel de significación de la variante D299G en el gen TLR4

TLR4 D299G	Genotipo <i>n</i> (frecuencia)		
	D/D	D/G	G/G
Afectos	20 (0,20)	57 (0,56)	25 (0,24)
Controles	30 (0,34)	53 (0,60)	6 (0,07)

$\chi^2=12,966^{**}$ $p<0,01$

n, tamaño de muestra; **, altamente significativo.

Tabla 9. Análisis de Odds Ratio (OR) para determinar el riesgo relativo de infección con *Helicobacter pylori* para los individuos que presenten el alelo W en el gen TLR2 y G en el gen TLR4.

Genes	Genotipos	Casos (n=102)	Control (n=89)	OR	95% IC	P
TLR2 R677W	R/R	2	5			
	R/W	64	51	0,319	0,059 – 1,711	1,949 ^{NS}
	W/W	36	33	0,367	0,067 – 2,020	1,416 ^{NS}
	R/W+W/W	100	84	0,336	0,064 – 1,776	1,801 ^{NS}
TLR4 D299G	D/D	20	30			
	D/G	57	53	0,620	0,315 – 1,221	1,923 ^{NS}
	G/G	25	6	0,160	0,056 – 0,460	12,803 ^{**}
	D/G+G/G	82	59	0,480	0,249 – 0,926	4,890 [*]

n, tamaño de muestra; IC, intervalo de confianza; NS, no significativo; *, significativo; **, altamente significativo.

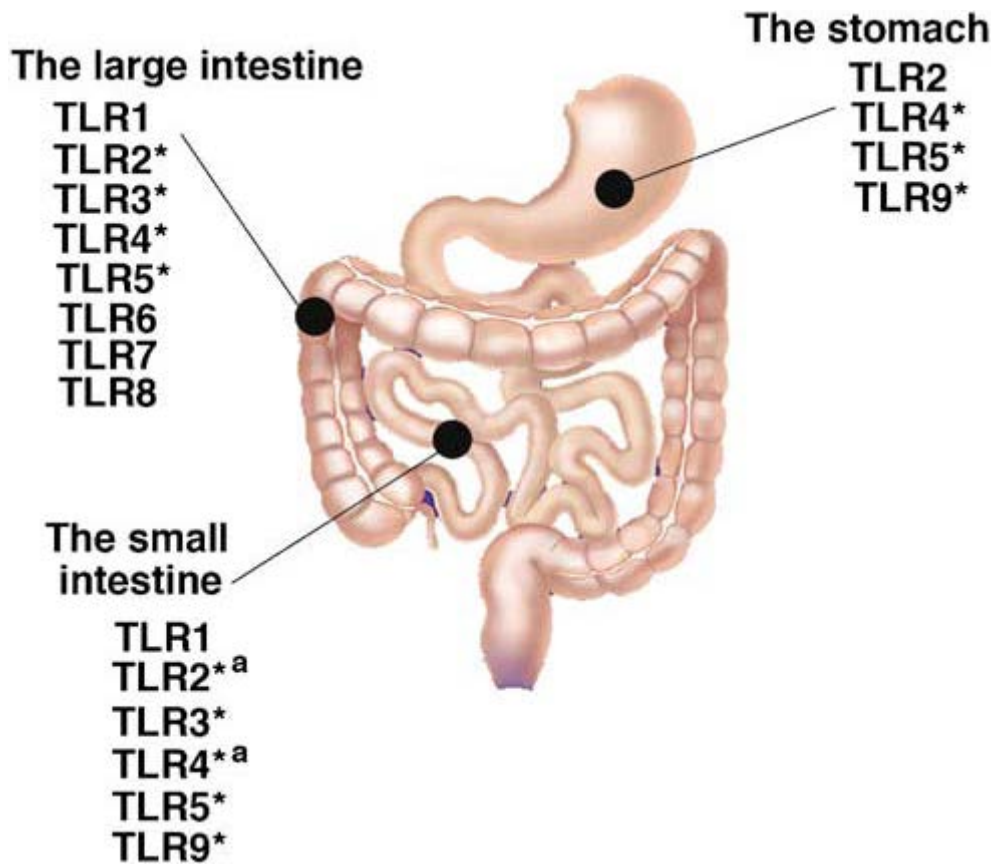
Tabla 10. Análisis de Odds Ratio (OR) para determinar el riesgo relativo de desarrollar patologías gástricas en los individuos portadores del alelo G en TLR4

TLR4 D299G Genotipo	Tipo de daño gástrico											
	Gastritis no atrófica				Gastritis atrófica				Metaplasia intestinal			
	Control	Afectos	OR (95% IC)	χ^2 ; p	Control	Afectos	OR (95% IC)	χ^2 ; p	Control	Afectos	OR (95% IC)	χ^2 ; p
D/D	5	7	1,8	$\chi^2=0,917$	1	10	3.9	$\chi^2=1,662$	-	3	-	$\chi^2=2,5$
D/G+G/G	59	46	(0,535 – 6,026)	p>0,05 ^{NS}	9	23	(0,436 – 35,151)	p>0,05 ^{NS}	12	13		p>0,05 ^{NS}
TOTAL	64	53			10	33			12	16		

χ^2 , chi cuadrado; IC, intervalo de confianza, NS, no significativo.

10. ANEXOS

Anexo 1. Localización de los diferentes TLRs en el tracto gastrointestinal.

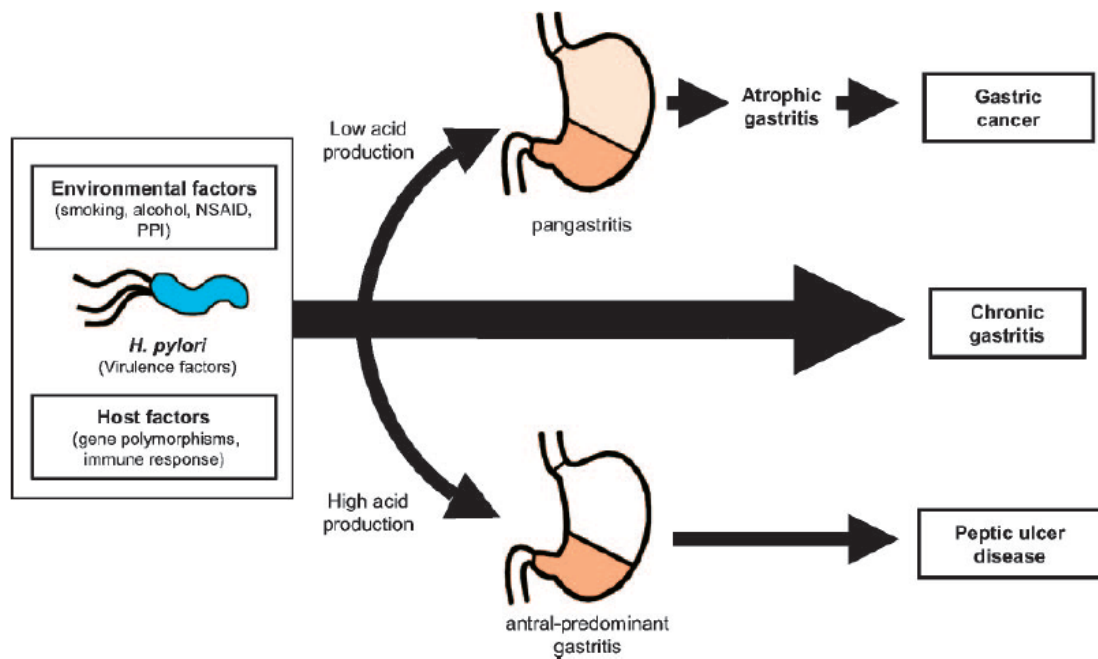


(Tomado de Fukata y Abreu, 2008)

La mayoría de TLRs se expresan en el intestino delgado y grueso. Además de células epiteliales intestinales y la lamina propia, los macrófagos expresan TLR2 y TLR4.

*, Indica expresión confirmada de la proteína. a, muestra funcionalidad en respuesta del ligando apropiado.

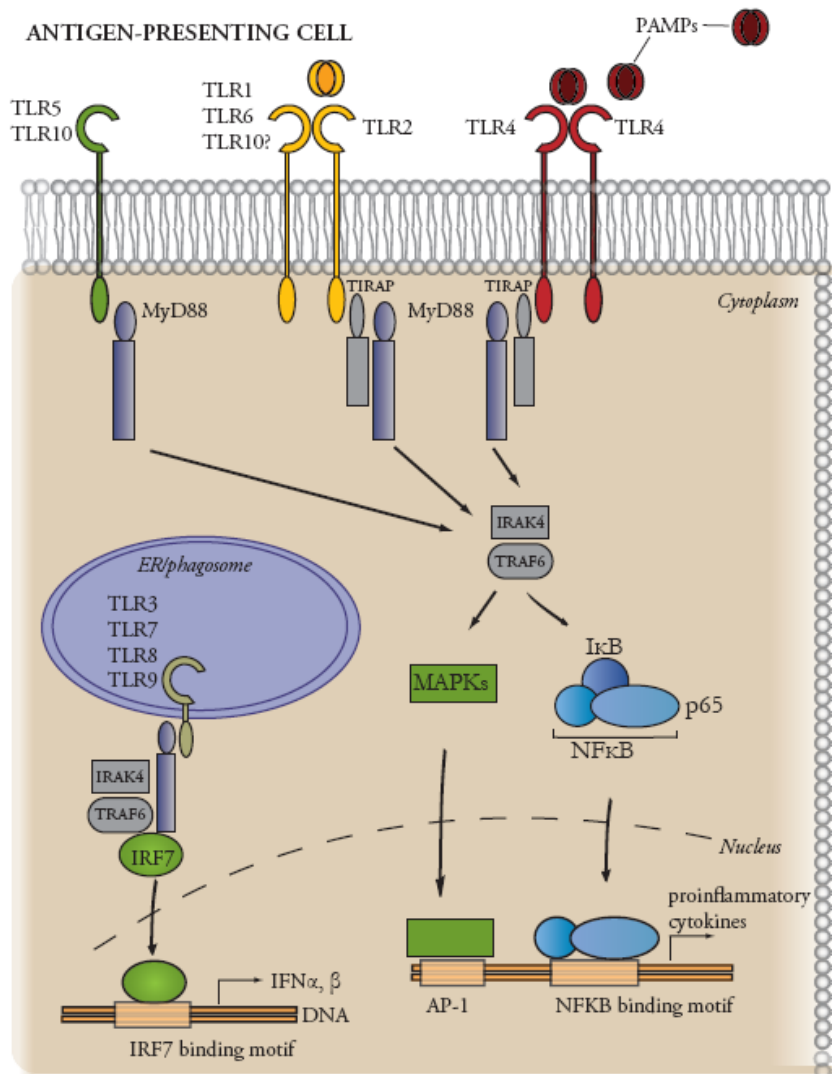
Anexo 2. Componentes del desarrollo de patologías gástricas asociadas a la infección con *H. pylori*.



Tomado de Kusters *et al.*, 2006.

Representación esquemática multifactorial de la progresión de enfermedades gástricas y su relación con la infección bacteriana por *H. pylori*.

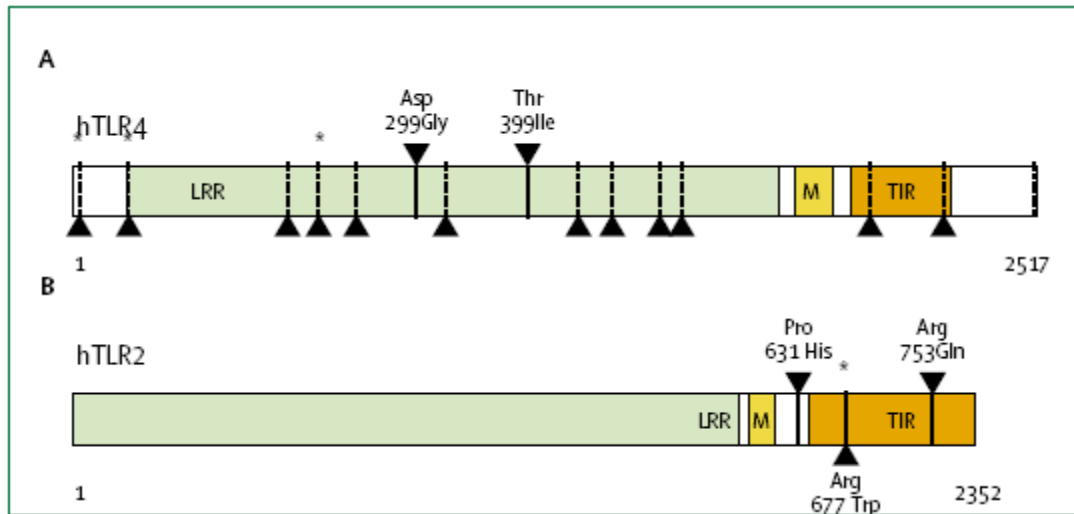
Anexo 3. Cascada de reacciones general de los TLRs para la activación de factores de transcripción.



Tomado de Kormann, 2007.

Los PAMPs son reconocidos por los TLRs. Por medio de del dominio TIR, que contiene la molécula adaptadora MyD88, se controla las vías de señalización de TLR para la activación de kinasas específicas (IRAK) y activar factores de transcripción (NF- κ B) para la expresión de citoquinas inflamatorias. Esta vía de señalización es usada por TLR2 y TLR4.

Anexo 4. Localización de SNPs conocidos en TLR2 y TLR4.



Tomado de Schröder y Schumann, 2005.

Los colores diferencian las regiones que expresarán estructuras de los receptores de membrana. Los polimorfismos encontrados producirán cambios en la proteína final y alterarán su funcionalidad.

GLOSARIO

Antígenos Lewis: Sistema de antígenos sanguíneos humanos basada en los genes *fut2* y *fut3* que codifican fucosiltransferasas. Los antígenos no son producidos por los eritrocitos, sino que son componentes de las secreciones epiteliales exócrinas que luego son adsorbidos a la superficie de los eritrocitos.

CD14 (Cluster of differentiation 14): componente del sistema inmune. La proteína funciona como un co-receptor, junto con TLR4 y MD-2, para la detección de LPS por medio de la proteína de unión de LPS.

Fucosilación: Proceso en el que se añaden azúcares fucosa a una molécula, realizado por enzimas fucosiltransferasas.

IFN (Interferon): citoquinas que se producen y se secretan por linfocitos en respuesta a la presencia de patógenos. Permiten la comunicación entre células para activar las defensas del sistema inmune.

IKK (Inhibitor of kappa B – kinase): es un complejo enzimático que está involucrado en propagar la respuesta celular a la inflamación. Es componente de la cascada de transducción de señales de NF- κ B, en la que se encarga de fosforilar I κ B para la activación de NF- κ B.

IL-8 (Interleucina 8): quimiocina producida por macrófagos y otros tipos celulares como células epiteliales.

MAPK (Mitogen-activated protein (MAP) kinases): quinasas específicas para proteínas ricas en Ser/Thr que responden a estímulos extracelulares (mitógenos, estrés osmótico, choque de calor y citoquinas proinflamatorias) para regular actividades celulares como la expresión génica, mitosis, diferenciación, proliferación y apoptosis.

MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene (88)): Es una proteína

adaptadora universal que es usada por todos los TLRs, excepto TLR3, para activar el NF- κ B.

NF- κ B (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells): complejo proteico que controla la transcripción de ADN. Involucrado en la respuesta celular a estímulos como antígenos virales y bacterianos. Regula la respuesta inmune en infecciones.

Sialización: Proceso de reacción con ácido siálico.

Th1 (T helper cells): son un subgrupo de linfocitos. Estas células son inusuales ya que no tienen actividad citotóxica o fagocítica. Estas células están involucradas en la activación y dirección de otras células inmunes.

TNF (Tumor necrosis factor): Es una citoquina involucrada en la inflamación sistémica, inducir la apoptosis e inhibir la tumorigénesis y la replicación viral.

TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing-interferon- β): es un adaptador que responde a la activación de TLRs. Media la cascada retardada de una cascada doble de señalización de TLRs, donde la otra es dependiente del adaptador MyD88.

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Bernardo David Castro Rodríguez, C.I. 171430613-9, autor del trabajo de graduación intitulado: “Análisis de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) C2029T en TLR2 y A896G en TLR4 en pacientes con infección con *Helicobacter pylori*” previo a la obtención del grado académico de LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 20 de abril del 2011

Sr. Bernardo David Castro Rodríguez

C.I. 171430613-9