



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“*Helicobacter pylori* Y POLIMORFISMOS -511 C/T Y -
31T/C DE LA IL-1B EN PACIENTES CON GASTRITIS
CRÓNICA Y ÚLCERA GÁSTRICA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

DINORAH NASHELY MARTÍNEZ CARRILLO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. GLORIA FERNÁNDEZ TILAPA
CO-DIRECTORA DE TESIS: DRA. ELVIRA GARZA GONZÁLEZ



Chilpancingo, Gro., Enero de 2009. i

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación Clínica de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en Chilpancingo, Guerrero y en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en Monterrey, Nuevo León, México.

Bajo la dirección de:

Dra. Gloria Fernández Tilapa

La co-dirección de:

Dra. Elvira Garza González

La asesoría de:

Dra. Berenice Illades Aguiar

Dra. Amalia Vences Velázquez

M en C. Adolfo Román Román

En colaboración con el Médico Especialista en Gastroenterología Reyes Betancourt Linares, jefe de la Unidad Especializada en Gastroenterología Endoscopia de la ciudad de Chilpancingo, Guerrero.

Esta investigación se desarrolló con el financiamiento otorgado por la SEP a través del PIFI 2007 y del Programa de Apoyo a la Reincorporación de Ex-becarios PROMEP 2007.

Durante el período en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, la QBP. Dinorah Nashely Martínez Carrillo, recibió beca del CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Gloria Fernández Tilapa, por todo el tiempo dedicado a este proyecto, por impulsarme a seguir en el camino de la superación.

A la Dra. Elvira Garza González, por todo el apoyo que me brindó sin conocerme y porque eso me permitió ver otros horizontes.

A la Dra. Berenice Illades, Dra. Amalia Vences y M en C. Adolfo Román, por todas sus aportaciones y el tiempo dedicado en la mejora de este proyecto; un agradecimiento especial a la Dra. Berenice porque también fue mi maestra de seminario, gracias por jalarnos las riendas. Al Dr. Reyes Betancourt Linares, por abrirme las puertas de su clínica y por todo el apoyo brindado.

A todos mis maestros, porque cada curso me dejó muchas enseñanzas y en especial a la MSP. Eugenia Flores Alfaro, por el tiempo y la ayuda que me brindó en la mejora de este trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio, por ese ambiente tan agradable que se respira, en especial a Eli, Trini y Temo, sin su ayuda hubiera sido más difícil.

A la quinta generación de la maestría, Beto, Yuli, Juan Pablo, Rubén, Claudia, Olga, Toño, Pao, Blanca, Diana, Irma, Ana Lilia y Pedro, no pude haber tenido mejor suerte, fuimos un excelente grupo, aprendí de cada uno de ustedes.

A mi papá y mamá por todo lo que me han dado y sobre todo lo que no me dieron, porque gracias a eso aprendí a valorar las cosas, me enseñaron a luchar por alcanzar mis metas, son los mejores papas que me pudieron haber tocado, los quiero mucho. A mis hermanas Karen, Lore y a Paco, porque son parte importante de mi vida y por apoyarme en los momentos difíciles, los quiero.

A la Biol. Paola, por su apoyo con todo lo administrativo, pero principalmente por permitirme conocerte como amiga.

A toda mi enorme familia, porque a pesar de las diferencias que existan, siempre estamos para apoyarnos.

A mis amigas, Ale, Mago, Angie, Hilda, Faby, Aralia, por darme ánimo para seguir adelante, saben que siempre pueden contar conmigo, las quiero. A Perla y Gypsy, porque sin conocerme me abrieron las puertas de su casa e hicieron que mi estancia en Monterrey fuera más fácil, gracias niñas me sentí como en casa.

A Julio, Javier, Manuel, son unos niños muy buena onda, gracias por demostrarme su cariño.

A ti que estuviste conmigo en el inicio de este proyecto y en muchos momentos más dándome tu apoyo, aguantando mis malos ratos, aunque las cosas ya no sean como antes siempre serás una persona importante en mi vida, te quiero.

A ti porque sin saberlo fuiste una luz de esperanza en los momentos de desesperación y me regresaste la ilusión que había perdido, porque a pesar del poco tiempo de conocernos hemos pasado momentos muy agradables, TQM.

A mi casi hermana Gis, por ser cómplice de mis locuras, muchas gracias por estar conmigo en los momentos más difíciles que me ha tocado vivir, pero también en los más divertidos y aventurados, juntas en las buenas y en las malas, te quiero amiga.

A todos los que de una u otra manera han estado a mi lado apoyándome en esta aventura llamada vida.

Dinorah Kashely

Índice

	Pág
1. RESUMEN.....	vii
2. ABSTRACT.....	viii
3. INTRODUCCIÓN.....	1
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	4
5. RESULTADOS.....	9
6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	19
7. REFERENCIAS.....	26
8. ANEXOS.....	29

1. RESUMEN

Antecedentes: El genotipo *vacA s1m1* de *H. pylori* está asociado con la inducción de inflamación y daño en la mucosa gástrica. En personas con los polimorfismos -511 C/T y -31 T/C de la *IL-1B* la infección con este genotipo de *Helicobacter* se asocia con el riesgo de hipoclorhidria y de cáncer gástrico. **Objetivo:** Evaluar si los polimorfismos -511 C/T y -31 T/C de la *IL-1B* y los genotipos *s1m1* y *s1m2* de *vacA* de *H. pylori* están asociados con el desarrollo de gastritis crónica y úlcera gástrica. **Material y métodos:** Se detectaron anticuerpos IgG e IgM anti-*H. pylori* en 102 sujetos control mediante ELISA. El genotipo de *vacA* de *H. pylori* se determinó por PCR alelo específica en 100 pacientes con gastritis crónica y 28 con úlcera gástrica por. En los casos y controles se genotipificó el polimorfismo -511 C/T de la *IL-1B* y el -31 T/C por pirosecuenciación. **Resultados:** En el grupo control el 59.8% tuvo IgG, IgM o ambos anticuerpos. En los casos de gastritis crónica la frecuencia de infección gástrica por *H. pylori* fue del 77% y de 85.7% en úlcera gástrica, el 43.7% de los infectados tenían el genotipo *s1m1*, el 21.8% *s1m2* y el 18.8% *s2m2*. Los genotipos -511CT y -31TC fueron los más frecuentes en gastritis crónica (60 y 52%) y úlcera gástrica (46.4 y 57.1%) y los genotipos -511TT y -31CC en el grupo control con 52 y 51% respectivamente. **Conclusión:** La genotipificación de la bacteria y del perfil genético de riesgo del hospedero puede ayudar a identificar a individuos que estén en mayor riesgo de desarrollar lesiones precursoras y cáncer gástrico.

Palabras clave: *H. pylori*, *IL-1B*, gastritis crónica, úlcera gástrica.

2. ABSTRACT

Background: The genotype *vacA s1m1* of *H. pylori* is associated with the inflammation induction and damage in the gastric mucosa. In people with the polymorphisms -511 C/T and -31 T/C the *IL-1B* the infection with this genotype of *Helicobacter* is associated with the risk of hypochlorhydria and gastric cancer. **Aim:** Our aim was to evaluate if the both polymorphisms -511 C/T, -31 T/C of the *IL-1B* and *H. pylori vacA* genotypes was associated with the chronic gastritis and gastric ulcer. **Materials and Methods:** Antibodies IgG and IgM anti-*H. pylori* were detected in 102 subjects control by ELISA. The genotype of *vacA* of *H. pylori* was determined by PCR in 100 patients with chronic gastritis and 28 with gastric ulcer. In the cases and controls the polymorphism -511 C/T of the *IL-1B* was genotyping by PCR-RFLP's and the -31 T/C by pyrosequencing. **Results:** In the group control the 59.8% had IgG, IgM or both antibodies. In the cases of chronic gastritis the frequency of *H. pylori* was of 77% and 85.7% in gastric ulcer, the 43.7% were genotype *s1m1*, the 21.8% *s1m2* and the 18.8% *s2m2*. The genotypes -511CT and -31TC were most frequent in chronic gastritis (60 and 52%) and gastric ulcer (46.4 and 57.1%) and the genotypes -511TT and -31CC in the group control with 53 and 51% respectively. **Conclusion:** The genotyping of the bacterium and the genetic profile of risk the host can help to identify individuals that are in greater risk of developing the pre-malign lesion and gastric cancer.

Keywords: *H. pylori*, *IL-1B*, chronic gastritis, gastric ulcer.

3. INTRODUCCIÓN

El adenocarcinoma gástrico es la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo. En México el cáncer de estómago fue la tercera y cuarta causa de muerte por tumor maligno en hombres y mujeres en 2006 y la gastritis, la úlcera y duodenitis ocuparon el cuarto lugar como causa de morbilidad, con un total de 1, 491,309 casos y, en el mismo año, estos padecimientos ocuparon el sexto lugar dentro de las primeras veinte causas de morbilidad en el estado de Guerrero, con 39,055 casos ¹.

Por estudios epidemiológicos y experimentos en roedores, se sabe que la infección por *Helicobacter pylori* se asocia con úlceras pépticas, linfoma tipo MALT, atrofia gástrica y adenocarcinoma gástrico distal; sin embargo, menos del 3% de los individuos infectados con *H. pylori* desarrollan neoplasias relacionadas con su presencia ^{2,3}.

H. pylori coloniza más de la mitad de la población mundial ². La infección por esta bacteria usualmente se adquiere en la niñez, y sin tratamiento puede persistir a lo largo de la vida. La prevalencia de infección por *H. pylori* es más alta en países en desarrollo que en países desarrollados. Entre los factores de riesgo para adquirir la infección por *H. pylori* se encuentran el bajo nivel socioeconómico, el hacinamiento, el país de origen y la etnicidad. La vía de transmisión más frecuente es la oral-oral, y la vía fecal-oral también es posible. La placa dental y la saliva son posibles fuentes de infección aunque la recuperación de *H. pylori* en muestras de cavidad oral ha fallado en algunos estudios, mientras que en otros se ha aislado y cultivado ⁴. La discrepancia entre los resultados clínicos debidos a la infección por la bacteria se puede explicar por variaciones en los factores de virulencia de la bacteria, exposición a factores ambientales, diferencias en la respuesta inmune del hospedero y a factores genéticos ⁵.

Las citotoxinas VacA (Citotoxina vacuolizante) y CagA (Citotoxina asociada al gen A) de *H. pylori* participan en la formación de lesiones en la mucosa gástrica. Ambas participan en la colonización y modulación de la respuesta inflamatoria así como en el desarrollo de úlcera péptica y cáncer gástrico ^{6,7,8}. VacA induce la formación de vacuolas intracelulares, y tiene un papel importante en la inducción de

cambios en el citoesqueleto, apoptosis, supresión de la proliferación epitelial, y migración en líneas celulares epiteliales ⁷.

El gen *vacA* está presente en todas las cepas de *H. pylori* y tiene al menos dos regiones variables. La región *s*, que codifica el péptido señal, existe como los tipos alélicos *s1* (subtipos *s1a*, *s1b*, *s1c*) y *s2*. La región *m* (media) puede ser del tipo *m1* o *m2*. La producción de la proteína está relacionada con el genotipo, en general, las cepas *s1/m1* producen niveles altos, las cepas *s1/m2* niveles moderados de toxina, mientras que las cepas *s2/m2* producen poco o nada de toxina ^{6,7,8}.

La inflamación inducida por *H. pylori* se incrementa por el aumento en la producción de citocinas proinflamatorias como la IL-1 β , TNF- α , IL-6. Los individuos con múltiples polimorfismos en citocinas que promueven la inflamación e infectados con cepas de *H. pylori* más virulentas pueden tener hasta cincuenta veces el riesgo de desarrollar cáncer gástrico comparado con aquellos individuos que carecen de dichos factores ².

La interleucina 1 β (IL-1 β) es una potente citocina pro-inflamatoria producida por monocitos y macrófagos ⁹, que se infiltran al sitio de la infección. El gen de la *IL-1B* está localizado en el cromosoma 2 (2q14), tiene un tamaño de 17.5 Kb y está compuesto por siete exones ¹⁰. La interacción entre LPS de *H. pylori* y el TLR4 (receptor Toll-like 4) regula la transcripción del gen de la *IL-1B* a través de la activación del factor de transcripción NF- κ B y elementos C/EBP β (proteína de unión al enhancer CCAAT) ¹¹.

El gen de la *IL-1B* se ha propuesto como un factor genético clave en la determinación del patrón de gastritis y del riesgo de transformación a la malignidad. Individuos colonizados por *H. pylori* y que poseen polimorfismos en la región promotora del gen de la *IL-1B* asociados con niveles altos de expresión de la citocina, tienen un mayor riesgo de desarrollar hipoclorhidria, atrofia gástrica y adenocarcinoma gástrico distal, en comparación con individuos con polimorfismos asociados con niveles bajos de expresión de IL-1 β ³. Los efectos sinérgicos entre los factores de virulencia de la bacteria y los polimorfismos de la *IL-1B* están asociados con el desarrollo de cambios histológicos severos en la mucosa gástrica, como

sucede en aquellos pacientes con genotipos de alto riesgo tanto de la bacteria como del hospedero (*cagA+/vacA+/IL-1B-511T/IL-RN*2*)¹².

Se conocen tres polimorfismos en el gen de la *IL-1B*, dos en la región promotora, en las posiciones -511C/T, -31T/C y uno en el cuerpo del gen, en la posición +3954 C/T^{13,14,15,16}. Estudios en diferentes poblaciones sugieren que los polimorfismos -511T y -31C de la *IL-1B* están asociados con el desarrollo de cáncer gástrico¹⁷.

En México sólo se han publicado los resultados de un estudio acerca del polimorfismo -31T/C de la *IL-1B* realizado en población del noreste del país en la que se demuestra que el alelo *IL-1B-31*C* es un factor de riesgo para cáncer gástrico.

Todavía no está bien documentada la asociación de los polimorfismos de la *IL-1B* y de los genotipos de *vacA* de *H. pylori* con el desarrollo de gastritis crónica y úlcera gástrica. Es probable que los genotipos -511TT y -31CC de la *IL-1B* en presencia de los genotipos *s1m1* y *s1m2* de *vacA* de *H. pylori* potencien el riesgo de desarrollar gastritis crónica y úlcera gástrica.

La genotipificación de *vacA* de *H. pylori* y de los polimorfismos de la *IL-1B* podría ser de importancia en la identificación temprana de los individuos con mayor riesgo de desarrollar carcinoma gástrico.

En base a los antecedentes descritos, los objetivos de este trabajo, fueron evaluar si los polimorfismos -511 C/T y -31 T/C de la *IL-1B* se asocian con el desarrollo de gastritis crónica y úlcera gástrica y analizar la posible asociación de los polimorfismos de la *IL-1B* y los genotipos *s1m1* y *s1m2* de *vacA* de *H. pylori* en el desarrollo de úlcera gástrica.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Población. De abril de 2007 a mayo de 2008 se realizó un estudio de casos y controles. El grupo de casos se integró con 100 pacientes con diagnóstico endoscópico e histopatológico reciente de gastritis crónica y 28 pacientes con diagnóstico endoscópico de úlcera gástrica, atendidos en la Unidad Especializada en Gastroenterología Endoscopía de la ciudad de Chilpancingo, Guerrero. El grupo control se integró con personas sin sintomatología de dispepsia, provenientes de la misma base poblacional que los casos. Fueron incluidos en el estudio aquellos que no tuvieran tratamiento antimicrobiano, ni con inhibidores de la bomba de protones o neutralizadores del pH gástrico, por lo menos un mes antes de la toma de muestra. En ambos grupos se excluyeron a aquellos con tratamiento antiinflamatorio no esteroideo (AINES). Tanto casos como los sujetos control firmaron una carta de consentimiento informado y se les aplicó una encuesta en la que se registraron datos generales de los participantes, datos socio-demográficos, hábitos alimentarios y antecedentes clínicos.

Obtención de las muestras. Para el grupo de casos, se obtuvieron dos biopsias gástricas de cada paciente durante el estudio endoscópico, tomadas del sitio de la lesión; una se destinó a la identificación molecular de *H. pylori* y la otra al estudio histopatológico. A los sujetos control se les tomaron dos muestras de sangre venosa una sin y otra con anticoagulante (EDTA). Las biopsias se mantuvieron en solución de extracción (Tris 10mM pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0, SDS 0.5%) a -20°C hasta su procesamiento. De las muestras de sangre se separó el suero y se conservó a -20°C hasta su análisis.

Obtención de DNA. De la biopsia gástrica se hizo la extracción de DNA empleando el protocolo de extracción a partir de tejido fresco. Todas las muestras se sometieron a digestión con 3.8 µL de proteinasa K (20 mg/mL), las reacciones se incubaron por 20 min a 65° C y se extrajo el DNA total por la técnica de fenol-cloroformo-alcohol

isoamílico (Anexo 3) ¹⁸, de las muestras de sangre con anticoagulante se hizo la extracción de DNA empleado la técnica de Miller.

Detección de anticuerpos IgG e IgM anti-*H.pylori*. Se verificó la presencia de anticuerpos IgG e IgM anti-*H. pylori*, en el suero de los sujetos control, mediante la técnica de ELISA, (International Immuno-Diagnostics, Estados Unidos), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Detección del DNA de *H. pylori*. El DNA de *H. pylori* se detectó con los oligonucleótidos: HP16-219 5'- GCTAAGAGATCAGCCTATGTCC-3' y HPGR16SR 5'- CAATCAGCGTCAGTAATGTTC- 3' ¹⁹, que amplifican una región de 522 pb del gen del RNAr 16S de la bacteria. La mezcla de reacción se hizo en un volumen final de 15 µL, con 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's (Invitrogen, Brasil), 5 pmol de cada oligonucleótido, 1U de Taq DNA polimerasa Platinum (Invitrogen, Brasil) y 150 ng de DNA total. El programa de amplificación incluyó un ciclo de desnaturalización inicial a 94° C por 5 min, 36 ciclos a 94° C por 30 s, 55° C por 30 s y 72° C por 45 s y un ciclo de extensión final a 72° C por 7 min. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz ultravioleta (UV).

Genotipificación de *vacA* de *H. pylori*. Las muestras positivas al gen del RNAr 16S de *H. pylori*, se sometieron a amplificación de la región señal (s) de *vacA* con los oligonucleótidos: VA1-F5'ATGGAAATACAACAACACAC3' Y VA1-R 5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC3' ²⁰. La reacción de amplificación se hizo en un volumen final de 20 µL con 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's, 15 pmol de cada oligonucleótido, 1U de Taq DNA polimerasa Platinum y 300 ng de DNA. El programa de amplificación incluyó un ciclo de desnaturalización inicial a 95° C por 3 min y 30 ciclos a 95° C por 30 s, 56° C por 45 s, 72° C por 45 s y un ciclo de extensión final a 72° C por 7 min. El producto de PCR se separó por electroforesis en gel de agarosa al 2.0%, se tiñó con bromuro de etidio y se observó con luz UV. Una banda de 259 pb correspondió al genotipo *s1* y una de 286 pb a *s2*. La amplificación de la región

media (m) se hizo con los oligonucleótidos: VA3-F 5'GGTCAAAATGCGGTCATGG3', VA3-R 5'CCATTGGTACCTGTAGAAAC3', VA4-F 5'GGAGCCCCAGGAAACATTG3' VA4-R 5'CATAACTAGCGCCTTGAC3'²⁰. La reacción de amplificación se hizo en un volumen final de 20 µL que contenía 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's, 10 pmol de cada oligonucleótido, 1 U de Taq DNA polimerasa Platinum y 300 ng de DNA. El programa de amplificación incluyó un ciclo de desnaturalización inicial a 94° C por 3 min y 30 ciclos a 94° C por 30 s, 53° C por 30 s, 72° C por 30 s y un ciclo de extensión final a 72° C por 7 min. El producto de PCR se separó por electroforesis en gel de agarosa al 2%, se tiñó con bromuro de etidio y se observó con luz UV. Una banda de 290 pb se interpretó como genotipo m1 y una banda de 352 pb como m2. Las muestras en las que no fue posible genotipificar la región m con esos iniciadores, se sometieron a una segunda PCR con los oligonucleótidos VAG-F 5'CAATCTGTCCAATCAAGCGAG3', VAG-R 5'GCGTCTAAATAATTCCAAGG3'²¹. La mezcla de reacción se hizo en un volumen final de 20 µL que constaba de 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's, 15 pmol de cada oligonucleótido, 1 U de Taq DNA polimerasa Platinum y 300 ng de DNA. El programa de amplificación incluyó un ciclo de desnaturalización inicial a 94° C por 3 min y 30 ciclos a 94° C por 30 s, 55° C por 30 s, 72° C por 30 s y un ciclo de extensión final a 72° C por 5 min. El producto de PCR se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, se tiñó con bromuro de etidio y se observó con luz UV. Una banda de 570 pb se interpretó como genotipo m1 y una banda de 645 pb como m2.

Se utilizó la cepa ATCC43504 de *H. pylori*, genotipo *vacA s1/m1*, como control positivo de la detección del DNA de *H. pylori* y de la genotipificación del gen *vacA*; como control negativo se sustituyó el DNA molde por agua desionizada estéril.

Genotipificación del polimorfismo -511 C/T de la *IL-1B*. El polimorfismo -511 C/T de la *IL-1B* fue genotipificado por PCR-Restricción de Fragmentos Polimórficos de Longitud variable (RFLP's). Se emplearon 200 ng de DNA humano obtenido de biopsias gástricas o sangre, para amplificar un fragmento de 305 pb de la región promotora de *IL-1B*, que incluía el sitio polimórfico, con los oligonucleótidos: F5'-

TGGCATTGATCTGGTTCATC-3', R5'-GTTTAGGAATCTTCCCCTT-3' ¹². La reacción de amplificación se hizo en un volumen final de 25 µL que contenía 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's, 15 pmol de cada oligonucleótido, y 1U de Taq DNA polimerasa recombinante (Invitrogen, Brasil). Las condiciones de PCR fueron: un ciclo de desnaturalización inicial a 95° C por 5 min y 35 ciclos a 95° C por 30 s, 55° C por 30 s, 72° C 30 s y un ciclo de extensión final a 72° C por 5 min. El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, se tiñó con bromuro de etidio y se observó con luz UV. Los productos de PCR se digirieron con 2 U de la enzima *AvaI* (New England Biolabs, Estados Unidos), que reconoce la secuencia 5' C'YCGRG 3'. La digestión se incubó a 37° C por 4 h. El fragmento amplificado tiene un sitio de corte para *AvaI* cuando el alelo es -511C, de esta forma se generan dos segmentos, uno de 190 pb y otra de 115 pb; el alelo -511T se caracteriza por la ausencia de sitio de restricción para *AvaI* por lo que el producto de PCR permanece sin digerir, 305 pb (-511T). Así, el genotipo heterocigoto (-511TC) se identifica por los productos de 305 pb (-511T), y 190 + 115 pb (-511C). Los productos de restricción se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y se observaron con luz UV.

Todas las reacciones de PCR se hicieron en un termociclador Mastercycler Ep gradient (Eppendorf, Alemania).

Genotipificación del polimorfismo -31 T/C de la *IL-1B*. El polimorfismo -31 T/C de la *IL-1B* fue genotipificado por pirosecuenciación para lo cual se obtuvieron productos de PCR biotinilados con los iniciadores: F:5'-CCACCAATACTCTTTTTCCCCTTCC-3' y R:5'-GATTGGCTGAAGAGAATCCCAGAGC-3' biotinilado. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL que contenía 25 pmoles de cada iniciador, 300 ng de DNA genómico, y 1U de Taq DNA polimerasa (Promega Madison, WI). El programa de amplificación incluyó un ciclo a 94° C por 3 min; 45 ciclos de 94° C por 30 s, 55° C por 30 s y 72° C por 30 s, seguido de un ciclo a 72° C por 3 min. El producto de PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2 %, se tiñó con bromuro de etidio y se observó con luz UV, las muestras positivas se

identificaron por la presencia de una banda de 186 pb. Para la pirosecuenciación, los productos de PCR biotinilados (20 µL) se inmovilizaron en una suspensión de perlas de sefarosa cubiertas con estreptavidina en amortiguador de unión. Las muestras se incubaron por 10 min en agitación constante a 1,400 rpm y después de la inmovilización, los complejos perlas-templados se sumergieron en amortiguador de lavado (AL) e NaOH 0.5 M. Las muestras se lavaron en AL y las perlas se añadieron a 45 µL de amortiguador de apareamiento que contenía 15 pmoles del iniciador de secuenciación 5´- TCCTACTTCTGCTTTTGA-3´. El apareamiento se llevó a cabo a 90° C por 2 min y los templados se dejaron a temperatura ambiente. Se llevó a cabo la transferencia de los complejos perlas-templados empleando el dispositivo PSQ 96 Sample PrepStation (Pyrosequencing AB). La pirosecuenciación (anexo 4) en tiempo real se llevó a cabo en el pirosecuenciador PSQ SNP 96 (Pyrosequencing AB, Uppsala, Suecia) ²².

Análisis estadístico. Los datos de la encuesta y los resultados obtenidos se capturaron en una base de datos en el programa estadístico SPSS versión 12.0. El análisis estadístico se hizo en el programa STATA versión 9, con el cual se obtuvieron las frecuencias simples y relativas de las variables cualitativas empleando la prueba de X^2 para obtener las diferencias entre los grupos, para variables cuantitativas no paramétricas se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar medianas entre grupos, considerando un valor de $p < 0.05$ estadísticamente significativo. Se realizaron modelos de regresión logística multinomial para determinar la asociación de los polimorfismos de la *IL-1B* con la gastritis crónica y úlcera gástrica y un modelo de interacción multiplicativo mediante regresión logística para evaluar la interacción entre los genotipos de *H. pylori* y de la *IL-1B* con la úlcera gástrica.

5. RESULTADOS

Población de estudio

Se incluyeron 230 personas, 102 sujetos control y 128 casos, de los cuales 100 fueron pacientes con diagnóstico endoscópico de gastritis crónica y 28 de úlcera gástrica. La edad promedio del grupo control fue de 30 años con un intervalo de 18 a 60, en los casos de gastritis crónica la media fue de 46 años con un intervalo de 11 a 80 años, se encontraron 5 casos menores de 20 años, en los pacientes con úlcera gástrica la media de edad fue de 56 años con un intervalo de 25 a 83. Las características generales de la población se muestran en el cuadro 1. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio en relación a la edad, escolaridad, lugar de origen, antecedentes familiares de gastritis y/o úlcera, hábito de fumar y consumo de café.

Cuadro 1. Características generales de los sujetos control y de los casos de gastritis crónica y úlcera gástrica

Característica	Controles n(%)	Casos		Valor de P
		Gastritis crónica n(%)	Úlcera gástrica n(%)	
Edad*	26 (22 - 34)	46 (37 - 58)	55 (45 - 70)	0.0001 [†]
Sexo				
Femenino	65 (63.7)	64 (64)	19 (67.9)	0.917 ^θ
Masculino	37 (36.3)	36 (36)	9 (32.1)	
Escolaridad				
Licenciatura	47 (46.1)	44 (44)	5 (17.9)	< 0.001 ^Ω
Preparatoria	35 (34.3)	17 (17)	3 (10.7)	
Secundaria	10 (9.8)	7 (7)	3 (10.7)	
Primaria	9 (8.8)	24 (24)	9 (32.1)	
Sin estudios	1 (0.9)	8 (8)	8 (28.6)	
Lugar de Origen				
Chilpancingo	44 (43.1)	30 (30)	5 (17.9)	0.021 ^θ
Otros municipios	58 (56.9)	70 (70)	23 (82.1)	
Antecedentes familiares				
No	49 (48.0)	39 (39.0)	22 (78.6)	0.001 ^θ
Si	53 (52.0)	61 (61.0)	6 (21.4)	
Hábito de fumar				
No	39 (38.2)	65 (65)	10 (35.7)	<0.001 ^θ
Fumador actual o ex fumador	63 (61.8)	35 (35)	18 (64.3)	
Consumo de alcohol				
No	14 (13.7)	22 (22)	7 (25)	0.211 ^θ
Si o consumió	88 (86.3)	78 (78)	21 (75)	
Consumo de café				
No	32 (31.4)	54 (54)	15 (53.6)	0.003 ^θ
Si	70(68.6)	46 (46)	13 (46.4)	
Total	102	100	28	

* Edad =se reporta mediana y rango intercuartil; para variables cualitativas se reportan frecuencias simples. [†] Prueba de Kruskal-Wallis; ^θ Prueba de X²; ^Ω Prueba exacta de Fisher

Detección de anticuerpos anti-*H. pylori* en sujetos control

El 59.8% de los sujetos control fueron positivos para IgG, IgM o para ambos anticuerpos y el 16.6% fueron positivos a IgG e IgM, figura 1.

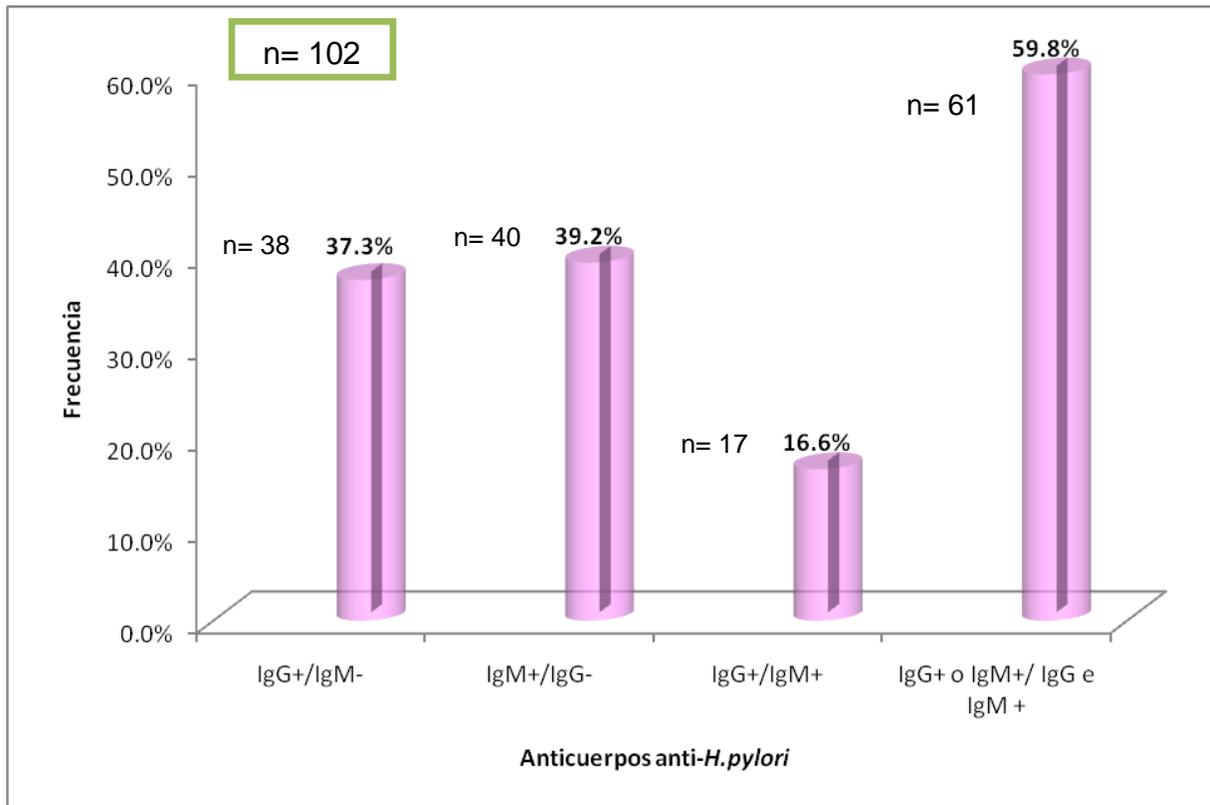


Figura 1. Frecuencia de anticuerpos anti-*H. pylori* en el grupo control.

Detección de *H. pylori* en los casos de gastritis crónica y úlcera gástrica

Para investigar la frecuencia de infección por *H. pylori*, se sometieron a PCR las 128 muestras de DNA total proveniente de biopsias gástricas de los pacientes con gastritis crónica y úlcera gástrica. Las muestras positivas a la infección produjeron una banda de amplificación de la longitud esperada, figura 2.

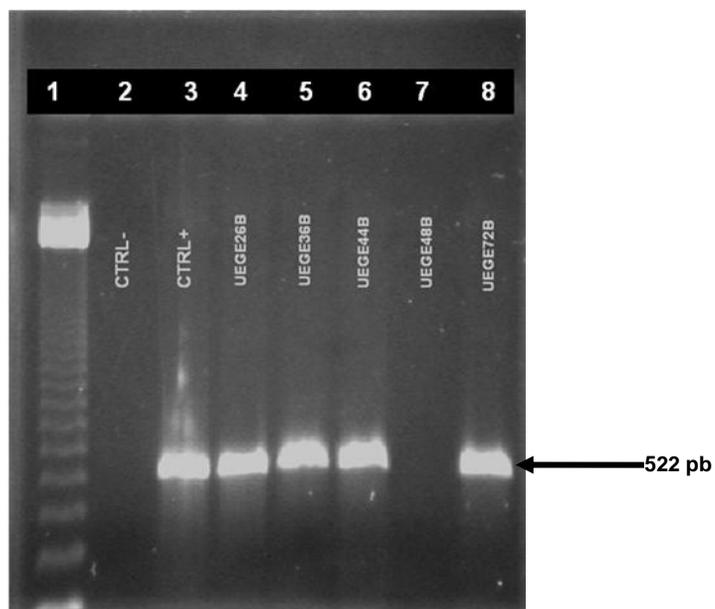


Figura 2. Fragmento de 522 pb del gen RNAr 16S de *H. pylori*. Carril 1: Marcador de peso molecular de 123 pb, carril 2: control negativo, carril 3: control positivo cepa ATCC43504, carril 4, 5, 6 y 8: muestras clínicas positivas a *H. pylori*, carril 7: muestra clínica negativa a *H. pylori*. Gel de agarosa al 1.5%.

El 78.8% de los casos fueron positivos a la presencia de *H. pylori*. En los pacientes con gastritis crónica la frecuencia fue del 77.0% y en úlcera gástrica del 85.7%, figura 3. Las muestras negativas a la detección de *H. pylori*, amplificaron para la región polimórfica -511 del gen de la *IL-1B*; de esta forma se comprobó que el DNA extraído estaba íntegro.

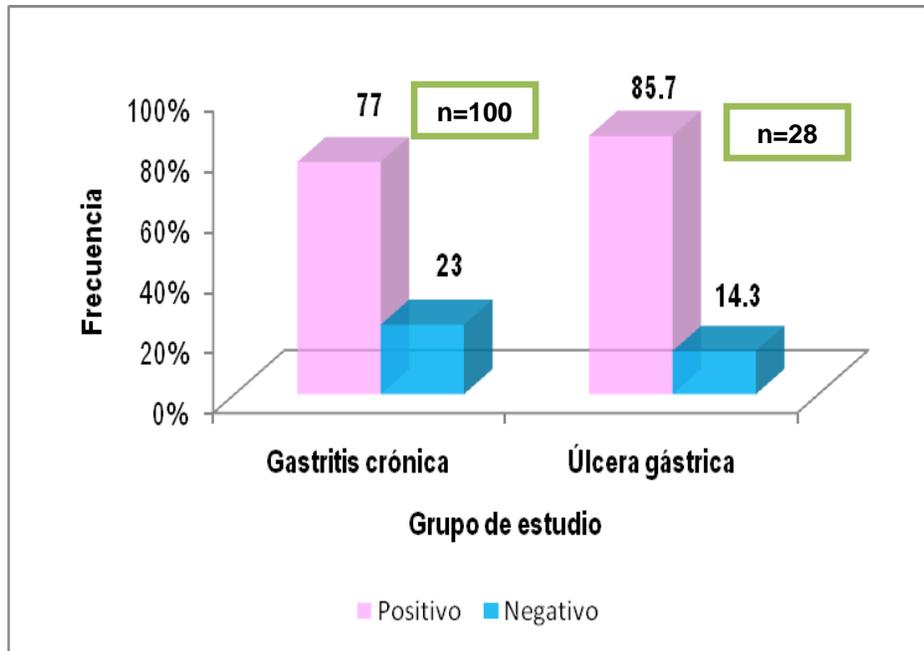


Figura 3. Frecuencia de *H. pylori* en los casos de gastritis crónica y úlcera gástrica.

Genotipificación del gen *vacA* de *H. pylori*

En los pacientes infectados se detectaron genotipos virulentos y no virulentos de *vacA* de *H. pylori*. En la figura 4 se observan dos muestras clínicas una con genotipo *s1m1* y otra *s2m2*, detectados por PCR alelo específica.

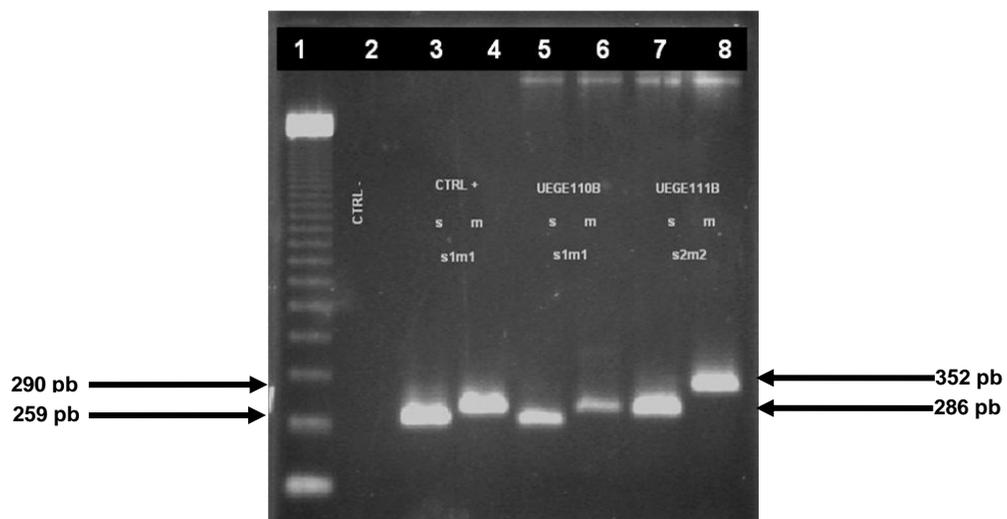


Figura 4. Genotipos de *vacA* de *H. pylori*. Carril 1: Marcador de peso molecular de 123 pb, carril 2: control negativo, carril 3 y 4: control positivo cepa ATCC43504 *s1m1*, carril 5 y 6: muestra clínica genotipo *vacA s1m1*, carril 7 y 8: muestra clínica genotipo *vacA s2m2*. Gel de agarosa al 2%.

En las 101 muestras positivas a *H. pylori*, el genotipo *vacA s1m1* fue el más frecuente con un 43.7% seguido del genotipo *s1m2* con un 21.8%, el 18.8% tenía genotipo *s2m2* y el 14.6% tuvo una co-infección con genotipos *s1m1/s1m2*. La frecuencia por patología gástrica se muestra en el cuadro 2, el alelo *s1* fue el más detectado en los casos de gastritis crónica y úlcera gástrica con un 82.4% y 88% respectivamente, cuadro 2.

Cuadro 2. Frecuencia de genotipos y alelos de *vacA* en los casos de gastritis crónica y úlcera gástrica

Genotipo	Casos		Valor de p
	Gastritis crónica n(%)	Úlcera gástrica n(%)	
<i>s1m1</i>	31 (40.2)	13 (54.1)	0.254 ^Ω
<i>s1m2</i>	16 (20.8)	6 (25.0)	
<i>s2m2</i>	16 (20.8)	3 (12.5)	
<i>s1m1 y s1m2</i>	14 (18.2)	1 (4.2)	
No tipificable *	-	1 (4.2)	
Total	77 (100)	24 (100)	
Alelos			
<i>s1</i>	75 (82.4)	22 (88.0)	0.551 ^Ω
<i>s2</i>	16 (17.6)	3 (12.0)	
Total	91 (100)	25 (100)	
<i>m1</i>	45 (49.5)	14 (58.3)	0.187 ^θ
<i>m2</i>	46 (50.5)	10 (41.7)	
Total	91 (100)	24 [‡] (100)	

* Región señal genotipo *s1* ^Ω Prueba exacta de Fisher

^θ Prueba de X²

[‡] En un caso no se pudo genotipificar el alelo *m*.

Genotipificación del polimorfismo -511 C/T y -31 T/C de la *IL1-B*

La genotipificación del polimorfismo -511 de los 102 DNA del grupo control y los 128 de los casos se hizo por PCR-RFLP's, figuras 5 y 6. Y el SNP en la posición -31 se tipificó por pirosecuenciación, figura 7.

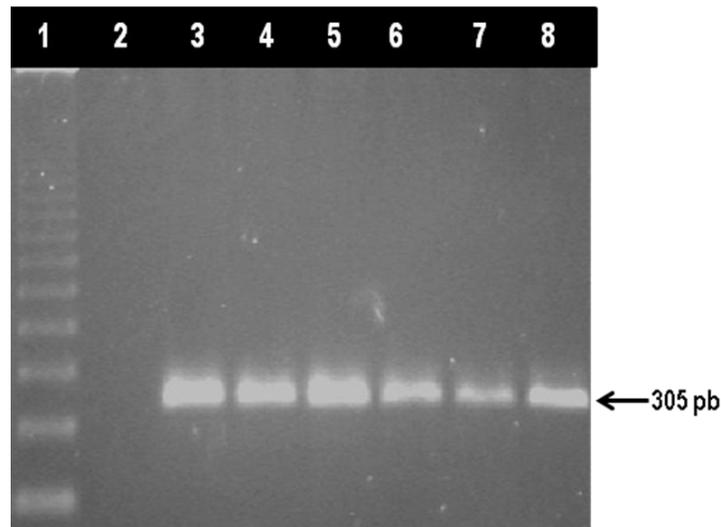


Figura 5. Fragmento de DNA de la región -511 del gen de la *IL-1B*. Carril 1: Marcador de peso molecular de 123 pb, carril 2: control negativo, carril 3-8: muestras positivas a la amplificación de la región -511 de la *IL-1B*. Gel de agarosa al 1.5%.

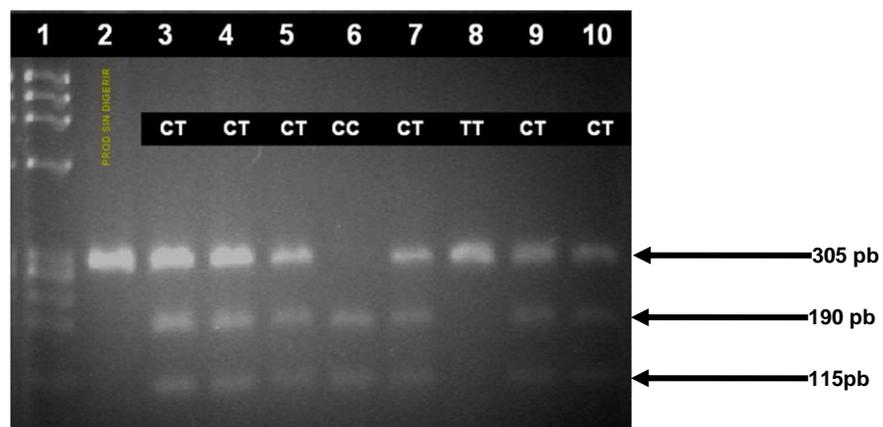


Figura 6. Patrón de restricción para la tipificación del polimorfismo -511 C/T de la *IL-1B*. Identificación del genotipo -511 después de la digestión con *Ava*I en gel de agarosa al 2.5%. Carril 1: Marcador de peso molecular ϕ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments, carril 2: producto de PCR sin digestión, carril 3, 4, 5, 7, 9 y 10: muestras heterocigotas TC, carril 6: muestra homocigota CC, carril 8: muestra homocigota TT.

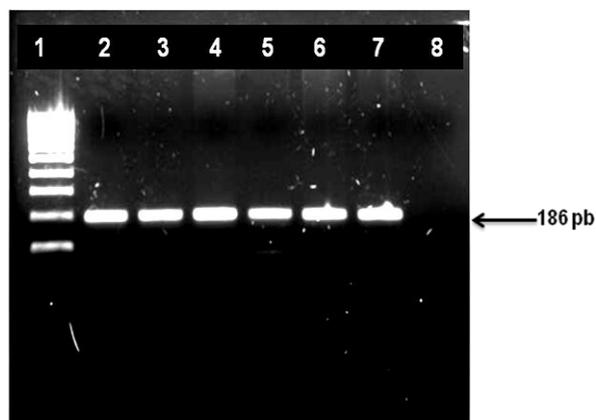


Figura 7. Productos de PCR biotinilados para la genotipificación del polimorfismo -31 T/C de la *IL-1B* por pirosecuenciación. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2-7: muestras positivas a la amplificación de la región -31 de la *IL-1B*, Carril 8: control negativo. Gel de agarosa al 2.0%.

El genotipo más frecuente del SNP-511 fue el CT en los casos de gastritis con un 60% y en los de úlcera con 46.4% y el TT en los sujetos control con un 52%. El alelo más frecuente en los tres grupos fue el alelo T, cuadro 3. Las frecuencias genotípicas en el grupo control se encontraron en equilibrio génico de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg ($X^2=0.479$).

Cuadro 3. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo -511 C/T de la *IL-1B* en los sujetos control y en pacientes con patología gástrica.

Genotipo	Controles n(%)	Casos		Valor de p ^θ
		Gastritis crónica n(%)	Úlcera gástrica n(%)	
CC	10 (9.8%)	9 (9%)	5 (17.9%)	0.015
CT	39 (38.2%)	60 (60%)	13 (46.4%)	
TT	53 (52.0%)	31 (31%)	10 (35.7%)	
Total	102	100	28	
Alelos				
Alelo C	0.289	0.390	0.411	
Alelo T	0.711	0.610	0.589	

^θ Prueba de X^2

Con respecto al SNP -31, en el grupo control el genotipo más frecuente fue el CC con un 51% mientras que en los casos el más frecuente fue el TC con un 52% en gastritis crónica y con 57.1% en pacientes con úlcera gástrica. El alelo más frecuente en los tres grupos fue el alelo C, cuadro 4. Las frecuencias genotípicas en el grupo control estuvieron en equilibrio génico de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg ($\chi^2=0.905$).

Cuadro 4. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo -31 T/C de la *IL-1B* en los sujetos control y en pacientes con patología gástrica.

Genotipo	Controles n(%)	Casos		Valor de p ^Ω
		Gastritis crónica n(%)	Úlcera gástrica n(%)	
TT	8 (7.8%)	17 (17.0%)	2 (7.1%)	0.027
TC	42 (41.2%)	52 (52.0%)	16 (57.1%)	
CC	52 (51.0%)	31 (31.0%)	10 (35.7%)	
Total	102	100	28	
Alelos				
Alelo T	0.284	0.430	0.357	
Alelo C	0.716	0.570	0.643	

^Ω Prueba exacta de Fisher

El análisis del efecto aditivo de los dos polimorfismo de la *IL-1B* indicó que en los sujetos control los genotipos más frecuentes fueron el -511TT/-31CC con un 49% seguido del -511CT/-31TC con un 38.2%, mientras que en los casos los genotipos más frecuentes fueron el -511CT/-31TC con un 48% en los pacientes con gastritis crónica y 42.9% en los pacientes con úlcera gástrica, seguido de la combinación -511TT/-31CC con 29% y 32.1% respectivamente. Al hacer la asociación de los genotipos más frecuentes con las patologías gástricas se encontró una tendencia a la asociación de los genotipos -511CC/-31TC (OR=8.03 IC95% 0.76-85.2) y -511TT/-31TC (OR=6.34 IC95% 0.25-161.8) con la úlcera gástrica, sin embargo ninguna fue estadísticamente significativa (datos no mostrados).

Mediante modelos de regresión logística multinomial se realizó el análisis de asociación de los genotipos de los polimorfismos -511 C/T y -31 T/C de la *IL-1B* con las patologías gástrica. No se encontró asociación estadísticamente significativa de ninguno de los genotipos de ambos SNP's con el desarrollo de gastritis crónica ni con úlcera gástrica, cuadros 5 y 6.

Cuadro 5. Asociación del polimorfismo -511 C/T de la *IL-1B* con la gastritis crónica y úlcera gástrica

Genotipo	Controles n= 102	Casos					
		GC ^a n= 100	RM [©] (IC95%)	RM [@] (IC95%)	UG ^b n= 28	RM [©] (IC95%)	RM [@] (IC95%)
CC	10	9	1.0*	1.0*	5	1.0*	1.0*
CT	39	60	1.71 (0.63- 4.59)	1.44 (0.44-4.80)	13	0.66 (0.19-2.31)	0.66 (0.12-3.52)
TT	53	31	0.64 (0.24-1.77)	0.46 (0.13-1.50)	10	0.38 (0.11-1.34)	0.27 (0.05-1.53)
CT+TT	92	91	1.10 (0.43-2.83)	0.83 (0.26-2.60)	23	0.5 (0.15-1.61)	0.43 (0.09-2.11)

* Categoría de referencia; ^a= Gastritis crónica; ^b= Úlcera gástrica; [©]= crudos; [@]= ajustado por edad, escolaridad, consumo de café, hábito de fumar y antecedentes familiares de GC y/o UG.

Cuadro 6. Asociación del polimorfismo -31 T/C de la *IL-1B* con la gastritis crónica y úlcera gástrica

Genotipo	Controles n= 102	Casos					
		GC ^a n= 100	RM [©] (IC95%)	RM [@] (IC95%)	UG ^b n=28	RM [©] (IC95%)	RM [@] (IC95%)
TT	8	17	1.0 *	1.0 *	2	1.0*	1.0 *
TC	42	52	0.58 (0.22-1.48)	0.43 (0.14-1.31)	16	1.52 (0.29-7.95)	1.91 (0.25-14.2)
CC	52	31	0.28 (0.10-0.72)	0.18 (0.06-0.60)	10	0.70 (0.09-5.50)	0.80 (0.11-5.80)
TC+CC	94	83	0.42 (0.17-1.01)	0.30 (0.10-0.83)	26	1.11 (0.22-5.53)	1.2 (0.17-8.32)

* Categoría de referencia ^a= Gastritis crónica; ^b= Úlcera gástrica; [©]= crudos; [@]= ajustado por edad, escolaridad, consumo de café, hábito de fumar y antecedentes familiares de GC y/o UG.

Para evaluar la interacción entre los genotipos de *H. pylori* y de la *IL-1B*, comparamos la combinación de las frecuencias de los genotipos bacteria/hospedero en los casos de úlcera gástrica tomando al grupo de gastritis crónica como grupo de referencia, mediante un modelo de interacción multiplicativo analizado por regresión logística, se encontró que aquellos pacientes con gastritis crónica portadores del alelo C en la posición -31 del gen de la *IL-1B* y que están infectados con *H. pylori vacA s1m1* tienen 4.4 (IC95% 1.02-19.2) veces la posibilidad de desarrollar úlcera gástrica en comparación con aquellos pacientes con gastritis crónica portadores del alelo T e infectados con *H. pylori vacA s2m2* o con uno de los genotipos de riesgo de la bacteria. No se encontró asociación de los genotipos de *vacA* de *H. pylori* y del SNP-511 de la *IL-1B* con la úlcera gástrica, cuadro 7.

Cuadro 7. Interacción de los genotipos *vacA* de *H. pylori* y de la *IL-1B* en pacientes con gastritis crónica y úlcera gástrica.

Genotipos <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> y del SNP-511 de la <i>IL-1B</i>	Gastritis crónica n=100	Úlcera gástrica n=28	RM[®] (IC95%)	RM[®] (IC95%)
s2m2/CC/portador T [¶] / s1m1/m2/CC	19	6	1.0*	1.0*
s1m2/portador T	16	6	1.20 (0.32-4.41)	1.22 (0.25-5.90)
s1m1/portador T	28	10	1.30 (0.35-3.63)	1.40 (0.33-5.60)
s1m1/m2/portador T	14	1	0.23 (0.02-2.10)	0.24 (0.02-2.63)
Genotipos <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> y del SNP-31 de la <i>IL-1B</i>				
s2m2/TT/portador C ^{¶¶} / s1m1/m2/TT	28	4	1.0*	1.0*
s1m2/portador C	13	6	3.23 (0.78-13.4)	3.73 (0.68-20.3)
s1m1/portador C	24	12	3.5 (0.99-12.3)	4.43 (1.02-19.2)
s1m1/m2/portador C	12	1	0.60 (0.06-5.78)	0.80 (0.06-9.51)

[¶]Se incluyen homocigotos T y heterocigotos; ^{¶¶}Se incluyen homocigotos C y heterocigotos; * Categoría de referencia [®]= crudos; [@]= ajustado por edad, hábito de fumar y antecedentes familiares de gastritis crónica y/o úlcera gástrica.

6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

La infección por *H. pylori* está asociada al desarrollo de gastritis crónica y de enfermedad ulceropéptica, carcinoma gástrico y linfoma tipo MALT. *H. pylori* puede causar gastritis crónica en todos los pacientes, sin embargo, no todos los individuos infectados desarrollan una patología gástrica más severa. Existe una marcada diferencia entre el número de individuos colonizados y aquellos con síntomas clínicos. Es probable que pacientes infectados con genotipos *s2m2* desarrollen solo una gastritis leve a lo largo de su vida, mientras que pacientes infectados con genotipos *s1m1* o *s1m2*, tienen mayor probabilidad de desarrollar enfermedad ulceropéptica, gastritis atrófica y eventualmente cáncer gástrico. La carcinogénesis gástrica es un proceso complejo y multifactorial, en el cual la persistencia de la infección por *H. pylori* puede jugar un papel importante ²³. El INEGI reporta que en México, en el año 2006, el cáncer gástrico ocupa el tercer lugar como causa de muerte por tumor maligno en el sexo masculino y el cuarto lugar en el sexo femenino ¹.

Las lesiones precursoras del cáncer gástrico, como la gastritis y la úlcera gástrica, son patologías frecuentes en la población mexicana, ocupando estas la cuarta posición a nivel nacional y el sexto lugar en el estado de Guerrero como causa de morbilidad en 2006 de acuerdo a los datos reportados por la Secretaría de Salud ¹. En este estudio encontramos que en los casos de gastritis crónica y úlcera gástrica, la edad coincide con lo reportado por la SSA, que informa que a nivel nacional y estatal se presentan casos de gastritis y úlcera a los 10 años. Se encontraron cinco casos de gastritis en menores de 20 años de edad, uno de los cuales tenía 11 años de edad, en cuanto al grupo de úlcera gástrica no encontramos casos que fueran menores de 20 años.

Se encontró una frecuencia del 59.8% de anticuerpos IgG, IgM o ambos contra *H. pylori* en el grupo control, porcentaje ligeramente superior a lo encontrado por Díaz *et al.*, 2006 ²⁴ en una población asintomática de Chilpancingo Gro, quienes reportaron una frecuencia del 54.4%. La frecuencia de anticuerpos IgG anti-*H. pylori* en el grupo

control fue del 37.3% menor a la informada por Leal *et al.*, 1999²⁵, que fue del 66% a nivel nacional; esta diferencia puede ser debida al método empleado para la detección de anticuerpos. En el estudio de Leal *et al.*²⁵, emplearon una técnica de ELISA no comercial que emplea antígeno obtenido de cepas circulantes en México y en este estudio se utilizó un kit comercial de una compañía extranjera (International Immuno-Diagnostics, California, EU) que emplea antígeno de cepas que probablemente no circulen en nuestra población. Encontramos que el 16.6% de los controles fueron positivos a IgG e IgM, porcentaje menor al 43.9%, reportado por Garza *et al.*, 2006²⁶ quienes analizaron a personal médico residente del Hospital Universitario de Puebla. Esta diferencia en las frecuencias puede deberse a las características de la población estudiada; en el estudio de Garza *et al.*,²⁶ la mayoría de los participantes fueron del sexo masculino (54.4%) y en el presente estudio participaron más mujeres (63.7%), esto podría ser debido a que en general los hombres ejercen con mayor libertad su sexualidad; las diferencias en la ocupación y la distribución geográfica de las poblaciones analizadas también podría estar influyendo en las diferencias de las frecuencias de anticuerpos. La presencia prolongada de *H. pylori* en personas asintomáticas puede ser un factor importante en la aparición de gastritis crónica que al no ser tratada puede evolucionar a una gastritis atrófica o alguna otra lesión precursora de cáncer gástrico.

El mosaicismo en la región s y m de *vacA* puede jugar un papel importante en la cadena de eventos que conducen a la carcinogénesis. Algunos estudios han mostrado que los genotipos s de *vacA* están asociados con la enfermedad en pacientes de diferentes países aunque en otros no se han confirmado estos hallazgos^{20,23}. En el presente estudio, en pacientes con gastritis crónica y úlcera gástrica encontramos una frecuencia de *H. pylori* del 78.9% (101/128); en aquellos con gastritis crónica fue del 77% y el 85.7% en pacientes con úlcera gástrica. Estas frecuencias fueron mayores a las de Chang *et al.*, 2006⁸, en población taiwanesa, quienes reportaron una frecuencia del 36.4% en pacientes con gastritis crónica y del 56.1% en pacientes con úlcera gástrica, son superiores también a las encontradas por López *et al.*²⁷, en 2008 en población mexicana quienes reportaron una

frecuencia del 38% en pacientes con cáncer gástrico y el 26% en pacientes con dispepsia no ulcerosa y/o reflujo gastroesofágico. En los pacientes infectados el genotipo *s1m1* fue el más frecuente con un 43.7%, frecuencia más alta a la encontrada por Nogueira *et al*²³, en 2001 en población portuguesa (39.1%). En población colombiana Nogueira encontró una frecuencia del 88.2% del genotipo *s1m1*, superior a la que se encontró en este estudio. Quiroga *et al.*, 2006²⁸, en población de Colombia reportaron que en 157 asilamientos de pacientes con patología gástrica, el genotipo *vacA* más frecuente fue el *s1m1* con un 67.5%, seguido por el *s2m2* con un 28.7% y con un 3.8% del *s1m2*. En este estudio encontramos que en pacientes con gastritis crónica y úlcera gástrica, el genotipo más frecuente fue el *s1m1* con un 40.2% y 54.1% respectivamente; estas frecuencias son más bajas que las reportadas por Caricio *et al.*, 2005⁷ en población del Norte de Brasil, donde reportaron una frecuencia del 62.1% para el genotipo *s1m1* en pacientes con gastritis y del 92.6% en pacientes con enfermedad úlcero péptica. Garza *et al.*, 2004²⁹ en población del Noreste de México reportaron una frecuencia del genotipo *s1m1* del 32.6%, seguido del *s2m2* con un 30.2% en pacientes con dispepsia no ulcerosa y en pacientes con enfermedad úlcero péptica el genotipo más frecuente fue el *s1m1* con un 57.1% y el 28.6% de *s2m2*; a diferencia de lo reportado por Garza *et al.*, en este estudio encontramos una baja frecuencia del genotipo *s2m2*; con estos resultados se confirma que la distribución geográfica de los genotipos de *H. pylori* varía entre países y también existen diferencias dentro del mismo país.

Las frecuencias de genotipos de *vacA* de *H. pylori* indican que en la población estudiada están circulando los genotipos *s1m1* y *s1m2*, por ello, esta población podría estar en mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico ya que está bien documentado que estos genotipos son productores de mayores cantidades de citotoxina vacuolizante en comparación con los genotipos *vacA s2m1* y *s2m2*. Se ha demostrado *in vitro* que las cepas con genotipo *s1* secretan grandes cantidades de citotoxina que las cepas *s2*, las cuales son conocidas por ser menos virulentas. Las cepas *m1* son las más frecuentemente asociadas con el daño epitelial, la genotipificación de la región media de *vacA* es la más importante para correlacionar

con los niveles de la citotoxina *in vitro*. Los niveles altos de la citotoxina causa daño epitelial, formación de vacuolas intracelulares, induce cambios en el citoesqueleto de las células, apoptosis, entre otros eventos que son factores que influyen en el desarrollo de enfermedad úlcero péptica o adenocarcinoma gástrico ^{6,7,8}.

Debido a que solo un pequeño porcentaje de pacientes infectados desarrollan alguna malignidad, es interesante realizar la identificación del genotipo de *vacA* y los marcadores genéticos del hospedero asociados con el desarrollo del cáncer gástrico. Varios estudios han reportado una correlación positiva entre los polimorfismo de la *IL-1B* y la hipoclorhidria, atrofia gástrica y carcinoma durante la infección crónica por *H. pylori* ^{12, 32,33, 35}.

En este estudio, además de tipificar el gen *vacA* de *H. pylori*, analizamos los polimorfismos -511 C/T y -31 T/C de la *IL-1B* en pacientes con gastritis crónica, úlcera gástrica y en personas asintomáticas del estado de Guerrero. Encontramos frecuencias altas de los genotipos de riesgo (-511TT/-31CC) de ambos polimorfismos. No podemos hacer una buena comparación con otros datos, debido a que en la mayoría de los estudios realizados han asociado a ambos polimorfismos con el desarrollo de cáncer gástrico teniendo generalmente como grupo de comparación a pacientes con gastritis crónica. El genotipo CT del SNP -511 fue encontrado con mayor frecuencia en pacientes con gastritis crónica (60%) y úlcera gástrica (46.4%) y el TT en el grupo control (52%); del SNP-31, el genotipo TC fue el mas encontrado en los casos de gastritis (52%) y úlcera gástrica (57.1%) y en los controles fue el CC con un 52%. No encontramos asociación significativa de los genotipos de estos SNP's con la gastritis crónica ni la úlcera gástrica. Zeng *et al.*, 2003 ³⁰, reportaron que en población de China el genotipo más frecuente del SNP-511 fue el CT en casos de cáncer gástrico (52.9%) y en controles (48.5%) y para el SNP-31 fue CC con un 77.7% en los casos y 78.7% en controles, datos similares fueron reportados por Kamangar *et al.*, 2006 ³¹, en población finlandesa para los dos polimorfismos, y no encontraron asociación con cáncer gástrico. Ruzzo *et al.*, 2005 ³², encontraron asociación del genotipo -511TT OR= 3.2 (IC95% 1.27-8.05) con el

cáncer gástrico y El-Omar *et al.*, 2000³³, encontraron que personas portadoras del genotipo -511CT tienen 1.8 (IC95% 1.3-2.4) veces más la posibilidad de desarrollar cáncer gástrico en comparación con aquellas personas portadoras del genotipo -511CC y que personas portadoras del genotipo -511 TT tienen 2.6 (IC95% 1.7-3.9) veces más esa posibilidad.

Se ha reportado un estudio del SNP-511 y uno del -31 de la *IL-1B* en población del continente americano, uno en Honduras en 2006 por Morgan *et al.*,³⁴ y otro en México en 2005 por Garza *et al.*,³⁴ ambos asociando los polimorfismos con cáncer gástrico. Morgan *et al.*,³⁴ en población hondureña reportaron que el polimorfismo -511 no se asocia con el desarrollo de cáncer gástrico, datos que coinciden con lo encontrado en el presente estudio, donde no se encontró asociación del SNP -511 C/T con la gastritis crónica ni úlcera gástrica. En México Garza *et al.*,³⁵ en población del noreste de México analizaron el SNP -31 y encontraron que los portadores del alelo -31C tienen 7.6 (IC95% 1.73-46.9) veces más la posibilidad de desarrollar cáncer gástrico en comparación con los portadores del genotipo -31TT, y que al parear por edad y sexo se incrementó el riesgo a 8.05 (IC95% 1.8-50.2), sin embargo en la población guerrerense al igual que con el polimorfismo -511 no encontramos asociación del SNP -31 T/C con la gastritis crónica ni la úlcera gástrica.

Los datos encontrados en este estudio, sugieren que los polimorfismos -511 C/T y -31 T/C de la *IL-1B* de forma independiente no están siendo un factor de predisposición genética para el desarrollo de gastritis crónica y úlcera gástrica, sin embargo sugerimos realizar estudios posteriores, en los cuales se considere aumentar el tamaño de la muestra para poder confirmar la falta de asociación de estos SNP's en la población guerrerense.

Al asociar los genotipos de *H. pylori* y los de la *IL-1B* con la úlcera gástrica, encontramos que aquellos pacientes con gastritis crónica portadores del alelo C en la posición -31 del gen de la *IL-1B* infectados con *H. pylori* genotipo *vacA s1m1* tienen 3.5 (IC95% 0.99-12.3) veces la posibilidad de desarrollar úlcera gástrica en

comparación con aquellos pacientes con gastritis crónica portadores del alelo T e infectados con *H. pylori vacA s2m2* o con uno de los genotipos de riesgo de la bacteria, y que al ajustar por edad, hábito de fumar y antecedentes familiares de gastritis crónica y/o úlcera gástrica se incrementa a 4.4 (IC95% 1.02-19.2) siendo estadísticamente significativo. Estos datos apoyan la hipótesis de que el daño en el epitelio gástrico puede estar relacionado con las diferencias en los genotipos de *H. pylori*, la respuesta inflamatoria gobernada por la genética del hospedero, y la interacción entre los determinantes del hospedero y la bacteria. La combinación de esos factores, favorece una respuesta inflamatoria de altas magnitudes, que puede eventualmente resultar en hipoclorhidria, atrofia y un incremento en el riesgo de cáncer gástrico ³⁶.

La IL-1 β , la cual está sobre regulada durante la infección crónica por *H. pylori*, es un poderoso inhibidor de la secreción de ácido gástrico. Este efecto antisecretor esta mediado a través de la inhibición de la función de las células gástricas parietales y las células parecidas a enterocromafina (ECL). La IL-1 β impide la secreción de histamina por las células ECL en el cuerpo gástrico vía mecanismos dependientes de NO y por la inducción de la apoptosis de las células ECL. Este fenómeno indica que la IL-1 β tiene un papel crucial en el desarrollo la hipoclorhidria gástrica. La alta secreción de IL-1 β en los pacientes conduce a reducir la secreción de ácido gástrico y una subsecuente colonización bacteriana del cuerpo¹². Nuestro estudio apoya el modelo multifactorial de la carcinogénesis gástrica, en el cuál tanto los factores de virulencia de *H. pylori* como los polimorfismos de la *IL-1B* son factores importantes para la progresión a cáncer; los genotipos virulentos de la bacteria son los responsables de los cambios histopatológicos de la mucosa gástrica y los polimorfismos de la *IL-1B* potencian el daño.

La carga genética para la producción del ácido gástrico juega un papel importante en la determinación de la topografía de la colonización por *H. pylori* y en el desarrollo de cáncer gástrico asociado a la gastritis de cuerpo. Se han estudiado otros factores genéticos del hospedero como el antígeno leucocitario humano, polimorfismos en

citocinas como *TNF-A*, *IL-1A*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-8RA*, *IL-8RB*, *IL-10*, así como en *CD14*, *CXCR*, *MTHFR*, *p16*, *p53*, *p21*, entre otros, los resultados varían de acuerdo a la población estudiada y en unos estudios han encontrado asociación con el cáncer gástrico y en otros no ^{13, 31, 36}.

Una de las limitaciones de este estudio fue la selección del grupo control ya que estos fueron seleccionados únicamente en base a la ausencia de sintomatología clínica de dispepsia y no hay evidencia que nos confirme que no presentan alguna alteración en la mucosa gástrica, por lo que sería importante que en estudios posteriores se considerara la posibilidad de hacer la asociación con cáncer gástrico para poder hacer una mejor comparación de los resultados publicados a nivel mundial.

En conclusión, la presencia de los polimorfismos de la *IL-1B* no es un factor causal único en el desarrollo de gastritis crónica y úlcera gástrica, pero al estar presentes los genotipos de riesgo de la citocina y la infección por *H. pylori* con genotipos virulentos, el daño a la mucosa gástrica se incrementa, lo que sugiere que si una persona está infectada con *H. pylori vacA s1m1* y es portadora del alelo *-31C* tiene un mayor riesgo de desarrollar úlcera gástrica que aquella que esté infectada con genotipos no virulentos de la bacteria y portadoras del alelo *-31T*. La genotipificación de la bacteria y del perfil genético de riesgo del hospedero puede ayudar a identificar a individuos que estén en mayor riesgo de desarrollar lesiones precursoras y cáncer gástrico.

7. REFERENCIAS

1. Información epidemiológica de morbilidad 2006, versión ejecutiva. Secretaría de Salud. Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. Dirección General de Epidemiología.
2. Atherton JC. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induce gastro-duodenale diseases. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2006; 1:63-96.
3. Peek RM, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nature* 2002; 2:28-37.
4. Berroteran A, Perrone M, Correnti M, Cavazza M, Tombazz C, Goncalvez R, et al. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the oral cavity and gastroduodenal system of Venezuelan population. *J Med Microbiol* 2002; 51: 764–770
5. Strömberg E, Edebo A, Svennerholm M, Lindholm C. Decreased epithelial cytokine responses in the duodenal mucosa of *Helicobacter pylori* – Infected duodenal ulcer patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10:116-124.
6. Marciorowska E, Roszko I, Kowalczyk O, Kaczmarek M, Chyczewski L, Kemona A. The evaluation of *vacA* gene alleles frequency in *Helicobacter pylori* strains in children and adults in Podlaskies region. *Folia Histochem Cytobiol* 2007; 45(3): 215-219.
7. Caricio L, Oliveira TC, Demachki S, Araujo M, Baraúna M, Araujo SC, et al. Clinical and pathological importance of *vacA* allele heterogeneity and *cagA* status in peptic ulcer disease in patients from North Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100 (8): 875-881.
8. Chang YH, Wang L, Lee MS, Cheng CW, Wu CY, Shiao MY. Genotypic Characterization of *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* from Biopsy Specimens of Patients with Gastroduodenal Diseases. *Mt Sinai J Med* 2006; 73(3): 622-626.
9. Kominato Y, Galson DL, Waterman WR, Webb AC, Auron PE. Monocyte expression of the human prointerleukin 1 β gene (*IL1B*) is dependent on promoter sequences which bind the hematopoietic transcription factor Spi-1/PU.1. *Mol Cell Biol* 1995; 15:58-68.
10. Dinarello CA. Biology of interleukin 1. *FASEB J* 1988; 2: 108-115.
11. Yamanaka N, Morisaki T, Nakashima H, Tasaki A, Kubo M, Kuga H, et al. Interleukin-1 β enhances invasive ability of gastric carcinoma through Nuclear Factor- κ B activation. *Clin Cancer Res* 2004; 10:1853-1859.
12. Rad R, Prinz C, Neu B, Neuhofer M, Zeitner, Volland P, et al. Synergistic effect of *Helicobacter pylori* virulence factors and interleukin-1 polymorphisms for the developed of severe histological changes in the gastric mucosa. *JID* 2003; 188: 272-280.
13. Perez GI, Garza E, Portal C, Olivares A. Role of cytokine polymorphisms in the risk of distal gastric cancer development. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14 (8): 1869-1873.
14. Santtila S, Savinainen K, Hurme M. Presence of the IL-1RA allele 2 (IL1RN*2) is associated with enhanced IL-1 β production in vitro. *Scand J Immunol* 1998; 47: 195-198.
15. Hsu PI, Li CN, Tseng HH, Lai KH, Hsu PN, Lo GH, et al. The *Interleukin-1 RN* Polymorphism and *Helicobacter pylori* Infection in the Development of Duodenal Ulcer. *Helicobacter* 2004; 9(6): 604-613.
16. Al-Moundhri MS, Al-Nabhani M, Al-Bahrani B, Burney IA, Al-Madhani A, Ganguly SS, et al, Interleukin-1 β gene (*IL-1B*) and interleukin 1 receptor antagonist gene (*IL-1RN*)

- polymorphisms and gastric cancer risk in an Omani Arab population. *Gastric Cancer* 2006; 9: 284-290.
17. El-Omar EM. The importance of interleukin 1 β in *Helicobacter pylori* associated disease. *Gut* 2001; 48:743-747.
 18. Sambrook J, Russel D. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 3ra ed. Col Spring Harbor Laboratory Press. EU. 2001.
 19. Ho SA, Hoyle JA, Lewis FA, Secker AD, Cross D, Mapstone NP, et al. Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. *J Clin Microbiol* 1991; 29(11): 2543-2549.
 20. Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, R, Tummuru MKR, Blasser MJ, Cover TL. Mosaicism in Vacuolating Cytotoxin Alleles of *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1995; 270: 17771-17777.
 21. Park CY, Kwak M, Gutierrez O, Graham DY, Yamaoka Y. Comparison of Genotyping *Helicobacter pylori* Directly from Biopsy Specimens and Genotyping from Bacterial Cultures. *J Clin Microbiol* 2003; 41(7): 3336–3338.
 22. Pérez-Pérez GI, Portal-Celhay C, Bosques-Padilla FJ, Garza-González E. Desarrollo de un protocolo de pirosecuenciación para la tipificación del polimorfismo -31 del gen de la interleucina 1 β en el estudio del riesgo al desarrollo de cáncer gástrico. *Rev Gastroenterol Mex* 2007; 72(1): 136-140.
 23. Nogueira C, Figueiredo C, Taveira A, Barreira R, Figueira P, Salgado C, et al. *Helicobacter pylori* Genotypes May Determine Gastric Histopathology. *Am J Pathol* 2001, 158: 647-654.
 24. Díaz-Mata D, Sánchez-Tacuba C, Flores-Alfaro E, Salgado-Bernabé A, Román-Román A, Fernández-Tilapa G. Prevalencia de anticuerpos IgG e IgM anti-*Helicobacter pylori* en personas sin sintomatología gástrica de la ciudad de Chilpancingo, Guerrero. *Revista Salud Pública y Nutrición (RESPYN) Edición especial* 2007;8(7):1-6 ISSN1870-0160
 25. Leal-Herrera Y, Torres J, Pérez-Pérez G, Gómez A, Monath T, Tapia-Conyer R, et al. Serologic IgG Response to Urease in *Helicobacter pylori*-Infected persons from Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60(4): 587–592.
 26. Garza-Yado MA, López-García AI, Paz-Martínez D, Galindo-García JA, Cuevas-Acuña MT, Papaqui-Tapia S, et al. Prevalencia de seropositividad a anticuerpos IgG e IgM contra *Helicobacter pylori* en el personal médico residente del Hospital Universitario de Puebla. *Revista Alergia México* 2006; 53(2): 69-72.
 27. López-Vidal Y, Pince-de-León S, Castillo-Rojas G, Barreto-Zuñiga R, Torre-Delgadillo A. High diversity of *vacA* and *cagA* *Helicobacter pylori* Genotypes in Patients with and without Gastric Cancer. *PLoS ONE* 2008;3(12):e3849.
 28. Quiroga AJ, Cittelly DM, Bravo MM. Frecuencia de los genotipos *babA2*, *oipA* y *cagE* de *Helicobacter pylori* en pacientes colombianos con enfermedades gastroduodenales. *Biomédica* 2005; 25: 325-334
 29. Garza-González E, Bosques-Padilla FJ, Tijerina-Menchaca R, Pérez-Pérez GI. Characterisation of *Helicobacter pylori* isolates from the north-eastern region of Mexico. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 41–45.
 30. Zeng ZR, Hu PJ, Hu S, Pang RP, Chen MH, Ng M, et al. Association of interleukin 1B gene polymorphism and gastric cancer in high and low prevalence regions in China. *Gut* 2003; 52: 1684-1689.
 31. Kamangar F, Abnet CC, Hutchinson AA, Newschaffer CJ, Helzlsouer K, Shugart YY, et al. Polymorphisms in inflammation-related genes and risk of gastric cancer (Finland). *Cancer Causes Control* 2006; 17:117-125.
 32. Ruzzo A, Graziano F, Pizzagalli F, Santini D, Battistelli V, Panunzi S, et al. Interleukin 1B gene (*IL-1B*) and interleukin 1 receptor antagonist gene (*IL-1RN*) polymorphisms

- in *Helicobacter pylori*-negative gastric cancer of intestinal and diffuse histotype. *Ann of Oncol* 2005; 16: 887-892.
33. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Breamk JH, Young HA, et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000; 404:398– 402.
 34. Morgan DR, Dominguez RL, Keku TO, Heidt PE, Martin CF, Galanko JA, et al. Gastric Cancer and the High Combination Prevalence of Host Cytokine Genotypes and *Helicobacter pylori* in Honduras. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4 (9): 1103-1111.
 35. Garza-González E, Bosques-Padilla FJ, El-Omar EM, Hold G, Tijerina-Menchaca R, Maldonado-Garza HJ, Pérez-Pérez GI. Role of the polymorphic *IL-1B*, *IL-1RN* and *TNF-A* genes in distal gastric cancer in Mexico. *Int J Cancer* 2005; 114: 237-241.
 36. Figueiredo C, Seruca R, Sousa S, Carvalho R, Capelinha AF, Quint W, et al. *Helicobacter pylori* and Interleukin 1 Genotyping: An Opportunity to Identify High-Risk Individuals for Gastric Carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94 (22): 1680-1686.
 37. Hamajima N, Naito M, Kondo T, Goto Y. Genetic factors involved in the development of *Helicobacter pylori*-related gastric cancer. *Cancer Sci* 2006; 97(11): 1129-1138.
 38. Agah A, Aghajan M, Mashayekhi F, Amini S, Davis RW, Plummer JD, et al. A multi-enzyme model for pyrosequencing. *Nucleic Acids Research* 2004; 32(21): 1-15.

8. ANEXOS



Anexo 1.
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
Laboratorio de Investigación Clínica



Av. Lázaro Cárdenas S/N, Ciudad Universitaria. Chilpancingo, Gro. Tel/Fax 01747 4 725503

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Diagnóstico molecular de infección por *Helicobacter pylori*

Al firmar este documento, doy mi consentimiento para que me entreviste un miembro del personal del Laboratorio de Investigación Clínica de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, ubicada en Av. Lázaro Cárdenas S/N, Chilpancingo, Gro. Entiendo que la entrevista aportará información útil para interpretar los resultados que se obtengan en los exámenes de laboratorio que se me practicarán y también formará parte de los resultados de un proyecto de Investigación. Este estudio proporcionará datos que ayudarán a que se me indique el tratamiento adecuado.

Entiendo que seré entrevistado(a), en los horarios que se me indiquen o que así convengan, se me harán unas preguntas familiares, personales y de salud. Entendiendo que se me tomará una muestra de saliva, placa dentobacteriana (de los órganos dentarios) y biopsia gástrica suficiente para los estudios de laboratorio. La entrevista durará entre 10 y 20 minutos, también estoy enterado (a) que el entrevistador (a) puede ponerse en contacto conmigo en el futuro, a fin de obtener más información.

Entendiendo que fui elegido (a) para participar en este proyecto debido a que cubría todas las características evaluadas. Se me ha dicho que las respuestas a mis preguntas y demás información obtenida no serán reveladas a nadie y que en ningún informe de este estudio se me identificará jamás en forma alguna.

Como compensación por cualquier esfuerzo o molestia relacionados con mi participación en este estudio me serán proporcionados los resultados de los análisis practicados, sin costo alguno.

Entiendo que en caso de que tenga alguna pregunta acerca del estudio o sobre mis derechos como participante, debo buscar a la Dra. Gloria Fernández Tilapa y al M en C. Adolfo Román Román, en el Laboratorio de Investigación Clínica de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la UAG. Teléfono 4726977

Nombre y firma del participante

Nombre y firma del entrevistador (a)

Fecha

Anexo 2

ENCUESTA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
Laboratorio de Investigación Clínica

Av. Lázaro Cárdenas S/N, Ciudad Universitaria. Chilpancingo, Gro. Tel/Fax 01747 4 725503



Diagnóstico molecular de infección por *Helicobacter pylori*

DATOS GENERALES

Nombre del paciente:	
	edad
Dirección: _____ Calle y número	Colonia
Lugar de origen: _____ Años de vivir en Chilpancingo (en caso que no hayan nacido en esta ciudad): _____	
Ocupación: _____	
Teléfono: _____	
Diagnóstico endoscópico: _____	
Tipo de muestras tomadas: () Saliva () Placa () Biopsia: _____	
Institución de salud: 1. ISSSTE 2. IMSS 3. Unidad de endoscopia	

PERFIL SOCIOECONÓMICO

1. Su casa es rentada o propia	1. Rentada 2. Propia 3. Otro, especifique _____ 01. NS 02. NR	
2. ¿Cuántos cuartos tiene su casa? (sin contar la cocina)	_____ cuartos	
3. ¿Cuántas personas viven en su casa?	_____ personas	
4. ¿Qué edad tienen?	1. _____ 0-5 años 2. _____ 6-12 años 3. _____ 13 y mas años	1. _____ 2. _____ 3. _____

	01. NS 02. NR 03. NA	
5. ¿Usted tiene agua entubada en su casa?	1. Si 2. No 3. Otro, especifique_____	
6. ¿Tiene WC / letrina propia para su familia o donde hace sus necesidades?	1. WC(con agua corriente) 2. Letrina 3. Otro, especifique_____	
7. ¿Tiene mascotas en su casa?	1. Si 2. No	
8. ¿Qué tipo de mascota?		

ESCOLARIDAD

1. Sabe leer y escribir	1. Solamente leer 2. Leer y escribir 3. No	
2. ¿Qué grado de escolaridad tiene?	00. Sin estudios 1. Primaria 2. Secundaria 3. Técnica 4. Preparatoria 5. Profesional, especifique_____	

HÁBITOS

1. Ha fumado alguna vez en su vida	1. Si 2. No (pasar a la pregunta 5)	
2. Fuma actualmente	1. Si 2. No 03. NA	
3. ¿A qué edad empezó a fumar?	_____ años 03. NA	
4. ¿Cuántos cigarros fuma al día?	_____ cigarros 03. NA	
5. Ha ingerido bebidas alcohólicas alguna vez en su vida	1. Si 2. No (pasar a la pregunta 8)	
6. Ingiere bebidas alcohólicas actualmente	1. Si 2. No 03. NA	
7. Con que frecuencia lo hace	_____ días	
8. Ingiere refrescos con gas	1. Si 2. No (pasar a la pregunta 10)	

9. ¿Cuántas veces al día?	_____ veces	
10. Toma café	1. Si 2. No (pasar a la pregunta 12)	
11. ¿Cuántas veces al día?	_____ veces	
12. ¿Cuántas veces come al día?	_____ veces	
13. ¿Qué comidas son las que realiza y a qué hora?	1. Desayuno: hora _____ 2. Almuerzo: hora _____ 3. Comida: hora _____ 4. Cena: hora _____ 01. NS 02. NR 03. NA	1. _____ 2. _____ 3. _____ 4. _____
14. Consumía comidas picantes	1. Si 2. No	
15. Consume comidas picantes actualmente	1. Si 2. No (Pasar a la pregunta 17)	
16. ¿Cuántas veces a la semana?	_____ veces 01. NS 02. NR 03. NA	
17. Consume salsas envasadas o enlatadas	1. Si 2. No (pasar a la pregunta 19)	
18. ¿Cuántas veces a la semana?	_____ veces	
19. Consume alimentos en la calle	1. Si 2. No (pasar a la pregunta 23)	
20. ¿Cuántas veces a la semana?	_____ veces 03. NA	
21. ¿Qué tipo de alimentos?	_____ 03. NA	
22. Consume verduras crudas con estos alimentos	1. Si 2. No 03. NA	
23. Consume fruta que preparan en la calle	1. Si 2. No (pasar a la pregunta 25)	
24. ¿Cuántas veces a la semana?	_____ veces	

25. Consume alguno de los siguientes alimentos y cuantas veces ala semana	1. Adobo: _____ veces 2. Chorizo: _____ veces 3. Chicharrón: _____ veces 4. Carne de puerco: _____ veces 5. Mole rojo: _____ veces 6. Pozole _____ veces 01. NS 02. NR 03. NA	
26. Con que desinfecta las frutas y verduras que consume en su casa	_____	

ESTADO EMOCIONAL

1. ¿Actualmente tiene problemas?	1. Si 2. No (pasar a la pregunta 5)	
2. ¿De qué tipo?	1. Personales 2. Laborales 3. Familiares 4. Otros, especifique: _____	
3. ¿Desde cuándo?	_____ 03. NA	
4. ¿Le han afectado a su salud?	1. Si 2. No	
5. ¿Cómo se considera usted?	1. Tranquilo 2. Nervioso 3. Enojón	
6. Se enoja fácilmente ante un problema	1. Si 2. No	
7. Padece insomnio	1. Si 2. No	
8. Toma algo para dormir	1. Si 2. No	
9. ¿Cuántas horas acostumbra dormir?	_____ hrs.	

SÍNTOMAS GÁSTRICOS

1. Padece alguno de los siguientes síntomas			
	1. Si	2. No	3. Ocasionalmente
A. Eructos			
B. Nauseas			
C. Mareos			
D. Vomito			
E. Dolor abdominal			
F. Sensación de vacío en el estómago			
G. Ardor en el estomago			
H. Reflujo			

2. Le han diagnosticado gastritis o úlcera gástrica	1. Gastritis 2. Úlcera 3. Otro, especifique _____ 4. NO	
3. Como se lo diagnosticaron	_____	
4. Le recetaron algún medicamento	1. Si 2. No	
5. ¿Cual fue?	_____	
6. ¿Por cuantos días se lo indicaron?	_____ días	
7. Se termino el tratamiento	1. Si 2. No (pasar a la pregunta 9)	
8. ¿Por qué no?	_____	
9. Tiene algún familiar que padezca gastritis o ulcera gástrica o con síntomas similares a loa que usted padece	1. Si 2. No 01. NS	
10. ¿Qué familiar?	_____	

Helicobacter pylori

1. ¿Ha oído hablar de <i>Helicobacter pylori</i> ?	1. Si 2. No (termina la entrevista)	
2. ¿Sabe que es y qué enfermedad causa?	_____	
3. ¿Le han recetado algún medicamento contra <i>Helicobacter pylori</i> ?	1. Si 2. No	
4. ¿Cuál fue?	_____	

Nombre y firma del entrevistado

Nombre y firma del entrevistador
Lugar y Fecha

Anexo 3

Técnica de extracción de DNA a partir de tejidos (Fenol-cloroformo-álcohol-isoamílico)

1. Colectar la muestra (biopsia) en 750 μ L de solución de extracción (Tris 10 mM pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0, SDS 0.5%).
2. Agregar 3.8 μ L de solución de proteinasa K (20 mg/mL) a cada tubo (utilizar para cada tubo una punta) para llegar a una concentración final de 100 μ g/mL. Mezclar vigorosamente en el vortex por 20 segundos.
3. Incubar a 65°C durante 20 minutos.
4. Añadir 250 μ L de fenol-cloroformo-álcohol-isoamílico, mezclar con vortex aproximadamente 40 segundos.
5. Centrifugar durante 5 minutos a 13,000 rpm a 4°C, recuperar la fase acuosa y pasarla a un tubo limpio.
6. Repetir los pasos 4 y 5 por 2 veces más.
7. Añadir 250 μ L de cloroformo-álcohol-isoamílico, mezclar con vortex aproximadamente durante 45 segundos.
8. Centrifugar durante 5 minutos a 13,000 rpm a 4°C y recuperar la fase acuosa y ponerla en un tubo limpio.
9. Agregar 75 μ L de LiCl 8M (concentración final 0.2 M) mezclar con vortex aproximadamente durante 15 segundos.
10. Centrifugar durante 5 minutos a 14,000 rpm a 4°C y recuperar casi todo el sobrenadante y pasarlo a un tubo limpio.
11. Agregar 40 μ L de NaCl 5M (concentración final 0.2 M), agitar por unos segundos y enseguida agregar 750 μ L de isopropanol y agitar por inversión hasta que se forme la hebra de DNA. Etiquetar el tubo.
12. Incubar por 30 minutos o más a -20°C.
13. Centrifugar a 14,000 rpm por 10 minutos, desechar el sobrenadante y recuperar el pellet.
14. Lavar con 1 mL de etanol al 75% en frío y mezclar suavemente por inversión.

15. Centrifugar por 5 minutos a 14,000 rpm.
16. Repetir los pasos 14 y 15 2 veces más.
17. Escurrir el exceso de etanol en papel absorbente y secar el pellet.
18. Resuspender el pellet en 55 μ L de agua desionizada estéril. Utilizar puntas nuevas bajo condiciones de esterilidad (prender el mechero), se mezcla varias veces de manera continua extrayendo con la punta el líquido constantemente (utilizar una punta diferente en cada mezcla). Guardar el DNA -20°C.

Anexo 4

Pirosecuenciación

La pirosecuenciación es un método de secuenciación en tiempo real, catalizado por cuatro enzimas; la DNA polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa y apirasa. Cada nucleótido proporcionado es evaluado individualmente para su incorporación en el molde de DNA.

Después de que un primer es hibridizado a un molde de DNA de cadena sencilla, se incuba con las cuatro enzimas y los substratos adenosina 5' fosfosulfato (APS) y luciferina. Cada uno de los cuatro deoxynucleotidos trifosfatos (dNTPs) son agregados individualmente a la mezcla de reacción. Cuando un dNTP es complementario a la base en la cadena molde, la DNA polimerasa cataliza su incorporación a la cadena de DNA. Cada evento de incorporación está acompañado por la liberación de pirofosfato inorgánico (PPi) en una cantidad equimolar a la cantidad de nucleótido incorporado. La ATP sulfurilasa cuantitativamente convierte PPi a ATP en presencia de adenosina 5'fosfosulfato. El ATP entonces conduce a la luciferasa para mediar la conversión de luciferina a oxiluciferina que genera luz visible en cantidades que son proporcionales a la cantidad de ATP. La luz producida en la reacción catalizada por la luciferasa es detectada por un dispositivo acoplado a una cámara y es observada como un pico en un pirograma. La altura del pico representa la intensidad de la señal, la cual es proporcional al número de nucleótidos incorporados. Los dNTP no incorporados y el exceso de ATP son continuamente degradados por la apirasa. Después de que la degradación esta completa el siguiente dNTP se agrega y un nuevo ciclo de pirosecuenciación se inicia ³⁸.