



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES POLIMÓRFICAS DE LOS GENES NOD1-CARD4 Y  
NOD2-CARD15 QUE SE PRESENTEN ASOCIADOS CON EL DESARROLLO DE  
ENFERMEDAD GASTRODUODENAL CAUSADA POR LA INFECCIÓN DE  
*HELICOBACTER PYLORI***

**PRESENTA**

**Jesús Norberto Lozano Ruiz Esparza**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAestrÍA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

**TUTOR**

**Dr. en C. Rodolfo González Segovia**

**COMITÉ TUTORAL**

**Dr. en C. Rafael Gutiérrez Campos**

**Dr. en C. Luis Fernando Torres Bernal**

**Aguascalientes, Ags., 30 de Mayo de 2014**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES

DR. RAÚL FRANCO DÍAZ DE LEÓN

DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTE

Por medio de la presente como tutor designado del estudiante **JESÚS NORBERTO LOZANO RUIZ ESPARZA** con ID 137047, quien realizó la tesis titulada:

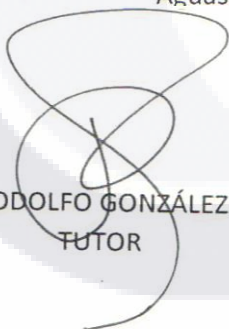
**IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES POLIMÓRFICAS DE LOS GENES NOD1-CARD4 Y NOD2-CARD15 QUE SE PRESENTEN ASOCIADOS CON EL DESARROLLO DE ENFERMEDAD GASTRODUODENAL CAUSADA POR LA INFECCIÓN DE *HELICOBACTER PYLORI***, y con fundamento en el artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO** para que él pueda proceder a imprimirla y así continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.


Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se lumen proferre"

Aguascalientes, Ags., a 29 de Mayo del 2014

  
DR. en C. RODOLFO GONZÁLEZ SEGOVIA  
TUTOR

  
DR. en C. RAFAEL GUTIÉRREZ CAMPOS  
COTUTOR

  
DR. en C. LUIS FERNANDO TORRES BERNAL  
ASESOR

ccp. Interesado

ccp. Secretaria de Investigación y Posgrado

ccp. Jefatura del Departamento de Microbiología



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

JESÚS NORBERTO LOZANO RUIZ ESPARZA  
MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA  
P R E S E N T E

Por medio de la presente se le informa que en cumplimiento de lo establecido en el Reglamento General de Docencia en el Capítulo XVI y una vez que ha cumplido con los siguientes requisitos; a) Participación como ponente en un congreso, b) Asistente a dos congresos de su área de formación, c) La aceptación o publicación de un artículo. d) Su trabajo de tesis, titulado:

**“IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES POLIMÓRFICAS DE LOS GENES NOD1-CARD4 Y NOD2-CARD15 QUE SE PRESENTEN ASOCIADOS CON EL DESARROLLO DE ENFERMEDAD GASTRODUODENAL CAUSADA POR LA INFECCIÓN DE HELICOBACTER PYLORI”**

Los requisitos para su titulación han sido revisados y aprobados por su tutor y el consejo académico, se autoriza continuar con los trámites para obtener el grado de **Maestría en Investigación Biomédica**.

Sin otro particular por el momento me despido enviando a usted un cordial saludo

**A T E N T A M E N T E**  
**“SE LUMEN PROFERRE”**

Aguascalientes, Ags., 30 de Mayo del 2014.

**DR. RAÚL FRANCO DÍAZ DE LEÓN**  
**DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD**

ccp. C.P. Ma. Esther Rangel Jiménez / Jefe de Departamento de Control Escolar.  
ccp. Mtra. Guadalupe Valdés Reyes / Jefa de Departamento de Apoyo al Posgrado.  
ccp. Archivo.

## **AGRADECIMIENTOS**

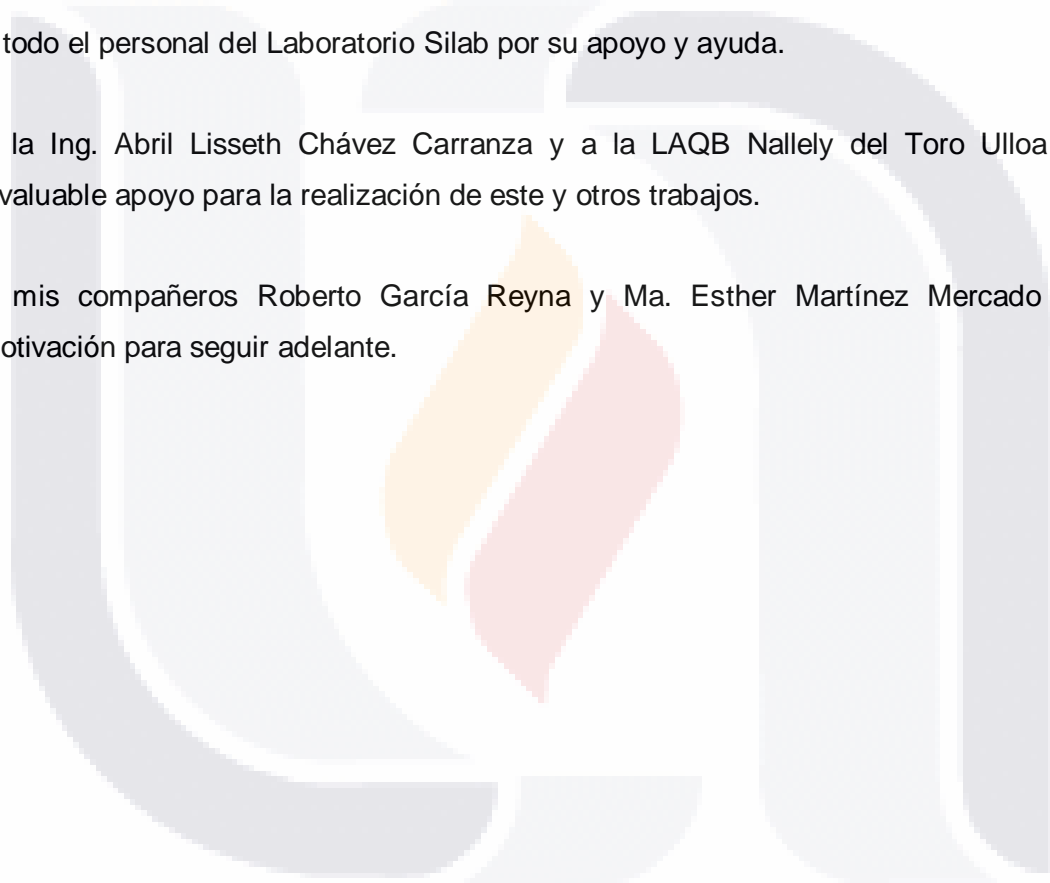
Quiero agradecer a Dios por permitirme alcanzar un objetivo más en mi vida profesional.

A mi familia, mi esposa Guillermina y a mis hijos Miguel Ángel, Jesús Guillermo, Luis Eduardo, Rafael Alejandro y Gabriel Arturo por su paciencia y comprensión.

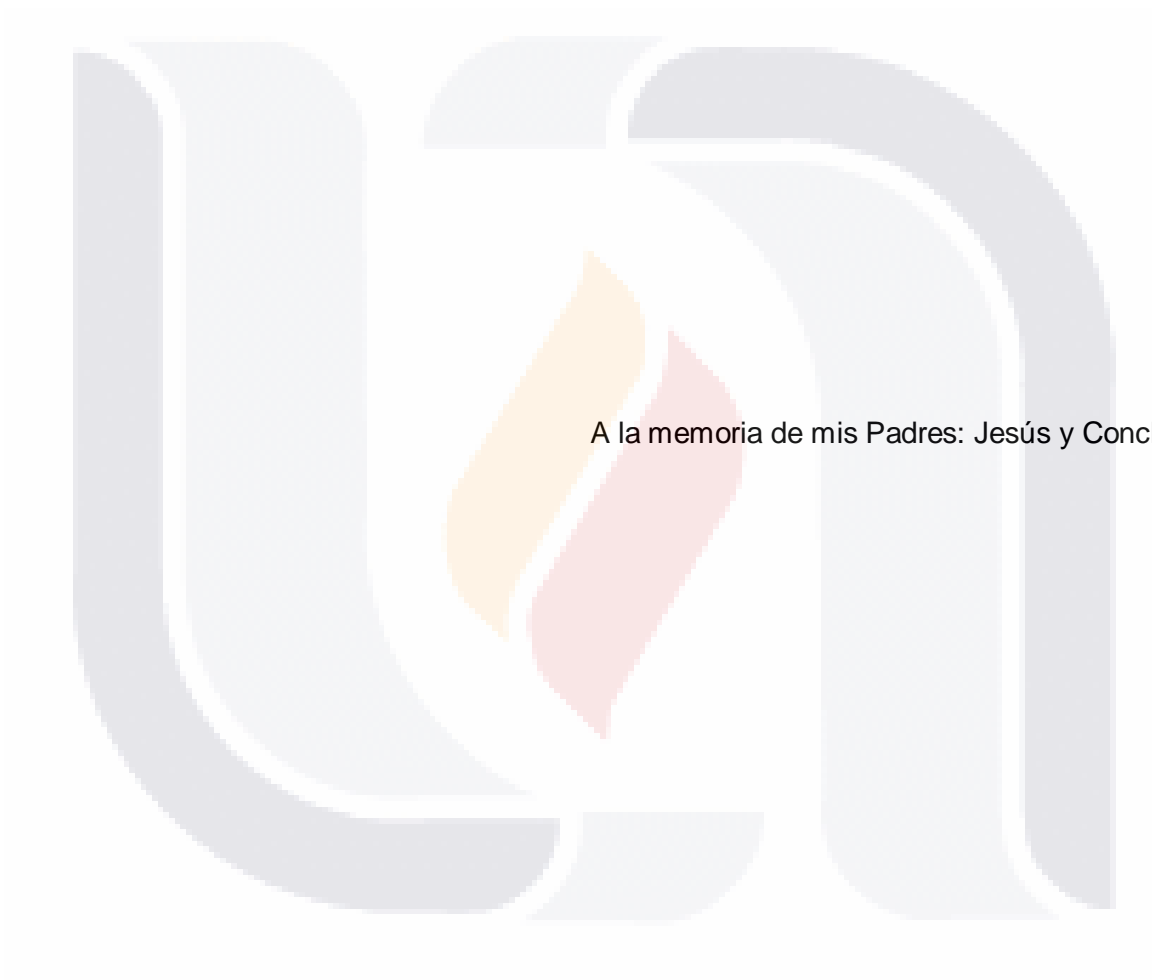
A todo el personal del Laboratorio Silab por su apoyo y ayuda.

A la Ing. Abril Lisseth Chávez Carranza y a la LAQB Nallely del Toro Ulloa por su invaluable apoyo para la realización de este y otros trabajos.

A mis compañeros Roberto García Reyna y Ma. Esther Martínez Mercado por su motivación para seguir adelante.



**DEDICATORIAS**



A la memoria de mis Padres: Jesús y Concha.

## ÍNDICE GENERAL

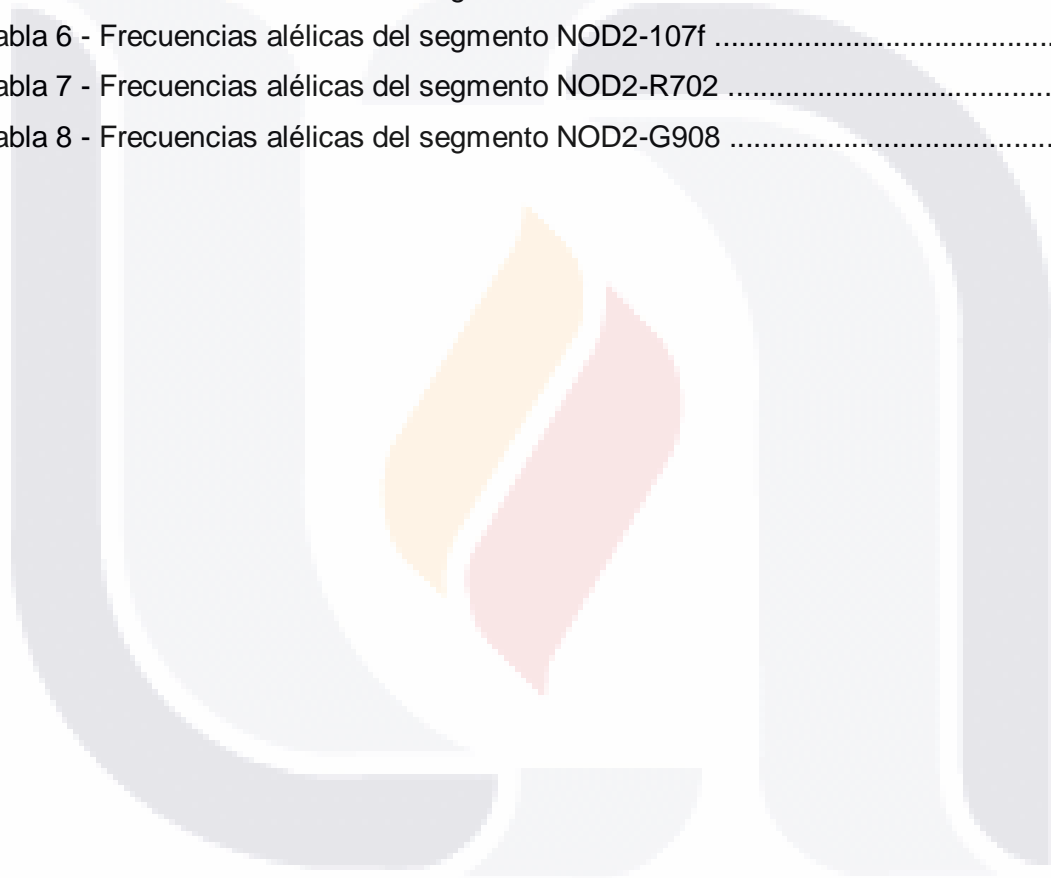
ÍNDICE DE TABLAS.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
INTRODUCCIÓN .....	8
EPIDEMIOLOGÍA DE <i>Helicobacter pylori</i> .....	12
MICROBIOLOGÍA DE <i>Helicobacter pylori</i> .....	13
INTERACCIÓN DE <i>Helicobacter pylori</i> CON EL SER HUMANO .....	16
<i>Helicobacter pylori</i> Y LAS PATOLOGÍAS GÁSTRICAS .....	17
<i>Helicobacter pylori</i> Y LA RESPUESTA INMUNE EN HUMANO .....	18
MARCO TEÓRICO .....	19
JUSTIFICACIÓN .....	21
OBJETIVO GENERAL .....	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
METODOLOGÍA .....	23
Población de estudio .....	23
Diseño de oligonucleótidos de secuencias génicas .....	23
Extracción de ADN a partir de tejido gástrico .....	25
Reacción en cadena de la polimerasa .....	25
Fusión de alta resolución (análisis HRM) .....	25
RESULTADOS .....	26
Estandarización de condiciones de amplificación de los segmentos génicos en NOD1 y NOD2 .....	26
Implementación del análisis de desnaturalización de ADN de alta resolución (High Resolution Melting; HRM) .....	28
DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	34
Análisis de variación génica .....	34
Análisis PCR-HRM segmento NOD1-160 .....	35
Análisis PCR-HRM segmento NOD1-164 .....	40
Análisis PCR-HRM segmento NOD2-107f .....	43
Análisis PCR-HRM segmento NOD2-R702 .....	45
Análisis PCR-HRM segmento NOD2-G908 .....	47

CONCLUSIONES .....	50
GLOSARIO .....	52
BIBLIOGRAFÍA .....	53
ANEXOS .....	57



**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1 - Secuencia oligonucleotidas de regiones LRR del gen NOD1 .....	24
Tabla 2 - Secuencia oligonucleotidas de regiones LRR del gen NOD2 .....	24
Tabla 3 - Temperaturas del Melting .....	32
Tabla 4 - Frecuencias alélicas del segmento NOD1-160 .....	40
Tabla 5 - Frecuencias alélicas del segmento NOD1-164 .....	42
Tabla 6 - Frecuencias alélicas del segmento NOD2-107f .....	44
Tabla 7 - Frecuencias alélicas del segmento NOD2-R702 .....	47
Tabla 8 - Frecuencias alélicas del segmento NOD2-G908 .....	49





## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Productos de amplificación de los genes NOD1 y NOD2 .....	26
Figura 2 - Productos de amplificación de distintos segmentos génicos .....	27
Figura 3 - Migración electroforética de muestras de ADN de tejido gástrico .....	28
Figura 4 - Curva de desnaturalización por HRM del fragmento NOD2-107fs .....	29
Figura 5 - Curva de desnaturalización normalizada del fragmento NOD2-107fs .....	32
Figura 6 - Curva de desnaturalización por HRM de la actividad de los genes NOD2- 107fs y NOD2-G908 .....	33
Figura 7 - Curva normalizada y curva de diferencia de los genes NOD2-107fs y NOD2-G908 .....	33
Figura 8 - Productos de amplificación de segmentos génicos .....	35
Figura 9 - Patrones de desnaturalización alélica del segmento NOD1-160 .....	36
Figura 10 - Curva de diferencia del segmento NOD1-160 .....	36
Figura 11 - Curva de Melt del segmento NOD1-160 .....	37
Figura 12 - Frecuencia de los distintos patrones de desnaturalización .....	38
Figura 13 - Patrones PDA del segmento NOD1-160 .....	39
Figura 14 - Patrones de desnaturalización del NOD1-164 .....	41
Figura 15 - Patrones PDA del segmento NOD1-164 en patrones y controles .....	42
Figura 16 - Patrones de desnaturalización del segmento NOD2-107f .....	43
Figura 17 - Patrones PDA del segmento NOD2-107f .....	44
Figura 18 - Patrones de desnaturalización del NOD2-702 .....	46
Figura 19 - Patrones PDA del segmento NOD2-702 .....	46
Figura 20 - Patrones de desnaturalización del segmento NOD2-G908 .....	48
Figura 21 - Patrones PDA del segmento NOD2-G908 .....	48

## ACRÓNIMOS

**H. pylori:** *Helicobacter pylori*, bacteria gram negativa.

**HRM:** High resolution melting (Fusión de alta resolución).

**IL:** Interleucinas: mensajeros químicos del sistema inmunológico.

**LRR:** Repetidos ricos en leucinas, región genética.

**NLR o NOD1 y 2:** Receptores tipo.

**PAMP's:** Patrones moleculares asociados patógenos.

**RRP:** Receptores de reconocimiento de patógenos.

**SNP:** Polimorfismos de nucleótido simple.

**TLR o Toll:** Receptores tipo.

**Tm's:** Temperaturas de fusión o melting

## RESUMEN

La inmunidad innata desempeña un papel muy importante en la protección de un huésped ante microorganismos, que son capaces de generar procesos de inflamación crónica generando daño en los tejidos.

El proceso inflamatorio inducido por la colonización gástrica de *H. pylori* es un factor frecuentemente asociado con el desarrollo de patologías gastroduodenales.

En la regulación de la respuesta innata intervienen moléculas como las NLR o NOD1 y 2 que son importantes receptores de reconocimiento de Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's).

Hay notables evidencias que los receptores tipo NOD identifican de manera intracelular a Patrones moleculares asociados a *Helicobacter pylori*, desencadenando la respuesta inflamatoria hacia esta bacteria.

El presente estudio tuvo como objetivo identificar la variación génica en los genes NOD1 y NOD2 que pudieran asociarse al desarrollo de problemas gastroduodenales.

Se realizó un sondeo de las regiones de repetidos ricos en leucinas de los genes NOD1 y NOD2 para la búsqueda de variantes polimórficas, habiendo encontrado que la región NOD1-160 fue la que presentó la mayor diversidad polimórfica identificada por la generación de 5 distintos patrones de desnaturalización en toda la población analizada, y en los otros 4 segmentos génicos se identificaron solo dos patrones de desnaturalización para cada segmento lo que sugiere que en el primer caso pudieran tener participación en asociaciones genéticas con este tipo de enfermedades.

## ABSTRACT

Innate immunity plays a role in the protection of a host against microorganisms, which are able to generate chronic inflammatory processes causing tissue damage.

The inflammatory process induced gastric colonization of *H. pylori* is a factor closely associated with the development of gastroduodenal diseases.

In the regulation of molecules involved in the innate response as NLR or NOD1 and 2 which are important recognition receptors Pathogen-associated molecular patterns (PAMP's).

Notable there is evidence that the receptors identified type NOD intracellularly associated molecular patterns *Helicobacter pylori*, triggering the inflammatory response towards this bacterium.

The present study aimed to identify gene variation in NOD1 and NOD2 genes that could be associated to the development of gastroduodenal problems.

A survey of the regions of leucine-rich repeat of NOD1 and NOD2 genes to search for polymorphic variants, having found that NOD1-160 was the region that had the highest polymorphic diversity identified by the generation of 5 different patterns was performed denaturing entire study population, and the other 4 gene segments denaturation only two patterns for each segment were identified suggesting that in the first case may have involvement in genetic associations with these diseases.

## INTRODUCCIÓN

La inmunidad innata juega un papel fundamental en la protección de un huésped en el control de microorganismos patógenos activándose diferentes mecanismos de defensa que permiten la eliminación del patógeno.

El Sistema Inmune puede detectar a posibles agentes potencialmente patógenos mediante el reconocimiento de moléculas denominadas Patrones Moleculares asociados a Patógenos (PAMP's), las cuales son identificadas por el hospedero como señales de peligro y ante las cuales el organismo procede a su identificación, mediante los llamados receptores de reconocimiento de patógenos (RRP) que se encuentran en las membranas celulares o intracelularmente de macrófago, neutrófilos, mastocitos y células epiteliales de diversos tejidos.

Los receptores tipo NLR (NOD LIKE RECEPTOR) son una familia de aproximadamente 23 proteínas que reconocen a los PAMP's y que están ubicados a nivel intracelular por lo que reconocen solamente a moléculas microbianas presentes en el citoplasma celular.

Dentro de su estructura presentan el dominio LRR (Repetidos Ricos en Leucinas) quien es el encargado del reconocimiento y unión con la molécula microbiana.

Dentro de la estructura de los NLR hay un dominio central de unión a nucleótidos NACHT o también llamado NOD (Nucleotide Oligomerization Domain receptors) y un dominio n-terminal CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain), los cuales son responsables de la oligomerización de proteínas relacionadas con el envío de señales intracelulares.

La unión del receptor NLR con su ligando a través del dominio LRR provoca en el dominio NACHT la homo-oligomerización de proteínas induciendo el reclutamiento de moléculas adaptadoras con CARD, generando una señal de interacción del receptor NLR con RIP2 y esta a su vez interaccionando con el inhibidor de NF-KB,  $IKK_{\gamma}$ , produciendo ubiquitinilación de esta activando la cinasa de  $IKK_{\alpha}$  e  $IKK_{\beta}$  dando como resultado la activación del factor nuclear de la transcripción NF-KB (Inohara et al 2000).

Los NLR también se desarrollan con la formación del inflamosoma que consiste en una secuencia de interacciones proteicas estimuladas por la enzima caspasa-1, la cual es indispensable para el procesamiento y maduración de algunas citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-18 (Martinon et al 2002; Srinivasula et al 2002).

La bacteria *Helicobacter pylori* es el factor desencadenante de múltiples patologías gastroduodenales; ya que su colonización en la mucosa gástrica estimula la inmunidad innata del hospedero generando una potente respuesta inflamatoria.

En esta respuesta inflamatoria existe la infiltración de células de defensa como los neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas y macrófagos, la cual está modulada por varias moléculas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-8 e TFN- $\alpha$  (Shimoyama et al 2002). Al no eliminar estas células de defensa adecuadamente a la bacteria se desarrolla una colonización ocasionando que en algunos hospederos se pueda desarrollar un proceso inflamatorio crónico activo en donde además de la inflamación de células mononucleares existe la presencia permanente de leucocitos polimorfonucleares como los neutrófilos (Shimada et al 1998).

La inflamación inducida por *H. pylori* es un factor fuertemente asociado al desarrollo de alteraciones gástricas características de las patologías gastroduodenales asociadas con la infección de la bacteria (Farinati et al 2003).

El peptidoglicano que *H. pylori* deposita en el citoplasma de células del epitelio de la mucosa gástrica a través del sistema de secreción tipo IV, presentan un reconocimiento por los NLR, NOD1 y NOD2, lo cual genera posteriormente una subsecuente respuesta inflamatoria (Viala et al 2004).

El aspecto genético del hospedero juega un papel muy importante en la intensidad de la respuesta innata hacia muchos microorganismos, las diferencias en la respuesta innata entre diferentes individuos, puede estar relacionada con polimorfismos, es decir con diferencias a nivel de secuencias génicas.

Hay evidencia que mutaciones genéticas en receptores de reconocimiento a patrones moleculares asociados a patógenos pueden modificar considerablemente los niveles de activación de factores de transcripción relacionados con la expresión de citocinas pro-inflamatorias.

Para el caso de NLR se ha demostrado que mutaciones presentes en los genes NOD2-CARD15 están asociados al desarrollo de linfoma gástrico, (MALT), la cual también es una enfermedad relacionada con *H. pylori* (Rosenstiel et al 2006).(Universidad de Kiel Alemania).

Es necesario realizar estudios polimórficos de población – asociación patológica para realizar el mapeo de regiones génicas completas en la búsqueda del total de las mutaciones presentes ya que de esta manera se podrían presentar tanto los polimorfismos ya descritos como nuevos que nos permitan entender mejor el aporte genético de la respuesta innata con el desarrollo de patologías gastroduodenales. Es por ello que la secuencia génica que corresponde a los dominios ricos en repetidos de leucinas (LRR) de los RRP's puede aportar datos relacionados con el reconocimiento de moléculas microbianas.

A este respecto en población mexicana para receptores NLR no existen reportes de asociación polimorfismos – patología gastroduodenal.

En la mayoría de los estudios polimórficos en RRP se analizan la presencia de SNPs previamente descritos lo que no permite conocer si nuevas mutaciones se pudieran asociar. La razón de ello es que las técnicas de mapeo que permiten descubrir nuevas mutaciones cuando se analizan muchas muestras; o son demasiado costosas como es el caso de una secuenciación o presentan dificultades técnicas como en el caso de PCR-SSCP.

Actualmente se hacen genotipificaciones basadas en la cinética de desnaturalización del DNA de doble cadena (DNA Melting Analysis) que permite identificar variantes polimórficas con la ayuda de compuestos fluorescentes como el LC-green en el que la cinética de desnaturalización se monitorea con equipos como el termociclador en tiempo

real. De esta forma utilizando un método relativamente económico se pueden analizar simultáneamente un número considerable de productos de amplificación de PCR de una longitud de hasta 200 pb, para posteriormente realizar únicamente la secuenciación de las variantes polimórficas.





## EPIDEMIOLOGÍA DE *Helicobacter pylori*

Casi un 50% de la población mundial está infectada con el microorganismo, no obstante los posibles síntomas y consecuencias de la infección son muy diferentes entre los diferentes países (Frenck y Clemens, 2003). En los países de América Latina la prevalencia de infección de *H. pylori* oscila entre el 70 y 90% de la población (Castro y Coelho, 1998). En Ecuador un estudio realizado en niños presentó un 42.4% de afectados por la bacteria y su prevalencia aumentó en un 71.4% en niños con condiciones socioeconómicas bajas (Cabrera *et al*, 2002). Sin embargo no obstante la alta prevalencia de individuos con *H. pylori* solo una minoría de individuos desarrolla una patología maligna severa (García *et al*, 2006); (Debets - Ossenkopp *et al*, 2013).

En los estratos socioeconómicos bajos la infección se adquiere con frecuencia desde la infancia cuando las condiciones de vida permiten el desarrollo de una patología digestiva (Chávez *et al*, 1998; Castro y Coelho, 1998).

La higiene y la mala calidad del agua juegan un papel muy importante en la adquisición temprana y la transmisión de *H. pylori*. La ruta de transmisión principal para el contagio son de persona a persona por vías oral - oral, fecal - oral (Frenck y Clemens, 2003; Bruce y Maroos, 2008). La transmisión fecal - oral tiene una implicación mayor que la transmisión oral - oral, ya que la bacteria se presenta en comida y agua contaminada con heces (Quaglia *et al*, 2006).

Diferentes estudios sugieren que la capacidad de la bacteria para infectar el tracto digestivo puede ser reversible. En adultos de países subdesarrollados la infección puede llegar a ser crónica, mientras que los niños presentan ciclos de adquisición y pérdida de la infección hasta que ésta sea crónica (Frenck y Clemens, 2003).

## MICROBIOLOGÍA DE *Helicobacter pylori*

*H. pylori* es un bacilo curvo, Gram negativo que mide de 2 a 4  $\mu$  de longitud y 0.5  $\mu$  de ancho. Usualmente tiene forma de bacilo curvo pero en condiciones ambientales adversas se presenta en forma de coco (Kusters *et al*, 2006; Goodman, 1997).

Este microorganismo tiene flagelos de aproximadamente 3  $\mu$  de longitud. La composición general de la envoltura celular de la bacteria es similar a la de otros Gram negativos. Posee una membrana interna periplasmática con péptidoglicano y una membrana externa. La membrana externa contiene fosfolípidos y lipopolisacáridos (LPS). Además *H. pylori* posee 5 familias de proteínas en la membrana exterior. La principal incluye adhesinas mientras que las otras 4 tienen proteínas transportadoras de hierro, proteínas asociadas al flagelo y proteínas con función desconocida (Kusters *et al*, 2006).

No obstante que el hábitat natural es la mucosa gástrica, la bacteria es considerada como neutro - halófila. *H. pylori* puede sobrevivir corto tiempo a valores de pH menores a 4.0 pero el crecimiento óptimo se presenta pH neutro (Kusters *et al*, 2006; Olson y Mayer, 2002). Una de las características más importantes de *H. pylori* es su capacidad de colonizar el medio gástrico ácido a pesar de no ser una bacteria acidófila. La mucosa gástrica tiene un valor de pH de 4.0 a 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 no ser arrastrada a la luz *H. pylori* siente el gradiente de pH dentro de la capa mucosa y por quimiotaxis se aleja de los contenidos ácidos del lumen hacia un ambiente de pH neutro, como la superficie de células epiteliales (Schreiber *et al*, 2004).

*H. pylori* se puede encontrar en la superficie de las células epiteliales estomacales y a veces dentro de las mismas (Petersen y Kroghfelt, 2003).

La distribución intragástrica y la severidad de la infección bacteriana depende de una variedad de factores tales como las características de la cepa colonizante, la genética del huésped, su sistema inmunológico, la dieta y el nivel de producción de ácido. Los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

primeros estudios acerca de las propiedades patogénicas diferenciales de las cepas de *H. pylori* muestran que el aumento 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 se relaciona con una serie de factores bacterianas 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 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 úlcera péptica o cáncer gástrica (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 papel muy importante en el desarrollo de la úlcera péptica y del cáncer gástrico (Cover y Blaser, 1992). Las actividades de VacA incluyen la formación de canales en la membrana, disrupción de la actividad lisosomal y endosomal, señalización celular, interferencia en las actividades de las funciones celulares, inducción a la apoptosis y modulación inmune (Cover y Blanke, 2005).

*H. pylori* debe sobrevivir al pH ácido del estomago y entrar a la mucosa para alcanzar su objetivo (Ottemann y Lowenthal, 2002). El componente principal para la resistencia al ácido de *H. pylori* es la enzima ureasa, la que convierte urea en amoniaco, carbamato y CO<sub>2</sub> lo que da por consecuencia un incremento de pH (Burne y Chen, 2000).

*H. pylori* se adhiere a la células epiteliales humanas usando glicoproteínas fucosiladas y glucolípidos sialisados como receptores celulares. Esta adhesión esta mediada por 2 componentes denominados BabA y SabA (Suerbaum y Josenhans, 2007).

BabA tiene un papel importante en la virulencia de la bacteria, ya que está fuertemente asociada 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).

La proteína bacteriana cagA es considerada un importante factor de patogenicidad, el cual está relacionado con el desencadenamiento e intensidad del proceso inflamatorio causado por *H. pylori* en la mucosa gástrica. Esta proteína se encuentra asociada con la presencia en algunas cepas del llamado islote de la patogenicidad el cual corresponde a un segmento génico que presenta un grupo de genes relacionados con un sistema de transporte tipo IV que introduce moléculas bacterianas al interior de las células epiteliales (Rhode *et al* 2003 y Tanaka *et al* 2003). Las cepas cagA(+) son más comúnmente asociadas con el desarrollo de úlcera péptica y adenocarcinoma gástrico en relación a líneas cagA(-) (Nomura *et al* 2002 y Blaser *et al* 1995). Siendo también las cepas cagA(+) relacionadas con una mayor producción de citocinas pro-inflamatorias (Zhang *et al* 1998). El incremento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias por cepas Cag(+) se encuentra asociado con la activación del factor NF- $\kappa$ B existiendo múltiples evidencias que esta activación es a consecuencia tanto del reconocimiento de TLR así como de NLR, en estos últimos la activación de NF $\kappa$ B se da debido al ingreso de moléculas bacterianas a la célula por el sistema de secreción tipo IV (Peek 2001).

Los LPS de *H. pylori* estimulan los factores de transcripción, como NF -  $\kappa$ B e interleucinas como IL-8 en las células epiteliales y en las células de respuesta inmune. Aún no se sabe si la capacidad de imitar un rango amplio de antígenos sanguíneos del huésped por parte de los LPS promueve la respuesta autoinmune gástrica o atenúa los efectos inmunoestimulantes de los LPS (Kusters *et al*, 2006).

## INTERACCIÓN DE *Helicobacter pylori* CON EL SER HUMANO

Los seres humanos ingieren muchos microorganismos diariamente pero la mayoría no logran colonizar exitosamente el estomago. Después de ingresar al estomago *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, ocasionalmente pueden penetrar dentro de las mismas, pero no es considerada una bacteria intracelular (Scott y Cover, 2006). Los receptores de reconocimiento de patógenos tipo Toll (TLRs) y NOD (NLR) se encuentran en las células epiteliales gástricas y reconocen patrones moleculares asociados 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 es muy poco probable, a menos que, existan disrupciones en la barrera del epitelio gástrico (Scott y Cover, 2006).

## ***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 desordenes clínicos del tracto gastrointestinal superior y, posiblemente el tracto hepatobiliar (Kusters *et al*, 2006).

Las úlceras gástricas y duodenales comúnmente llamadas úlceras pépticas, son defectos en la mucosa que presentan un diámetro de 0.5 cm que penetran a través de la mucosa muscular. Las complicaciones que pueden surgir incluyen sangrado, perforación y formación de constricciones. Los 2 tipos de úlceras tienen una fuerte relación con *H. pylori* por lo que los pacientes infectados con la bacteria tienen de 3 a 10 veces más riesgo 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 de desarrollo de gastritis crónica y de úlcera péptica en la etiología del cáncer gástrico (Goodman, 1997). Esta es la razón por la cual la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer considera que la bacteria es un carcinógeno tipo I (Larc, 1994). Varios niveles de daño en el estomago son identificados antes de que la neoplasia se presente: la gastritis no atrófica crónica, gastritis atrófica crónica, 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 la 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).

## ***Helicobacter pylori* Y LA RESPUESTA INMUNE EN HUMANO**

La inflamación gástrica se desarrolla en un periodo corto de tiempo después de la infección con *H. pylori*. La colonización se manifiesta con 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 en 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 e intracitoplásmicas y LPS, están asociados a una respuesta inflamatoria incrementada (Scott y Cover, 2006).

La proteína bacteriana *cagA* ha sido considerada como un importante factor de patogenicidad el cual se relaciona con el desencadenamiento e intensidad del proceso inflamatorio generado por *H. pylori* en la mucosa gástrica. Esta proteína está asociada con la presencia en algunas cepas del llamado islote de la patogenicidad el cual corresponde a un segmento génico que presenta un grupo de genes relacionados con un sistema de transporte tipo IV que introduce moléculas bacterianas al interior de células epiteliales (Rohde et al 2003 y Tanaka et al 2003).

El aumento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias por cepas Cag(+) se encuentra asociado con la activación del factor NF- $\kappa$ B habiéndose encontrado muchas evidencias de que esta activación se da del reconocimiento de receptores TLR y de receptores NLR, en estos últimos la activación de NF- $\kappa$ B es debido al ingreso de moléculas bacterianas a la célula por el sistema de secreción tipo IV (Peek 2001).

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).

## MARCO TEORICO

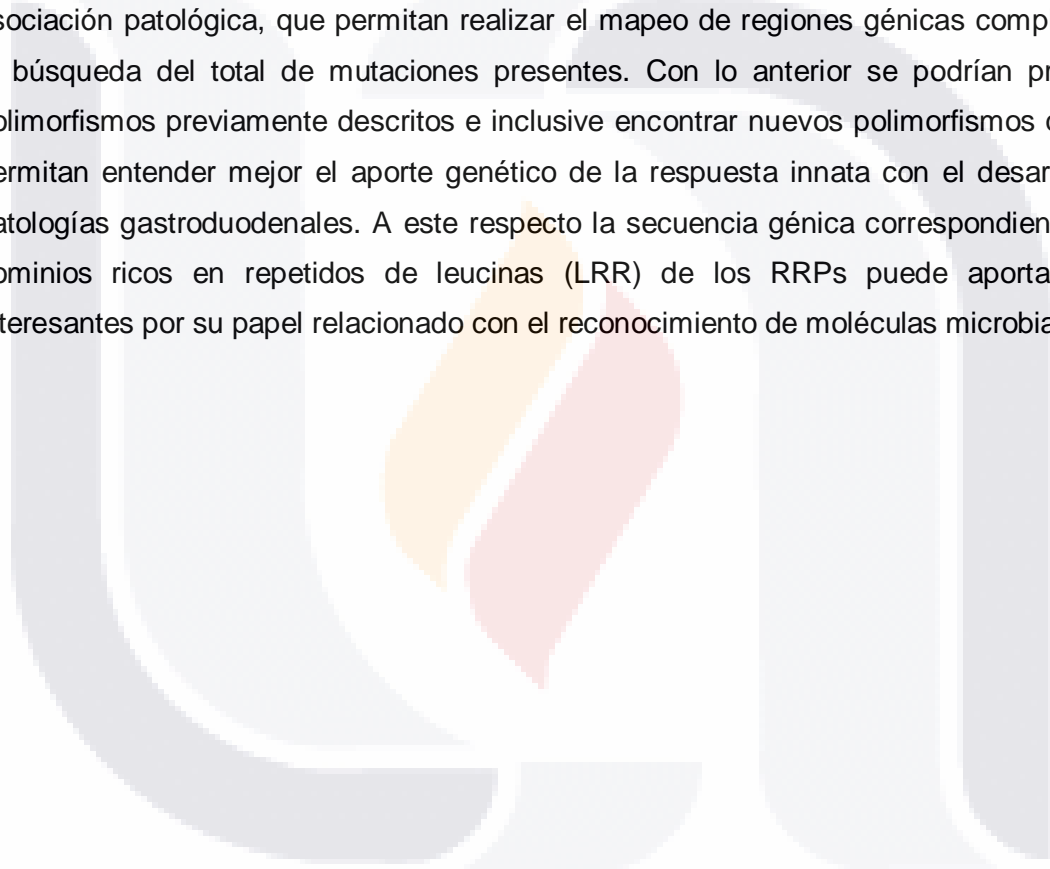
Por otro lado es bien sabido que el aspecto genético del hospedero puede jugar un papel muy importante en la intensidad de la respuesta innata hacia muchos tipos de microorganismo incluyéndose también para el caso de la respuesta innata generada hacia *H. pylori*. Estas diferencias de respuesta innata entre individuos puede estar relacionada a cuestiones polimórficas o dicho de otra manera a las diferencias a nivel de secuencias génicas entre individuos. Existen evidencias que mutaciones genéticas en receptores a patrones moleculares de patógenos pueden modificar considerablemente los niveles de activación de factores de transcripción relacionados con la expresión de citocinas pro-inflamatorias. Para el caso de *H. pylori* existen estudios clínicos que indican una asociación de alelos TLR específicos con el desarrollo de patologías gastroduodenales causadas por *H. pylori* como por ejemplo la sustitución Thr399Ileu en TLR4 se presenta en mayor frecuencia en pacientes con gastritis crónica en relación a la frecuencia observada en individuos asintomáticos situación que también ha sido relacionada con el riesgo en el desarrollo de lesiones precancerosas (Achyut *et al*, 2007). Así mismo se ha demostrado que polimorfismos presentes entre los nucleótidos 196 al 174 del TLR2 se presentan en mayor frecuencia en pacientes Japoneses con cáncer gástrico en relación con pacientes saludables (Tahara *et al*, 2007). Para el caso de NLR se ha demostrado que mutaciones presentes en los genes NOD2/CARD15 han sido significativamente asociados al desarrollo de linfoma gástrico, enfermedad también relacionada con la infección de *H. pylori* (Rosenstiel *et al*, 2006)(Universidad de Kiel en Alemania).

A pesar de la existencia de evidencias que indican la correlación de variantes polimórficas en secuencias génicas de RRP con el desarrollo de patologías asociadas a la infección de *H. pylori*, hay trabajos que se contraponen en relación al papel de los polimorfismos de RRP con el riesgo de desarrollo de patologías asociadas a la infección de la bacteria. Tal es el caso del polimorfismo SNP (Single Nucleotide Polymorphism) de TLR4 +896A→G en el cual un estudio realizado en pacientes reclutados en un Hospital de Dublin Irlanda concluye que según sus resultados no existen evidencias que este polimorfismo de la molécula TLR4 incremente el riesgo en el desarrollo de gastritis crónica y metaplasia intestinal (Murphy *et al*, 2009). En contradicción con estos datos estudios en población de origen diverso se concluyen que este mismo polimorfismo en TLR4 se encuentra



relacionado con el desarrollo de patologías asociadas con la infección de *H. pylori* tales como la gastritis crónica atrófica y el adenocarcinoma gástrico (Hold *et al*, 2007). Aunque estos datos en una primera instancia genera confusión bien pudieran ser consecuencia del reconocimiento de un determinado PAMPs, a partir de cooperación de RRP (entre TLR y/o TLR y Nod) que presenten variantes polimórficas distintas para diferentes grupos poblacionales, pero que tengan un reconocimiento equivalente hacia un mismo PAMPs.

Para demostrar lo anterior es necesario considerar estudios polimórficos de población – asociación patológica, que permitan realizar el mapeo de regiones génicas completas en la búsqueda del total de mutaciones presentes. Con lo anterior se podrían presentar polimorfismos previamente descritos e inclusive encontrar nuevos polimorfismos que nos permitan entender mejor el aporte genético de la respuesta innata con el desarrollo de patologías gastroduodenales. A este respecto la secuencia génica correspondiente a los dominios ricos en repetidos de leucinas (LRR) de los RRP puede aportar datos interesantes por su papel relacionado con el reconocimiento de moléculas microbianas.



## JUSTIFICACIÓN

Si bien existen estudios de polimorfismo en receptores RRP realizados en poblaciones de varias partes del mundo, en población mexicana son pocos los estudios realizados, encontrándose entre estos un par de trabajos en el que se analiza la asociación de polimorfismos en nucleótido único (SNP) en el TLR4 con el desarrollo de padecimientos gastroduodenales (Trejo-de la O *et al*, 2008; Garza-González *et al*, 2007). Mientras que para el caso de de receptores NLR no existen reportes de asociación polimorfismos-patología gastroduodenal relacionados con población mexicana. En la mayor parte de los estudios polimórficos en RRP incluidos a los que se hace referencia en población mexicana, se analizan la presencia de SNPs previamente descritos situación que no permite conocer si nuevas mutaciones se pudieran asociar. Esto se debe a que las técnicas de mapeo que permiten descubrir nuevas mutaciones tienen dos problemas cuando se pretende analizar una amplio número de muestras, pues o bien son demasiado costosas como es el caso de una secuenciación del total de muestras o por otro lado tienen dificultades técnicas para análisis poblacional resultando poco prácticas en el análisis de número amplio de muestras como es el caso de PCR-SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) / secuenciación, en el cual mediante migraciones electroforéticas en gel nativo de poliacrilamida se identifican las variantes polimórficas y son únicamente estas las que se someten a secuenciación. En los últimos años se han utilizado genotipificaciones basadas en la cinética de desnaturalización del DNA de doble cadena (DNA Melting Analysis) para la identificación de variantes polimórficas, en este tipo de análisis se facilita la interpretación con la ayuda de compuestos fluorescentes específicos de DNA de doble cadena (ejemplo, SYBR green o Bromuro de etidio) en el que la cinética desnaturalización puede ser monitoreada mediante equipos automatizados como lo es el termociclador en tiempo real. De esta manera mediante un método relativamente económico se pueden analizar simultáneamente un número considerable de productos de amplificación PCR de una longitud de alrededor de hasta 200 pb. Para considerar posteriormente la secuenciación únicamente de las variantes polimórficas.

## OBJETIVO GENERAL

Identificación de variantes polimórficas de los genes NOD1-CARD4 y NOD2-CARD15 que se presentan asociados con el desarrollo de “Gastritis Atrófica Crónica” causada por la infección de *Helicobacter pylori*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Implementar una técnica para la identificación de polimorfismos en productos de PCR basada en curvas de desnaturalización de DNA de doble cadena de alta resolución (High Resolution Melting: HRM).
- b) Establecer condiciones para la amplificación por PCR de fragmentos génicos correspondientes a los genes NOD1-CARD4 y NOD2-CARD15.
- c) Determinar en una población de individuos asintomáticos el repertorio alélico de los fragmentos de PCR a analizar en ambos genes, mediante el análisis de HRM y secuenciación.
- d) Realizar un estudio polimórfico en una población de pacientes con Gastritis atrófica crónica para los fragmentos a analizar en ambos genes realizando un estudio comparativo relativo a las formas alélicas presentes en la población asintomática.
- e) Realizar un análisis estadístico para determinar la existencia de formas alélicas asociadas con desarrollo de Gastritis atrófica crónica.

## METODOLOGIA

### **Población de estudio.**

Se trabajó con un lote de ADN de tejido gástrico obtenido por el método de Fenol-Cloroformo de grupos de pacientes e individuos control asintomáticos. Se consideraron individuos de entre 18 a 70 años de edad. La valoración clínica y endoscópica se realizó en la unidad de endoscopia de la clínica 7 del IMSS por un médico gastroenterólogo. En la población de pacientes (n=32) se incluyeron individuos con diagnóstico de alguno de los siguientes padecimientos gastroduodenales asociados a la infección de *H. pylori*: gastritis crónica activa, gastritis atrófica crónica, úlcera péptica (duodenal o gástrica), linfoma gástrico y adenocarcinoma gástrico. Para el grupo control asintomáticos (n=25) se consideraron individuos que por valoración clínica y endoscópica no presentasen padecimientos gastroduodenales asociados a la infección de *H. pylori* pero pudiendo presentar cualquier otra patología. Para la inclusión en el protocolo se solicitó el consentimiento informado por el paciente.

### **Oligonucleótidos de secuencias génicas**

Se utilizaron primers previamente diseñados basados en la secuencia de los sitios LRR reportadas para NOD1 (NM\_006092.2) y NOD2 (NM\_022162.1) considerando las regiones que presentase considerando regiones que presentasen mutaciones de nucleótido simple (SNP) incluidas dentro de los dominios LRR de cada gen, reportadas en la base de datos de SNP de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). En la tabla 1 se enlista el diseño de primers que se realizó para el análisis de NOD1 utilizando el software de diseño BLAST. De igual manera para el caso de NOD2 se determinaron los SNP en las regiones LRR reportados (tabla 2), aun que en este caso los primers para las amplificaciones se basaron en secuencias ya reportadas en una publicación previa (*Helio et al, 2003, Gut vol 52 p 558-562*).

NOD1 cromosoma 7 (NG_013025.1)			
NOMBRE DEL OLIGO	SECUENCIA	SNP(s) REPORTADO	Tamaño producto
<b>FNOD1-227</b> <b>RNOD1-227</b>	5-TGGGGAAGTGATGCAGGACGAA-3 5-GCGGGCTACCTGAAGAGCC-3	rs 5743347 y rs117756270	227
<b>FNOD1-160</b> <b>RNOD1-160</b>	5-AGGAGGGGTGAGCATGGCTGTTTC-3 5-GGGCCACAGTTACCTCAGGGTGG-3	Rs 55924701	160
<b>FNOD1-164</b> <b>RNOD1-164</b>	5-GTGTTCCTTCTAGTCTTGCGTCC-3 5-TGGACGACAAAGCAAGACCCTATCA-3	rs 115002719	164

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>

**Tabla 1.** Relación de secuencias oligonucleótidas diseñadas en este trabajo para la amplificación y análisis polimórfico de las regiones LRR del gen NOD1. \*SNP's reportados por la NCBI para el segmento génico correspondiente.

NOD2 cromosoma 16 (NC_000016.9)			
NOMBRE DEL OLIGO	SECUENCIA	SNP(s) REPORTADO	Tamaño producto
<b>SEN-R702W</b> <b>ANS-R702W</b>	5-AGATCACAGCAGCCTTCCTG-3 5-CAGCTCTTGGCTCACC-3	rs 6413461	185
<b>SEN-G908R</b> <b>ANS-G908R</b>	5-CTCTTTTGGCCTTTTCAGATTCTG-3 5-CAGCTCCTCCCTCTCACCT-3	rs 58586167	185
<b>SEN-1007fs</b> <b>ANS-1007fs</b>	5-GGCAGAAGCCCTCCTGCAGGGCC-3 5-CCTCAAATTCTGCCATTCC-3	rs 111403064 rs 2066847 rs 5743293, rs 41450053 rs 112436597	151

Helio *et al*, 2003, Gut vol 52 p558)

**Tabla 2.** Relación de secuencias oligonucleótidas para la amplificación de las regiones LRR del gen NOD2 utilizadas en este trabajo para el análisis polimórfico del gen NOD2. \*SNP's reportados por la NCBI para el segmento génico correspondiente (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).

### **Reacción en cadena de la polimerasa.**

Para la obtención de los segmentos génicos de los distintos fragmentos se realizó la amplificación por PCR utilizando Buffer PCR (10X) 2  $\mu$ l,  $MgCl_2$  (50 mM) 0.4  $\mu$ l, dNTP's (10 mM) 0.4  $\mu$ l, primers sentido y antisentido (0.5 pmol/  $\mu$ l), ADN molde (400 ng), Taq DNA pol (5U/  $\mu$ l) 0.3  $\mu$ l ajustado a en un volumen final de 20  $\mu$ l. Las condiciones de PCR utilizadas fueron las siguientes: incubación inicial 2 minutos 92°C, 40 ciclos de amplificación de 30 segundos a 92 °C, 30 segundos a 55 °C y 1 min a 72 °C así como una incubación final de y 1 min a 72 °C, en un equipo de PCR en punto final (Promega). Los productos fueron verificados por la migración de 3  $\mu$ l de la reacción de PCR en electroforesis en gel de agarosa a una concentración mayor a al 2.5% en Buffer TBE y revelados con bromuro de etidio.

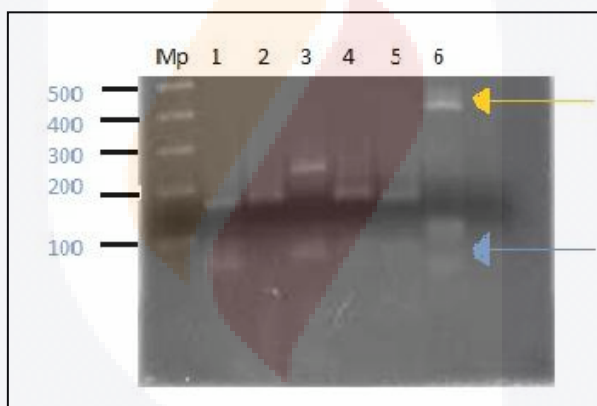
### **Fusión de alta resolución (análisis HRM)**

El análisis de fusión de alta resolución se llevo a cabo en un termociclador en tiempo real (marca illumina). La reacción de HRM consistió en 12  $\mu$ l del producto de PCR, 2  $\mu$ l de LCgreen (10X), y 6  $\mu$ l de Tris-HCl (50 mM). Se realizó una desnaturalización inicial a 95°C y la desnaturalización gradual mediante un gradiente de temperatura de 55- 95°C para generar la curva de fluorescencia excepto para NOD2-702 que fue 55- 95°C. El análisis de los resultados se realizó a través de curvas de desnaturalización normalizada considerando las zonas de melting activo para cada producto identificado por las presencia de puntos del melting indicados por el equipo. Las  $T_m$ 's cercanas a los 60°C no fueron consideradas por estar relacionadas con los primer usados en la amplificación. Así mismo se analizaron curvas de diferencia y curvas de MELT.

## RESULTADOS

### Estandarización de condiciones de amplificación de los segmentos génicos en NOD1 y NOD2.

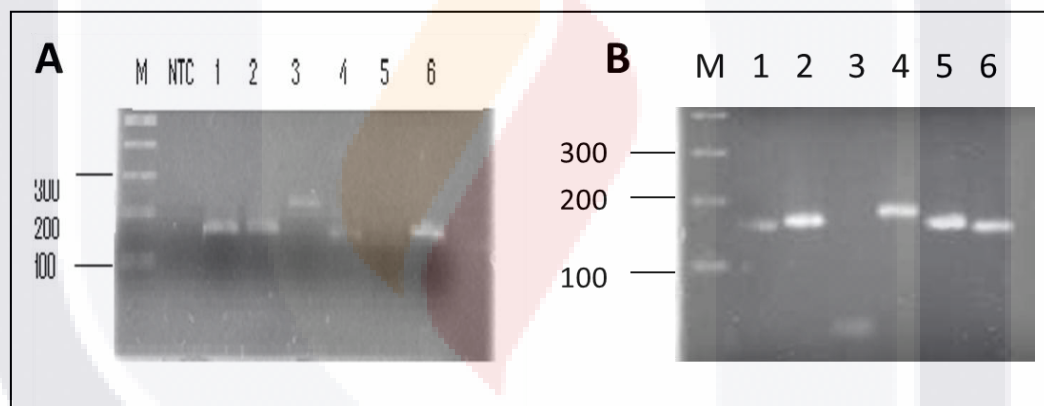
En los primeros ensayos realizados se encontró la generación de productos de amplificación de tamaño esperado de los segmentos correspondientes para ambos genes: NOD1-160 (160pb), NOD1-164(164pb), NOD2-G908R(165 pb), NOD1-227 (227 pb), NOD2-107fs (151pb) y NOD2-R702w (180 pb). (Figura 1), se presentó la presencia de bandas adicionales que pueden ser consecuencia de exceso de primers (bandas menores a los 100 pb; Figura 1, flecha inferior) o la generación de productos inespecíficos. En relación a esto último para el segmento NOD2-R702w se observa el producto esperado de 151 pb y un producto inespecífico de alrededor de 450 pb (Figura 1, flecha superior).



**Figura 1.** Productos de amplificación de los genes NOD1-160(1) 160pb, NOD1-164(2) 164pb, NOD1-227(3) 227pb, NOD2-G908R(4) 180pb, NOD2-107fs(5) 184pb y NOD2-R702w(6) 151pb en gel de agarosa 2.5% y revelados con bromuro de etidio.

Debido a lo anterior se realizó el ajuste de algunas de las condiciones obteniendo los mejores resultados cuando se disminuyó la concentración de los primers de 1.6 pmol/μl a 0.54pmol/μl. En los resultados obtenidos en este segundo experimento se observa que dejan de aparecer los productos inespecíficos debidos al excedente de primer permitiendo observar únicamente productos específicos y sin la presencia de bandas adicionales (Figura 2A). En el caso NOD2-107fs (Figura 2A, carril 5) para esta amplificación en particular presento una baja intensidad de amplificación.

A pesar de que las condiciones de amplificación obtenidas permitieron de forma adecuada la amplificación de los distintos segmentos se empezó a tener posteriormente problemas en la amplificación, situación que después de una serie de experimentos fue atribuida a degradación de los oligonucleótidos por tal razón se opto por solicitar la síntesis de un nuevo lote de oligonucleótidos para la obtención de todos los segmentos génicos. Con los nuevos primers se realizo de forma adecuada la amplificación de 5 de los 6 segmentos génicos, observándose la amplificación de productos del tamaño esperado (Figura 2B). Nótese la mejor separación de los productos de acuerdo a su peso molecular cuando se hace una electroforesis en gel de agarosa al 3.5% (figura 2B) en relación al 2.5% (Figura 2A). No fue posible amplificar el segmento de NOD1-227 (Figura 2B) muy posiblemente porque los primers no fueron sintetizados adecuadamente por la empresa proveedora, por tal razón no fue posible hacer el análisis para este segmento.



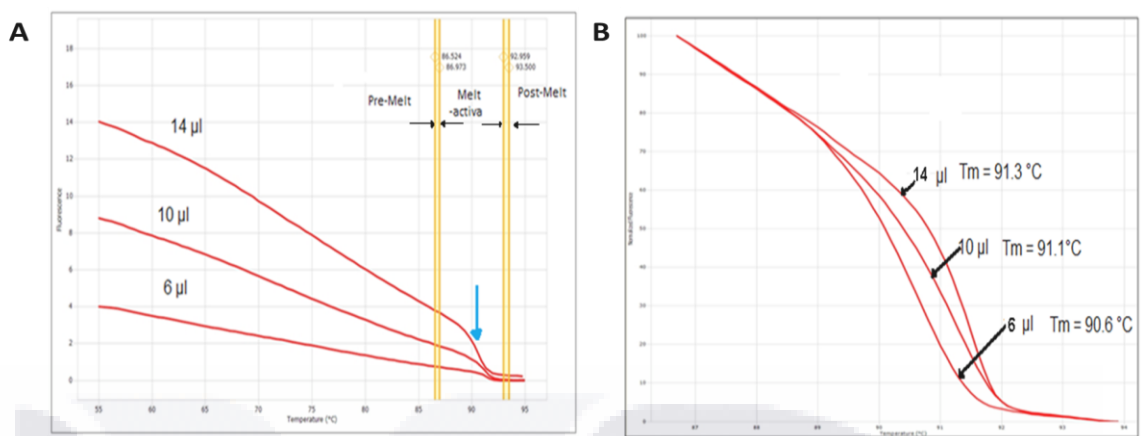
**Figura 2.** Productos de amplificación de los distintos segmentos génicos usando dos distintos lotes de primers. **(A)** Primer lote de primers carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6 con muestras NOD1-160, NOD1-164, NOD1-227 227pb, NOD2-G908R, NOD2-107fs y NOD2-R702w respectivamente en gel de agarosa **2.5%** y revelados con bromuro de etidio. **(B)** Segundo lote de primers carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6 con muestras NOD1-160, NOD1-164, NOD1-227 NOD2-R702w , NOD2-G908R y NOD2-107fs respectivamente en gel de agarosa **3.5%** y revelados con bromuro de etidio. Se incluyo un marcador de peso (M) y muestra control negativo sin ADN molde (NTC).



### **Implementación del análisis de desnaturalización de ADN de alta resolución (High Resolution Melting; HRM).**

La implementación del método de HRM para la determinación de polimorfismos en los productos de amplificación de ADN se inicio con un primer experimento en el que se amplifico el fragmento NOD2-107fs en un termociclador de punto final. El producto obtenido de las amplificaciones posteriormente se analizo en un equipo de tiempo real con función de análisis de HRM. En este análisis se manejaron distintos volúmenes del producto de PCR ( 6, 10 y 14  $\mu$ l) y se utilizo como colorante de unión a ADN de doble cadena para el monitoreo de la curva de desnaturalización, el compuesto SYBGreen.

En la figura 4A se observan los patrones de fluorescencia correspondientes a la curva de desnaturalización del producto de PCR. Para el análisis de dicha curva primeramente se determino el área de melting activo del producto (Fig. 4A). Dicha área se caracteriza por ser el rango de la curva en el que existe una caída más pronunciada de la fluorescencia dependiente del incremento de temperatura. En dicho rango es donde se ubica la temperatura de melting ( $T_m$ ) del producto de PCR el cual es característico para cada secuencia de ADN y junto con el patrón de la curva de desnaturalización es un parámetro que nos permite identificar variaciones de secuencia entre productos de PCR. Mediante el software del equipo de HRM se selecciono el área de melting activo mediante la definición de un límite inferior a la región de melting activo (Pre-Melt) y un límite superior (Post-Melt). Posteriormente para facilitar el análisis de la curva de desnaturalización, mediante el mismo software del equipo se genero la curva de desnaturalización “normalizada” mediante el ajuste al 100% de la fluorescencia con los puntos de Pre-Melt y Post-melt.



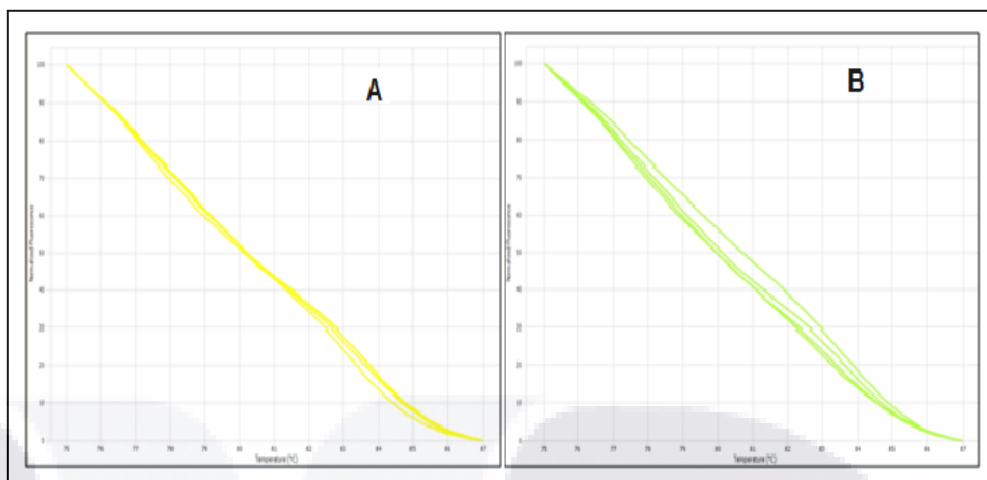
**Figura 4.** (A) Curva de desnaturalización por HRM de productos de PCR del fragmento NOD2-107fs variando la concentración de productos de amplificación (6, 10 y 14 µl) de la reacción de PCR. (B) Curva de desnaturalización normalizada de productos de PCR del fragmento NOD2-107fs variando el volumen de los productos (6, 10 y 14 µl) de la reacción de PCR. El rango de normalización utilizado fue 86.5 – 93.5 °C.

Una vez obtenida la curva Normalizada (Fig. 4B) en un rango de temperatura de 86.5 – 93.5 °C se pudo observar que las curvas de desnaturalización del producto de PCR NOD2-107fs para los distintos volúmenes (6, 10 y 14 µl) presentan un patrón de desnaturalización muy semejantes entre sí, diferenciándose únicamente en una disminución de fluorescencia dependiente de la concentración del producto de PCR. Tal situación es congruente con el resultado esperado por que al tratarse de un mismo segmento de ADN, su dinámica de desnaturalización es idéntica y la única diferencia radica en la magnitud de fluorescencia motivada por la concentración de ADN. Al igual que el patrón de desnaturalización las Tm's para los distintos volúmenes del producto de PCR NOD2-107fs mostró un valor equivalente 90.6, 91.1 y 91.3 °C para 6, 10 y 14 µl respectivamente (Fig. 4B) lo que corrobora que el análisis de HRM con el uso de SYBGreen y bajo las condiciones utilizadas nos permite identificar un mismo producto PCR como tal a pesar de presentarse en distinta concentración.

Si bien en estos primeros experimentos el uso de SYBGreen y las condiciones de HRM mostraron ser útil en el análisis de las curvas de desnaturalización, se demostró que al realizar en una sola reacción el análisis de PCR-HRM, el SYBR green tuvo un efecto inhibitorio de la reacción de amplificación por PCR. Por lo anterior se decidió considerar otro cromóforo de afinidad por ADN de doble cadena alternativo al SYBGreen. El colorante que se considero evaluar fue el cromoforo denominado LCgreen, existen reportes que muestran que presenta una baja actividad inhibitoria de la enzima TaqDNApol y por lo tanto una menor afectación del proceso de amplificación. Así mismo esta considerado como un fluorocromo intercalante con mayor saturación que el SYBgreen lo que permite la formación de curvas desnaturalización mas finas que este último. Dentro del proceso de validación se verifico que este cromóforo no genera afectación en el proceso de amplificación por PCR (Datos mostrados en los informes parciales) y por lo tanto se pudiera utilizar en un análisis PCR-HRM simultáneo, por cuestiones prácticas el estudio de HRM de las poblaciones de pacientes y controles se realizo finalmente por separado. Ya que era necesario verificar la existencia del producto de amplificación correspondiente de cada una de las muestras que se fueran a analizar para garantizar un estudio comparativo.

Con el uso de LCgreen como nuevo fluorocromo una segunda variable que se evaluó en el análisis de HRM fue el efecto de la concentración de sales. Lo anterior debido a que la concentración de sales es un factor que de forma importante puede modificar los patrones de desnaturalización de una secuencia de ADN. Para abordar este estudio se decidió realizar un análisis comparativo de la reacción de PCR-HRM considerando una reacción de PCR con baja concentración de sales, reacción preparada en H<sub>2</sub>O inyectable (tal y como se había realizado en los experimentos anteriores) y una reacción de mayor saturación de sales, para lo cual se considero una reacción de PCR preparada en buffer Tris-HCl (50 mM). Para lo cual se realizó el análisis de HRM de las replicas de amplificación con Tris-HCl y con H<sub>2</sub>O inyectable (Figura 5). Para éste análisis se utilizaron curvas normalizadas en un rango de temperatura de 75.82 - 86.2°C. Si bien las curvas normalizadas para Tris-HCl como para H<sub>2</sub>O inyectable presenta un patrón de desnaturalización muy semejante (Figura 5), es necesario hacer notar que en las replicas de reacción con H<sub>2</sub>O puede observarse mayor dispersión (Figura 5B) en relación a las réplicas de TrisHCl (Figura 5 A).

La dispersión mencionadas anteriormente pueden ser ilustradas de una forma numérica mediante el análisis de las temperaturas de melting (T<sub>m</sub>) de las distintas replicas (Tabla 3). Donde se puede observar una dispersión mayor de los valores de T<sub>m</sub> en las replicas de reacción desarrolladas en H<sub>2</sub>O inyectable en relación a las elaboradas con TrisHCl. El valor de T<sub>m</sub> obtenido para las reacciones con H<sub>2</sub>O fue  $80.55 \pm 3.29$  °C (T<sub>m</sub>± SD), mientras que con Tris-HCl se tuvo T<sub>m</sub> medio de  $83.42 \pm 0.20$  °C (T<sub>m</sub>± SD). La menor desviación estándar presente en las replicas de reacción con Tris-HCl nos confirma que la presencia que concentración de sales durante el análisis de HRM genera una desnaturalización del producto de PCR con menos variabilidad, situación que favorece los análisis comparativos en un estudio polimórfico. Por lo mencionado anteriormente se decidió utilizar TrisHCl para el estudio de HRM pues las curvas de desnaturalización en presencia del TrisHCl son mas reproducibles que con H<sub>2</sub>O inyectable.



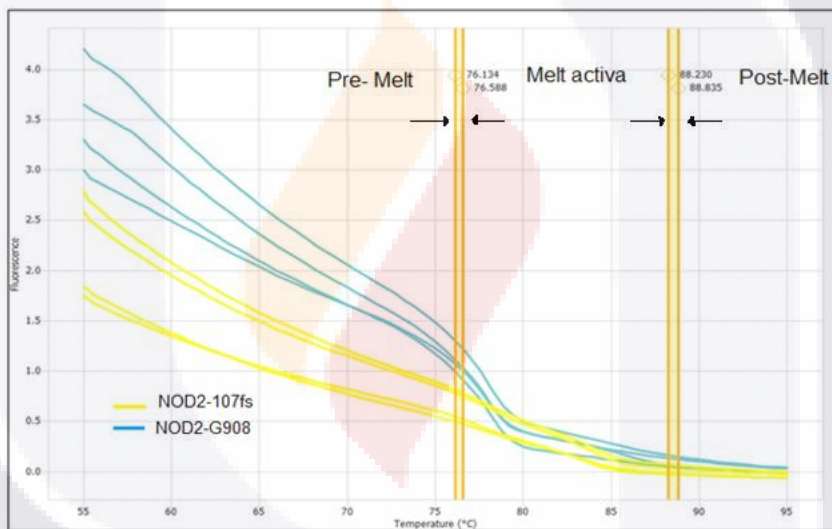
**Figura 5.** Curva de desnaturalización normalizada del fragmento NOD2 107fs de reacciones replica (n=4) preparadas con TrisHCl (A) o con H<sub>2</sub>O inyectable (B).

NÚMERO DE RÉPLICA	T <sub>m</sub> (°C) - TRIS-HCL	T <sub>m</sub> (°C) - H <sub>2</sub> O
1	83.3	77.9
2	83.6	83.3
3	83.6	83.5
4	83.2	77.5
<b>Media</b>	<b>83.42 ± 0.20</b>	<b>80.55 ± 3.29</b>

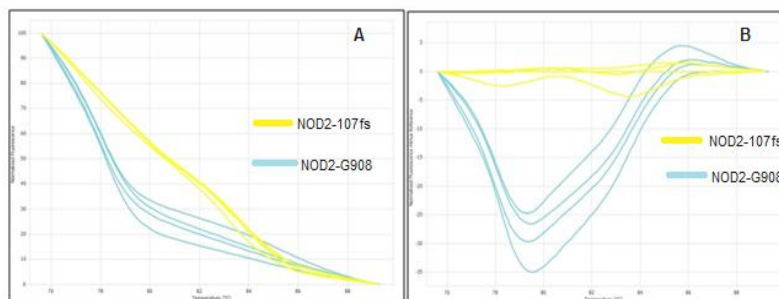
**Tabla 3.-** Temperaturas de melting (T<sub>m</sub>) registradas para las réplica del reacción (n=4) preparadas con TrisHCl (50 mM) o con H<sub>2</sub>O inyectable obtenidas con la finalidad de evaluar el efecto de la concentración de sales en el sistema HRM.

Con el fin de demostrar que las condiciones para el análisis de HRM obtenidas en los experimentos anteriores nos permiten identificar mediante curvas de desnaturalización dos productos de PCR distintos. Se realizó un análisis de PCR-HRM comparativo de dos diferentes segmentos del gen NOD2, el fragmento NOD2-107fs y el fragmento NOD2-G908. En dicho experimento, se desarrolló un análisis de HRM mediante una curva de desnaturalización “Normalizada” (Figura 7A) bajo los mismos los límites de melting (76.13°C y 88.83°C) para ambos segmentos (Fig. 6). Así como un segundo tipo de análisis mediante una curva de “Diferencia” (grafico relativo al ajuste a cero de la fluorescencia de la curva de una de las muestras) considerando una de las replicas del fragmento NOD2-107fs como valor de referencia para el ajuste de fluorescencia (Figura

7B). En dicho análisis es posible observar que tanto en la curva normalizada como en la curva de diferencia (Figura 7 A y B), el patrón de las de desnaturalización que presenta el fragmento NOD2-107fs es radicalmente distinto al que presenta el NOD2-G908 en las distintas replicas analizadas. Adicionalmente se realizo un análisis de los valores de Tm correspondientes para ambos productos de PCR, encontrando una clara diferencia en los valores de Tm en ambos fragmentos. En el caso del fragmento 107fs se presenta una Tm media de  $83.42 \pm 0.20$  y mientras que para el fragmento G908 fue de  $78.025 \pm 0.12$ . Dado que ambos productos presentan una clara diferencia en sus valores de Tm y se presenta una evidente diferencia en la curva de desnaturalización en ambos productos de PCR podemos considerar que las condiciones utilizadas en el análisis HRM permiten diferenciar claramente entre dos productos de PCR distintos.



**Figura 6.** Curva de desnaturalización completa de HRM comparando actividad de genes 107fs y G908 de NOD2, tomando como rango de temperatura de 76.13°C a 88.83°C.



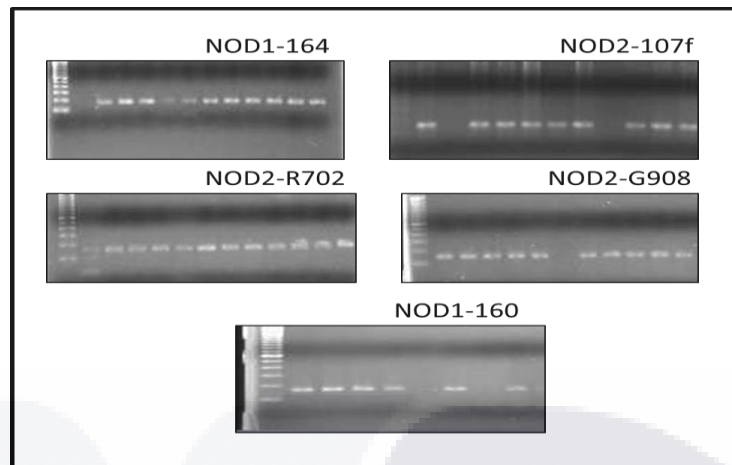
**Figura 7 . A)** Curva normalizada para genes 107fs y G908 **B)** Curva de diferencia para genes 107fs y G908 considerando como valor de referencia una de las réplicas del gen 107fs.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### Análisis de Variación Génica

Para conocer la existencia de variaciones alélicas relacionadas con la población de pacientes se abordó el estudio de curvas de desnaturalización de alta resolución HRM a partir de productos de PCR (PCR-HRM). Utilizando ADN genómico normalizado a 400 ng/μl se procedió a la amplificación por PCR en punto final de cada uno de los segmentos génicos de la población de pacientes así como del grupo de individuos control asintomáticos. Los productos de amplificación de cada una de las muestras fueron verificadas en electroforesis en gel de agarosa considerando únicamente aquellas en las que se presentase solamente la banda correspondiente al tamaño esperado para el segmento correspondiente. En la figura 8 se observa a manera de ejemplo el corrimiento electroforético de algunas muestras correspondientes a los distintos segmentos génicos en estudio de los genes NOD1 y NOD2. Se presentó la dificultad en la amplificación de algunos segmentos para algunas de las muestras probablemente por problemas de degradación de ADN (las muestras se mantuvieron en congelación a -80°C) por tal razón no fue posible obtener productos de PCR para todas las muestras de ambos grupos.

Una vez verificados los productos de amplificación se procedió al análisis de curvas de desnaturalización mediante el análisis de alta resolución, utilizando tres tipos de curvas: 1) Curva de Normalización, 2) Curva de Diferencia y 3) Curva de MELT derivada. Para un mismo segmento génico se realizó de manera simultánea el estudio de HRM en el total de las muestras de ambos grupos, esto para permitir un adecuado análisis comparativo de los patrones de desnaturalización.



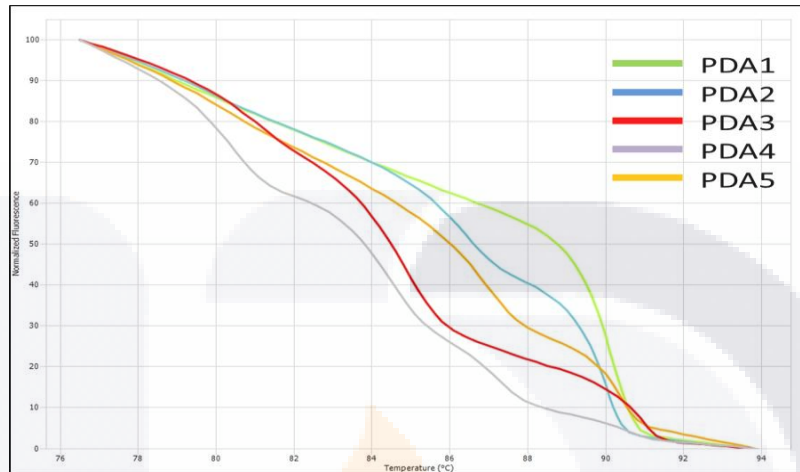
**Figura 8.** Productos de amplificación de los distintos segmentos génicos a partir de 5 distintos individuos. El análisis se realizó en electroforesis en gel de agarosa 2.5% y revelados con bromuro de etidio. Se incluyó un marcador de peso (Mp).

### **Análisis PCR-HRM segmento NOD1-160**

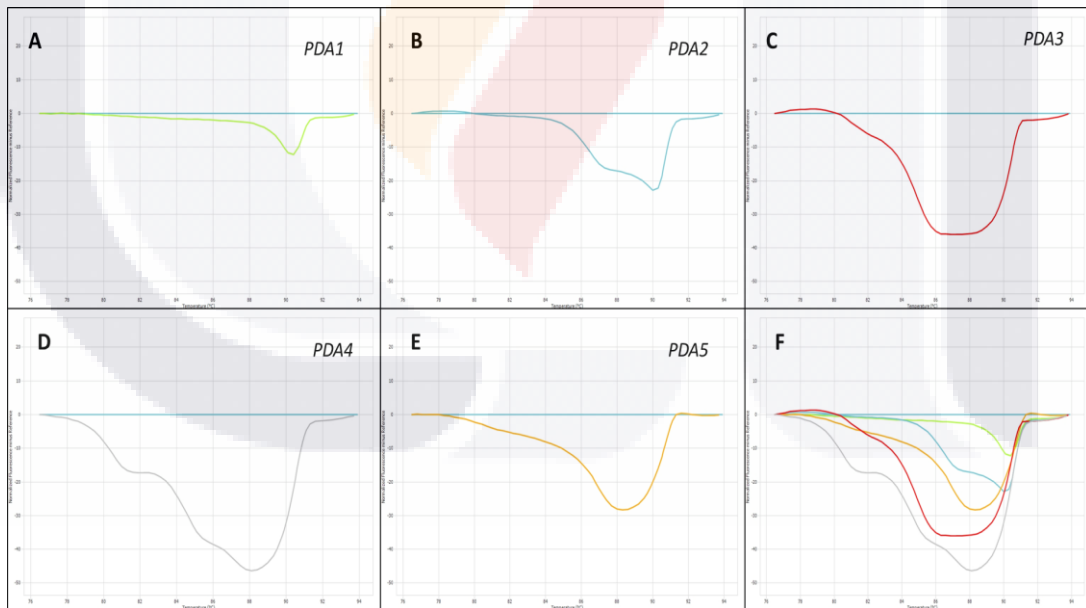
En el análisis de desnaturalización para el segmento NOD1-160 se logró identificar en las distintas muestras la presencia de 3 principales temperaturas de melting ( $T_m$ ), siendo la  $T_m$  mayoritaria  $T_{m1} = 90.08 \pm 0.5 \text{ } ^\circ\text{C}$ , siguiendo una  $T_{m2} = 84.65 \pm 1.25$  y finalmente una  $T_{m3} = 80.61 \pm 0.58 \text{ } ^\circ\text{C}$ . Para generar las curvas de normalización y diferencia se seleccionó un rango de temperatura donde este producto presentase actividad de melting para lo cual se consideró de entre  $77$  a  $93 \text{ } ^\circ\text{C}$ . Mediante el análisis de las pendientes en las curvas de Normalización de los productos de PCR para el segmento NOD1-160 para ambas poblaciones se logró identificar la existencia de 5 distintos comportamientos en la pendiente de desnaturalización que podrían corresponder a su vez a 5 diferentes patrones de desnaturalización alélica (PDA), figura 9. Para corroborar lo anterior se realizó un análisis mediante una curva de Diferencia considerando el análisis de las muestras representativas de estos 5 patrones y como referencia la resta de fluorescencia de una muestra que presentase el patrón mayoritario (PDA1). A través de este análisis pudimos determinar que cada uno de los patrones de desnaturalización observados en la curva de Normalización (figura 9) coincidió claramente con la generación de 5 distintas curvas de Diferencia (figura 10 A-F). La situación anterior correlacionó también con la curva del MELT derivada para cada una de las muestras, pues se presentaron 5 distintos patrones de MELT correspondientes a los diferentes comportamientos de desnaturalización (Figura



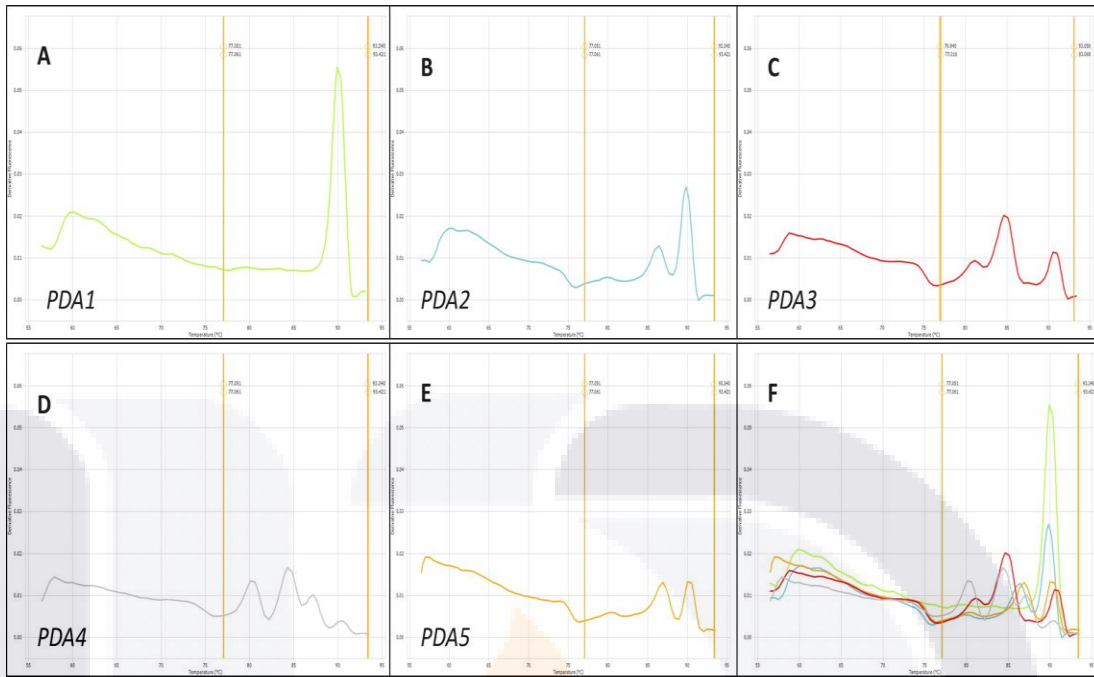
11). Bajo este análisis integrado pudimos considerar que en el segmento génico NOD1-160 existen 5 distintos Patrones de Desnaturalización Alélica (PDA) en ambas poblaciones estudiadas.



**Figura 9.** Patrones de desnaturalización alélica del segmento NOD1-160 presentes en el total de la población estudiada. El rango utilizado para la normalización de la fluorescencia fue 77 a 93 °C.



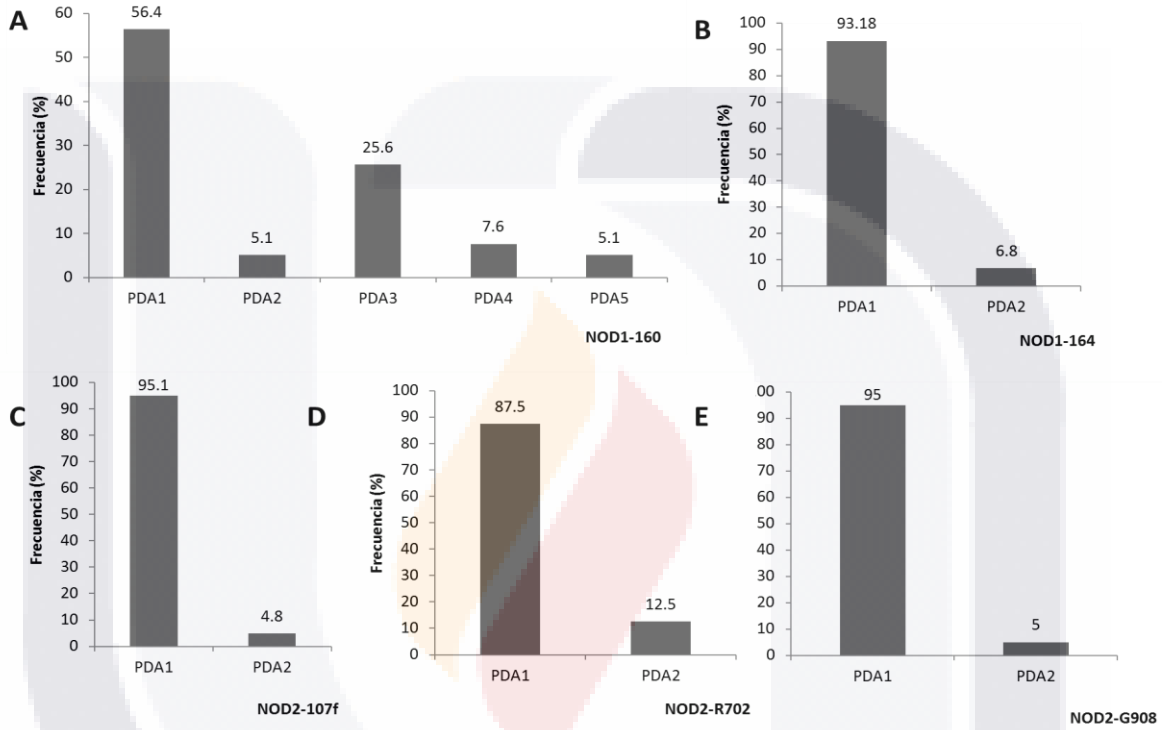
**Figura 10.** Curva de diferencia del segmento NOD1-160. Se presentan los cinco distintos patrones de desnaturalización alélica (PDA) identificados para este segmento génico (A-E). Se muestra además un gráfico comparativo de los 5 PDA identificados (F). El rango utilizado para la normalización de la fluorescencia fue 77 a 93 °C y el análisis de diferencia se realizó utilizando como referencia una muestra de un individuo portador del PDA1 (individuo control C1).



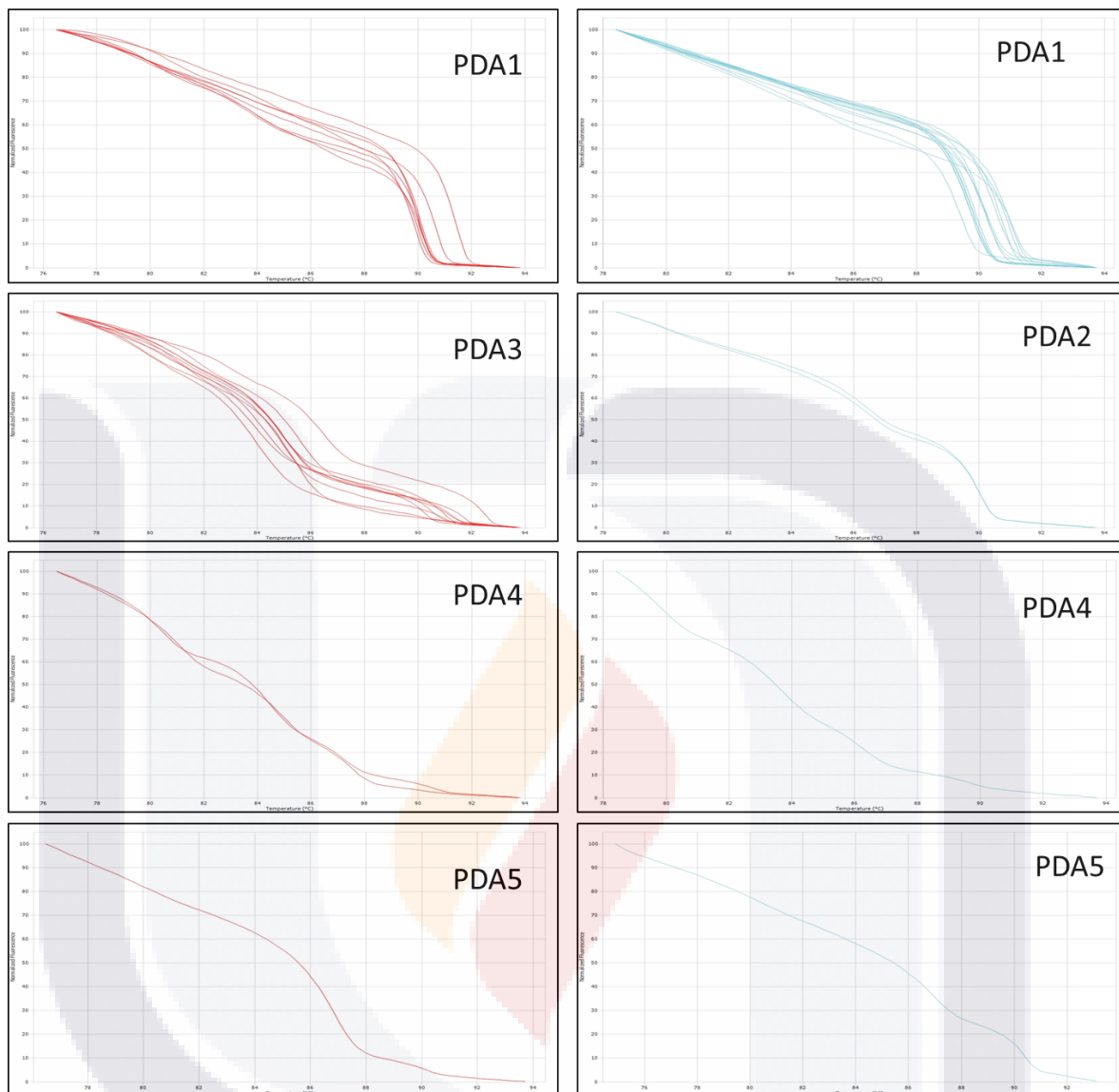
**Figura 11.** Curva de MELT derivada del segmento NOD1-160. Se presentan los cinco distintos patrones de desnaturalización alelica (PDA) identificados para este segmento génico (A-E). Se muestra además un grafico comparativo de de los 5 PDA identificados (F).

A continuación se busco determinar la distribución de frecuencia de cada uno de los patrones de desnaturalización alélica tanto en la población de pacientes como en el grupo de individuos control. El PDA1 resulto ser el patrón de desnaturalización que se presento de manera más frecuente en todo el universo de individuos analizados, estando presente este en el 56.4 % del total de individuos (figura 12), siguiendo a este el PD3 identificado en un 25.6 % y finalmente con menor frecuencia el PD4 (7.6%), PD2 (5.1%) y PD5 (5.1%). Cuando se realizó un análisis para determinar la distribución de frecuencia pero ahora en relación a las dos poblaciones de estudio se encontró de manera interesante que el PDA1 caracterizado por los tres tipos de curvas se presento mayormente relacionado con los individuos control asintomáticos pues presento una frecuencia de un 77.7 % en esta población (Tabla 4, figura 13), mientras que en el grupo de pacientes este fue del 38 % esta diferencia resulto significativa (tabla 4). En contra parte el PD3 se identifico como un patrón altamente asociado con la población de pacientes analizados pues se presento en el 47.6% y estuvo ausente en toda la población de individuo control analizados ( $p=0.0006$ ) (Tabla 4, figura 13). El patrón PDA2 se presento en el grupo control (Figura 13) en un 11.1% y ausente en la totalidad de los individuos del grupo de pacientes

(Tabla 4). Los patrones PDA4 y PDA5 presentaron una distribución equivalente en ambas poblaciones de estudio (Tabla 4, figura 13), estando PD4 en un 9.5 % de los pacientes y en el grupo control en el 5.5% (p=NS), mientras que PD5 se identifico en el 4.7 y 5.5 % en las poblaciones de pacientes y controles respectivamente (p=NS).



**Figura 12.** Frecuencia de los distintos Patrones de desnaturalización alélica (PDA) presentes en los 5 segmentos de génicos, considerando el total de individuos analizados. NOD1-160 (A), NOD1-164 (B), NOD2-107f (C), NOD2-702 (D) y NOD2-G908.



**Figura 13.** Patrones PDA del segmento NOD1-160 identificados en la población de pacientes (Gráficas columna izquierda color rojo) y en la población de individuos control asintomáticos (Gráficas columna derecha color azul). Se muestran únicamente las curvas normalizadas de cada patrón.

SEGMENTO NOD1-160					
	PACIENTES		CONTROLES		
PD alélico	Frecuencia (%)	n	Frecuencia (%)	n	Valor P
PDA1	0.380 (38.0)	8	0.777 (77.7)	14	0.0227*
PDA2	0	0	0.111(11.1)	2	NS
PDA3	0.476 (47.6)	10	0	0	0.0006**
PDA4	0.095 (9.5)	2	0.055 (5.5)	1	NS
PDA5	0.047(4.7)	1	0.055 (5.5)	1	NS
TOTAL	1	21	1	18	NS

**Tabla 4.** Tabla de frecuencias alélicas para el segmento NOD1-160. El Análisis estadísticos se realizo mediante el test de Fischer, considerando  $p < 0.05$  como una diferencia significativa, NS=no significativo.

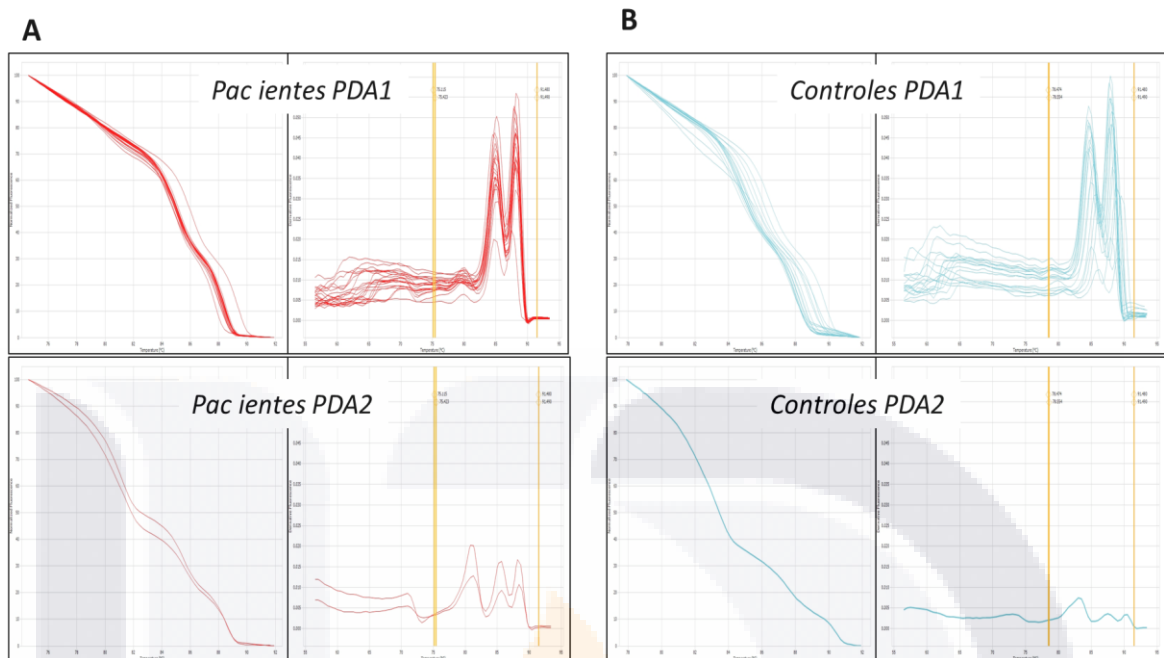
#### Análisis PCR-HRM segmento NOD1-164

En el segmento NOD1-164 en las distintas muestras se identifico la presencia también de 3 Tm´s. Para este producto la Tm mayoritaria (Tm1) fue de  $88.36 \pm 0.5$  , siguiendo una Tm2=  $85.19 \pm 0.6$  y finalmente una Tm3=  $80.09 \pm 1.0$  °C. El rango de actividad de melting que se considero para este producto fue de entre 75 a 91 °C . Mediante el análisis de las pendientes en las curvas de Normalización de los productos de PCR para el segmento NOD1-164 en la totalidad de muestras se logró identificar de acuerdo a las pendientes del análisis de curvas de normalización de dos distintos patrones (Figura 14A). La confirmación de los patrones se realizo también con la correlación con el análisis de Diferencia y la curva de MELT derivada (Figura 14 B y C). A través de este análisis se considero que en el segmento génico NOD1-164 existen 2 distintos Patrones de Desnaturalización Alelica (PDA) en ambas poblaciones estudiadas.



**Figura 14.** Patrones de desnaturalización alélica del segmento NOD1-164 presentes en el total de la población estudiada. Se presenta la Curva Normalizada (A) en el rango de 75 a 91 °C, Curva de diferencia (B) considerando como referencia muestras con PDA1 y curva de MELT derivada (C). En color azul se indica los patrones de desnaturalización correspondientes al PD1 y en color rojo los correspondientes a PDA2.

El PDA1 del segmento génico de NOD1-164 resulto ser el patrón alélico mas frecuente en la población estudiada ya que se identifico en la mayor parte de los individuos analizados, pues el 93.1% del total de los individuos fue portador de este PDA, en contra parte el PDA2 se identifico solo en un 6.8% (figura 12). En relación a la distribución de PDA1 y PDA2 en los grupos de estudio se observo que se presenta una frecuencia equivalente en ambas poblaciones (figura 15 y Tabla 5). Pues se pudo determinar que el PDA1 se identifico en 92% en pacientes y el 94.7% de los controles y PDA2 se observo en el 8.0% y 5.2% respectivamente en ambas poblaciones.



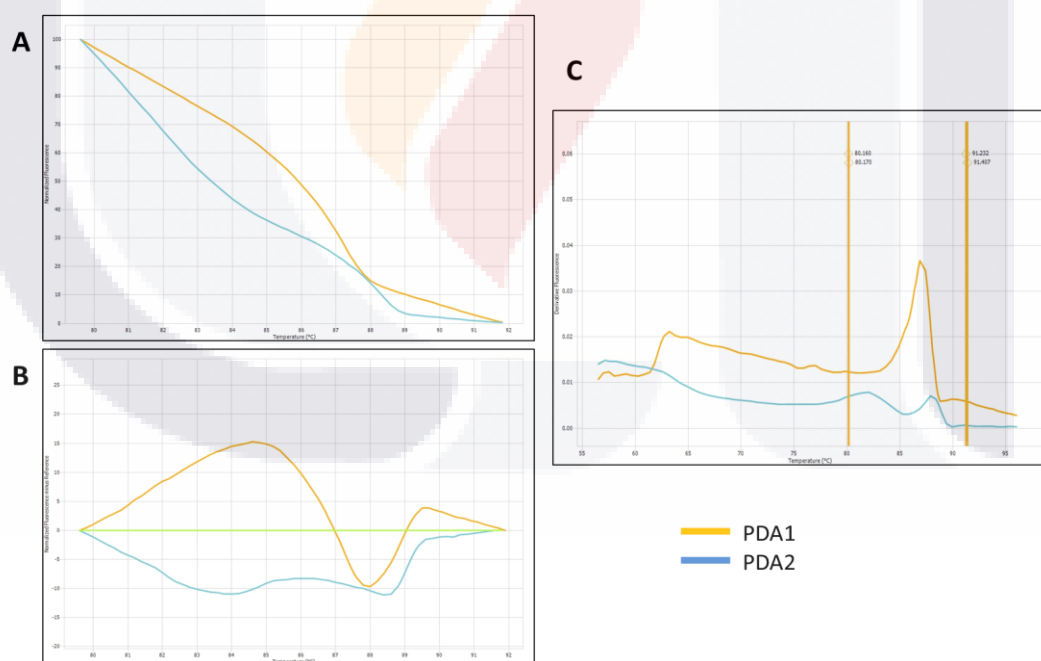
**Figura 15.** Patrones PDA del segmento NOD1-164 identificados en la población de pacientes (A) y en la población de individuos control asintomáticos (B). Tanto para el patrón PDA1 como PDA2 se presenta las curvas normalizada (gráficos a la izquierda de cada figura) y curva de MELT derivada (gráficos a la derecha de cada figura).

SEGMENTO NOD1-164					
		PACIENTES		CONTROLES	
PD alélico	Frecuencia	n	Frecuencia	n	Valor P
PD1	0.92	23	0.947	18	NS
PD2	0.080	2	0.052	1	NS
TOTAL	1	25	1	19	

**Tabla 5.** Tabla de frecuencias alélicas para el segmento NOD1-164. El Análisis estadísticos se realizo mediante el test de Fischer, considerando  $p < 0.05$  como una diferencia significativa, NS=no significativo.

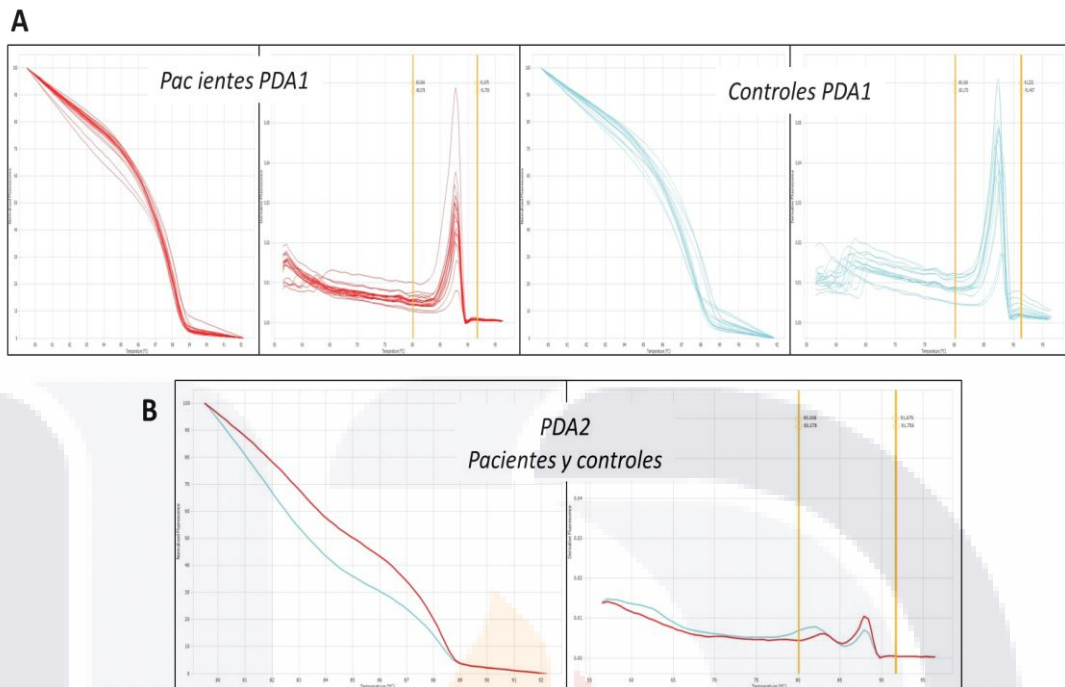
## Análisis PCR-HRM segmento NOD2-107f

Cuando se realizó el análisis de desnaturalización del producto de PCR correspondiente al segmento NOD2-107f en todo el universo de individuos analizado, se encontró que casi todas las muestras presentaron una única temperatura de melting ( $T_m$  de  $87.7 \pm 0.3$ ). Presentándose solamente en dos individuos un producto de PCR con dos  $T_m$ 's, siendo en estos dos casos un producto con una  $T_{m1}$  coincidente con las demás muestras ( $T_m=87.7 \pm 0.56$ ) y una  $T_m$  adicional ( $T_{m2}$ ) con un valor de  $90.9 \pm 0.14$ . Al realizar el análisis de normalización en ambas poblaciones se pudieron identificar 2 únicos patrones de desnaturalización alélica verificados por los demás parámetros del análisis de desnaturalización (Figura 16). La PDA1 para este segmento se presentó en el 95.1 % de la población total (Figura 12). Así mismo el PDA1 tuvo una frecuencia equivalente en las población de pacientes (95.6 %) y en el grupo control (94.4%) (Figura 17 y Tabla 6). El patrón PDA2 fue identificado únicamente por un individuo de la población de pacientes y un individuo de la población control (Figura 17 y Tabla 6).



**Figura 16.** Patrones de desnaturalización alélica del segmento NOD2-107f presentes en el total de la población estudiada. Se presenta la Curva Normalizada (A) en el rango de 80 a 91 °C, Curva de diferencia (B) considerando como referencia muestras con PDA1 y curva de MELT derivada (C). En color naranja se indica los patrones de desnaturalización correspondientes al PD1 y en color azul los correspondientes a PDA2.





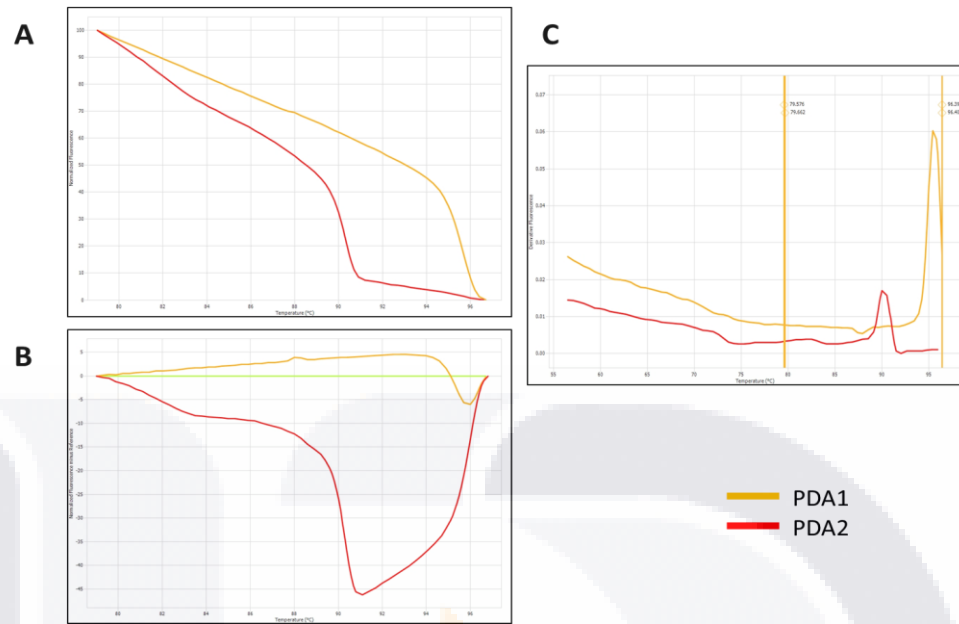
**Figura 17.** Patrones PDA del segmento NOD2-107f. **(A)** PDA1 identificado en la población de pacientes (gráficos en color rojo) y en la población de individuos control asintomáticos (gráficos en color azul). **(B)** PDA2 identificados tanto en pacientes (rojo) como en controles (azul). Se presenta la curvas normalizada (izquierda) y curva de MELT derivada (derecha) de cada PDA.

SEGMENTO NOD2-107f					
	PACIENTES		CONTROLES		
PD alélico	Frecuencia	n	Frecuencia	n	Valor P
PD1	0.956	22	0.944	17	NS
PD2	0.043	1	0.055	1	NS
TOTAL	1	23	1	18	

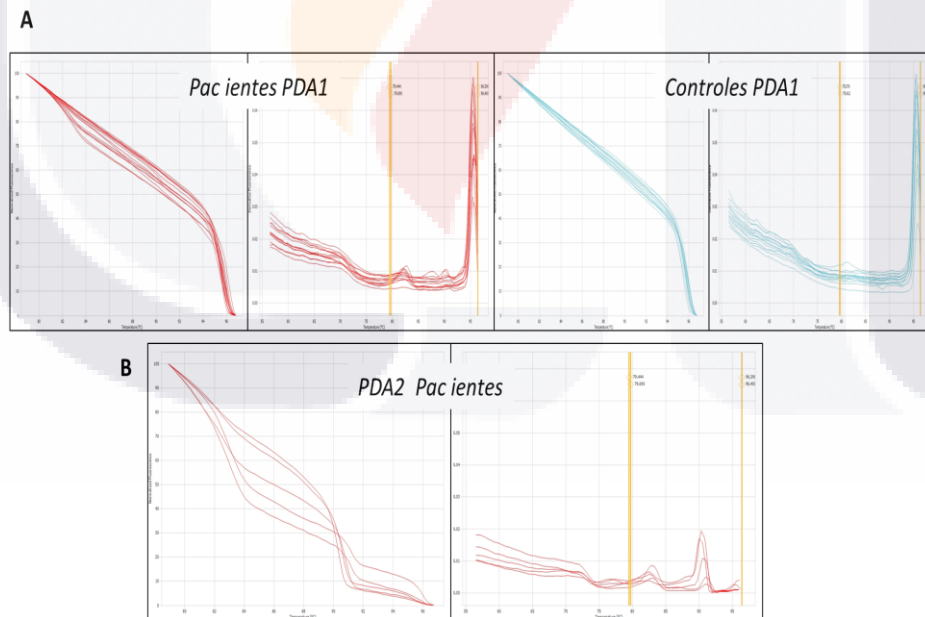
**Tabla 6.** Tabla de frecuencias alélicas para el segmento NOD2-107f. El Análisis estadísticos se realizo mediante el test de Fischer, considerando  $p < 0.05$  como una diferencia significativa, NS=no significativo.

### **Análisis PCR-HRM segmento NOD2-R702**

El producto de PCR correspondiente al segmento NOD2-702, presento en la mayoría de individuos una Tm1 mayoritaria de  $95.64 \pm 0.19$  y adicionalmente algunas muestras presentaron una Tm2 de  $82.4 \pm 0.29$ . Aun que en algunos individuos se observo presentaron productos con menores puntos de desnaturalización presentando una Tm1 de 83.0 y Tm2 de  $91.05 \pm 0.07$ . Cuando se realizó el análisis de normalización en ambas poblaciones se pudieron identificar 2 patrones de desnaturalización alélica verificados por la curva de diferencia y MELT derivada (Figura 18). La PD1 se identifico como el patrón mas prevalente en el total de individuos analizados presentando en un 87.5 % (Figura 12). Este patrón alélico se presento en el 100% de los individuos control pero de manera interesante se observo una menor frecuencia en la población de pacientes con un 77.2 % de individuos portadores en este grupo, aun que esta diferencia de frecuencia no resulto tener significancia estadística ( $p=0.053$ )(Tabla 7) (figura 19). El PDA2 se presento con una menor frecuencia en la población total, identificándose en el 12.5 % de los individuos analizados. Este patrón de desnaturalización no se identifico en la población control aun que en el grupo de paciente se observo en el 22.7 % de los individuos de esta población)(Tabla 7) (figura 19). Mas sin embargo la diferencia de frecuencia de este PDA en ambas poblaciones tampoco presento una significancia estadística.



**Figura 18.** Patrones de desnaturalización alélica del segmento NOD2-702 presentes en el total de la población estudiada. Se presenta la Curva Normalizada (A) en el rango de 79 a 96 °C, Curva de diferencia (B) considerando como referencia muestras con PDA1 y curva de MELT derivada (C). En color naranja se indica los patrones de desnaturalización correspondientes al PD1 y en color rojo los correspondientes a PDA2.



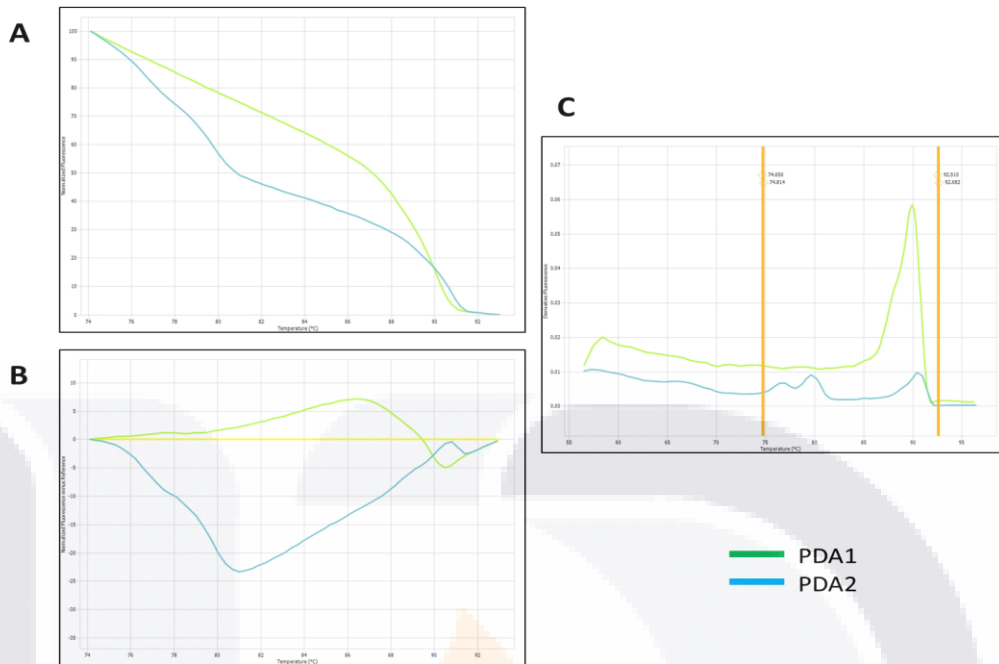
**Figura 19.** Patrones PDA del segmento NOD2-702. (A) PDA1 identificado en la población de pacientes (gráficos en color rojo) y en la población de individuos control asintomáticos (gráficos en color azul). (B) PDA2 identificados en pacientes (rojo). Nota: en grupo control no se identifico PDA2. Se presenta la curvas normalizada (izquierda) y curva de MELT derivada (derecha) de cada PDA.

SEGMENTO NOD2-R702					
PD alélico	PACIENTES		CONTROLES		Valor P
	Frecuencia	n	Frecuencia	n	
PD1	0.772	17	1	18	0.053
PD2	0.227	5	0	0	NS
TOTAL	1	22	1	18	

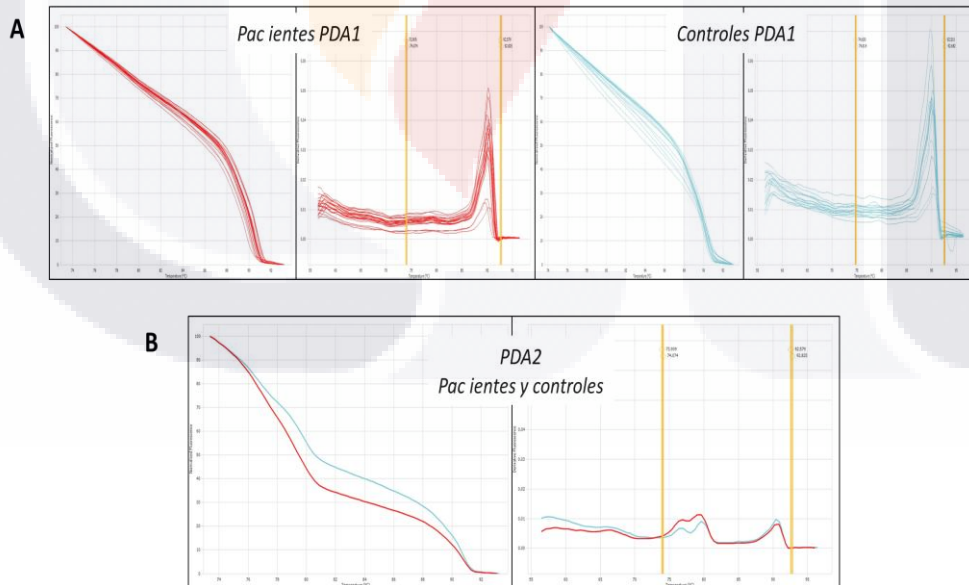
**Tabla 7.** Tabla de frecuencias alélicas para el segmento NOD2-R702. El Análisis estadísticos se realizo mediante el test de Fischer, considerando  $p < 0.05$  como una diferencia significativa, NS=no significativo.

### **Análisis PCR-HRM segmento NOD2-G908**

En el análisis de desnaturalización del producto de PCR correspondiente al segmento NOD2-G908 se encontró que la mayor parte de los individuos analizados presentaron una única temperatura de melting ( $T_m$  de  $90.16 \pm 0.26$ ). Aun que en algunas muestras se observo una  $T_m$  minoritaria ( $T_{m2}$ ) de forma adicional ( $79.06 \pm 0.53$ ). Al realizar el análisis de normalización en ambas poblaciones se pudieron identificar 2 únicos patrones de desnaturalización alélica verificados por los demás parámetros del análisis de desnaturalización (Figura 20). La PDA1 para NOD2-G908 se presento en el 95.0 % de la población total (Figura 12) sin presentar una frecuencia diferencial tanto en las población de pacientes (95.6 %) y controles (94.4%) (Figura 21 y tabla 8). El patrón PDA2 se presento únicamente por un individuo de la población de pacientes y un individuo de la población control (Tabla 8 y Figura 21).



**Figura 20.** Patrones de desnaturalización alélica del segmento NOD2-G908 presentes en el total de la población estudiada. Se presenta la Curva Normalizada (A) en el rango de 75 a 93 °C, Curva de diferencia (B) considerando como referencia muestran con PDA1 y curva de MELT derivada (C). En color verde se indica los patrones de desnaturalización correspondientes al PD1 y en color azul los correspondientes a PDA2.



**Figura 21.** Patrones PDA del segmento NOD2-G908. (A) PDA1 identificado en la población de pacientes (gráficos en color rojo) y en la población de individuos control asintomáticos (gráficos en color azul). (B) PDA2 identificados tanto en pacientes (rojo) como en controles (azul). Se presenta la curvas normalizada (izquierda) y curva de MELT derivada (derecha) de cada PDA.

SEGMENTO NOD2-G908					
PD alélico	PACIENTES		CONTROLES		Valor P
	Frecuencia	n	Frecuencia	n	
PD1	0.956	22	0.941	16	NS
PD2	0.043	1	0.058	1	NS
TOTAL	1	23	1	17	

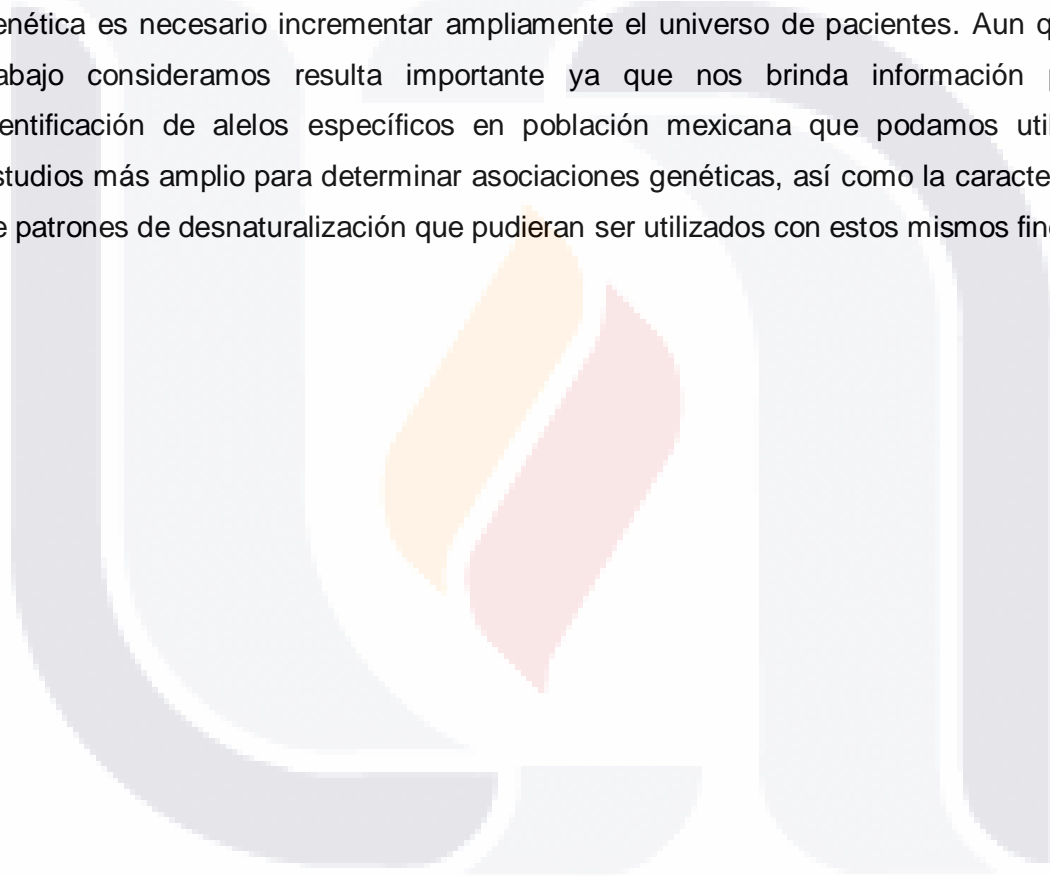
**Tabla 8.** Tabla de frecuencias alélicas para el segmento NOD2-G908. El Análisis estadísticos se realizo mediante el test de Fischer, considerando  $p < 0.05$  como una diferencia significativa, NS=no significativo.

## CONCLUSIONES

Debido a la importancia que tiene el proceso inflamatorio de la mucosa gástrica durante su colonización por la bacteria *H. pylori* como un factor desencadenante del daño gástrico que puede generar distintas patologías gástricas y duodenales, resulta importante estudiar a nivel poblacional la participación de variantes alélicas en genes que participan de manera importante en la respuesta inflamatoria. Tal es el caso de los genes NOD1 y NOD2 que de manera importante reconoce moléculas microbianas para desencadenar y sostener una respuesta innata activa. El análisis de curvas de desnaturalización de alta resolución nos permitió realizar un sondeo de las regiones de repetidos ricos en leucinas de los genes NOD1 y NOD2 para la búsqueda de variantes polimórficas de estos genes. Mediante este análisis se encontró que de estos dos genes en la región NOD1-160 se presentó la mayor diversidad polimórfica, identificada por la generación de 5 distintos patrones de desnaturalización en toda la población analizada. Mientras que en los otros 4 segmentos génicos se identificaron dos patrones de desnaturalización para cada segmento. Debido a que cada patrón de desnaturalización se genera por una combinación alélica en particular (PDA: Patrón de desnaturalización alélica) de estos patrones génicos deberá determinarse la secuencia nucleotídica específica para identificar el número y tipo de polimorfismo.

Resultado interesante identificar PDAs con una distribución diferencial en las poblaciones analizadas. Tal fue el caso del PDA1-NOD1-160 que se presentó con mayor frecuencia en los individuos control asintomáticos (77.6%) en relación a la población de pacientes (38.0%) esta situación indica la posibilidad de que la combinación alélica presente en este patrón de desnaturalización pudiera generar variantes del gen NOD1 de resistencia. En contra parte el PDA3-NOD1-160 pudiera indicar una combinación alélica de susceptibilidad ya que se identificó con una mayor frecuencia en la población de pacientes presentándose en el 47.6% de individuos de este grupo y en ninguno de los individuos control asintomático. En los segmentos NOD1-107f, NOD1-164 y NOD2-G908 si bien se presentaron 2 distintos PDA en cada región en todos los casos se presentó el PDA predominante con frecuencia cercanas o superiores al 95% en la población y con una distribución equivalente tanto en la población de pacientes como en controles. Lo anterior se presentó también con el PDA minoritario de estos segmentos genéticos, situación que

siguiere que estas regiones pudieran no tener participación en asociaciones genéticas al desarrollo de este tipo de enfermedades. En el caso de PDA3-NOD2-R702 se mostro una tendencia como combinación alélica de resistencia ya que se encuentra disminuida en la población de pacientes aun que no se tuvo una diferencia estadística. Debido a que el objetivo de este trabajo fue el de realizar un sondeo múltiple de estos segmentos génicas para identificar regiones con mayor relación con el desarrollo de patologías gastroduodenales se tuvo para el análisis la limitante de un número de pacientes muy amplias pero resulta importante considerar que para poder determinar una asociación genética es necesario incrementar ampliamente el universo de pacientes. Aun que este trabajo consideramos resulta importante ya que nos brinda información para la identificación de alelos específicos en población mexicana que podamos utilizar en estudios más amplio para determinar asociaciones genéticas, así como la caracterización de patrones de desnaturalización que pudieran ser utilizados con estos mismos fines.





## GLOSARIO

**Antígenos Lewis.** Sistema de antígenos sanguíneos humanos basada en los genes fut 2 y fut 3 que codifican fucosiltransferasas. Los antígenos no son producidos por los eritrocitos sino que son componentes de las secreciones epiteliales exócrinas que luego son absorbidos a la superficie de los eritrocitos.

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

**IFN (Interferón):** 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 (Inhibidor of kappa B - kinase):** Es un complejo enzimático que está involucrado en propagar la respuesta celular a la inflamación. Es componente de la casacada de transducción de señales de NF-kB en la que se encarga de fosforilar IκB para la activación de NF-kB.

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

**NF-kB:** (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, induce la apoptosis e inhibe la tumorigénesis y la replicación viral

## BIBLIOGRAFÍA

1. Achyut BR, Ghoshal UC, Moorchung N, Mittal B. Association of Toll-like receptor-4 (Asp299Gly and Thr399Ileu) gene polymorphisms with gastritis and precancerous lesions. *Hum Immunol.* 2007, 68:901-7.
2. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995, 55: 2111-5.
3. Elinotoba-Johnson y Bohling AD. Solution-based Scanning for single-base alterations using a double-stranded DNA binding dye and fluorescence-melting profiles. *Am J Pathology.* 2001, 159(3), p 845-852.
4. Ernest P., Review: article el role of inflammation in the pathogenesis of gastric cancer. *Aliment pharmacol ther.*, 1999, suppl 1, p 13-18.
5. Farinati F, Cardin R, Russo VM, Busatto G, Franco M, Rugge M., *Helicobacter pylori* CagA status, mucosal oxidative damage and gastritis phenotype: a potential pathway to cancer? *Helicobacter.* 2003 Jun;8(3):227-34
6. Garza-Gonzalez E, Bosques-Padilla FJ, Mendoza-Ibarra SI, Flores-Gutierrez JP, Maldonado-Garza HJ, Perez-Perez GI. Assessment of the toll-like receptor 4 Asp299Gly, Thr399Ile and interleukin-8 -251 polymorphisms in the risk for the development of distal gastric cancer. *BMC Cancer.* 2007 Apr 26;7:70.
7. Hold G, Rabkin C, Chow WH, Smith M, Gammons, Rish H, Vaughan L, McColl K. A functional polymorphism of TII-Like Receptor 4 gene increases Risk of Gastric Carcinoma and its precursors. 2007. *Gastroenterology.*132:3 p. 905-912.
8. Inohara N. et al., An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J Biol Chem* 2000; 275: 27823-31.

9. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 2002; 10: 417-426.
10. Murphy G, Thornton J, McManus R, Swan N, Ryan B, O'Morain CA, Hughes DJ, and Sullivan M O. Association of gastric disease with polymorphisms in the inflammatory related genes IL-1B, IL-1RN, IL-10, TNF and TLR4. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2009; 21(6): 630-635.
11. Nomura AMY, Perez-Perez GI, Lee J, Stemmermann G, Blaser MJ. Relation between *Helicobacter pylori* cag A status and risk of peptic ulcer disease. *Am J Epidemiol* 2002, 155: 1054-59.
12. Obonyo M, Sabet M, Cole SP, Ebmeyer J, Uematsu S. Deficiencies of Myeloid differentiation factor 88, Toll-like receptor 2 (TLR2), or TLR4 produce specific defects in macrophage cytokine secretion induced by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2007, 75: 2408-14.
13. Papas A. M., *Antioxidant status, diet, nutrition and Health*, 1999. Editorial CRC press, primera edición, p. 8-13.
14. Peek RM. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions. IV *Helicobacter pylori* strains-specific activation of signal transduction cascades related to gastric inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001, 280: 525-30.
15. Rohde M, Puls J, Buhrdorf R, Fisher W. A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system. *Mol Microbiol* 2003, 49:219-34.
16. Rosenstiel P, Hellmig S, Hampe J, Ott S, Till A, Fischbach W, Sahly H, Lucius R, Fölsch UR, Philpott D, Schreiber S. Influence of polymorphisms in the NOD1/CARD4 and NOD2/CARD15 genes on the clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Cell Microbiol.* 2006 8: 1188-98.

17. Shimada T., Terano A., Chemokine expression in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa. 1998. J. Gastroenterol., 33(5), p 613-617.
18. Shimoyama T., Fukuda S., Liu Q., Nakaj S., Fukuda Y., Sugawara K., Production of chemokines and reactive oxygen species by human neutrophils stimulated by Helicobacter pylori., 2002, Helicobacter, 7: 170-174.
19. Smoot D. T., Elliott T. B., Verspaget H. W., Jones D., Allen C. R., Vernon K. G., Bremner T., Kidd C. R., Kim K. S., Groupman J. D., Ashktorab H. Influence of Helicobacter pylori on reactive oxygen-induced gastric epithelial cell injury. Carcinogenesis 2000, 21(11), p 2091-2095.
20. Srinivasula SM, Poyet JL, Razmara M, Datta P, Zhang Z, Alnemri ES. The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspases-1. J Biol Chem 2002; 277: 21119-21122.
21. Tahara T, Arisawa T, Wang F, Shibata T, Nakamura M, Sakata M, Hirata I, Nakano H. 13Toll-like Receptor 2 (TLR) -196 to 174 del Polymorphism in Gastro-duodenal Diseases in Japanese Population. Dig Dis Sci. 2008 53: 919-24.
22. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. Annu Rev Immunol 2003, 21:335-76.
23. Takenaka R, Yokota K, Ayada K, Mizuno M, Zhao Y, Fujinami Y, Lin SN, Toyokawa T, Okada H, Shiratori Y, Oguma K. Helicobacter pylori heat-shock protein 60 induces inflammatory responses through the Toll-like receptor-triggered pathway in cultured human gastric epithelial cells. Microbiology. 2004,150:3913-22.
24. Tanaka J, Suzuki T, Mimuro H, Sasakawa C. Structural definition on the surface of Helicobacter pylori type IV secretion apparatus. 2003. Cell Microbiol 5: 395-404.

25. Trejo-de la O A, Torres J, Pérez-Rodríguez M, Camorlinga-Ponce M, Luna LF, Abdo-Francis JM, Lazcano E, Maldonado-Bernal C. TLR4 single-nucleotide polymorphisms alter mucosal cytokine and chemokine patterns in Mexican patients with *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal diseases. *Clin Immunol*. 2008 Nov;129(2):333-40. Epub 2008 Aug 27.
26. Viala J, Chaput IG, Boneca A, Cardona SE, Girardin AP, Noran R, Athman S. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. 2004. *Nat Immunol*. 5: 1166-1174.
27. Yokota S, Ohnishi T, Muroi M, Tanamoto K, Fujii N, Amano K. Highly-purified *Helicobacter pylori* LPS preparations induce weak inflammatory reactions and utilize Toll-like receptor 2 complex but not Toll-like receptor 4 complex. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007, 51:140-8.
28. Zhang QB, Etolhi G, Dawodu JB, Husain A, Gemmell CG, Russell RI. Relationship between mucosal levels of interleukin 8 and toxinogenicity of *Helicobacter pylori*. *Inflammopharmacology*. 1998;6(2):109-17.

ANEXOS



ANEXO A

Federación Nacional de Químicos Clínicos  
CONAQUIC, A. C.

DGP F-370



Mérida, Yucatán , 23 de agosto de 2013

Estimado Jesús Norberto Lozano Ruiz Esparza  
Universidad Autónoma de Aguascalientes.  
PRESENTE

El Comité de Editor de la NOTICONAQUIC, tiene el agrado de comunicarle que su artículo: **“Identificación de variantes polimórficas de los genes NOD1-CARD4 y NOD2-CARD15 que se presenten asociados con el desarrollo de enfermedad gastroduodenal causada por la infección de *Helicobacter pilory*”**, ha sido aceptado para su publicación en el No. 62 de la Revista NOTICONAQUIC.

Agradecemos su contribución a la Revista NOTICONAQUIC y aprovechamos la oportunidad para saludar a Ud. muy cordialmente.

  
Dra. *María América Delgado Herrera*

Secretaria de Asuntos Editoriales  
Revista NOTICONAQUIC.

[dherrera02@hotmail.com](mailto:dherrera02@hotmail.com)

[america.delgado.herrera@gmail.com](mailto:america.delgado.herrera@gmail.com)

**“Servir con responsabilidad y compromiso”**

Morelos Pte. No. 101, Colonia Barrio del Calvario  
C.P. 51350, Zinacantepec, Estado de Mexico.  
Tel./Fax: (981) 811 57 45