



UNAM
POSGRADO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



**POSGRADO DE ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA
FACULTAD DE QUÍMICA**

**Estudio de las proteínas de choque térmico (HSP70) en
cáncer gástrico**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA**

P R E S E N T A :

CÉSAR RAMIRO MARTÍNEZ GONZÁLEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ

México, D.F., 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.10. Cáncer gástrico	1
1.11. Factores de riesgo y protección	2
1.12. <i>Helicobacter pylori</i> y cáncer gástrico	3
1.13. Historia familiar	4
1.14. Dieta	4
1.15. Nivel socioeconómico	5
1.16. El sistema HLA: Generalidades	5
1.17. Localización y estructura del sistema HLA	7
1.7.1 Genes HLA de clase I (Clásicos) o Ia	8
1.7.2 Genes HLA de clase I (no Clásicos) o Ib	8
1.7.3 Pseudogenes	9
1.7.4 Genes truncados	9
1.7.5 Segmentos génicos	9
1.7.6 Genes no HLA que se encuentran dentro de la región de clase I	9
1.7.6.1 Región de clase II	9
1.7.6.2 Región de clase III	10
1.18. Mapa genético del Sistema HLA	10
1.19. Polimorfismo serológico	12
1.20. Polimorfismo genético	12
1.21. Polimorfismos del Sistema HLA	12
1.22. Aplicaciones al estudio del Sistema HLA	13
1.23. HLA y Enfermedades gástricas asociadas a <i>H. pylori</i>	14



1.24. Proteínas de choque Térmico	14
1.24.1. Proteínas Chaperonas	16
1.25. Consecuencias celulares del estrés térmico	17
1.26. Respuesta de las células al estrés	18
1.27. Termotolerancia y resistencia a drogas	18
1.28. Familia HSP	19
1.28.1. Familia de las pequeñas HSP	20
1.28.12. Hsp22 o <i>alfa B-crystallin</i>	20
1.28.13. Hsp25	21
1.28.14. Hsp27	21
1.28.2. Familia Hsp40	21
1.28.22 Hsp47	21
1.28.3. Familia de Hsp60	22
1.28.4. Familia de Hsp70	22
1.28.5. Familia Hsp90	22
1.28.6. Familia Hsp110	22
1.29. HSP70	23
1.30. <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (SNP)	24
1.31. Polimorfismos de HSP70 y su asociación a enfermedades	26
2. OBJETIVOS	
2.1. General	27
2.2. Particulares	27
3. HIPÓTESIS	28
4. DISEÑO EXPERIMENTAL	
4.1. Tipo de estudio	29
4.2. Población de estudio	29
4.3. Criterios de inclusión	29
4.4. Criterios de exclusión	29



5. MATERIAL Y MÉTODOS	
5.1. Obtención de la muestra	30
5.2. Extracción del DNA	30
5.3. Cuantificación del DNA obtenido	31
5.4. Genotipificación por <i>TaqMan</i>	31
5.5. Análisis Estadístico	34
6. RESULTADOS	
6.1. Discriminación alélica variantes tipo SNP	35
6.2. Equilibrio de Hardy-Weinberg	35
6.3. Frecuencias alélicas y genotípicas	39
6.4. Haplotipos	40
6.5. Desequilibrio de Ligamiento	41
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS	42
8. CONCLUSIONES	48
9. LITERATURA CITADA	49



El presente estudio fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología de la Unidad de Alta Especialidad del Hospital de Pediatría, del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección de la Dra. Martha Esthela Pérez Rodríguez.

Se realizó gracias al Fondo para el Fomento a la Investigación IMSS con número 302256.



INTRODUCCIÓN

Cáncer gástrico

El cáncer es la principal causa de muerte a escala mundial, se le atribuyen 8,2 millones de defunciones ocurridas en todo el mundo en 2012, siendo el cáncer gástrico el tercer lugar con 723,000 defunciones, solamente superado por el cáncer pulmonar (1.59 millones) y cáncer hepático (745,000) de muerte en todo el mundo GLOBOCAN 2012 (IARC), Section of Cancer Information, <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancer/stomach.asp>. Debido al descenso continuo de las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer gástrico, pasó de ser de la cuarta causa de muerte (Coleman *et al.*, 1993) a la tercer causa en el mundo (OMS, 2012). En el año 2000 el número de casos diagnosticados en el mundo fue de alrededor de 700,000 personas con cáncer gástrico, y aproximadamente 650,000 murieron (Parkin *et al.* 2001; Parkin 2004; Brenner *et al.*, 2009), casi dos tercios de los cuales aparecieron en los países en desarrollo (Parkin, 2004); ese número aumenta cada año debido al envejecimiento de la población. Las tasas más altas se presentan en Japón, China y Corea (Ahn *et al.*, 1991; Yamamoto, 2001), países del Este de Europa, países tropicales de América del Sur y Costa Rica. Las tasas más bajas ocurren en población caucásica de Estados Unidos, Australia y África (Pisani *et al.*, 1990). De acuerdo a un informe de 2013 de la Organización Panamericana de la Salud en América Latina el cáncer gástrico es más común en hombres que en mujeres y se considera un problema significativo de salud pública. La supervivencia de los pacientes con cáncer gástrico es muy baja, tanto en los países industrializados como en los que están en vías de desarrollo, debido a que la mayoría de los casos se diagnostican en etapas avanzadas, cuando la probabilidad de curación es muy reducida (Douglas *et al.*, 1982; Webb, 1996). En Japón, las tasas generales de supervivencia son considerablemente mayores gracias a los programas masivos de detección temprana, lo que permite aplicar el tratamiento oportuno (Hisamichi *et al.*, 1988; Fukao *et al.*, 1995).

En México, el cáncer es la segunda causa de muerte y el gástrico se encuentra entre las cuatro principales neoplasias malignas más frecuentes (Secretaría de Salud, 2013). Existen zonas que difieren en riesgo de cáncer gástrico; en el Estado de México el riesgo es de 2.5/100,00 habitantes (Bajo), en el Distrito Federal de 4.5/100,000 habitantes (Medio) y en Chiapas es de 6.4/100,000 habitantes (Alto) (Torres *et al.*, 1998; OMS, 2011). La mayoría de los tumores del estómago son de origen epitelial (97%), se clasifican como adenocarcinomas, los cuales han sido divididos histológicamente en dos



principales tipos: difuso e intestinal. Difieren en su epidemiología, etiología, patogénesis y comportamiento. El adenocarcinoma de tipo difuso o indiferenciado, se origina en una pangastritis sin atrofia (Crew y Neugut, 2006), produce metástasis más temprano, se presenta por igual en toda la población, teniendo una distribución geográfica más homogénea (Muños *et al.*, 1968), es más frecuente en poblaciones jóvenes que en el intestinal y se encuentra más relacionado con factores genéticos (Park *et al.*, 2000). El adenocarcinoma de tipo intestinal está relacionado con una gastritis que predomina en el cuerpo, seguida por atrofia gástrica y metaplasia intestinal (Crew y Neugut, 2006), es bien diferenciado, de crecimiento expansivo, prevalece en poblaciones de alto riesgo de cáncer gástrico como en hombres de mayor edad (Lauren, 1965; Correa *et al.*, 1973) y se relaciona con factores ambientales. La disminución de la incidencia de cáncer gástrico se atribuye principalmente al tipo intestinal. Los cambios que preceden a la aparición de este tipo de cáncer son la gastritis crónica atrófica, la metaplasia y la displasia. El proceso completo tarda por lo menos dos décadas. En todas las etapas de este proceso interactúan la predisposición genética, los factores de riesgo y los factores de protección, ya sea facilitando, retrasando o evitando el desarrollo del cáncer (Correa, 1992).

El cáncer gástrico es una enfermedad multifactorial, su amplia variación geográfica y el cambio de su incidencia a través de los años sugieren que factores ambientales o de estilo de vida son contribuyentes principales en la etiología de esta enfermedad, por lo que se le relaciona con factores ambientales (nivel socioeconómico, hábitos higiénicos y alimenticios), infecciosos (*Helicobacter pylori*) y del hospedero (mutaciones y polimorfismos genéticos) (Akhter *et al.*, 2007).

Factores de riesgo y protección para el desarrollo de cáncer gástrico

La infección con *Helicobacter pylori* (especialmente desde edades tempranas), la historia familiar de cáncer gástrico, el bajo nivel socioeconómico, la producción endógena de nitrosaminas, la alta ingesta de compuestos nitrosados e irritantes y el bajo consumo de frutas y verduras, han sido asociados con mayor riesgo de padecer cáncer gástrico de tipo intestinal. La influencia de las variaciones geográficas en las tasas de incidencia de este tumor, las tendencias temporales decrecientes y las diferencias del riesgo en las poblaciones que emigran, sugieren que existen factores ambientales que cumplen un papel importante en la carcinogénesis gástrica (Logan y Walker, 2001).



Helicobacter pylori

Se reconoce que la infección con *H. pylori* es la principal causa de gastritis crónica, úlceras pépticas y el principal factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico. La infección se adquiere, en la mayoría de los casos, en la infancia, y es capaz de permanecer en el hospedero toda la vida. Sin embargo, solo un grupo muy pequeño desarrolla cáncer gástrico o úlceras pépticas, mientras que un gran número de infectados (más del 70%) son asintomáticos. Los aspectos más relevantes de la infección son: la inflamación crónica, la proliferación celular excesiva y la disminución de la secreción ácida, lo cual puede modular el proceso de carcinogénesis. Surge la pregunta sobre cuáles son las circunstancias o mecanismos que predisponen al hospedero infectado para que desarrolle las patologías gástricas con mayor o menor severidad (Correa, 1995; Dunn *et al.*, 1997; Forman, 1998).

Algunos estudios sugieren la existencia de cepas de *H. pylori* más virulentas, de acuerdo con algunos fenotipos de la misma. Las cepas productoras de la toxina *VacA* y las que poseen el gen *cagA*, han sido asociadas con mayor riesgo de metaplasia intestinal y cáncer gástrico. Sin embargo, algunas investigaciones encontraron que la fuerza de la asociación varía entre diferentes poblaciones, o no se encuentra asociación, ni se han podido identificar en la bacteria, genes o polimorfismos de mayor riesgo para el desarrollo de úlceras o cáncer. Actualmente, varios factores de virulencia de la bacteria están siendo ampliamente investigados (Calam *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 2001).

Por otra parte, investigaciones recientes muestran que pacientes infectados que presentan gastritis atrófica severa, gastritis predominante en el cuerpo o metaplasia intestinal, tienen mayor riesgo de cáncer gástrico (Blaser *et al.*, 1995; Rokkas *et al.*, 1999), así como aquellas personas con úlceras gástricas o pólipos hiperplásicos. Aunque no existe ese riesgo entre los pacientes con úlceras duodenales. Se ha postulado que las enfermedades gástricas, asociadas con la infección por *H. pylori* se deben principalmente a una inapropiada regulación de la respuesta inmune y esta contribuye a la patogénesis del cáncer. Lo anterior se debe a que dentro del grupo de personas infectadas por *H. pylori* que presentan determinados polimorfismos del gen *IL-1B* que codifica la citocina inflamatoria interleucina-1 β , tienen mayor riesgo de padecer lesiones precancerosas y cáncer gástrico. Esos polimorfismos, en presencia de *H. pylori*, causan sobre expresión de la proteína *IL-1 β* , lo que causa una disminución significativa de las secreciones ácidas del estómago en presencia de *H. pylori*, que junto con la hipoclorhidria, crean un ambiente



de riesgo de cáncer gástrico, que incrementa el daño, permitiendo la acumulación de bacterias y sus toxinas y de mediadores antiinflamatorios (Uemura *et al.*, 2001; Balkwill *et al.*, 2001).

Se sospecha que el resultado final de la infección está determinado por la extensión y severidad de la inflamación gástrica (gastritis extensiva al cuerpo, hipoclorhidria y atrofia), la cual depende de interacciones complejas entre la edad en que fue adquirida la infección, los mecanismos de respuesta inmune del huésped, la virulencia de la bacteria y la dieta (Ernst y Gold, 2000; Calam *et al.*, 2001; Uemura *et al.*, 2001).

Historia familiar

El riesgo de padecer cáncer gástrico es mayor en personas con una historia familiar positiva de cáncer gástrico (Brenner *et al.*, 2000). Esta disposición puede ser el resultado de factores genéticos y ambientales. También se ha demostrado que la prevalencia de metaplasia intestinal y de gastritis atrófica e hipoclorhidria es significativamente mayor en familiares de pacientes con cáncer gástrico, infectados por *H. pylori*, que en controles también infectados (Meining *et al.*, 1999; Omar *et al.*, 2000). Brenner y colaboradores (2000) encontraron que la infección por la cepa *cagA* positiva y una historia familiar de cáncer gástrico, eran factores independientes, y los sujetos que reunían esas dos condiciones tenían 16 veces más riesgo de padecer este tumor. La herencia de polimorfismos que disminuyen la secreción ácida del estómago (p.e. *IL-1B*), en presencia de *H. pylori*, podría explicar, en parte, el mayor riesgo de padecer cáncer gástrico en las personas infectadas por esa bacteria y con una historia familiar positiva. Estos serían marcadores útiles para identificar individuos con alto riesgo de cáncer gástrico y dirigir los esfuerzos para erradicar la bacteria, o darles seguimiento tendiente a detectar el cáncer en etapa temprana (Inoue *et al.*, 1996).

Dieta

La conclusión más consistente sobre el vínculo entre la dieta y el cáncer gástrico, ha sido que las dietas altas en vegetales frescos y frutas reducen el riesgo de cáncer gástrico. Esa asociación está especialmente ligada con el consumo de frutas y verduras que contienen antioxidantes. Así, la menor ingesta de ese tipo de alimentos o los niveles séricos bajos de beta-carotenos, tocoferoles y vitamina C, están correlacionados con la aparición de esta patología (Tsugane *et al.*, 1993). Sin embargo, las frutas contienen otras



sustancias junto con las mencionadas, que pueden ser, por sí mismas, relevantes en la prevención del cáncer. Recientemente, varios estudios han encontrado que el consumo de vegetales del género *Allium*, especialmente el ajo, disminuyen el riesgo de cáncer gástrico (Fleischauer *et al.*, 2000). Pero, el consumo de alimentos salados, ahumados, picantes y aquellos que contienen nitrosaminas está asociado a un mayor riesgo de padecer ese cáncer (Buiatti *et al.*, 1989). Algunos autores sostienen la hipótesis de que los compuestos N-nitrosos, especialmente las nitrosaminas endógenas, promueven la carcinogénesis gástrica, mientras que algunos antioxidantes, como el ácido ascórbico, pueden bloquear la preparación de esos compuestos (Correa, 1995), que además, los antioxidantes podrían frenar o hacer retroceder las lesiones precancerosas, y evitar que se desarrolle el cáncer gástrico, al reaccionar con los radicales libres o agentes oxidantes. Sin embargo, es necesaria mayor investigación para precisar las funciones de los antioxidantes en el complejo proceso carcinogénico, aunque se sabe que los antioxidantes bloquean a las especies reactivas de oxígeno, que estas a su vez dañan el DNA, alterando genes importantes para el control celular (Correa, 1992).

Nivel socioeconómico

Se ha demostrado que la mortalidad por cáncer gástrico está estrechamente relacionada con las condiciones socioeconómicas en los primeros años de la vida. Esta conclusión es consistente con la mayor prevalencia de infección con *H. pylori*, en la niñez de poblaciones pobres (Forman y Goodman, 2000).

El sistema HLA: Generalidades

El Sistema Principal de Histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*) es un conjunto de genes en su mayoría altamente polimórficos, cuyos productos se expresan en la superficie de gran variedad de células y que son responsables de la respuesta inmune adaptativa. Se considera que estos genes que están presentes en todos los vertebrados y en el hombre (Klein *et al.*, 1986; Humphreys *et al.*, 1994) recibe el nombre de sistema HLA (del inglés, *Human Leukocyte Antigen*). Fue descubierto en los años 50 en una situación artificial de trasplante de tejidos de un individuo a otro. Las proteínas que codifican estos genes se denominan moléculas HLA o antígenos HLA que son los que determinan el rechazo o aceptación de un injerto. Así, dos individuos que expresen en sus células el mismo HLA aceptan tejidos trasplantados uno



del otro, e individuos que difieran en estos *loci* lo rechazarán vigorosamente. Aunque el papel de estas moléculas en el rechazo de trasplantes tiene un considerable interés, la función primordial de las proteínas codificadas por este complejo genético es la presentación antigénica (respuesta inmunológica específica mediada por linfocitos T). La función principal de los genes HLA en la respuesta inmune frente a antígenos fue postulada en 1970 cuando se demostró que los linfocitos T antígeno-específicos no reconocían antígenos libres o en forma soluble, sino que reconocían porciones de proteínas antigénicas unidas no covalentemente a las moléculas HLA. Puesto que estas moléculas son proteínas asociadas a membrana, los linfocitos T pueden reconocer antígenos extraños solamente si están unidos a la superficie de otras células. Esta limitación en la activación de los linfocitos T es debida a que interaccionan mejor con otras células que muestran antígenos asociados a moléculas HLA que en forma soluble. El modelo de asociación del antígeno con la molécula HLA determina el tipo de linfocito T que es estimulado. Así, los antígenos unidos a moléculas HLA de clase I estimulan principalmente a linfocitos T CD8+ y los unidos a moléculas HLA de clase II a linfocitos T CD4+. La forma en que estos genes influyen en la respuesta inmune frente a diferentes antígenos viene determinada por la modulación del repertorio de células T maduras realizada por el MHC. De esta manera, el sistema inmunológico es capaz de diferenciar lo propio de lo no propio (patógenos) e incluso de lo propio alterado (transformación tumoral).

El sistema HLA es dialélico y codominante. Presenta tres características principales:

- *Es poligénico; está constituido por varios genes clasificados en tres regiones.

- *Es muy polimórfico, existen múltiples alelos para cada locus. Los distintos alelos difieren entre sí en la habilidad para unir y presentar con mayor eficacia diferentes antígenos proteicos. Cada individuo puede tener dos alelos diferentes para cada gen, y la mayor parte de los individuos de una población son heterocigotos para cada gen de este sistema.

- *Presenta desequilibrio de ligamiento, es decir, diferentes alelos de distintos genes se encuentran en el mismo cromosoma con una frecuencia mayor a la teóricamente esperada en una combinación al azar. Todas estas propiedades hacen que el MHC sea uno de los sistemas genéticos más complejos y a la vez fascinantes descritos en la naturaleza (Humphreys *et al.*, 1994).

Localización y estructura del sistema HLA

El sistema HLA se localiza físicamente en el brazo corto del cromosoma 6, en la parte distal de la banda 6p21.3 y ocupa una longitud de 4 centimorgan (CM), aproximadamente 4 millones de pares de bases (Ferrando *et al.*, 1981) y contiene al menos 200 genes, pseudogenes y fragmentos génicos (Campbell y Trowsdale, 1997). Dependiendo del origen genético y/o funcionalidad biológica de sus productos, el conjunto de genes de esta región tradicionalmente se ha dividido en 2-4 grandes grupos. En la actualidad se admiten tres regiones, aunque la identificación y caracterización constante de nuevos genes no excluye una revisión futura de esta clasificación (Fig. 1) (Klein, 1977; Campbell y Trowsdale, 1997).

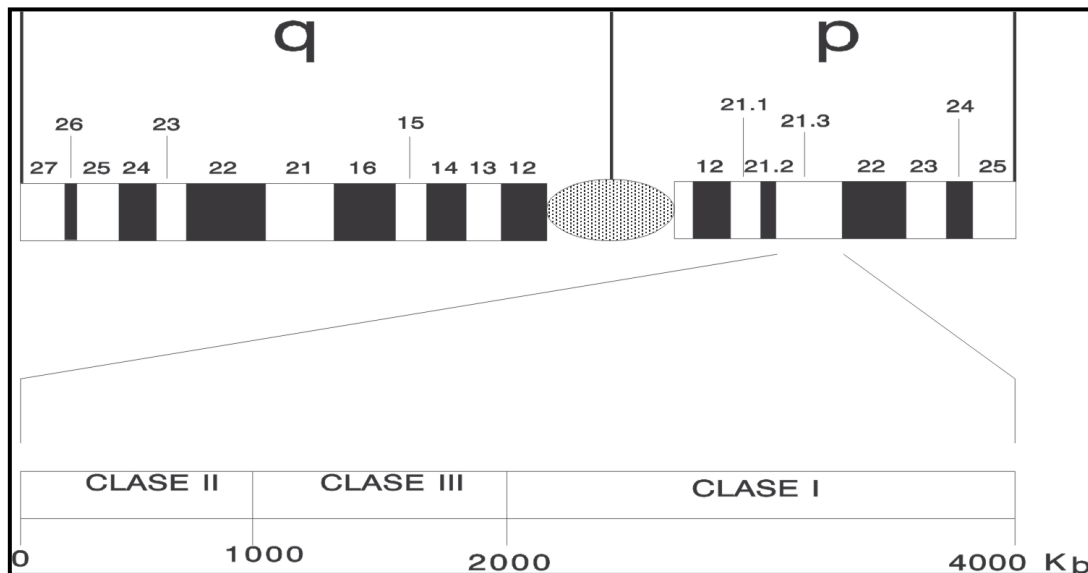


Figura 1. Vista de la localización del sistema HLA en el brazo corto del cromosoma 6.

Región de clase I

Es la región más telomérica y abarca un segmento cromosómico de unas 1600 Kilobases, comprende seis subgrupos de genes cuya nomenclatura está relacionada con el orden cronológico de su descripción, estructura, funcionalidad y patrón de expresión celular. En la Figura 2 se esquematiza la localización de estos genes en la región de clase I.

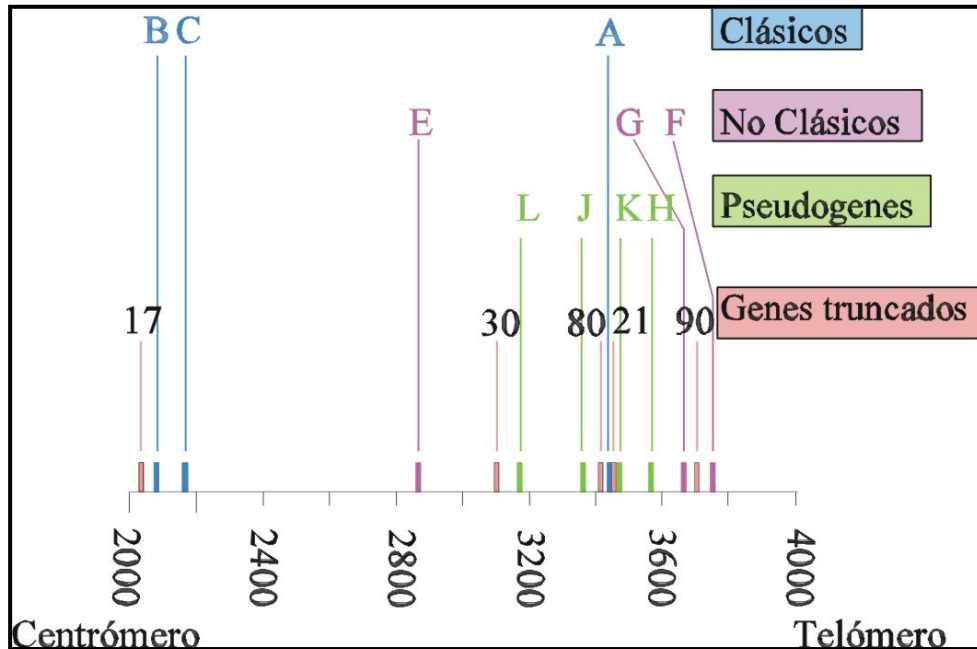


Figura 2. Genes de la región HLA de clase I.

Genes HLA de clase I (Clásicos) o Ia

A este grupo pertenecen los genes HLA-A, -B y -C. Son los primeros descritos dentro del sistema HLA. Codifican para glicoproteínas de membrana que se expresan en prácticamente todas las células del organismo si bien su nivel de expresión varía desde un máximo en células pertenecientes al sistema inmune (linfocitos T, B y macrófagos) hasta un mínimo en células musculares, del sistema nervioso y fibroblastos. Son moléculas implicadas en la restricción del reconocimiento antigénico mediada por linfocitos T citotóxicos.

Genes HLA de clase I (no clásicos) o Ib

Son HLA-E, -F y -G. Codifican para proteínas estructuralmente similares a las de los genes clásicos. Se diferencian básicamente de los anteriores por su limitada expresión tisular, su bajo polimorfismo y por su función aún poco conocida. Además, en la región de clase I se han descubierto toda una serie de secuencias de DNA que según su mayor o menor grado de similitud con genes funcionales se han clasificado en:



Pseudogenes

Hasta la fecha se han descrito cuatro pseudogenes nombrados como HLA-H, -J, -K y -L 6. Se sitúan en las proximidades de HLA-A, teloméricos o centroméricos a éste. Todos ellos tienen en común la presencia de deleciones que rinden codones de terminación prematuros. Se desconoce si tienen alguna función biológica.

Genes truncados

Son los denominados HLA-16, -75, -80 y -90. Presentan homología con los genes de clase I en zonas extensas 7. HLA-75 es el único que tiene homología con la región 5'UT (del inglés, *UnTranslated*) de los genes de clase I; los demás la presentan con la región 3'UT (Geraghty *et al.*, 1992).

Segmentos génicos

Son las secuencias más pequeñas y con un menor grado de homología con clase I, el cual se observa en cortas regiones exón/intrón. Aquí se incluyen HLA-17, -21, -30 y -81. HLA-81 solamente presenta homología con el exón 8 y región 3'UT, lo cual sugiere que podría ser un pseudogen procesado. Además, mapea fuera del sistema HLA.

Genes no HLA que se encuentran dentro de la región de clase I:

Existe un grupo de genes que mapean dentro de la denominada región de clase I pero que no tienen ninguna función conocida que los relacione con la presentación antigénica, si bien muchos de ellos podrían ser genes reguladores. A este apartado pertenecen los genes OTF3, gen MOG, genes S, gen de la cadena de la tubulina, genes de la familia P5, genes HSR1, exón B30-2, gen de la prolactina, genes MIC y gen de la hemocromatosis. Dentro de este grupo quizás el más interesante sea el gen de la hemocromatosis (HFE) (Bouteiller, 1994). La proteína para la que codifica parece estar implicada en el metabolismo del hierro. Se ha postulado, mediante un análisis de homología de secuencia, que podría tener estructura de molécula de clase I (Feder *et al.*, 1996).

Región de clase II

Es la más centromérica y comprende unas 900 Kb. Se divide a su vez en tres subregiones de centrómero a telómero: HLA-DP, -DQ y -DR. Los genes de clase II se definen con la letra D, seguida de la inicial de la subregión (P, Q o R). Cada subregión se compone a su



vez de varios genes. Las proteínas para las que codifican estos genes están implicadas en fenómenos de restricción del reconocimiento antigénico mediado por linfocitos T cooperadores CD4+. Su distribución tisular está prácticamente limitada a células del sistema inmune: linfocitos B, macrófagos, linfocitos T activados, etc. Entre las subregiones -DP y -DQ aparecen otra serie de genes poco conocidos, éstos son -DN, -DO, -DMA y -DMB (Trowsdale y Kelly, 1985; Kelly *et al.*, 1991). Además, en esta misma zona también se han descrito los genes TAP (TAP1 y TAP2) que codifican para proteínas transportadoras de péptidos (Spies *et al.*, 1990; Trowsdale *et al.*, 1990) y LMP que intervienen en el procesamiento antigénico (Glynne *et al.*, 1991; Kelly *et al.*, 1991).

Región de clase III

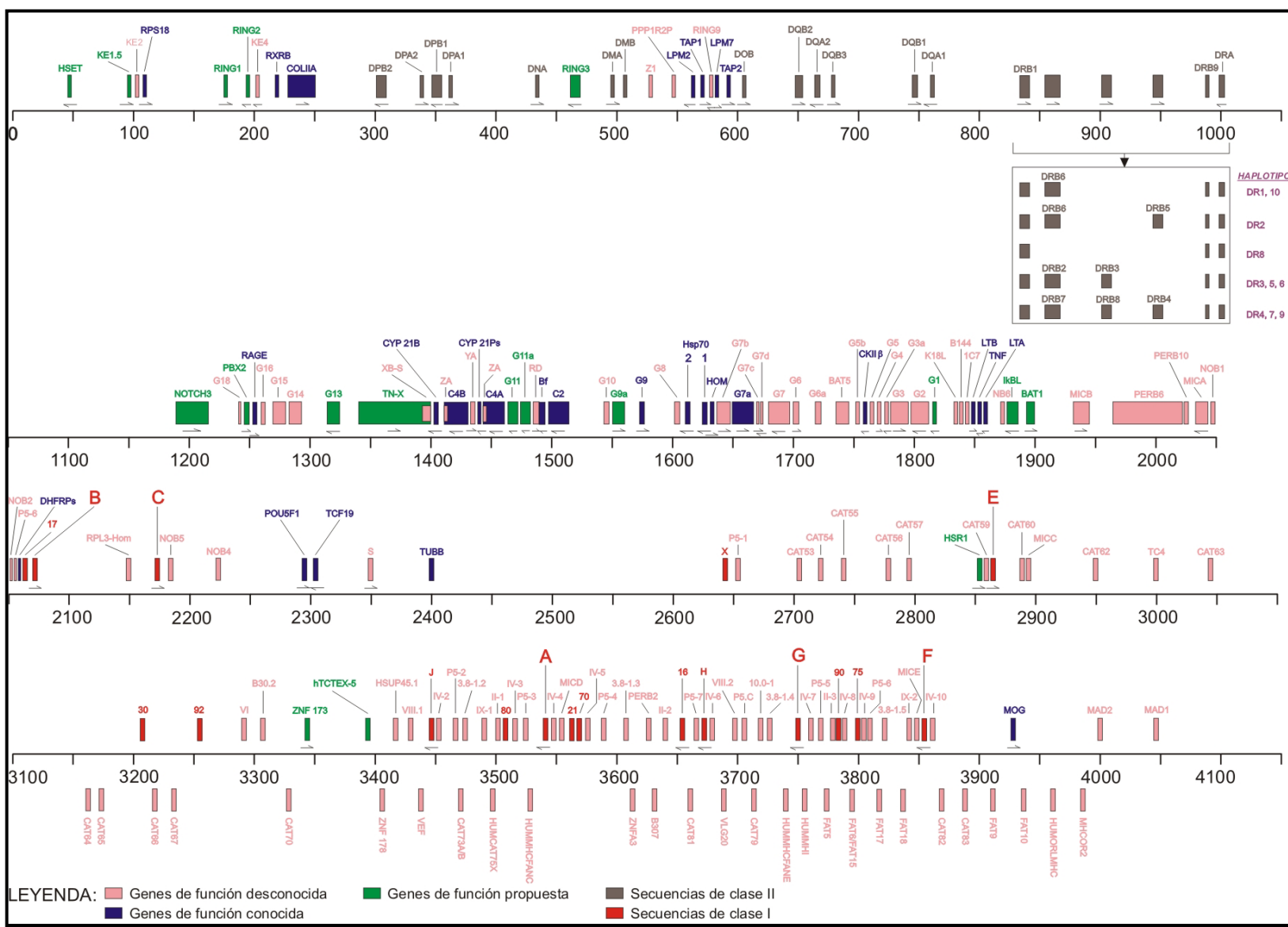
Al menos 36 genes se han identificado en el fragmento cromosómico que corresponde a esta región. Estos genes, fuertemente ligados, abarcan un segmento de DNA de unas 100 Kb. No todos sus genes presentan función inmunológica. Así, esta región incluye factores del complemento de la vía clásica (C4A, C4B, C2) y de la vía alternativa (Bf). También mapean en esta zona los genes A y B de factores de necrosis tumoral (TNF-A y TNF-B), genes para las proteínas inducidas por estrés (HSP70-1, HSP70-2 y HSP70-HOM) y muchos otros, algunos de ellos de función desconocida. La presencia en esta región de genes sin relación funcional o evolutiva con los antígenos HLA hace que muchos autores no la consideren como perteneciente al Sistema Principal de Histocompatibilidad (Klein, 1990).

Mapa genético del Sistema HLA

La aplicación de técnicas de genética molecular ha permitido determinar la organización física de los *loci* del complejo HLA. El mapa más completo y reciente se ha publicado en 1997. En él se observa la localización y caracterización de al menos 209 loci que corresponden a genes, pseudogenes y fragmentos génicos. La función de muchos de ellos permanece todavía desconocida (Figura 3) (Campbell, 1997).



Figura 3. Mapa del Sistema Principal de Histo compatibilidad Humano (HLA).





Polimorfismo serológico

El polimorfismo del sistema HLA se detectó inicialmente mediante técnicas serológicas (Terasaki, 1964; Danilovs *et al.*, 1980) que consisten en ensayos de linfocitotoxicidad por anticuerpos mediada por complemento. Por tanto, es necesario disponer de anticuerpos monoclonales o policlonales (menos frecuentes actualmente) para reconocer un antígeno HLA en diferentes laboratorios.

Polimorfismo genético

Este se ha incrementado notablemente, respecto al detectado por técnicas serológicas, con el descubrimiento y aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (Saiki *et al.*, 1985) (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*), lo que ha permitido desarrollar nuevas técnicas moleculares de caracterización del polimorfismo genético de los alelos HLA de clase I y clase II: amplificación e hibridación con oligosondas específicas de alelo o grupos de alelos (oligotipaje directo y reverso), y la secuenciación de DNA genómico y cDNA (Bodmer *et al.*, 1996).

Polimorfismos del Sistema HLA

El sistema HLA presenta un enorme polimorfismo en los genes cuyas proteínas participan en la presentación antigénica; HLA de clase I clásicos (A, B y C) y de clase II (DR, DQ y DP). Esta característica implica que dos individuos, sin ser parientes, tengan muy pocas probabilidades de ser HLA idénticos.

Entre los genes que codifican las moléculas de HLA clase I y II, se incluyen varios que son altamente polimórficos, hasta el 2004 los números de variantes alélicas reportadas son los siguientes: 349 HLA-A; 627 HLA-B; 182 HLA-C; 394 HLA-DRB1; 28 HLA-DQA1; 61 HLA-DQB1; 22 HLA-DPA1 y 116 HLA-DPB1 (Marsh *et al.*, 2005).

Convencionalmente se consideran que hay una asociación con una enfermedad o una infección si la frecuencia de uno o más alelos está incrementada (asociación positiva) o disminuida (asociación negativa) de forma significativo cuando se compara un grupo de pacientes contra un grupo de control apropiado. Existen evidencias de que el polimorfismo HLA se mantiene por selección positiva relacionada a su función inmunológica. Esta selección puede mantener linajes alélicos por periodos de tiempo más largos de lo que se espera y ciertas variedades pueden asociarse a enfermedades, de tipo inflamatorio y alérgico (A asma, Behcet, etc), infeccioso (Tuberculosis, VIH, VPH, etc) y tumoral (Cáncer de próstata, Melanoma, Cáncer de tiroides, etc) (Shiina *et al.*, 2004).



La combinación de los alelos de diferentes loci, localizados unos cerca de otros en un segmento cromosómico, que tienden a heredarse en bloque, recibe el nombre de haplotipo. Algunas combinaciones se presentan en haplotipos HLA más frecuentes de lo esperado por las frecuencias de los alelos individuales, esto es, la frecuencia de las combinaciones de alelos no es al azar. Este fenómeno se conoce como desequilibrio de enlace y varía de un grupo étnico a otro reflejando las presiones de selección a que ha estado sometido (Rodey, 2000). El desequilibrio de enlace es importante en la asociación de HLA con la enfermedad, debido a que hay ciertas enfermedades que han sido asociadas con algún locus en particular, pero que al estudiar el polimorfismo de loci cercanos se ha observado que dicha asociación es efecto secundario del desequilibrio de enlace con un locus próximo que es el que en realidad está asociado. Por lo anterior es muy importante estudiar el polimorfismo de los genes cercanos cuando se encuentra una asociación, y así descartar el efecto del desequilibrio de enlace (Rodey, 2000).

Aplicaciones al estudio del Sistema HLA

El conocimiento cada vez más preciso adquirido en los últimos años respecto a la evolución y función de genes y moléculas HLA (MHC en general) ha permitido su estudio aplicado a múltiples disciplinas (Arnaiz, 1993):

- Legales: El polimorfismo del sistema HLA permite realizar estudios de paternidad, ya que es muy improbable que dos personas no relacionadas genéticamente posean los mismos antígenos HLA. Su poder de discriminación supera el de otros sistemas de proteínas.
- Evolutivas: El polimorfismo y el desequilibrio de ligamiento del sistema HLA sirven como herramienta para relacionar filogenéticamente grupos poblacionales humanos, alelos y loci genéticos entre intra e inter especies (Arnaiz *et al.*, 1995, Martínez *et al.*, 1996).
- Clínicas: Por una parte intentar establecer la relación entre la compatibilidad HLA y la supervivencia de los trasplantes de órganos. Por otra parte, existen muchos estudios que relacionan ciertas moléculas HLA, e incluso determinadas secuencias de DNA, como factores de protección y susceptibilidad a padecer enfermedades (Arnaiz, 1996).



HLA y Enfermedades gástricas asociadas a *H. pylori*

La principal interacción entre el HLA y *H. pylori* más probable es la presentación de antígenos peptídicos de la bacteria a los linfocitos T a través del HLA de clase II. También se ha observado la inducción de apoptosis por la ureasa de *H. pylori* en células epiteliales gástricas que expresan moléculas HLA clase II, lo que apunta a un posible mecanismo en el cual la bacteria y la respuesta del hospedero se integran y participan en la patogénesis del daño en las células epiteliales (Chiba *et al.*, 1995; Fan *et al.*, 1998 y 2000).

La mayoría de estudios de asociación entre alelos del sistema HLA y cáncer gástrico, relacionado con la infección crónica de *H. pylori*, se han realizado en poblaciones japonesas y caucásicas (Lee *et al.*, 1996; Azuma *et al.*, 1998; Karhukorpi *et al.*, 1999). Se han encontrado asociaciones de loci HLA-DQ con la infección y las enfermedades. En Japón el alelo DQA1*0102 es menos frecuente en pacientes de gastritis atrófica y úlcera duodenal cuando se les compara con pacientes de gastritis superficial y con testigos *H. pylori* negativo (Azuma *et al.*, 1995 y 1998; Yoshitake *et al.*, 1999). Por lo tanto, puede considerarse que ausencia de dicho alelo podría constituir un factor genético para la asociación de gastritis atrófica causada por *H. pylori* y cáncer gástrico (distal) de tipo histológico intestinal (Azuma *et al.*, 1998) en contraste con el tipo histológico difuso. Otros estudios, también en población Japonesa han relacionado positivamente el alelo DQB1*0401 con gastritis atrófica y úlcera duodenal (Sakai *et al.*, 1999; Yoshitake *et al.*, 1999). Sin embargo, en la población caucásica no se encontró asociación alguna con HLA-DQ (Caselli *et al.*, 1999; Karhukorpi *et al.*, 1999; Kuntsmann *et al.*, 2002; Perri *et al.*, 2002), aunque algún estudio reportó aumento de DQB1*0301 en pacientes con cáncer gástrico (Lee *et al.*, 1996).

En población mexicana, al estudiar las frecuencias de un grupo de 20 pacientes mestizos mexicanos con cáncer gástrico y 99 controles sanos, se reportó una susceptibilidad por parte del alelo DQB1*050101 con una razón de momios de 4.5 (Herrera *et al.*, 2004).

Proteínas de choque Térmico

Las proteínas de choque térmico (HSP) pertenecen a una familia que se encuentra, en su mayor parte, en forma constitutiva en todas las células procariotas y eucariotas. Frente a determinadas agresiones ambientales, los organismos reaccionan con un mecanismo de defensa celular que involucra la sobreexpresión de estas proteínas y la inducción de otras, de la misma familia, que no son constitutivas. Su función es minimizar los daños



producidos por el estrés. Las células en cultivo responden de manera similar a cambios en su medio ambiente habitual o situaciones de estrés, iniciándose una respuesta que implica la síntesis de un conjunto de proteínas, conocidas bajo la común denominación de HSP (Heat shock proteins) o proteínas antiestrés. La denominación proviene del hecho que se detectaron inicialmente producidas por un estrés térmico en *Drosophila* (Ritossa, 1962). Por ejemplo, un cambio de alrededor de 5 °C superior a la temperatura normal de un cultivo celular desata la rápida síntesis de Hsp. Su función es citoprotectora, cuando el factor causante del estrés es eliminado del medio ambiente, las células continúan normalmente con su metabolismo. En cambio, si el estrés aumenta, la función protectora de las Hsp se ve sobrepasada deteniéndose su producción y activándose el programa de apoptosis (Samali y Cooter, 1996).

Otros factores perjudiciales, como exposición a tóxicos, metales pesados, análogos de aminoácidos, hipoxia, etc., desencadenan un proceso similar. También la presencia de infecciones virales, estados febriles o inflamatorios y la presencia de neoplasias, activan la producción de estas proteínas. La Hsp se encuentran entre las proteínas mejor conservadas filogenéticamente, con respecto a función y a estructura, cumpliendo un papel similar en todos los organismos: bacterias, levaduras, plantas y células animales (Kindas y Trautinger, 1994). Su ubicuidad ha hecho que un primer momento se las agrupara bajo el nombre genérico de ubiquitinas (Finley y Varshavsky, 1985).

Las células normales son capaces de expresar constitutivamente muchas proteínas antiestrés, que intervienen en procesos metabólicos esenciales como la síntesis, plegamiento y ensamblaje de otras proteínas. Los factores que aumentan la producción de las Hsp constitutivas son el proceso de mitosis, la acción de factores de crecimiento y procesos de diferenciación celular (Welch, 1993; Kindas y Trautinger, 1994; Trautinger *et al.*, 1995).

El plegamiento de una proteína es el proceso por el cual la información lineal contenida en la secuencia de aminoácidos obtiene la conformación tridimensional típica de cada proteína funcional, siendo un proceso dependiente de ATP. En años recientes se ha comprobado que para determinadas proteínas, este proceso requiere de la preexistencia de otras, denominadas chaperonas, que no formarán parte de la estructura final de la proteína funcional. El grupo de Hsp que no son constitutivas de la célula sino que son inducibles por estrés, cumple funciones de protección, que abarcan desde la eliminación de proteínas desnaturalizadas, hasta el aumento de la producción de otras proteínas



requeridas por la célula. La acumulación intracelular de proteínas desnaturalizadas o plegadas defectuosamente por efecto de una situación de estrés, desencadena una respuesta que consiste en la producción de altos niveles de Hsp, que facilitan el reordenamiento de las proteínas defectuosas. La rápida inducción de HSP es debida a la activación del factor de transcripción (HSF1), que incrementa la actividad de los genes que codifican estas proteínas (Moritomo *et al.*, 1990). La mayor estabilidad del mRNA de las HSP sería una respuesta adaptativa primaria temprana, que puede contribuir a establecer mecanismos de defensa hacia distintos tipos de estrés (Huot *et al.*, 1996).

Hay múltiples vías que llevan a la restauración de la homeostasis celular en situaciones problemáticas y la vía de las HSP es uno de los mecanismos mejor caracterizados. En células normales la interacción de las HSP con otras proteínas en proceso de maduración es transitoria, pero en condiciones de estrés las HSP permanecen unidas a ellas. Se cree que los distintos grupos de HSP trabajan coordinados para facilitar la formación de nuevas proteínas con mayor rapidez y precisión. Por eso, en una situación donde se desnaturalizan gran cantidad de proteínas que deben ser reemplazadas, el aumento de las HSP acelera el ensamblado de las proteínas faltantes y también actúa reparando proteínas desnaturalizadas o promoviendo su degradación (Trautinger *et al.*, 1995).

Proteínas Chaperonas

Se conoce con este nombre a aquellas proteínas que acompañan a otras estabilizando las formas inestables, actuando por medio de uniones y desuniones controladas, facilitando el ensamblado, la correcta unión de oligómeros, su transporte a otro compartimento celular o la disposición para la degradación. Además, previenen interacciones incorrectas entre polipéptidos, aumentando el rendimiento de las reacciones de ensamblado aunque no así su velocidad (Ulrich, 1996).

Una característica genérica de las proteínas chaperonas es que involucran reacciones dependientes de ATP en los procesos en que actúan. La cooperación entre diferentes chaperonas crea una red sinérgica, para el plegamiento de las proteínas celulares que mantiene la homeostasis bajo condiciones no permisivas para los plegamientos espontáneos (Beissinger *et al.*, 1998).



Funciones de las proteínas chaperonas

*Unión de las cadenas nascentes de polopéptidos a fin de lograr el retardo transitorio en su plegamiento hasta que la síntesis se complete.

*Establecer la conformación adecuada de dichas cadenas para su translocación a través de las membranas de las organelas.

*Impedir la agregación intermolecular o intramolecular.

*Transportar metabolitos tóxicos para su degradación por proteosomas (Benjamin *et al.*, 1998).

Consecuencias celulares del estrés térmico

El citoesqueleto celular está compuesto por una serie de estructuras proteicas poliméricas que forman microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios. Las proteínas implicadas son alfa-beta y gamma tubulinas, actina y centractina (Liang *et al.*, 1997).

El choque calórico interrumpe numerosos procesos metabólicos y rompen estructuras celulares, pudiendo culminar con la muerte. Los principales daños se detectan en el citoesqueleto con desorganización de la red, relocalización de las fibras de actina alrededor del núcleo, disrupción de los microtúbulos así como pérdida de mitocondrias y desensamblaje de la fosforilación oxidativa. Diferentes grupos de proteínas en diferentes localizaciones, son dañados sucesivamente hasta que la célula expuesta al estrés entra en necrosis. Sin embargo, sería suficiente la estabilidad de al menos uno de estos grupos de proteínas para evitar la muerte y este papel estabilizador es atributo a las HSP (Kampinga *et al.*, 1995). El choque térmico no sólo induce síntesis de nuevas HSP, sino también la fosforilación de las preexistentes o constitutivas y las formadas de novo. El tamaño de los oligómeros de HSP aumenta, llevando a la formación de estructuras superagregadas que se distribuyen dentro del núcleo o en localización perinuclear (Garrido *et al.*, 1996; Benjamin *et al.*, 1998). La fosforilación de las HSP puede tener efectos inhibitorios o estimuladores sobre el crecimiento celular, dependiendo del estímulo empleado. Si se les estimula con calor, estrés oxidativo o factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el efecto de la fosforilación es inhibir el crecimiento. En cambio, la presencia de suero o la estimulación con mitógenos sobre cultivos celulares en condiciones de temperatura normal, da como resultado una estimulación. En ambas situaciones se fosforilan los mismos residuos de HSP, lo que sugiere que actuaría la misma kinasa activada por dos mecanismos diferentes (Mehlen y Arrigo, 1994).



Respuesta de las células al estrés

Se ha comprobado que si se somete a una célula a estrés, en pocos minutos del 15 al 25% de las proteínas intracelulares son HSP. Distintos mecanismos causantes de estrés que conducen a la producción de proteínas anormales convergen en una misma vía, que lleva al aumento de los niveles de proteínas citoprotectoras, tendientes a disminuir o neutralizar los efectos deletéreos. Las células poseen mecanismos de señales muy sensibles. A través de la vía de activación de proteínas kinasas, se activa la transcripción de genes que codifican proteínas con función protectora (Huot *et al.*, 1996). Por ejemplo, el estrés oxidativo lleva a la activación de Mapkap-2 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2) que una vez activada, fosforila a la HSP27 y esta fosforilación induce modificaciones en su estructura oligomérica. Este paso podría ser la llave que modula la dinámica de los microfilamentos de actina (Lavoie *et al.*, 1995). Estudios señalan que la familia de la PCK (protein kinase C) contribuiría en la fosforilación de las HSP (Maizels *et al.*, 1998). El estrés oxidativo induce profundas alteraciones en la red de microfilamentos, fundamentalmente iniciando un proceso de fragmentación de la F-actina que tiende a formar agregados alrededor del núcleo celular. El mecanismo de este proceso no está suficientemente claro, pero involucraría depleción de ATP, oxidación de grupo-SH de la actina y cruzamientos entre los filamentos (Huot *et al.*, 1996). Las HSP27 también induce protección celular contra la acción del TNF- α , gracias a su capacidad de disminuir el nivel de ROS (Especies de Oxígeno Reactivas) e incrementar el nivel de glutation, el mecanismo citotóxico del TNF- α involucra daño oxidativo del DNA, solamente los largos agregados de HSP27 que se forman cuando los residuos de serina son reemplazados por alanina, son capaces de modular esta respuesta protectora contra el TNF- α , si el reemplazo es otro aminoácido la protección no es tan eficaz (Park *et al.*, 1998).

Termotolerancia y resistencia a drogas

Se observó que la respuesta celular al tratamiento con calor de alrededor de 56°C aumenta la capacidad de las células para resistir un posterior estrés letal, este fenómeno conocido como termotolerancia, también funciona con respecto a la hipoxia o isquemia, más aún, un pretratamiento calórico produce tolerancia cruzada hacia otros tipos de estrés, como los producidos por distintos agentes tóxicos. Las células transfectadas con el



gen para HSP, son más resistentes a los diversos estrés que las células normales (Welch, 1993; Samali *et al.*, 1996).

La sobreexpresión de HSP también confiere protección contra la acción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de oxiradicales generados por drogas anticancerígenas. Ciocca y colaboradores, han elaborado la hipótesis que el grado de protección conferido por la HSP27 contra el calor termico, depende de la combinación y/o interacción de distintas variables, el tipo celular involucrado, la relación de las HSP inducidas y la presencia de otras proteínas citoprotectoras. Otro fenómeno interesante y con amplias implicaciones a nivel terapéutico, es la resistencia que presentan las células neoplásicas que sobreexpresan HSP27, a drogas antineoplásicas como doxorubicina, colchicina y vincristina (Oesterreich *et al.*, 1993; Bonnal y Calvo, 1996).

Familia HSP

La superfamilia HSP se compone de varias familias cuyos miembros se agrupan en base a sus pesos moleculares, que varían entre 10000-150000 y se les puede encontrar en los compartimentos celulares principales (Cuadro 1). Por convención para indicar las proteínas, se utiliza la letra H con mayúscula, seguida de s y p minúsculas (Hsp), mientras que los genes correspondientes se indican con minúscula (hsp). Las proteínas constitutivas de la célula se expresan como Hsc (Benjamin *et al.*, 1998), sin embargo, no todos los autores se ajustan a esta nomenclatura.



Cuadro 1. Familias de proteínas de choque térmico (Hsp)

Familia	Nombre	Localización	Función
Pequeñas Hsp	p20	Citoplasma	Vasorelajación
	Hsp22	Citoplasma y núcleo	Estabilización del citoesqueleto
	Hsp25 (ratón)	Citoplasma/núcleo	<i>Chaperona</i>
	Hsp27 (humana)	Citoplasma/núcleo	Dinámica de la actina
Hsp40	Hsp40	Citoplasma	<i>Chaperona</i>
	Hsp47	Ret. Endoplásmico	Control en síntesis de colágeno
Hsp60	Hsp58	Mitocondrias	<i>Chaperonas</i>
	Hsp60		
Hsp70	Hsc70	Citoplasma	
	Hsp70	Citoplasma/núcleo	
	Hsp75	Mitocondria	
Hsp90	Hsp90 α	Citoplasma	Unión a receptores de hormonas esteroideas
	Hsp90 β	Citoplasma	
Hsp110	Hsp105	Citoplasma	<i>Chaperonas</i> , citoprotectoras
	Hsp110	Nucléolo/citoplasma	

Familia de las pequeñas HSP

Las proteínas de este grupo presentan un PM entre 15 y 30 KDa, la más conspicuas son la Hsp22 conocida como *alfa B crystallin* de ratón y la Hsp27-28 humana, que corresponde a la Hsp25 de ratón con la que tienen secuencias de aminoácidos similares a pesar de corresponder a distintas especies (Oesterreich *et al.*, 1993; Klemenz *et al.*, 1993; Mehlen y Arrigo, 1994).

Hsp22 o *alfa B-crystallin*, es la mayor proteína estructural del cristalino, también está presente en fibras musculares estriadas con alta capacidad oxidativa, como el corazón y músculo esquelético, donde se ha localizado en las bandas Z. Sin embargo, su localización parece depender de las condiciones fisiológicas, el calor o la isquemia disparan su translocación a la fracción nuclear, su agregación y la interacción específica con las bandas Z del sarcómero 28. Estas proteínas pequeñas tienen una gran tendencia



a formar largos complejos heterooligoméricos, cuya significación fisiológica se ignora (Van *et al.*, 1998).

Hsp25: Se expresa en cantidades variables en todos los tejidos de ratón analizados. La expresión de los genes que codifican para esta proteína está relacionada con la respuesta a hormonas esteroides, siendo regulada por estrógeno. Su fosforilación puede inducir tolerancia al estrés (Klemenz *et al.*, 1993).

Hsp27: Fue originalmente llamada 24K o 28K y actualmente también se la encuentra con la denominación de *srp-27 (stress response protein 27)*. Se conocen tres isoformas. Se expresa en órganos sensibles al estrógeno como útero, oviducto, vagina y piel (Kindas y Trautinger, 1994), habiéndose observado cambios significativos en su localización y cuantificación, durante las diferentes fases del ciclo menstrual (Ciocca *et al.*, 1996). Su presencia en el cordón umbilical y en menor nivel en la placenta, indican su expresión en la circulación materno-fetal humana (Li *et al.*, 1996). Se han descrito numerosas funciones para la Hsp27, en termotolerancia, en proliferación celular, resistencia a drogas, polimerización de actina y como chaperona (Xu *et al.*, 1996). Estaría involucrada en el transporte del receptor estrogénico desde el citoplasma al núcleo por medio de un mecanismo dependiente de actina. Estímulos fisiológicos como estrés, citoquinas y factores de crecimiento, aumentan su fosforilación en los residuos de serina 15, serina 78 y serina 83. Existe otra proteína pequeña, la p20, que no es inducida por calor ni estrés químico, pero que tiene un dominio C-terminal similar a las otras (Ciocca *et al.*, 1993).

Familia Hsp40

Hsp47: Es inducida por calor o alteraciones patológicas (por ejemplo: fibrosis hepática), y está asociada con el aumento en la síntesis de colágeno. Se le detecta en el retículo endoplásmico y se une transitoriamente al colágeno, pudiendo además desnaturalizarlo. Las líneas celulares tumorales derivadas de metástasis de carcinomas y que son metastásicas en animales sintetizan altos niveles de Hsp47, lo que sugeriría la posibilidad de usar esta proteína como marcador de la actividad metastásica de células de tumores humanos (Morimo *et al.*, 1997).



Familia de Hsp60

Las mitocondrias proveen un medio ambiente cerrado donde funciona esta familia, cooperando en el plegado de proteínas, en la translocación de las mismas a través de membranas y en la aceleración del ensamblado (Xu *et al.*, 1996).

Familia de Hsp70

Las Hsp70 son las más conservada en la evolución, siendo constitutiva y participando en los procesos de maduración de otras proteínas celulares, transporte de las mismas, eliminación de proteínas desnaturalizadas y actividad de ATPasa (Xu *et al.*, 1996). Se comprobó que tras un choque térmico, se acumulan Hsp70 en el interior del nucléolo, estructura donde se fabrican los ribosomas. Confiere protección al centrosoma y filamentos intermedios (Liang y Mac, 1997). La Hsp75 no es constitutiva de la célula. Todos los miembros de esta familia son abundantes en células eucariotas, donde actúan como chaperonas. En el citoplasma se unen a los polipéptidos en formación, antes que se liberen del ribosoma, en base a su habilidad para unirse a los segmentos hidrofóbicos de los péptidos de manera dependiente de ATP (Ulrich, 1996).

Familia Hsp90

La familia de las Hsp90 se relaciona funcionalmente con los receptores de las hormonas esteroides, regulando su actividad biológica. En ausencia de la hormona correspondiente, el receptor se asocia con varias proteínas celulares, entre ellas las Hsp90 que lo mantienen inactivo. En presencia de la progesterona, la Hsp se libera y el receptor cambia su configuración para poder unirse al DNA y activar la expresión de los genes correspondientes (Welch, 1993). Son relativamente abundantes a temperatura ambiente y su nivel basal se ve aumentado con el estrés, uniéndose a los microtúbulos. Dos miembros de esa familia, Hsp90 α y β , constituyen del 1-2% de las proteínas totales del citoplasma (Xu *et al.*, 1996).

Familia Hsp110

Tienen funciones de *chaperonas* y citoprotectoras (Xu *et al.*, 1996).



HSP70

Los genes que codifican para las Hsp70 están ubicados en el brazo corto del cromosoma 6 en la región p21.3, dentro del Complejo Mayo de Histocompatibilidad (CMH) clase III. Existen tres genes que codifican para las Hsp. El loci HSP70 está localizado cerca de HLA-B, e incluye a los genes HSP70-2 y dos genes adyacentes HSP70-1 y HSP70-HOM a 280 Kb centomérico de TNF- α (Sargent *et al.*, 1989). Estos genes están involucrados en el procesamiento y presentación de antígenos (Pirce *et al.*, 1991), pero además poseen diversas funciones inmunológicas. En condiciones de estrés, sus moléculas son reconocidas por células NK y linfocitos T citotóxicos como antígenos (Botzler *et al.*, 1998) y su polimorfismo se ha asociado con enfermedades autoinmunes (Ratanachaiyavong *et al.*, 1991; Pablos *et al.*, 1995; Jarjour *et al.*, 1996; Vargas *et al.*, 2002).

Las proteínas de HSP70 muestran secuencias de aminoácidos y dominios estructurales altamente conservados, consisten en: un dominio de ATPasa conservado, región intermedia con sitios sensibles a proteasas, dominio de unión a péptidos, región C-terminal que permite a la proteína unirse a chaperonas y otras HSP (Frattoni *et al.*, 1996; Day *et al.*, 2003). Hsp70-1a (HSP70-1) y Hsp70-1b (HSP70-2) son codificadas por genes muy próximos entre sí, inducibles casi todos menos dos de sus 641 aminoácidos siendo idénticos por más de 99% (Chouchane *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2010). El gen de las Hsp70-1 tiene tamaño de 2.4 Kd y está formado por tres exones, los cuales codifican para una proteína de 641 aminoácidos (Shimizu *et al.*, 1999). El polimorfismo de esta Hsp70-1 es una mutación sinónima, en donde el cambio de base no repercute en la substitución del aminoácido (Milner y Campbell, 1992). En el caso de Hsp70-2, también carece de intrones, codifica para una proteína de 641 aminoácidos, además Hsp70-1 y -2 contienen la misma secuencia la cual, solo difiere de 8 bp. El polimorfismo de esta Hsp-70 también, es una mutación sinónima, en donde el cambio de base no repercute en la substitución del aminoácido (Milner y Campbell, 1992). Por último las Hsp70-hom, presentan relevancia ya que la transición de T por C resulta en la substitución de metionina por treonina en la posición 493, la cual se encuentra ubicada en el sitio de unión del péptido (Milner y Campbell, 1992).



Polimorfismos de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism, SNP*)

Se han utilizado como herramienta estudios de asociación genética, los cuales determinan la posible relación estadística entre variables genéticas poblacionales y fenotipos determinados. Algunos toman en cuenta otros factores (ambientales y nutricionales) que pudieran contribuir al riesgo de desarrollar cierta enfermedad (Sevilla, 2007). Las variables genéticas más comunes que se analizan en los estudios de asociación, son del tipo polimórficas, las cuales representan el 1% del genoma humano (aproximadamente 12 millones de pares de bases); estimándose que existe un cambio por cada 1000-3000 pb. Tales variantes, se pueden agrupar en tres grupos: polimorfismos por deleciones e inserciones de fragmentos cortos, polimorfismos de variación en el número de copias y polimorfismos de cambio de un solo nucleótido (SNP). Este último grupo, es uno de los más recurrentes en los estudios de asociación (Iniesta et al., 2005; Attia et al., 2009). Un SNP, es el cambio de una base en la secuencia de DNA, presente en más del 1% de la población (Vignal et al., 2002). Los SNP's no contienen la fuerza necesaria para la inducción de una enfermedad, pero sí producen un incremento del riesgo a los individuos portadores cuando se compara con la población no portadora, por lo cual podrían ser usados como marcadores de susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad (St. George et al., 1990). Se ha reportado que las variantes alélicas pueden dar lugar a la modificación de los niveles de expresión de los genes o a variaciones de las proteínas (Hoenicka, 2006).

Para que un estudio de asociación genética de SNP aporte información que pudiera ligarse al desarrollo de una enfermedad se recurre frecuentemente a un análisis de casos y controles. Para ello, se identifica un grupo de casos diagnosticados clínicamente con la enfermedad y otro de individuos no afectados en la misma población: a los cuales se determinan la frecuencia de distribución de las variantes genéticas que presentan para determinado polimorfismo. Con estos datos, se obtiene como mínimo la siguiente información, que permite una comparación estadística entre casos y controles (Bird et al., 2001; Cordell y Clayton, 2005):

Frecuencias alélicas: Proporción con la cual aparece un alelo (forma alternativa de un gen), en un determinado locus génico en una población dada.

Frecuencias genotípicas: Proporción de las posibles combinaciones de alelos de un locus génico. En el caso de los SNP, se pueden obtener tres resultados; homocigoto para un alelo, heterocigoto y homocigoto para el otro alelo.



Frecuencias haplotípicas y/o combinaciones multiloci: Proporción de una combinación de múltiples alelos que se encuentren (haplotipos) o no en un mismo gen (combinación multiloci).

Además deberá evaluarse el Equilibrio de Hardy-Weingberg (EQHW) y el Desequilibrio de Ligamiento (LD). El EQHW es una forma de evaluar las características genotípicas de la población y detectar errores en la genotipificación. Debido a que realiza un análisis de las frecuencias genotípicas obtenidas en el estudio y las compara con las esperadas para el EQHW. Este equilibrio considera que las frecuencias alélicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación siempre y cuando: no exista traslape de generaciones, los apareamientos se den al azar (panmixia), la población sea infinita, no aparezcan mutaciones, no existan migraciones ni selección natural (Attia *et al*, 2009).

El análisis LD es un recurso para identificar genes con una posible asociación causal con el fenotipo de interés. Evalúa si ciertos *loci* (posiciones en un cromosoma) no son heredados de manera independiente durante un evento meiótico, si no que pasan la progenie en bloques. Lo cual podría ligarse al riesgo y/o susceptibilidad para el desarrollo de enfermedades complejas (Lunetta, 2008; Slatkin, 2008).

Si en la comparación estadística de las frecuencias alélicas entre los casos y los controles, se encontraran un alelo de posible susceptibilidad, se deben de tomar en cuenta tres posibilidades, que son:

*El alelo está realmente relacionado con el fenotipo de la enfermedad.

*El alelo no sea responsable del fenotipo, pero se encuentre en desequilibrio de ligamiento con el alelo de otro SNP que si lo genere. Por lo que puede actuar como marcador de susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad.

*La variante encontrada sea propia de un grupo derivado de una mezcla poblacional o estrato genético de la población analizada. Por lo cual, es necesario realizar un estudio de sub-estructuración poblacional, identificar las variantes propias de cada grupo y destacar asociaciones falsas (Wyszynsk, 1998; Cardon y Bell, 2001).

Una característica importante para la validez de los estudios de asociación genética es la replicación de los resultados. Lo cual consiste en el hecho que, las variantes encontradas como asociadas a una enfermedad en determinada población, deberán ser las mismas cuando se aumente el número de casos y controles. De lo contrario, es necesario considerar las posibilidades que se explicaron anteriormente (Ioannidis *et al.*, 2001).



Polimorfismos de HSP70 y su asociación a enfermedades

La unión a péptidos a la afinidad de la proteína así como la actividad de ATPasa, pueden modificarse por cambios de nucleótidos en las regiones codificantes, mientras que cambios de nucleótidos en las regiones flanqueadas afectan la inducibilidad, grado de expresión o la estabilidad del mRNA que codifica las HSP (Todryk *et al.*, 2003). Debido a que HSP70 es una chaperona molecular muy importante las variaciones en su secuencia pueden afectar la expresión o función de esta proteína contribuyendo a la susceptibilidad de ciertas enfermedades. Los polimorfismos encontrados en HSP70 se han asociado con, autoinmunidad, enfermedad de las arterias coronarias, con distintos cánceres incluyendo cáncer de pulmón, leucemia linfoblástica aguda y cánceres gástricos (Wilson *et al.*, 2002). Un elevado nivel de expresión de HSP70 se ha relacionado con pobre diferenciación en tumores y también con el aumento de proliferación celular (en cáncer de mama, cérvicouterino, pulmón), metástasis a los nódulos linfáticos, incremento en el tamaño del tumor (Todryk *et al.*, 2003). También su expresión se ha correlacionado con un mal pronóstico en cáncer de mama, endometrio, cérvicouterino (Mestiri *et al.*, 2001). Los genes de HSP70 ubicados en el MHC son monoexónicos y tienen polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), que se analizan con mayor frecuencia son el de la enzima de restricción PstI en el nucleótido +1267 de HSP70-1B (rs1061581), este polimorfismo se encuentra en una región codificante y provoca una sustitución de A→G que causa un cambio sinónimo en la proteína de HSP70-2 que afecta la estructura secuencia de mRNA, la estabilidad del mRNA y la expresión de la proteína. Otro polimorfismo estudiado es la posición +190 en la región 5'UTR (Untranslated región por sus siglas en inglés) del gen HSPA1A (rs1043618) que origina un cambio de G→A. Aunque este cambio no influye directamente en la secuencia de aminoácidos, las secuencias 5'UTR de genes eucariontes tienen funciones en el control de la localización celular, la estabilidad y la eficiencia en la traducción del mRNA, este polimorfismo puede afectar la expresión de Hsp70-1a (HSP70-1), el SNP +2437 C→T de HSP70-HOM provoca un cambio del aminoácido metionina a treonina (Pesole *et al.*, 2001; Javid *et al.*, 2007). Los polimorfismos antes mencionados se han encontrado asociados con varias enfermedades como leucemia linfoblástica aguda, enfermedad coronaria, obesidad, diabetes, esquizofrenia, cáncer gástrico y cáncer de pulmón (Pesole *et al.*, 2001; Shibata *et al.*, 2009).



OBJETIVOS

General

Determinar si los polimorfismos de los genes HSP70-1, -2 y -HOM en pacientes con cáncer gástrico participan en la susceptibilidad genética a esta enfermedad.

Particulares

-Comparar los polimorfismos de los genes HSP70-1, -2 y -HOM de pacientes con cáncer de mama y gastritis, con los pacientes de cáncer gástrico.

-Determinar las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas en pacientes con cáncer gástrico, cáncer de mama, gastritis y un grupo control.

-Evaluar el equilibrio de Hardy-Weinberg como una medida comparativa de variabilidad genética entre los grupos estudiados.

-Analizar los patrones de ligamiento de los *loci* estudiados en casos y controles, en búsqueda de un patrón de desequilibrio de ligamiento que pudiera estar ligado al cáncer gástrico, cáncer de mama y gastritis.



HIPOTESIS

Los polimorfismos localizados en las posiciones son frecuentes en los pacientes con diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control, serán relacionados como factor de riesgo frente al desarrollo de cáncer gástrico, cáncer de mama y gastritis.



DISEÑO EXPERIMENTAL

Tipo de Estudio

Es un estudio de casos y controles

Población de Estudio

El estudio incluyó a 573 pacientes diagnosticados con cáncer gástrico (n=163), cáncer de mama (n=349) y gastritis (n=61), captados en la consulta externa del Instituto Mexicano del Seguro Social durante el periodo 2012-2013. Como grupo de comparación se incluyeron a 628 controles no relacionados aparentemente sanos.

Criterios de Inclusión

- *Tener 18 años de edad o más al momento del diagnóstico.
- *No presentar antecedentes de enfermedades autoinmunes.
- *Ser mexicano con ascendencia de dos generaciones mexicanas o más.

Criterios de exclusión

- *Estar embarazada.

Criterios de eliminación

- *Muestra insuficiente de sangre.
- *DNA degradado.
- *No tener DNA suficiente.
- *Resultados incompletos de genotipificación.

Variable independiente

- *Polimorfismos de los genes HSP70-1, -2 y -HOM.

Variable dependiente

- *Cáncer gástrico
- *Cáncer de mama
- *Gastritis



Requerimientos adicionales: A todos los individuos se les invito a participar en el presente estudio y se obtuvo su consentimiento informado voluntario.

El estudio fue de riesgo mínimo ya que solo incluyó la venopunción antecubital para la obtención de sangre periférica.

El proyecto cumplió con los requisitos del comité institucional de ética e investigación del Centro Medico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de Muestra

De cada paciente se tomó en un tubo vacutainer con EDTA con anticoagulante, 6 mL de sangre venosa periférica para la extracción del DNA, el DNA genómico de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se realizó por medio de la técnica *Salting-out* de pacientes con cáncer gástrico (n=163), cáncer de mama (n=349), gastritis (n=61) y controles (n=628).

Extracción del DNA

La extracción del DNA se efectuó por la microtécnica de salting-out. La concentración y calidad del DNA obtenido se evaluó mediante cuantificación espectrofotométrica. La integridad del DNA se realizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% (Fig. 4A).

Cuantificación del DNA obtenido

Los ácidos nucleicos absorben eficientemente luz ultravioleta debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de las cadenas de DNA. La absorción de UV del DNA es una característica de la molécula, que es usada eficientemente para determinar su concentración. Cada una de las bases tiene su propio y único espectro de absorción y por lo tanto contribuye de manera diferente a la propiedad total de absorción de UV de una molécula de DNA. Para muchas aplicaciones, el porcentaje de contribución de cada una de las bases al espectro de absorción de UV de una molécula de DNA de doble cadena de alto peso molecular (dsDNA) puede ser ignorado. Sin embargo, esas contribuciones son más significativas cuando se trata de oligonucleótidos y deben ser consideradas si se requiere determinar correctamente la concentración.



Los ácidos nucleicos tienen un máximo de absorción a una longitud de onda de 260nm. A esta longitud por lo tanto, la absorción es proporcional a la concentración.

Las proteínas tienen un máximo de absorción a A_{280} (principalmente por residuos de triptófano) las lecturas a esta longitud pueden mostrar si existe algún contaminante proteico. El cálculo de la relación A_{260}/A_{280} es una manera común para expresar la pureza del DNA. Dependiendo de la composición nucleica, un valor de 1.65 a 1.9 indican una muestra pura (Fig. 4B), la absorción a A_{230} nm es la detección de sales, carbohidratos u otros posibles contaminantes.

Las muestras que cumplieron los criterios de calidad e integridad fueron diluidas a una concentración de trabajo.

Genotipificación por *TaqMan*

A diferencia de la PCR convencional, la PCR en tiempo real permite realizar la detección del producto amplificado y al mismo tiempo llevar a cabo su cuantificación por ciclo. La PCR tiempo real con sondas *TaqMan*, es un ejemplo donde se utiliza un método de fluorescencia directo, debido a que además del juego de primers, incluye una sonda que se alinea a una cadena del templado de DNA.

Cada ensayo *TaqMan* contienen dos cebadores para amplificar la secuencia de interés y dos sondas *TaqMan* para la detección de alelos, lo que nos permite determinar el genotipo de los dos alelos posibles. El ensayo determina la presencia o ausencia de un SNP basado en el cambio de la fluorescencia asociada a las sondas, ya que se encuentran marcadas con un fluoróforo en el extremo 5' (VIC para el alelo uno y FAM para el alelo dos), ambas sondas tienen en el extremo 3' un quencher el cual inhibe la emisión de fluorescencia mientras la sonda no hibride con la secuencia específica de DNA. Una vez que se haya dado la hibridación de la sonda con el DNA si se encontrará la presencia del polimorfismo la sonda *TaqMan* se uniría a una secuencia homóloga y la polimerasa degradará el quencher, lo que dará como resultado la liberación de fluorescencia, por lo que será posible la identificación del alelo basándonos en el tipo de emisión (Fig. 4C). En el caso de la genotipificación de SNP's por PCR tiempo real mediante sondas *TaqMan*, se diseñan dos sondas marcadas con fluoróforos distintos, una de las sondas contiene en su secuencia al alelo ancestral y la otra al cambio polimórfico. El proceso de amplificación, revelará la detección de la señal de una o ambas sondas, dependiendo de los alelos de un SNP determinado en un individuo (Fig. 5A). La



intensidad de la fluorescencia emitida en la curva de amplificación para cada alelo, son interpretados por el Software del equipo en un diagrama de dispersión, gracias al cual puede llevar a cabo la discriminación alélica e identificación del genotipo correspondiente a cada uno de los individuos estudiados. Existen tres genotipos posibles para cada polimorfismo: Homocigoto para el alelo ancestral, heterocigoto y homocigoto para el alelo polimórfico (Fig. 5A).

Para hacer la discriminación alélica se usaron sondas *TaqMan* en el equipo Applied Biosystems modelo StepOne y StepOnePlus (Fig. 5B).

Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)

SNP	Cromosoma	Gen		Cambio	Ancestral
		Gen	Posición		
rs2075800	6:31777946	HSPA1L	+2763	AAAGGAATTG[A/G]AGCAGATGTG	G
rs2227956	6:31778272	HSPA1L	+2437	GTCACAGCCA[C/T]GGACAAGAGC	T
rs1043618	6:31783507	HSPA1A	+190	ATCTCAGAGC[C/G]GAGCCGACAG	G
rs1061581	6:31796780	HSPA1B	+1267	AGCTGCTGCA[A/G]GACTTCTTCA	A

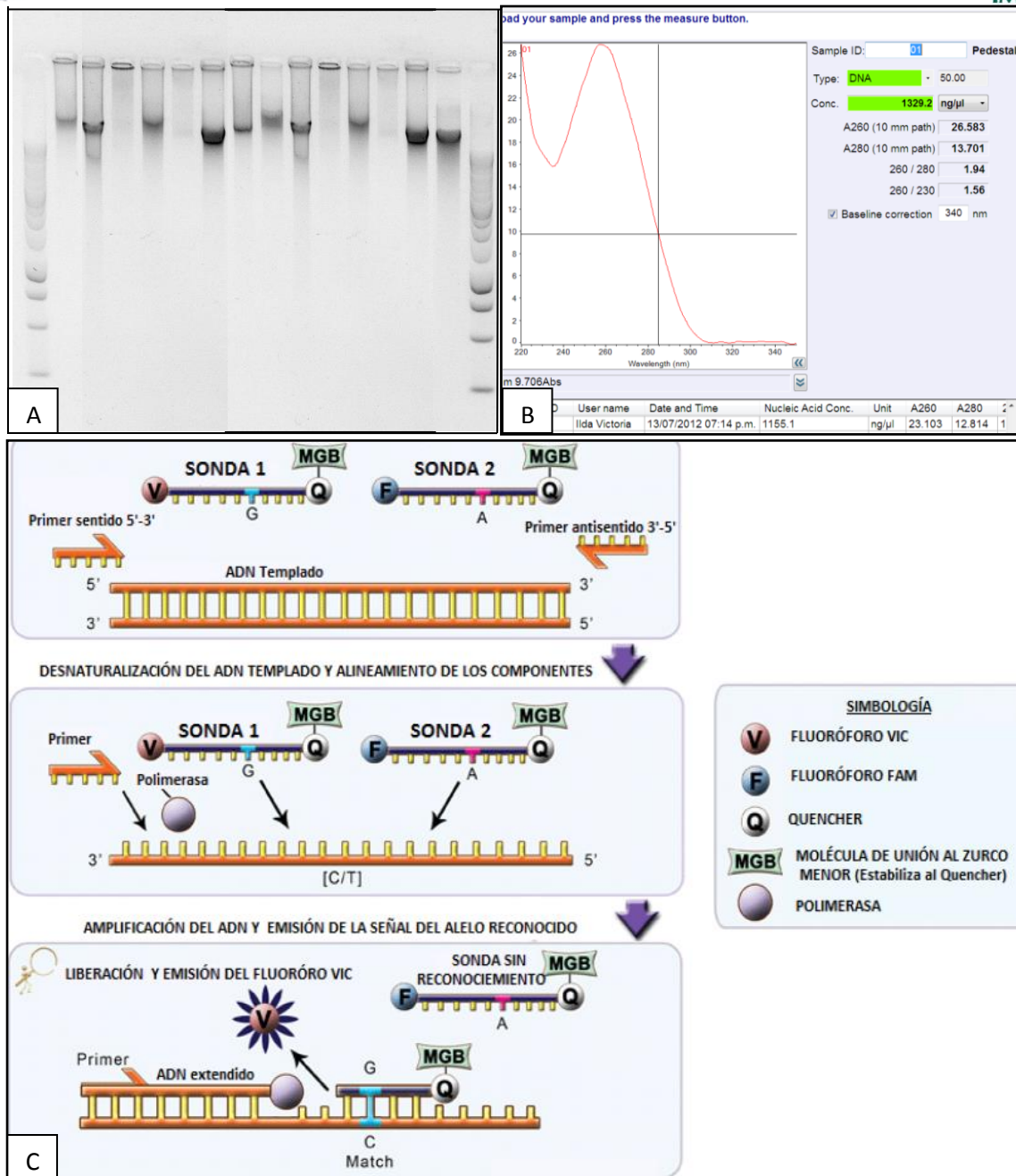


Figura 4. A. DNA genómico visualizado en un gel de agarosa. B. Gráfica obtenida a partir de la cuantificación mediante espectrofotometría. C. Componentes y fundamentos de la genotipificación por PCR en tiempo real mediante tecnología *TaqMan*.

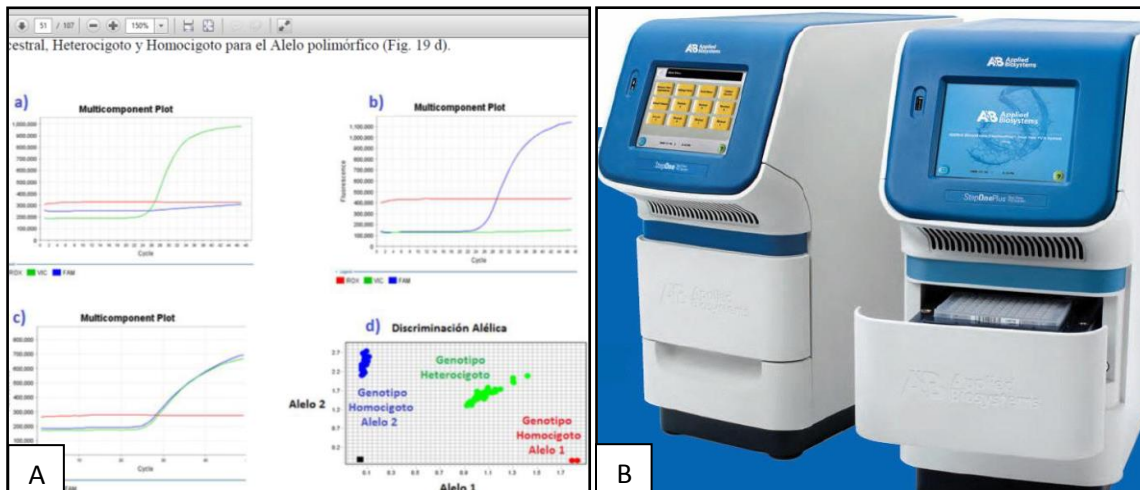


Figura 5. A. Detección de la señal de amplificación de los alelos y su discriminación. Se presentan los tres posibles resultados de la señal de amplificación alélica: a) Amplificación del alelo marcado con VIC, por encima del fluoróforo basal ROX, lo que significa que el genotipo del individuo es Homocigoto para el alelo uno. b) Se observa que la amplificación del alelo marcado con FAM rebasa la fluorescencia basal, lo cual se interpreta como un genotipo Homocigoto para el alelo dos. c) Se observa una amplificación bialélica lo que se conoce como un genotipo Heterocigoto. Las señales anteriores, son graficadas por el software del termociclador en un diagrama de dispersión, por medio del cual puede generar la discriminación de los genotipos de las muestras. **B.** Equipo Applied Biosystems modelo StepOne y StepOnePlus usados en el presente trabajo.

Análisis Estadístico

Las frecuencias alélicas y haplotípicas se obtuvieron con el programa Haploview 4.2. Las frecuencias genotípicas se realizaron por conteo directo. Se analizó el equilibrio de Hardy-Weinberg y el desequilibrio de ligamiento con el mismo software. Las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas de los genes se analizaron con la prueba de Chi cuadrada o la prueba de P exacta de Fisher. El valor de p menor a 0.05 obtenido se corrigió por el número de especificidades estudiadas para obtener p corregida (pc). En caso de que el valor continúe siendo menor a 0.05 el resultado se consideró estadísticamente significativo. El vigor de asociación se determinará calculando el OR (*Odds Ratio*) con IC 95%.



RESULTADOS

Discriminación alélica variantes tipo SNP

Se genotificaron cuatro SNP's localizados en tres genes de HSP70, HSPA1L (rs2075800 y rs2227956), HSPA1A (rs1043618) y HSPA1B (rs1061581). En el cuadro tres se encuentran las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNP's correspondientes en los tres grupos de comparación, pacientes con cáncer gástrico vs controles, cáncer de mama vs controles y gastritis vs controles.

Equilibrio de Hardy-Weinberg

A partir de las frecuencias alélicas se calcularon los valores esperados para ver si se cumplía el Equilibrio de Hardy-Weinberg: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$.

Gen/SNP	Controles n=628		
HSPA1L rs2075800 [A/G]	Frecuencias Alélicas		Equilibrio de Hardy-Weinberg
	Alelo A	527 (0.41)	$p^2 = (0.41)^2 = 0.16$ $q^2 = (0.58)^2 = 0.33$ $2pq = 2 \times 0.41 \times 0.58 = 0.47$
	Alelo G	719 (0.58)	
	Cancer Gástrico n=163		
	Frecuencias Alélicas		Equilibrio de Hardy-Weinberg
	Alelo A	138 (0.42)	$p^2 = (0.42)^2 = 0.17$ $q^2 = (0.57)^2 = 0.32$ $2pq = 2 \times 0.42 \times 0.57 = 0.47$
	Alelo G	188 (0.57)	
	Cáncer de Mama n=349		
Frecuencias Alélicas		Equilibrio de Hardy-Weinberg	
Alelo A	262 (0.37)	$p^2 = (0.37)^2 = 0.13$ $q^2 = (0.62)^2 = 0.38$ $2pq = 2 \times 0.37 \times 0.62 = 0.45$	
Alelo G	436 (0.62)		
			0.96
Gastritis n=61			



Frecuencias Alélicas		Equilibrio de Hardy-Weinberg
Alelo A	46 (0.37)	$p^2 = (0.37)^2 = 0.13$ $q^2 = (0.62)^2 = 0.38$ $2pq = 2 \times 0.37 \times 0.62 = 0.45$
Alelo G	76 (0.62)	

Gen/SNP	Controles n=628		
HSPA1L rs2227956 [C/T]	Frecuencias Alélicas		Equilibrio de Hardy-Weinberg
	Alelo C	89 (0.07)	$p^2 = (0.07)^2 = 0.0049$ $q^2 = (0.92)^2 = 0.84$ $2pq = 2 \times 0.07 \times 0.92 = 0.12$
	Alelo T	1167 (0.92)	
	Cancer Gástrico n=163		
	Frecuencias Alélicas		Equilibrio de Hardy-Weinberg
	Alelo C	25 (0.07)	$p^2 = (0.07)^2 = 0.0049$ $q^2 = (0.92)^2 = 0.84$ $2pq = 2 \times 0.07 \times 0.92 = 0.12$
	Alelo T	301 (0.92)	
	Cáncer de Mama n=349		
Frecuencias Alélicas		Equilibrio de Hardy-Weinberg	
Alelo C	42 (0.06)	$p^2 = (0.06)^2 = 0.0036$ $q^2 = (0.93)^2 = 0.86$ $2pq = 2 \times 0.06 \times 0.93 = 0.11$	
Alelo T	656 (0.93)		
			} 0.97
Gastritis n=61			
Frecuencias Alélicas		Equilibrio de Hardy-Weinberg	
Alelo C	9 (0.07)	$p^2 = (0.07)^2 = 0.0049$ $q^2 = (0.92)^2 = 0.84$ $2pq = 2 \times 0.07 \times 0.92 = 0.12$	
Alelo T	113 (0.92)		
			} 0.96



Gen/SNP	Controles n=628		
HSPA1A rs1043618 [C/G]	Frecuencias Alélicas		Equilibrio de Hardy-Weinberg
	Alelo C	343 (0.27)	$p^2 = (0.27)^2 = 0.07$ $q^2 = (0.72)^2 = 0.51$ $2pq = 2 \times 0.27 \times 0.72 = 0.38$
	Alelo G	913 (0.72)	
	Cancer Gástrico n=163		
	Frecuencias Alélicas		Equilibrio de Hardy-Weinberg
	Alelo C	77 (0.23)	$p^2 = (0.23)^2 = 0.05$ $q^2 = (0.76)^2 = 0.57$ $2pq = 2 \times 0.23 \times 0.76 = 0.34$
	Alelo G	249 (0.76)	
	Cáncer de Mama n=349		
Frecuencias Alélicas		Equilibrio de Hardy-Weinberg	
Alelo C	219 (0.31)	$p^2 = (0.31)^2 = 0.09$ $q^2 = (0.68)^2 = 0.46$ $2pq = 2 \times 0.31 \times 0.68 = 0.42$	
Alelo G	479 (0.68)		
			0.97
Gastritis n=61			
Frecuencias Alélicas		Equilibrio de Hardy-Weinberg	
Alelo C	36 (0.29)	$p^2 = (0.29)^2 = 0.08$ $q^2 = (0.70)^2 = 0.49$ $2pq = 2 \times 0.29 \times 0.70 = 0.40$	
Alelo G	86 (0.70)		
			0.97



Gen/SNP	Controles n=628		
HSPA1B rs1061581 [A/G]	Frecuencias Alélicas		Equilibrio de Hardy-Weinberg
	Alelo G	613 (0.48)	$p^2 = (0.48)^2 = 0.23$ $q^2 = (0.51)^2 = 0.26$ $2pq = 2 \times 0.48 \times 0.51 = 0.48$
	Alelo A	643 (0.51)	
	Cancer Gástrico n=163		
	Frecuencias Alélicas		Equilibrio de Hardy-Weinberg
	Alelo G	146 (0.44)	$p^2 = (0.44)^2 = 0.19$ $q^2 = (0.55)^2 = 0.30$ $2pq = 2 \times 0.44 \times 0.55 = 0.48$
	Alelo A	180 (0.55)	
	Cáncer de Mama n=349		
Frecuencias Alélicas		Equilibrio de Hardy-Weinberg	
Alelo G	326 (0.46)	$p^2 = (0.46)^2 = 0.21$ $q^2 = (0.53)^2 = 0.28$ $2pq = 2 \times 0.46 \times 0.53 = 0.48$	
Alelo A	372 (0.53)		
			0.97
Gastritis n=61			
Frecuencias Alélicas		Equilibrio de Hardy-Weinberg	
Alelo G	62 (0.50)	$p^2 = (0.50)^2 = 0.25$ $q^2 = (0.49)^2 = 0.24$ $2pq = 2 \times 0.50 \times 0.49 = 0.49$	
Alelo A	60 (0.49)		
			0.98

**Cuadro 3. Frecuencias alélicas y genotípicas**

Gen/SNP	Controles	Cáncer gástrico	Cáncer de mama	Gastritis
HSPA1L rs2075800 [A/G]	n=628 2n=1256	n=163 2n=326	n=349 2n=698	n=61 2n=122
Frecuencias Alélicas				
Alelo A	527 (0.41)	138 (0.42)	262 (0.37)	46 (0.37)
Alelo G	719 (0.58)	188 (0.57)	436 (0.62)	76 (0.62)
Genotipos	Frecuencias Genotípicas			
AA	104 (0.165)	26 (0.159)	51 (0.146)	10 (0.163)
GG	205 (0.326)	51 (0.312)	138 (0.395)	25 (0.409)
AG	319 (0.507)	86 (0.527)	160 (0.458)	26 (0.426)
HSPA1L rs2227956 [C/T]	n=628 2n=1256	n=163 2n=326	n=349 2n=698	n=61 2n=122
Frecuencias Alélicas				
Alelo C	89 (0.07)	25 (0.07)	42 (0.06)	9 (0.07)
Alelo T	1167 (0.92)	301 (0.92)	656 (0.93)	113 (0.92)
Genotipos	Frecuencias Genotípicas			
CC	3 (0.004)	1 (0.006)	0 (0)	0 (0)
TT	542 (0.863)	139 (0.852)	307 (0.879)	52 (0.852)
CT	83 (0.132)	23 (0.141)	42 (0.120)	9 (0.147)
HSPA1A rs1043618 [C/G]	n=628 2n=1256	n=163 2n=326	n=349 2n=698	n=61 2n=122
Frecuencias Alélicas				
Alelo C	343 (0.27)	77 (0.23)	219 (0.31)	36 (0.29)
Alelo G	913 (0.72)	249 (0.76)	479 (0.68)	86 (0.70)
Genotipos	Frecuencias Genotípicas			
CC	35 (0.055)	10 (0.061)	39 (0.111)	6 (0.098)
GG	320 (0.509)	96 (0.588)	169 (0.484)	31 (0.508)
CG	273 (0.434)	57 (0.349)	141 (0.404)	24 (0.393)
HSPA1B rs1061581 [A/G]	n=628 2n=1256	n=163 2n=326	n=349 2n=698	n=61 2n=122
Frecuencias Alélicas				
Alelo A	643 (0.51)	180 (0.55)	372 (0.53)	60 (0.49)
Alelo G	613 (0.48)	146 (0.44)	326 (0.46)	62 (0.50)
Genotipos	Frecuencias Genotípicas			
AA	152 (0.242)	50 (0.306)	96 (0.275)	16 (0.262)
GG	137 (0.218)	33 (0.202)	73 (0.209)	17 (0.278)
AG	339 (0.539)	80 (0.490)	180 (0.515)	28 (0.459)



Haplotipos

Se realizaron los análisis de los haplotipos de HSP70-1, -2 y -HOM mediante el programa Haploview 4.2 (Cuadro 4). Se compararon los grupos de pacientes con cáncer gástrico, cáncer de mama y gastritis contra el grupo asintomático.

De acuerdo a la posición del cromosoma 6, los SNP's fueron ordenados de la siguiente manera: HSPA1L +2763 (rs2075800), HSPA1L +2437 (rs2227956), HSPA1A +190 (rs1043618) y HSPA1B +1267 (rs1061581).

Cuadro 4. Haplotipos

Combinaciones de SNP's					Cáncer gástrico	Controles	p	Cáncer mama	Controles	p	OR	Gastritis	Controles	p
A	A	A	A	Frecuencia		Frecuencia		Frecuencia				Frecuencia		
1	2	3	4											
1	T	A	G	A	0.339	0.334	0.8504	0.258	0.326	0.0017	0.57	0.351	0.337	0.76
2	C	A	G	G	0.209	0.219	0.6875	0.155	0.211	0.5521	----	0.254	0.219	0.38
3	C	A	G	C	0.172	0.208	0.1497	0.193	0.204	0.0025	0.59	0.234	0.209	0.51
4	C	A	G	A	0.092	0.069	0.1613	0.120	0.154	0.0006	0.55	0.030	0.068	0.09
5	T	A	G	G	0.051	0.044	0.623	0.056	0.095	0.6006	----	0.015	0.044	0.12
6	C	G	G	A	0.054	0.044	0.4393	0.036	0.042	0.5276	----	0.049	0.041	0.69
7	C	A	C	A	0.044	0.027	0.1098	0.105	0.034	0.5532	----	0.035	0.026	0.56
8	T	A	C	A	0.015	0.026	0.2752	0.010	0.023	0.6391	----	0.010	0.024	0.27
9	C	G	G	G	----	----	----	0.013	0.012	0.7094	----	----	----	----
Porcentaje					72%	76%		60%	74%			84%	76%	

Desequilibrio de ligamiento

Se realizó el análisis de desequilibrio de ligamiento con el programa Haploview 4.2. En la figura seis se muestran las gráficas de desequilibrio de ligamiento. A la izquierda de cada uno de los rombos se observa el SNP al que corresponde la columna y en el interior se encuentra el valor de r^2 para el análisis de asociación entre cada uno de los polimorfismos. En el presente trabajo no se identificó asociación.

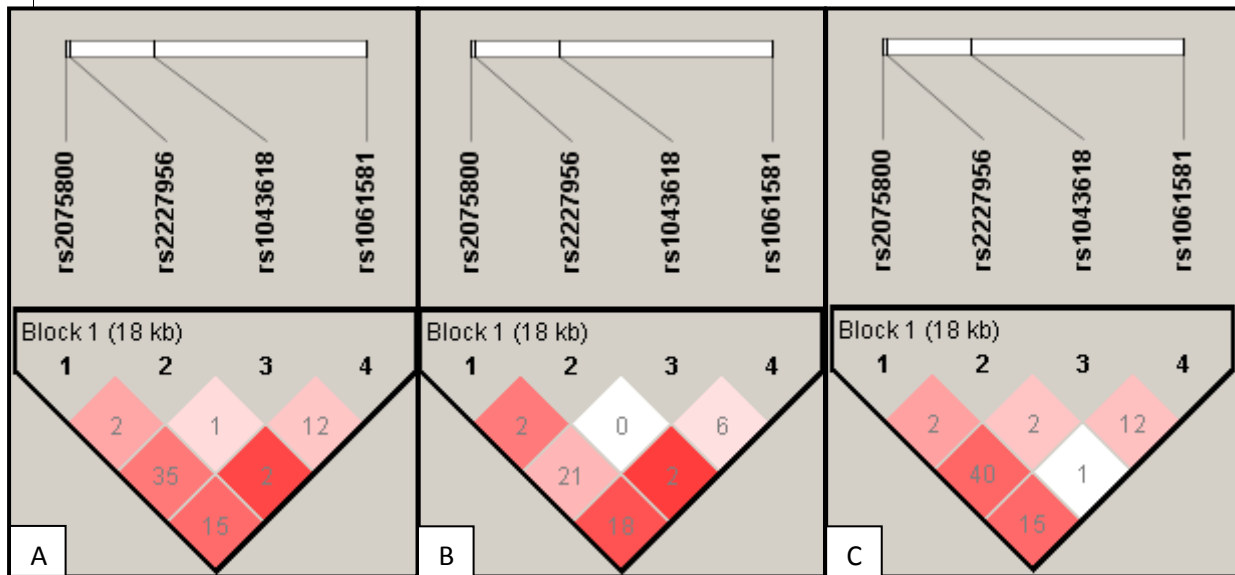


Figura 6. Gráfica de desequilibrio de ligamiento de los genes HSPA1L (rs2075800), HSPA1L (rs2227956), HSPA1A (rs1043618) y HSPA1B (rs1061581). **A.** Gráfica de desequilibrio de ligamiento de cáncer gástrico. **B.** Gráfica de desequilibrio de ligamiento de cáncer de mama. **C.** Gráfica de desequilibrio de ligamiento de gastritis.



ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se calcularon los valores esperados para el Equilibrio de Hardy-Weinberg: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, todos los valores obtenidos para controles, cáncer gástrico, cáncer de mama y gastritis fueron muy próximos a 1, lo cual quiere decir que nuestras poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg. El no cumplimiento de alguna o varias de las premisas en las que se basa el equilibrio de Hardy-Weinber resultará en la modificación del equilibrio, como es la unión no aleatoria (Estratificación, población estratificada en aquella que contiene varios subgrupos que se han mantenido genéticamente separados. Unión dirigida, consiste en la elección de compañero con algún rasgo particular y Consanguinidad (endogamia), es la unión entre parientes), selección natural (para comprender el afecto de la selección natural resulta útil definir el concepto de ventaja selectiva, la ventaja selectiva de una mutación es el factor que determina que esta nueva mutación se pierda inmediatamente, sobreviva a unas cuantas generaciones, o se convierta en un alelo, la mayor parte de las mutaciones son neutrales o deletéreas) y flujo génico (migración, es la difusión de genes a través de una barrera). Todos estos factores inciden en la probabilidad de coincidencia de variantes alélicas por lo que resultaran en un incremento de la proporción de homocigotos en la descendencia.

Los polimorfismos genéticos son variantes que aparecen por mutaciones en algunos individuos, se transmiten a la descendencia y adquieren cierta frecuencia en la población tras múltiples generaciones (Iniesta *et al.*, 2005). Los SNP's son secuencias de DNA polimórfico causados por variaciones en un solo nucleótido a nivel genómico (Zur Hansen *et al.*, 2002), son la base de la evolución y los que se consolidan pueden proporcionar ventajas a los individuos, aunque también pueden contribuir a causar enfermedades (Gutmacher *et al.*, 2002), pueden provocar cambios en la expresión genética, solos o conjuntamente pueden determinar diferencias fenotípicas de una proteína y pueden contribuir a una susceptibilidad a cáncer (Zur Hansen *et al.*, 2002).

Varios investigadores han demostrado el papel potencial de las proteínas de HSP70 en la inmunidad tumoral y en la patogénesis del cáncer. Se ha demostrado que HSP70 actúa como chaperona molecular para péptidos antigénicos derivados de células tumorales, llevando a un reconocimiento del sistema inmune antitumoral mediado por linfocitos T citotóxicos, tales mecanismos aumentan la posibilidad de que la eficacia de la inmunoreacción antitumoral pueda depender de los fenotipos de HSP70. Un fenotipo de



HSP70 que tenga gran afinidad por antígenos tumorales inmunogénicos específicos, puede originar una respuesta inmune antitumoral efectiva (Flores-Domínguez, 2002). Sin embargo, la expresión de HSP70 sobre las células tumorales se ha relacionado con la inhibición de la actividad monocitotóxica que puede originar posible protección de células malignas en contra de reacciones inmunológicas del hospedero, distintos fenotipos de HSP70 se pueden asociar a un alto nivel de expresión de proteínas HSP70 sobre las células tumorales o con la protección de la citotoxicidad de TNF- α y consecuentemente con el desarrollo tumoral, ya sea que HSP70 actúa como un promotor tumoral, esto puede depender de sus fenotipos (Schmit, 2007).

El SPN +2437 de HSP70-HOM se encuentra en la región codificante del gen, el cambio de nucleótidos T→C se traduce en un cambio de aminoácidos metionina → treonina en la posición 493, además esta posición se encuentra en las hojas β -plegadas del sitio de unión de péptidos de HSP70-HOM que es muy parecido al de las moléculas de HLA de clase I (Milner y Campbell, 1992). El alelo T ha sido asociado en población mexicana con el padecimiento de espondiloartropatías (espondilitis anquilosante, espondiloartropatías no diferenciadas y artritis reactiva). Vargas-Alarcón *et al.*, (2002), lo que sugería que podría tener algún efecto inflamatorio en el desarrollo de gastritis, sin embargo, en el presente estudio no se encontró ninguna asociación con estas enfermedades. El genotipo más frecuente fue TT en controles, cáncer gástrico, cáncer de mama y gastritis, seguido de CT y el genotipo CC solo se presentó en el grupo control con tres individuos y un individuo con cáncer gástrico, cáncer de mama y gastritis no presentaron este cambio, lo cual nos muestra que se sigue conservando el alelo ancestral de este gen.

Se ha descrito que el SNP +190 de HSPA1A se encuentra a 26 pb del codón de iniciación de la transcripción, esto puede causar una estructura alterada del bucle del 5'UTR (Untranslated Region) del gen lo que afecta su eficiencia en la traducción, este cambio no influye directamente en la secuencia de aminoácidos de HSP70-1 pero debido a que las secuencias 5'UTR de genes eucariontes han mostrado tener funciones en el control de la localización celular (Singer, 1992), la estabilidad (Beelman y Parker, 1995) y la eficiencia traduccional del mRNA (Curtis *et al.*, 1995), quizás este polimorfismo esté involucrado en la regulación post-transcripcional de HSP70-1. La expresión de HSP70 en la mucosa gástrica es afectada por la infección de *H. pilory*, TNF es sobre expresado (Suganuma *et al.*, 2008), mientras que HSP70 disminuye su expresión (Targosz *et al.*, 2006), en contraste, en pacientes con cáncer gástrico, los niveles de HSP70 se reportaron en



aumentan (Isomoto *et al.*, 2003). HSP70 actúa como una chaperona molecular para péptidos antigénicos derivados de células tumorales, que conducen al reconocimiento antitumoral por parte de linfocitos T citotóxicos (Suto *et al.*, 1995), además HSP70 es inducida en células tumorales para soportar las condiciones estresantes enfrentadas por el tumor, tales como la falta de nutrientes, oxígeno o la respuesta inmune antitumoral contribuyendo así a la sobrevivencia del tumor (Soti *et al.*, 1998), más aún, algunos reportes sugieren que HSP70 puede estar actuando como promotor tumoral endógeno *in vivo*. Teóricamente un análisis de plegamiento para la estructura secundaria sugiere que la secuencia UTR de HSPA1A, que contenga el alelo C o G del SNP +190 provoca diferentes parámetros termodinámicos y una diferente estructura terminal de la horquilla en la región 3´terminal (Jolly y Morimoto, 2000). Estudios previos han asociado a este SNP con distintas enfermedades, como la enfermedad coronaria en una población China, asociado al genotipo CC de HSPA1A +190 con el aumento de riesgo de padecer esta enfermedad. Posteriormente se asoció ese mismo genotipo en la población de Taiwán como un riesgo a desarrollar enfermedad de Parkinson y finalmente este genotipo CC se asoció con un aumento en el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón en la población procedente de China (Daugaard *et al.*, 2007). Por lo tanto, en el presente estudio se trató de demostrar si existía asociación de este polimorfismo con el desarrollo de cáncer gástrico, cáncer de mama y gastritis. Al comparar el grupo de cáncer gástrico, cáncer de mama y gastritis contra controles ($p = >0.05$), no se encontró asociación. El genotipo más frecuente fue GG para controles, cáncer gástrico, cáncer de mama y gastritis, seguido de CG y el genotipo CC se presentó en menor proporción, lo cual nos muestra que se sigue conservando el alelo ancestral de este gen. HSP70-2 es una proteína idéntica en sus 641 aminoácidos a HSP70-1, que se expresa en condiciones de estrés celular, a pesar de que el SNP +1267 se ubica en la secuencia codificante del gen, la sustitución A→G no provoca ningún cambio en la secuencia de aminoácidos (Milner y Campbell, 1990).

La posible función del gen HSPA1B +1267 se reportó previamente en diferentes enfermedades, aunque este SNP es una variación sinónima tiene un significado funcional, ya que influye en diferentes niveles de expresión y actividad enzimática del mRNA, afectando su estabilidad, tiempo de plegamiento que altera el sustrato o sitio de unión (Tsan *et al.*, 2004). Estudios previos acerca de este polimorfismo lo han asociado con diversas enfermedades como la enfermedad de altura de montaña en chinos en donde se reportó que el genotipo GG incrementa el riesgo de este padecimiento, este SNP también



se encontró asociado a carcinoma naso-faríngeo, cáncer de seno y linfoma Hodgking en una población de Túnez presentando el genotipo GG como factor de riesgo a desarrollar estos tipos de cáncer, así mismo los genotipos GG y AG se asociaron como riesgo en carcinoma de células escamosas de la piel, mientras el genotipo AA se asocio con protección en la población de India (Nieves-Ramírez, 2006). En contraste a estos resultados el genotipo GG se asocio a protección en Leucemia linfoblástica aguda en la población Mexicana y de Gales, con cáncer gástrico a la población de Japón (Vargas-Alarcón, 2002). Las posibles razones a estos distintos hallazgos pueden incluir diferencias étnicas y el tipo de cáncer valorado. Sin embargo, en el presente estudio para población mexicana no se observo asociación alguna de este SNP en cáncer gástrico, cáncer de mama y gastritis al compararlos con el grupo control. Para este gen el genotipo AG fue el más frecuente para controles, cáncer gástrico, cáncer de mama y gastritis, seguido de AA en controles, cáncer gástrico y cáncer de mama, en gastritis el segundo genotipo más frecuente fue GG, este mismo genotipo fue el menos frecuente en controles, cáncer gástrico y cáncer de mama. En relación al cáncer gástrico, Shibata y colaboradores (2009), publicaron una asociación del genotipo GG de HSP70-2 +1267 en mujeres japonesas, estos autores trabajaron con 223 pacientes con cáncer gástrico (64 mujeres) y un grupo control heterogéneo de 200 pacientes (60 mujeres) con otras enfermedades gastroduodenales, sin embargo, no encontraron ninguna asociación con ninguna de estas enfermedades, incluso al ajustar por género, las frecuencias en los pacientes fueron muy semejantes a la del grupo asintomático, esta discrepancia puede deberse a diferencias étnicas y al origen del cáncer ya es considerado multifactorial, entre la población japonesa y la mexicana, a su vez, los resultados obtenidos en los asintomáticos concuerdan con los reportados en población mestiza mexicana sana por Zuñiga *et al.*, (1999) y Vargas-Alarcón *et al.*, (2002). HSP70-HOM, se expresa en bajos niveles tanto de forma constitutiva como en choque térmico porque no tiene río arriba en su secuencia elementos de choque térmico (Miller y Campbell, 1990). Probablemente el cambio de la frecuencia de este SNP no se traduzca en cuanto al nivel de expresión, sino a modificaciones en su actividad de chaperona y de presentación de péptidos.

En el presente trabajo no se identificó asociación por DL, pero al realizar el análisis de los posibles haplotipos que se muestra en el cuadro cuatro, revela que aunque podría haber $2^4 = 16$ combinaciones de alelos diferentes, sólo se observan ocho posibles haplotipos en



pacientes con cáncer gástrico y gastritis, y nueve en pacientes con cáncer de mama. Tres haplotipos acumulan una frecuencia que va del 60-84% en pacientes y controles, en este caso el análisis de los nueve haplotipos tienen una frecuencias igual o superior al 1% en todos los casos. El haplotipo uno es el más frecuente en las tres comparaciones por lo cual se tomó como referencia, pero solamente se encuentra en una frecuencia máxima en pacientes con cáncer gástrico de 33.9% que no difiere con el 33.4% de frecuencia del grupo control, con un valor de $p = 0.8504$, por lo cual el resultado es no significativo ya que $p > 0.05$ (El valor de 0,05 es un valor establecido de acuerdo al nivel de confianza del 95%), es decir, aceptamos la hipótesis nula de independencia y por lo tanto concluimos que ambas variables estudiadas son independientes en pacientes con cáncer gástrico y gastritis, por lo cual no existe una relación entre ellas. El segundo haplotipo en frecuencia contiene variantes para los polimorfismos uno y tres simultáneamente que de igual forma el valor de p es no significativo y no hay una relación entre casos y controles.

En pacientes de cáncer de mama, el haplotipo uno, dos, tres, cuatro, cinco y seis se encuentra con una frecuencia mayor en controles que en casos, pero solamente el haplotipo uno, tres y cuatro $p < 0.05$ (El valor de 0,05 es un valor establecido de acuerdo al nivel de confianza del 95%), es decir, rechazamos la hipótesis nula de independencia y por lo tanto las combinaciones de estos SNP's son dependientes y existe una relación entre ellas (Esto significa que existe más de un 5% de probabilidad de que la hipótesis nula sea cierta en nuestra población y lo consideramos suficiente para aceptar), se calcularon las *odds ratios* (OR) de estas tres posibles combinaciones de SNP's, dando 0.57, 0.59 y 0.55 respectivamente, donde esta combinación sugiere ser de protección ya que con un intervalo de confianza al 95% los OR's calculados < 1 .

El desequilibrio de ligamiento se refiere a la asociación que existe entre alelos que se encuentran ubicados muy cercanamente en un mismo segmento cromosómico, el propósito de los estudios que relacionan genotipo y enfermedad es buscar asociación por DL entre un marcador genético y un gen de susceptibilidad, cuando existe cercanía física entre ambos como es el caso de los genes HSP70. En estudios de genotipo-enfermedad, la asociación por DL surgiría como consecuencia de que ambos *loci* tenderían a heredarse conjuntamente y se mantendrían asociados en las personas enfermas, si no se han sucedido un número suficiente de generaciones que rompan esta asociación alélica. En la figura seis se muestran las gráficas de desequilibrio de ligamiento de los genes



HSPA1L (rs2075800), HSPA1L (rs2227956), HSPA1A (rs1043618) y HSPA1B (rs1061581), lo cual se observó que no hay asociación por desequilibrio de ligamiento en cáncer gástrico, cáncer de mama y gastritis, ya que los valores de r^2 en el análisis de asociación son < 80 .



CONCLUSIONES

En este trabajo se estudiaron polimorfismos en los genes de HSP70 en pacientes mexicanos diagnosticados con cáncer gástrico, cáncer de mama y gastritis. Los datos genotípicos para el grupo control, cáncer gástrico, cáncer de mama y gastritis se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

En los genes HSPA1L +2763 (rs2075800), HSPA1L +2437 (rs2227956), HSPA1A +190 (rs1043618) y HSPA1B +1267 (rs1061581), el alelo más frecuente fue G, T, G y A respectivamente, lo cual nos muestra que se sigue conservando el alelo ancestral en estos genes.

Aunque no se identificó asociación por DL, se observaron ocho posibles combinaciones de SNP's en pacientes con cáncer gástrico y gastritis, y nueve en pacientes con cáncer de mama, concluimos que ambas variables estudiadas son independientes en pacientes con cáncer gástrico y gastritis, por lo cual no existe una relación entre ellas. En pacientes de cáncer de mama, la posible combinación uno, tres y cuatro se encuentran con una frecuencia mayor en controles que en casos y estas posibles combinaciones serian de protección.

Los resultados sugieren que no hay asociación entre los polimorfismos estudiados y el desarrollo a cáncer gástrico, cáncer de mama y gastritis.



LITERATURA CITADA

Arnaiz-Villena A. MHC research: fast forward. *Immunology Today* 1993; 14: 3-5.

Arnaiz-Villena A, Benmamar D, Alvarez M, Díaz-Campos N, Varela P, Gomez-Casado E et al. HLA allele and haplotype frequencies in Algerians. Relatedness to Spaniards and Basques. *Hum Immunol* 1995; 43: 259-68.

Arnaiz-Villena A, Martinez-Laso J, Corell A, Allende L, Rosal M, Gomez-Reino JJ et al. Frequencies of HLA-A24 and HLA-DR4-DQ8 are increased in and that of HLA-B blank is decreased in chronic toxic oil syndrome. *Eur J Immunogenet* 1996; 23: 211-19.

Attia J, Ioannidis JP, Thakkinstian A, McEvoy M, Scott RJ, Minelli C, Thompson J, Infante-Rivard C, Guyatt G. 2009. How to use an article about genetic association: A: Background concepts. *JAMA*; 301: 74-81.

Azuma T, Ito Y, Miyaji H, Dojyo M, Tanaka Y, Iria M, Ito S, Kato T, Kohli Y. 1995. Immunogenetic analysis of the human leucocyte antigen DQA1 locus in patients with duodenal ulcer or chronic atrophic gastritis harbouring *Helicobacter pylori*. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 7: 71.

Azuma T, Ito S, Sato F, Yamazaki Y, Miyaji H, Ito Y, Suto H, Kuriyama M, Kato T, Kohli Y. 1998. The role of the HLA-DQA1 gene in resistance to atrophic gastritis and gastric adenocarcinoma induced by *Helicobacter pylori* infection. *Cancer* 82: 1013.

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and Cancer: back to Virchow?. *Review Lancet*, 2001; 357:539-546.

Benjamin I, McMillan DR. Stress (Heat shock) proteins. *Biol Chem* 1998; 379: 245-59.

Beissinger M, Buchner J. How chaperones fold proteins. *Biol Chem* 1998; 379: 245-59.

Bird T, Jarvik GP, Wood N. 2001. Genetic association studies: genes in search of diseases. *Neurology*; 57(7): 1153-1154.

Blaser M.J, Pérez-Pérez G, Kleanthous H, Cover T, Chyou PR, Stemmerman G. and Nomura A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res*, 1995; 55:2111-2115.

Bodmer JG, Marsh S, Albert E, Bodmer W, Bontrop R, Charron D et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. In: Genetic diversity of HLA Functional and Medical implications. Charron D (ed). Vol 2. Paris, EDK: 505-532, 1997.

Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Geraghty DE, Hansen. 2005. Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens*, 65: 301.



Bonnal C, Calvo F. Resistance to antineoplastic treatments: mechanisms, clinical value. *C. R. Seances Soc Biol Fil* 1996, 190-4: 455-66.

Botzler C, Li G, Issels RD, Multhoff G. Definition of extracellular localized epitopes of Hsp70 involved in an NK immune response. *Cell Stress Chaperones* 1998; 3(1): 6.

Brenner H, Arndt V, Sturmer T, Stegnaier Ch, Zeigler H, Dhom G. Individual and Joint Contribution of Family History and Helicobacter pylori Infection to the Risk of Gastric Carcinoma. *Cancer*, 2000; 88:274-279.

Buiatti E, Palli D, Decarli D, Amadori D, Avellini C, Bianchi S, Biserni R, Cipriani F, Cocco P, Giacosa A, Marubini E, Puntoni R, Vindigni C, Fraumeni J, Blot W. A case-control Study of Gastric Cancer and Diet in Italy. *Int J Cancer*, 1989; 44:611-616.

Calam J, Baron J. Pathophysiology of duodenal and gastric ulcer and gastric cancer. *ABC of the upper gastrointestinal tract. BMJ*, 2001; 2323:980-982.

Campbell RD, Trowsdale J. A map of the human major histocompatibility complex. *Immunol Today* 19, 1997.

Canoz O, Beleni O, Patiroglu TE. General features of gastric carcinomas and comparison of HSP70 and NK cell immunoreactivity with prognostic factors. *Pathol Oncol Res* 2002; 8: 262-269.

Cardon L, Bell J. 2001. Association study designs for complex diseases. *Nature Reviews Genetics*; 2(2): 91-99.

Caselli M, Balboni A, Chiamenti CM, D'Ambrosi A, Alvisi V, Gandini E. Helicobacter pylori and Human Leucocyte Antigens. *Scand J Gastroenterol* 34: 943.

Chiba M, Ishii N, Ishioka T, Murata M, Masamune O, Sugiyama T, Yachi A. Topographic study of Helicobacter pylori and HLA-DR antigen expression on gastric epithelium. *Journal of Gastroenterology* 30: 149.

Ciocca D, Oesterreich S, Chamness G, Mc Guire W, Fuqua S. Biological and clinical implications of heat shock protein 27000 (Hsp27): a Review. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1558-70.

Ciocca D, Stati A, Fanelli M, Gaestel M. Expression of heat shock protein 25000 in rat uterus during pregnancy and pseudopregnancy. *Biol Reprod* 1996, 54: 1326-35.

Coleman M.P, Esteve J, Damiacki P, Arslan A, Renard H. Trends in Cancer Incidence and Mortality. Lyon, 1993: International Agency for Research on Cancer, (IARC/WHO).

Cordell H, Clayton D. 2005. Genetic association studies. *Lancet*; 366: 1121-1131.

Correa P. Human Gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. *Cancer Res*, 1992; 52:6735-6740.



Correa P. H. pylori and Gastric Carcinogenesis. Am J Surg Pathol, 1995; 19(Supp1):S37-S43.

Correa P. The role of Antioxidants in gastric Carcinogenesis. Critical Rev Food Sci Nutr, 1995; 35(1&2):59-64.

Danilovs J, Terasaki PI, Park MS, Ayoub G. B-lymphocyte isolation by thrombin-nylon wood. In: Histocompatibility Testing 1980. Terasaki PI (ed). Los Angeles, UCLA Tissue Typing Laboratory: 287-288, 1980.

Daugaard M, Rohde M and Jaattela M. 2007. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. FEBS Lett, 581(19): 3702-3710.

Dunn B, Cohen H, Blaser M. Helicobacter pylori. Clin Microbiol Rev, 1997; 10:720-741.

Douglas H. Potentially Curable Cancer of the Stomach. Cancer, 1982; 50: 2582-2589.

Ernst P, Gold B. The disease spectrum of Helicobacter pylori: The immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. Ann Rev Microbiol, 2000; 54:615-640.

Evans DJ, Evans DG. Helicobacter pylori CagA: Analysis of Sequence Diversity in Relation to Phosphorylation Motifs and Implications for the Role of CagA as a Virulence factor. Helicobacter, 2001; 6(3):186-198.

Fan XJ, Crowe S, Behar S, Gunasena H, Ye G, Haeberle H, Van Houten N, Gourley WK, Ernst PB, Reyes VE. 1998. The effect of class II major histocompatibility complex expression on adherence of Helicobacter pylori and induction of apoptosis in gastric epithelial cells: a mechanism for T helper cell type 1-mediated damage. J Exp Med 187: 1659.

Fan XJ, Gunasena H, Cheng Z, Espejo R, Crowe SE, Ernst PB, Reyes VE. Helicobacter pylori urease binds to class II MHC on gastric epithelial cells and induces their apoptosis. J Immunol 165: 1918.

Feder J N, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. Nat Genet 1996; 13: 399-408.

Ferrando P, San Román C, Rodríguez de Córdoba S, Arnaiz-Villena A. Partial trisomy 6P: 46 XX, -10, der (10), T (6; 10) (p22; q26) pat and HLA localization. J Med Genet 1981; 18: 231-4.

Finley D, Varshavsky A. The ubiquitin system: functions and mechanisms. Trends in Biochem Sci 1985; 10: 343-7.



Fleischauer AT, Poole Ch, Arab L. Garlic consumption and cancer prevention: meta-analyses of colorectal and stomach cancer. *Amer J Clin Nutr*, 2000; 72:1047-52.

Flores-Domínguez C. 2002. Alleles of the major histocompatibility system associated with susceptibility to the development of Takayasu's arteritis. *Gac Med Mex*. 138(2): 177-183.

Forman D. Helicobacter pylori, infection and cancer. *Br Med Bull*, 1998; 54:71-78.

Forman D, Goodman KJ. The epidemiology of stomach cancer correlating the past with the present. Socioeconomic influences in early life mortality in adult life (editorial coment). *BMJ*, 2000; 320:1682-1683.

Fukao A, Tsubono Y, Tsuji I. The evaluation of screening of gastric cancer in Miyagi Prefecture, Japan: a population-based case-control study. *Int J Cancer*, 1995a; 60:45-48.

Garrido C, Mehlen P, Fromentin A, et al. Inconstant association between 27.KDa heat shock protein (Hsp27) content and doxorubicin resistance in human colon cancer cells. *Eur J Biochem* 1996; 237: 653-9.

Geraghty DE, Koller BH, Pei J, Hansen JA. Examination of four HLA class I pseudogenes: common events in the evolution of HLA genes and pseudogenes. *J Immunol* 1992; 149: 1947-56.

Glynne R, Powis SH, Beck S, Kelly A, Kerr LA, Trowsdale J. A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature* 1991; 353: 357-60.

Guttmaches AE, Collins FS. 2002. Genomic medicine-a primer. *N Engl J Med*. 2002; 347: 1512-1520.

Herrera-Goepfert R, Zuñiga J, Hernández-Guerrero A, Rodríguez-Reyna T, Osnalla N, Ruíz-Morales J, Vargas-Alarcón G, Yamamoto-Furosho J, Mohar-Betacourt A, Hernández-Pardo R, Granados J. 2004. Asociación del alelo HLA-DQB1*0501 del complejo mayor de histocompatibilidad con cáncer gástrico en México. *Gac Med Méx* 140(3): 299.

Hisamichi S, Sugawara N, Fukao A. Effectiveness of gastric mass screening in Japan. *Cancer Detect. Prev*, 1988, 11:323-329.

Hoenicka J. 2006. Genes de la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol*; 42(5): 302-305.

Humphreys T, Reinherz EL. Invertebrate immune recognition, natural immunity and the evolution of positive selection. *Immunol Today* 1994; 15: 316-20.



Huot J, Houle F, Spitz D, Landry J. HSP27 Phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res* 1996; 56: 273-9.

Iniesta R, Guinó E, Moreno V. 2005. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit.*, 19(4): 333-341

Inoue M, Tajima K, Kobayashi S, Suzuki T, Matsuura A, Nakamura T, Inuzuka K, Shirai M, Nakamura S, Tominaka S. Prospective factor against progression from atrophic gastritis to gastric cancer- data from a cohort study in Japan. *Int J Cancer*, 1996; 66:309-314.

Ioannidis J, Ntzana E, Trikalinos T, Contopoulos-Ioannidis D. 2001. Replication validity of genetic association studies. *Nature Genetics*; 29(3): 306-309. Marsh SGE, Albert ED.

Isomoto H, Oka M, Yano Y, Kanazawa Y, Soda H, Terada R, Yasutake T, Nakayama T, Shikuwa S, Takeshima F, Udono H, Murata I. Expression of heat shock protein (Hsp) 70 and Hsp 40 in gastric cancer. *Cancer Lett.* 2003; 198:219-228.

Jarjour W, Reed A, Gauthier J, Hunt S, Winfield J. 1996. The 8.5 kb PstI allele of the stress protein gene, Hsp70-2. An independent risk factor for systemic lupus erythematosus in African Americans. *Human Immunol* 45: 59.

Jolly C and Morimoto R 2000. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst*, 92(19): 1564-1572

Kampinga H, Brunsting J, Stege G, Burgman P, Konings A. Thermal protein denaturation and protein aggregation in cells made thermotolerant by various chemicals: role of heat shock proteins. *Exp Cell Res* 1995; 219: 536-46.

Karhukorpi J, Ikaheimo I, Silvennoinen-Kassinen S, Tiilikainen A, Karttunen R. 1999. HLA-DQA1 alleles and the presence of *Helicobacter pylori* antibodies. *European Journal of Immunogenetics* 26: 15.

Kelly AP, Monaco JJ, Cho S, Trowsdale J. A new human HLA class II-related locus, DM. *Nature* 1991; 358: 571-6.

Kelly AP, Powis SH, Glynn R, Radley E, Beck S, Trowsdale J. Second proteasome-related gene in the human MHC class II region. *Nature* 1991; 353: 667-8.

Kindas I, Trautinger F. Increased expression of the M 27,000 heat shock protein (hsp27) in *in vitro* differentiated normal human keratinocytes. *Cell Growth & Differentiation* 1994; 5: 777-81.

Klein J. *Natural History of the Major Histocompatibility complex*. New York, Wiley, 1986.

Klein J. *Evolution and function of the major histocompatibility system; facts and speculations. The major histocompatibility system in man and animal*. Götze D (ed). New York, Springer-Verlag: 339-378, 1977.



Klein J. The major histocompatibility complex. Immunology. Klein J (ed). Massachusetts, Blackwell Scientific Publications: 161-187, 1990.

Klemenz R, Andres AC, Fröhli E, Schäfer R, Aoyama A. Expression of the murine small heat shock proteins hsp25 and α B crystallin in the absence of stress. *J Cell Biol* 1993; 120: 639-45.

Kuntzmann E, Hardt C, Treitz H, Suerbaum S, Faller G, Peitz U, Scmiegel W, Epplen J. 2002. In the European population HLA-classII genes are not associated with *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 14(1): 49.

Lavoie J, Lambert H, Hickey E, Weber L, Landry J. Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 505-16.

Le Bouteiller P. HLA class I chromosomal region, genes and products: facts and questions. *Crit Rev Immunol* 1994; 14: 89-129.

Lee JE, Lowy AM, Thompson WA, Lu M, Loflin PT, Skibber JM, Evans DB, Curley SA, Mansfield PF, Reveille JD. 1996. Association of gastric adenocarcinoma with the HLA class II gene DQB10301. *Gastroenterology* 111: 426.

Li D, Gordon C, Stagg C, Udelsman R. Heat shock protein expression in human placenta and umbilical cord. *Shock* 1996; 5: 320-3.

Liang P, Mac Rae T. Molecular chaperons and the cytoskeleton. *J Cell Sci* 1997; 110: 1431-40.

Logan RP, Walker MM. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Clinical review. *BMJ*, 2001; 323:920-922.

Lunetta K. 2008. Genetic Association Studies. *Circulation*; 118: 96-101.

Maizels E, Peters C, Kline M, Cutler R, Shanmugam M, Hunzicker-Dunn M. heat shock protein-25/27 phosphorylation by the delta isoform of protein kinase C. *Biochem J* 1998; 332: 703-12.

Martinez-Laso J, Gazit E, Gomez-Casado E, Morales P, Martinez-Quiles, Alvarez M et al. HLA-DR and DQ polymorphism in Ashkenazi and non-Ashkenazi Jews: comparison with other Mediterraneans. *Tissue Antigens* 1996; 47: 63-71.

Mehlen P, Arrigo A. The serum-induced phosphorylation of mammalian hsp27 correlates with changes in its intracellular localization and levels of oligomerization. *Eur J Biochem* 1994; 221: 327-34.

Milner, C.M., Campbell, RD., 1992. Polymorphic analysis of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* 36, 357-362.



Meining AG, Bayerdörffer E, Stolte M. Helicobacter pylori gastritis of the gastric cancer phenotype in relatives of gastric carcinoma patients. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1999; 11:717-720.

Morimo M, Tsuzuki T, Ishikawa Y, et al. Specific expression of Hsp47 in human tumor cell lines in vitro. In vivo 1997; 11: 17-21.

Moritomo R, Tissieres A, Georgopoulos C. The stress response, function of the proteins and perspectives. In: RI Morimoto, A. Tissieres, C. Georgopoulos (eds) Stress proteins in biology and medicine, Cold Spring Harbor, CSH Press, 1990, p 1-36.

Nieves-Ramirez, M. 2006. Análisis del Polimorfismo de los genes del Sistema principal de histocompatibilidad en el desarrollo de lesiones precursoras del cáncer cérvico uterino. Universidad Nacional Autónoma de México: México.

Oesterreich S, Weng Ch, Qiu M, Hilsenbeck S, Osborne C, Fuqua S. The small heat shock protein hsp27 is correlated with growth and drug resistance in human breast cancer cell lines. Cancer Res 1993; 53: 4443-8.

Omar E, Oien K, Murray L, El-Nujumi A, Wirz A, Gillen D, Willians C, Fullarton G, McColl K. Increased Prevalence of Precancerous Changes in Relatives of Gastric Cancer Patients: Critical Role of H. pylori. Gastroenterology, 2000b; 118:22-30.

Organización Mundial de la Salud (2011). Cáncer. Fact sheets num. 297. Octubre, 2011. Recuperado el 9 de enero de 2012, de:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>

Organización Mundial de la Salud (2012). *Cáncer*. Nota descriptiva N°297, febrero 2012. Recuperado el 13 de enero de 2013, de:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

Pablos J, Carreira P, Martin-Villa J, Montalvo G, Arnaiz-Villela A, Gomez-Reino J. 1995. Polymorphism of the heat-shock protein gene HSP70-2 in SLE. Br J Rheumatol 34: 721.

Park J, Yang H, Yo Kin W, Caldas C. Report on the first meeting of the international collaborative group on hereditary gastric cancer. J Natl Cancer Inst, 2000; 92(21):1781-1782.

Park Y, Han M, Blackburn R, Lee Y. Overexpression of HSP25 reduces the level of TNF alpha-induced oxidative DNA damage biomarker, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in L929 cells. J Cell Physiol 1998; 174: 27-34.

Perri F, Pidepolo A, Quitadamo M, Quarticelli M, Merla A, Bisceglia M. 2002. HLA-DQA1 and DQB1 genes and Helicobacter pylori infection in Italian patients with gastric adenocarcinoma. Tissue Antigens 59: 55-57.

Pierce SK, DeNagel DC, VanBuskirk AM. A role for heat shock protein in antigen processing and presentation. Curr Top Microbiol Immunol 1991; 167: 83.



Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer*, 1999; 83:18-29.

Ratanachaiyavong S, Demaine A, Campbell R, McGregor A. 1991. Heat shock protein 70 (HSP70) and complement C4 genotypes in patients with hyperthyroid Graves' disease. *Clin Exp Immunol* 84: 48.

Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962; 18: 571-3.

Rodey GE. 2000. HLA beyond tears: Introduction to human Histocompatibility. 2nd ed. De Novo, USA.

Rokkas T, Liatsos C, Petridou E, Papatheodorou S, Karameris A, Ladas S, Raptis S. Relationship of *H. pylori* CagA(+) status to gastric juice vitamin C levels. *Eur J Clin Invest*, 1999; 29:56-61.

Saiki RK, Scharf S, Falaona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich H et al. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-4.

Sakai T, Aoyama N, Satonaka K, Shigeta S, Yoshida Y, Shirasaka D, Miyamoto M, Nose Y, Kasuga M. 1999. HLA-DQB1 locus and the development of atrophic gastritis with *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol* 34: 24.

Sargent CS, Dunham I, Trowsdale J, Campbell RD. Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 1968.

Schmitt E. 2007. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol.* 81(1): 15-27.

Sevilla SD. 2007. Metodología de los estudios de asociación genética. *Insuficiencia cardiaca*; 2(3): 111-114.

Shibata T, Arisawa T, Tahara T, Yoshioka D, Maruyama N, Fujita H, Kamiya Y, Nakamura M, Nagasaka M, Iwata M, Takahama K, Watanabe M, Hirata I, Nakano H. Protective role of genetic polymorphism of heat shock protein 70-2 for gastric cancer risk. *Dig Dis Sci.* 2009; 54:70-74.

Shiina T, Inoko H, Kulski JK. 2004. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations. *Tissue Antigens* 64: 631.

Shimizu, S., Nomura, K., Ujihara, M., Demura, H., 1999. An additional exon of stress-inducible heat shock protein 70 gene (HSP70-1). *Biochem Biophys Res Commun* 257, 193-198.

Slatkin M. 2008. Linkage disequilibrium understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nature Reviews Genetics*; 9(6): 477-485.



Samali A, Cotter T. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp Cell Res* 1996; 223: 163-70.

Soti C, Csermely P. Molecular chaperones in the etiology and therapy of cancer. *Pathol Oncol Res* 1998; 4:316-321.

Spies T, Bresnahan M, Bahram S, Arnold D, Blanck G, Mellins E et al. A gene in the human major histocompatibility complex class II region controlling the class I antigen presentation pathway. *Nature* 1990; 348: 744-7.

St George P, Haines J, Farrer L, Polinsky R, Van Broeckhoven C, Goate A. 1990. Genetic linkage studies suggest that Alzheimer's disease is not a single homogeneous disorder. FAD Collaborative Study Group. *Nature*; 347: 194-197.

Suganuma M, Yamaguchi K, Ono Y, Matsumoto H, Hayashi T, Ogawa T, Imai K, Kuzuhara T, Nishizono A, Fujiki H. TNF-alpha-inducing protein, a carcinogenic factor secreted from *H. pylori*, enters gastric cancer cells. *Int J Cancer* 2008; 123: 177-122.

Suto R, Srivastava PK, A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned-peptides. *Science* 1995, 269: 1585-1588.

Terasaki PI, McClelland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964; 204: 998-1000.

Trautinger F, Kindas Mugg I, Dekrout B, Knobler R, Metze D. Expression of the 27-KDa heat shock protein in human epidermis and in epidermal neoplasms: an immunohistological study. *Br J Dermatol* 1995; 133: 194-202.

Trowsdale J, Kelly A. The human class II? chain gene Dz? is distinct from genes in the DP, DQ and DR subregions. *Embo J* 1985; 4: 2231-7.

Trowsdale J, Hanson I, Mockridge I, Beck S, Townsend A, Kelly A. Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the ABC superfamily of transporters. *Nature* 1990; 348: 741-4.

Tsan M and Gao B. 2004. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol.* 76(3): 514-519.

Tsugane S, Kabuto M, Imai H, Gey F, Tei Y, Hanaoka T, Sugano K, Watanabe S. *Helicobacter pylori*, dietary factors, and atrophic gastritis in five Japanese populations with different gastric cancer mortality. *Cancer Causes and Control*, 1993; 4:297-305.

Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido N, Taniyama K. *Helicobacter pylori* Infection and the Development of Gastric cancer. *New Engl J Med*, 2001; 345:784-789.

Ulrich Hartl F. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996; 381: 571-80.



Van de Klundert F, Gijsen M, van del Ijssel P, Snoeckx L, de Jong W. Alpha B-crystallin and hsp25 in neonatal cardiac cells differences in cellular localization under stress conditions. *Eur J Cell Biol* 1998; 75: 38-45.

Vargas-Alarcon G. Heat shock protein 70 gene polymorphisms in Mexican patients with spondyloarthropathies. *Ann Rheum Dis*, 2002 61(1): p 48-51.

Vargas-Alarcón G, Londoño J, Hernández-Pacheco, Gamboa R, Castillo E, Pacheco-Tena C, Cardiel M, Granados J, Burgos-Vargas R. 2002. Heat shock protein 70 gene polymorphism in Mexican patients with spondyloarthropathies. *Ann Rheum Dis* 61: 48.

Vignal A, Mila D, Sancristobal M, Egge A. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics, selection, evolution: GSE* 34(3): 275-305.

Webb A, Cunningham D. Curing gastric cancer - home the scalpel with magic?. *Br J Cancer* 1996; 73:418-419.

Welch W. Respuesta de las células al estrés. *Investigación y Ciencia* 1993; 7: 22-9.

Wyszynski D. 1998. La epidemiología genética: disciplina científica en expansión. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 3:1.

Xu Q, Wick G. The role of heat shock proteins in protection and pathophysiology of the arterial wall. *Mol Med Today* 1996; 9: 372-80.

Yoshitake S, Okada M, Kimura A, Sasazuki T. 1999. Contribution of major histocompatibility complex genes to susceptibility and resistance in *Helicobacter pylori* related diseases. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 11: 875.

Zur-Hausen H. 2002. Papillomaviruses and cáncer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, 2(5) 342-350.