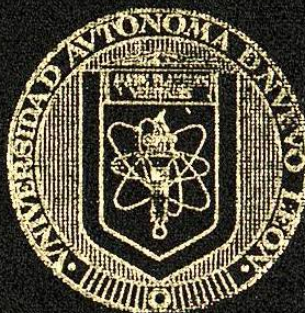


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



ASOCIACION DE DIVERSAS PATOLOGIAS
GASTRICAS CON LA INFECCION POR CEPAS DE
Helicobacter pylori CagA⁺ y/o VacA⁺ y ALELOS
DE HLA-DQ

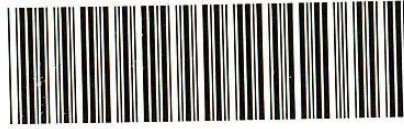
Por
ELVIRA GARZA GONZALEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en
Microbiología Médica

Marzo, 2002

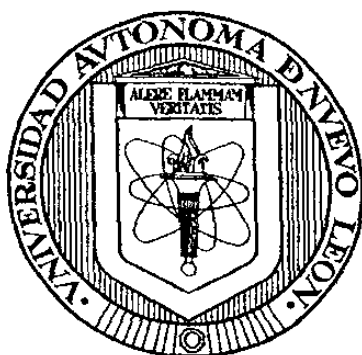
TD
Z6658-
FM
2002
.G3

ELVIRA GARZA GONZALEZ



1020147963

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



ASOCIACIÓN DE DIVERSAS PATOLOGÍAS GÁSTRICAS CON LA INFECCIÓN
POR CEPAS DE *Helicobacter pylori* CagA+ y/o VacA+ y ALELOS DE HLA-DQ

Por

ELVIRA GARZA GONZÁLEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en
Microbiología Médica

Marzo, 2002

308001

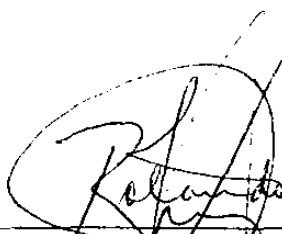
TD
26658
FII
2002
E13



FONDO
TESIS

ASOCIACIÓN DE DIVERSAS PATOLOGÍAS GÁSTRICAS CON LA INFECCIÓN
POR CEPAS DE *Helicobacter pylori* CagA+ y/o VacA+ y ALELOS DE HLA-DQ

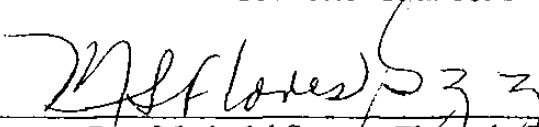
Aprobación de la Tesis:



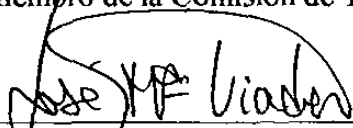
Dr. med. Rolando Tijerina Menchaca
Director de la Tesis



Dr. Francisco Javier Bosques Padilla
Codirector de la Tesis



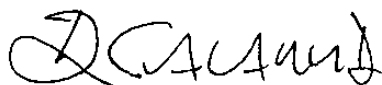
Dra. María del Socorro Flores de Castañeda
Miembro de la Comisión de Tesis



Dr. Ing. Quím. José María Viader Salvadó
Miembro de la Comisión de Tesis



Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez
Miembro de la Comisión de Tesis



Dr. Dionicio A. Galarza Delgado
Subdirector de Investigación y Estudios de Postgrado

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi familia, muy especialmente a mi mamá, por ser siempre ejemplo de superación y por apoyarme siempre incondicionalmente.

A mis asesores de tesis, los Doctores Rolando Tijerina Menchaca, Francisco Javier Bosques Padilla y Guillermo Pérez Pérez por el gran apoyo que siempre me brindaron, por los conocimientos que compartieron conmigo, pero sobre todo por su amistad.

Al Dr. Juan Pablo Flores Gutiérrez por el apoyo recibido en el análisis histológico de las biopsias.

A la Comisión de Tesis por sus sugerencias y comentarios

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca académica otorgada con el oficio 62450 y a la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo económico brindado en los programas “Apoyo a tesis de postgrado 2001” y “Programa de Apoyo a la Investigación Ciencia y Tecnología” (PAICyT) 2000 y 2001.

El presente trabajo se realizó en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas y en el Laboratorio de Química Biomolecular del Departamento de Microbiología de La Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, el Servicio de Gastroenterología y el Laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" y en los Departments of Medicine and Microbiology, New York University School of Medicine.

Asesor: Dr. med. Rolando Tijerina Menchaca

Coasesores: Dr. med. Francisco Javier Bosques Padilla

Dr. Guillermo I. Pérez Pérez

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Características microbiológicas de <i>Helicobacter pylori</i>	1
1.2 Ecología y epidemiología de <i>H. pylori</i>	1
1.3 Patogénesis de <i>H. pylori</i>	2
1.3.1 Factores de colonización	2
1.3.2 Interacciones entre <i>H. pylori</i> y el epitelio gástrico	2
1.4 Patologías gástricas relacionadas con <i>H. pylori</i>	3
1.4.1 Dispepsia no ulcerosa	3
1.4.2 Úlcera gástrica y/o duodenal	3
1.4.3 Cáncer gástrico	4
1.4.3.1 Epidemiología del cáncer gástrico	4
1.4.3.2 Mecanismos carcinogénicos propuestos	5
1.5 Métodos de diagnósticos para <i>H. pylori</i>	7
1.5.1 Pruebas invasivas	7
1.5.1.1 Análisis histológico	7
1.5.1.2 Cultivo	7
1.5.1.3 Prueba rápida de ureasa	8

Capítulo	Página
1.5.1.4 Métodos moleculares	9
1.5.2 Pruebas no invasivas	9
1.5.2.1 Prueba del aliento	9
1.5.2.2 Detección de anticuerpos totales anti- <i>H. pylori</i>	9
1.6 Factores de riesgo para el desarrollo de las diferentes patologías gástricas relacionadas con <i>H. pylori</i>	11
1.6.1 Factores del medio ambiente	11
1.6.2 Factores de la bacteria	11
1.6.2.1 Citotoxina formadora de vacuolas	11
1.6.2.2 Gen asociado a la citotoxina	12
1.6.3 Factores del hospedero	14
1.6.3.1 Sistema de antígenos de leucocitos humanos (HLA)	14
1.6.3.1.1 Descripción de HLA	14
1.6.3.1.2 HLA en las poblaciones humanas	16
1.6.3.1.3 Estudio de HLA	16
1.6.3.1.4 Asociación de algunos alelos de HLA-DQ y diversas enfermedades gástricas	16
1.6.3. 1.5 Frecuencia de los alelos de HLA DQA1 y DQB1 en población mexicana	17
1.7 Objetivos	18

Capítulo	Página	
1.7.1	Objetivo general	18
1.7.2	Objetivos específicos	18
1.8	Hipótesis	19
1.9	Justificación	19
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	20
2.1	Estrategia general	20
2.2	Criterios de inclusión	22
2.3	Endoscopia gastroduodenal	22
2.4	Cultivo de biopsias gástricas	23
2.5	Prueba directa de ureasa	24
2.6	Análisis histológico	24
2.7	Determinación de anticuerpos anti- <i>H. pylori</i>	24
2.7.1	Ensayo serológico	25
	2.7.1.1 Preparación del antígeno	25
	2.7.1.2 Prueba de ELISA	25
	2.7.1.3 Interpretación de los resultados	26
2.7.2	Validación del método	26
2.8	Clasificación de los pacientes en grupos de estudio	27
2.8.1	Diagnóstico de la infección	27
2.8.2	Grupos de estudio	28

Capítulo		Página
	2.8.3 Tamaño de la muestra	28
2.9	Determinación de anticuerpos anti-CagA y anti-VacA por Western blot	28
	2.9.1 Ensayo serológico	28
	2.9.2 Validación de la determinación de anticuerpos anti-CagA por Western blot	29
	2.9.3 Genotipificación de <i>cagA</i> empleando la PCR	30
	2.9.3.1 Extracción del DNA	30
	2.9.3.2 Detección de <i>cagA</i>	31
	2.9.3.3 Detección de los productos de PCR	31
	2.9.3.4 Determinación de la sensibilidad y especificidad del ensayo	31
2.10	Genotipificación de HLA-DQA1 y DQB1	32
	2.10.1 Obtención y preparación del DNA genómico humano	32
	2.10.2 Amplificación de HLA-DQA1 y HLA-DQB1	33
	2.10.3 Detección de productos amplificados	34
	2.10.4 Documentación e interpretación del gel	35
2.11	Análisis estadístico	36
	2.11.1 Análisis univariado	36
	2.11.2 Análisis multivariado	36
3.	RESULTADOS	38

Capítulo	Página
3.1 Validación del ensayo serológico	38
3.2 Diagnóstico de la infección y clasificación en grupos de estudio	38
3.2.1 Diagnóstico de la infección	38
3.2.2 Clasificación de los pacientes en grupos de estudio	38
3.3 Determinación de anticuerpos anti-CagA y anti-VacA por Western blot	40
3.3.1 Determinación de la sensibilidad de la determinación de anticuerpos anti-CagA por Western blot	41
3.3.2 Frecuencias de la infección por cepas de <i>H. pylori</i> CagA+ en los grupos de estudio.	41
3.3.3 Frecuencias de la infección por cepas de <i>H. pylori</i> VacA+ en los grupos de estudio.	43
3.4 Frecuencias de alelos en las regiones HLA-DQA1 y HLADQB1 en los grupos de estudio.	44
3.5 Análisis de regresión logística multivariada	49
3.6 Asociación en desequilibrio de los diferentes haplotipos	52
 4. DISCUSIÓN	 53
 5. CONCLUSIONES	 58

Capítulo	Página
REFERENCIAS	59
APÉNDICES	67
APÉNDICE A PRUEBAS BIOQUÍMICAS	67
APÉNDICE B TINCIONES	68
APÉNDICE C MEDIOS DE CULTIVO O DE TRANSPORTE	69
APÉNDICE D PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES	70
APÉNDICE E RESULTADOS DE LAS PRUEBAS EMPLEADAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR <i>H. pylori</i>	75
APÉNDICE F CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN ESTE ESTUDIO	79
APÉNDICE G RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-CagA Y ANTI-VacA POR WESTERN BLOT	83
APÉNDICE H GENOTIPOS DE HLA-DQA1 Y DQB1 EN LOS PACIENTES DE ESTUDIO	86

NOMENCLATURA

C	Grupo cáncer gástrico
<i>cagA</i>	Gen asociado a la citotoxina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DS	Desviación estándar
EDTA	Etilendiaminotetracetato
ELISA	Inmunoensayo absorbente con enzima unida
g	Gravedades
G	Grupo gastritis
HLA	Sistema de antígenos de leucocitos humanos
IL	Interleucina
LPMN	Leucocitos polimorfonucleares
mg	Miligramos
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
min	Minutos
mL	Mililitros
N	Grupo normal
nm	Nanómetros
OR	Razón de momios (Odds ratio)
p	Probabilidad
PAI	Isla de patogenicidad

pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-SSP	PCR con iniciadores <i>secuencia-específicos</i>
PRU	Prueba rápida de ureasa
RDO	Relación de densidad óptica
s	Segundos
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TCR	Receptor de células T
U	Grupo úlcera
UV	Ultravioleta
<i>vacA</i>	Citotoxina formadora de vacuolas
V	Voltios
µg	Microgramos

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Ventajas y desventajas de las pruebas más frecuentemente empleadas para el diagnóstico de la infección por <i>H. pylori</i> .	10
II.	Componentes de la mezcla de reacción para la PCR.	34
III.	Condiciones empleadas en la PCR para la amplificación de HLA-DQA1 y DQB1.	34
IV.	Características de la población en cada uno de los grupos de estudio.	39
V.	Resultados de la determinación de anticuerpos anti-CagA y anti-VacA en los grupos de estudio.	44
VI.	Alelos de HLA-DQA1 más frecuentes en los grupos de estudio.	48
VII.	Frecuencias de alelos de HLA-DQB1 encontradas para cada uno de los grupos de estudio.	49
VIII.	Modelos de regresión logística construidos para estudiar la combinación de variables.	51

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación esquemática de la hipótesis propuesta acerca de los cambios histológicos que llevan de la gastritis crónica al desarrollo de cáncer gástrico.	6
2	Representación esquemática de la estructura del gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> .	12
3	Interacción entre las moléculas de clase II y los linfocitos TCD4+.	15
4	Esquema que muestra la estrategia general seguida para determinar si existe asociación entre las diferentes patologías gástricas relacionadas con <i>H. pylori</i> y la infección por cepas CagA+ y/o VacA+ y alelos de HLA-DQ.	21
5	Comparación del lugar de nacimiento de los pacientes entre los grupos de estudio.	40
6	Ejemplo de patrones de Western blot obtenidos con los sueros de 15 pacientes estudiados empleando el estuche comercial Helicoblot 2.1.	42

Figura		Página
7	Frecuencias de infección por cepas de <i>H. pylori</i> CagA+ y/o VacA+ en los grupos de estudio.	43
8	Ejemplo de las genotipificaciones del locus DQA1 empleando el estuche comercial Olerup SSP.	45
9	Ejemplo de las genotipificaciones del locus DQB1 empleando el estuche comercial Olerup SSP.	46

RESUMEN

Elvira Garza González

Fecha de graduación: 2002

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: Asociación de diversas patologías gástricas con la infección por cepas de *Helicobacter pylori* CagA+ y/o VacA+ y alelos de HLA-DQ

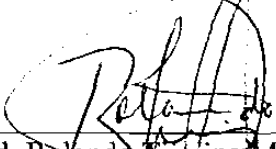
Número de páginas: 89

Candidato al grado de Doctor en Ciencias con
Especialidad en Microbiología Médica

Área de estudio: Microbiología Médica

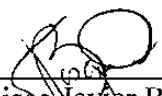
Propósito y Método del Estudio: La diversidad clínica relacionada con *H. pylori* se ha asociado a factores de virulencia en la bacteria como la producción de las proteínas CagA y/o VacA y factores del hospedero como el sistema de antígenos de leucocitos humanos (HLA). En este trabajo se investigó si existe asociación entre diversas patologías gástricas relacionadas con *Helicobacter pylori* y la infección por cepas CagA+, VacA+ y HLA-DQ. Se estudiaron 4 grupos de pacientes de 30 individuos cada uno: sin patología gástrica/*H. pylori*-, con gastritis/*H. pylori*+, con enfermedad úlcero péptica/*H. pylori*+ y con cáncer gástrico-displasia/*H. pylori*+. El diagnóstico de la infección se realizó por la determinación de anticuerpos IgG anti-*H. pylori*, prueba rápida de ureasa, cultivo y análisis histológico. Se definió si los individuos estaban infectados por cepas CagA+ y/o VacA+ mediante la determinación de anticuerpos anti-CagA y anti-VacA por la técnica de Western-Blot. Se genotipificaron las regiones HLA-DQA1 y HLA-DQB1 empleando la técnica de PCR con iniciadores secuencia específicos (PCR-SSP).

Contribuciones y Conclusiones: Se confirmó la asociación entre la infección por cepas CagA+ y VacA+ con cáncer o displasia y se encontró que la frecuencia del alelo DQA1*0503 es menor en los pacientes con cáncer o displasia/*H. pylori*+ que en los pacientes histológicamente normales/*H. pylori*- y que en los pacientes con gastritis/*H. pylori*+. Un análisis multivariado que incluyó la infección por cepas *H. pylori* CagA+, VacA+ y la ausencia del alelo DQA1*0503 mostró que sólo la ausencia del alelo DQA1*0503 se asoció significativamente con un riesgo mayor al desarrollo de cáncer o displasia. En este trabajo se concluyó que los pacientes infectados con cepas VacA+ y/o CagA+ tienen un riesgo mayor al desarrollo de cáncer gástrico que los infectados por cepas VacA- y/o CagA- y que la presencia del alelo *0503 podría representar un factor protector al desarrollo de cáncer gástrico o displasia.



Dr. med. Rolando Tijerina Menchaca

Asesor



Dr. med. Francisco Javier Bosques Padilla

Coasesor



Dr. Guillermo Pérez Pérez

Coasesor

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Características microbiológicas de *Helicobacter pylori*

El género *Helicobacter* contiene más de 9 especies que infectan el tubo intestinal de mamíferos y humanos. Son bacilos Gram negativos curvados que miden entre 0.3 y 1 μM de ancho por 1.5 a 10.0 μM de largo y que pueden tomar formas esféricas o cuerpos cocoides como consecuencia de una incubación prolongada (17, 43). La especie de mayor importancia para humanos es *Helicobacter pylori* el cual es móvil por múltiples flagelos monopolares, no forma esporas, es ureasa y oxidasa positivo y para su cultivo requiere una atmósfera húmeda a 37°C y una concentración de CO₂ del 5 al 12% (43).

1.2 Ecología y epidemiología de *H. pylori*

H. pylori coloniza aproximadamente a la mitad de la población mundial adulta (17). Se encuentra primariamente en la capa mucosa adyacente al epitelio gástrico, coloniza el cardias, cuerpo y antro de estómago además de áreas de metaplasia gástrica en el intestino delgado proximal (4, 19, 50). La prevalencia de la infección por *H. pylori* varía ampliamente por regiones geográficas, edad y el nivel socioeconómico de las poblaciones estudiadas (17, 42). En los países en vías de desarrollo, la prevalencia de la infección puede ser del 70% o más y la mayoría de las personas colonizadas adquieren la infección antes de los 10 años de edad (12). Estudios realizados en la República Mexicana muestran que la prevalencia de la infección es del 66% (60). La frecuencia de la infección por *H. pylori* ha

disminuido significativamente en países desarrollados en los cuales la población infantil presenta actualmente una prevalencia cercana al 10%. Por otro lado, la mayoría de los estudios muestran que la infección afecta a hombres y mujeres en igual proporción (12).

1.3 Patogénesis de *H. pylori*

1.3.1 Factores de colonización

Diversos factores permiten a la bacteria colonizar y sobrevivir en el ambiente ácido del estómago. La presencia de flagelos le permite desplazarse a través de la capa de moco, penetrarla y escapar del pH ácido. Los flagelos le permiten además evitar ser arrastrado por el peristaltismo intestinal (17, 42).

H. pylori produce grandes cantidades de ureasa la cual hidroliza la urea con producción de amoníaco, éste último reacciona con el ácido producido por las células parietales del estómago lo cual eleva sustancialmente el pH y genera un microambiente adecuado para el desarrollo de la bacteria (17, 19). Esta enzima es de utilidad como un marcador de la presencia de la bacteria y se ha descrito también como un inductor importante de la producción de citocinas proinflamatorias y de la activación de monocitos (17, 33).

1.3.2 Interacciones entre *H. pylori* y el epitelio gástrico

H. pylori se adhiere a las células del hospedero y no tiene tendencia a invadir las células. Una vez que *H. pylori* se adhiere al epitelio gástrico, las células del hospedero inician la respuesta con producción de interleucina 8 (IL-8) la cual funciona como un potente mediador proinflamatorio en la reclutación y activación de neutrófilos (19, 33). El

aumento en la permeabilidad facilita el acceso del ácido al tejido subyacente y facilita el transporte de proteínas inmunogénicas a la lámina propia con lo que induce además una respuesta sistémica (19).

1.4 Patologías gástricas relacionadas con *H. pylori*

Desde el aislamiento de *H. pylori* por Warren y Marshall en 1982 (41), numerosas evidencias han mostrado su papel etiológico en diversas patologías gástricas. *H. pylori* provoca a nivel histológico en prácticamente todos los individuos colonizados una gastritis generalmente asintomática. En aproximadamente el 15% de estos individuos se desarrollan diversas presentaciones clínicas tales como la enfermedad úlcero péptica o el cáncer gástrico (42).

1.4.1 Dispepsia no ulcerosa

En la infección por *H. pylori* los infiltrados celulares reflejan inflamación crónica y leucocitos polimorfonucleares (LPMN). Como resultado de la infección persistente, se asocian otros cambios histológicos, tales como la fibrosis y la atrofia (19, 27, 30). Puede cursar con dolor epigástrico, náusea, vómito y/o regurgitación.

1.4.2 Úlcera gástrica y/o duodenal.

Aproximadamente el 90 al 95% de las úlceras duodenales y del 70 al 75% de las úlceras gástricas se atribuyen a la infección por *H. pylori*. En ciertos individuos la presencia de *H. pylori* y la gastritis son suficientes para incrementar los niveles de gastrina e inducir

cambios en la secreción de ácido gástrico además de un incremento en la permeabilidad a través de las células epiteliales. Estos cambios pueden facilitar el acceso del ácido de la luz intestinal o la pepsina al tejido subyacente con formación de úlceras (19, 27, 30, 35).

1.4.3 Cáncer gástrico

1.4.3.1 Epidemiología del cáncer gástrico

El cáncer gástrico es el decimocuarto tipo de cáncer más común en el mundo, el número dos como causa de muerte y es más frecuente en países con economías emergentes que en el mundo industrializado. En muchos países de Latinoamérica y Asia el cáncer gástrico es el tipo de cáncer más común entre hombres y el segundo más común entre mujeres. Las tasas en Colombia y Japón son de 80 por 100,000 habitantes. En cambio, afecta a menos de 10 por cada 100,000 habitantes en los Estados Unidos y Europa occidental (19).

Se ha demostrado que la presencia de *H. pylori* representa un riesgo 6 veces mayor en el desarrollo de cáncer gástrico (23) aunque los datos epidemiológicos sugieren que la incidencia varía considerablemente de una región geográfica y de una generación a otra (24, 25). Resultados contradictorios se han obtenido en poblaciones africanas donde a pesar de la alta prevalencia de *H. pylori*, las tasas de cáncer gástrico son muy bajas (32).

El riesgo mayor de cáncer gástrico en una población se asocia con adquisición precoz de *H. pylori* (8, 11, 24, 25). Teniendo en cuenta que la bacteria persiste a lo largo de los años y nunca cura espontáneamente, podría especularse que un factor importante podría ser precisamente la infección por *H. pylori* en la infancia.

1.4.3.2 Mecanismos carcinogénicos propuestos

En 1994 la OMS clasificó al *H. pylori* como carcinógeno de Categoría 1 (44). Diversos mecanismos carcinogénicos han sido postulados en relación con la infección por *H. pylori*, sin embargo hasta ahora no se ha demostrado una actividad carcinogénica por esta bacteria. Se ha propuesto una transformación gradual de la celularidad que va desde gastritis pasando por gastritis atrófica, metaplasia intestinal, displasia y finalmente el desarrollo de cáncer gástrico (figura 1). Se ha propuesto que esta transformación maligna es causada por el estrés oxidativo producido por la liberación de proteasas y metabolitos reactivos del oxígeno por los LPMN, lo cual provoca un estallido oxidativo que produce un daño al ácido desoxirribonucleico (DNA) e induce mutaciones en las células germinales mucosas que eventualmente no son reparadas (14, 24, 25, 30, 50).

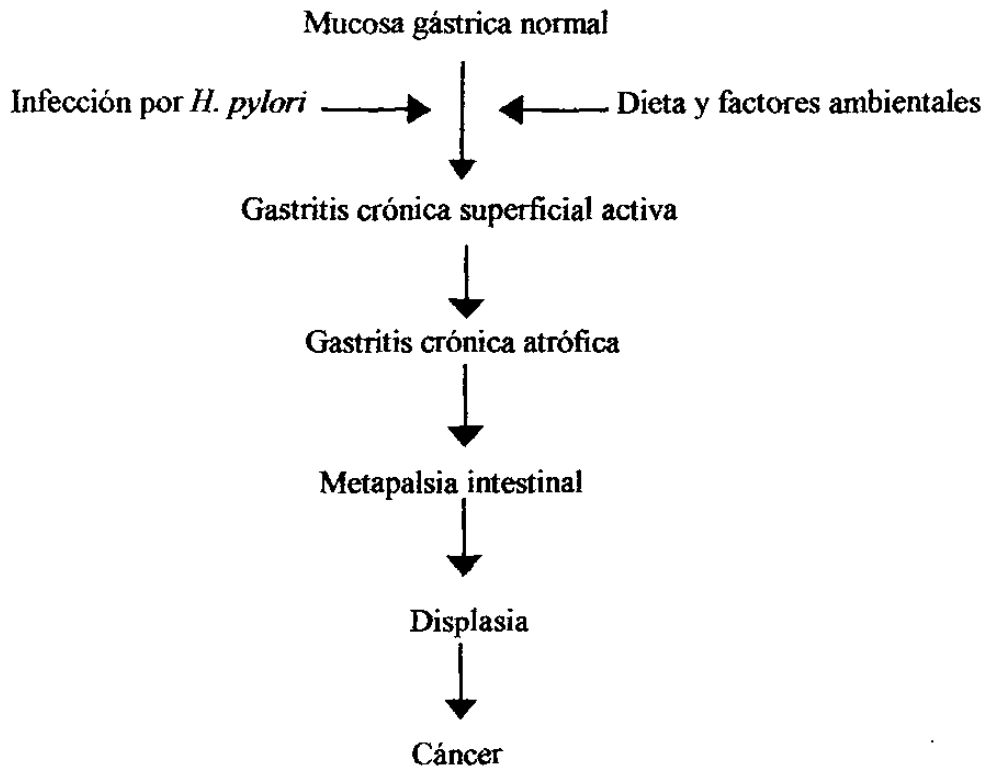


Figura 1. Representación esquemática de la hipótesis propuesta acerca de los cambios histológicos que llevan de la gastritis crónica al desarrollo de cáncer gástrico (14).

1.5 Métodos de diagnóstico para *H. pylori*

Para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* se pueden emplear tanto pruebas invasivas como pruebas no invasivas. Las pruebas invasivas involucran una endoscopia del tubo digestivo superior y toma de biopsias gástricas (2, 11, 17, 33). Las pruebas no invasivas no requieren la endoscopia. Las ventajas y desventajas de estas pruebas se resumen en la tabla I.

1.5.1 Pruebas invasivas

Se puede detectar directamente la presencia de la bacteria por análisis histológico, el cultivo o de manera indirecta con la prueba rápida de ureasa (PRU) o por métodos moleculares.

1.5.1.1 Análisis histológico.

El análisis histológico permite la detección de bacilos concordantes con *H. pylori*, además de la clasificación de las lesiones gastroduodenales y la observación de lesiones premalignas o malignas. Se emplean tinciones como la de Giemsa, Hematoxilina y Eosina o bien tinciones más específicas como la tinción con plata de Wartin Starry o por métodos inmunohistoquímicos que emplean anticuerpos fluorescentes (11).

1.5.1.2 Cultivo

Para el aislamiento de *H. pylori* se recomienda el empleo de medios no selectivos como el agar sangre, Muller-Hinton o Columbia con sangre al 10% así como también el empleo de medios con agentes antimicrobianos que inhiben las bacterias u hongos

contaminantes que pudieran dificultar el aislamiento de la bacteria (49). Entre los medios selectivos se emplean el medio con yema de huevo y otros medios como el agar Columbia, el agar soya tripticasa, y el agar Brucella suplementados con agar sangre y una mezcla de antibióticos (49). *H. pylori* se desarrolla bien a 37 °C y en una atmósfera de microaerobiosis (CO₂ al 12%). Crece bien en las condiciones obtenidas con las jarras de anaerobiosis empleando el sistema CampyPak plus, CampyPouch (Becton Dickinson) o el sistema Anaerocult C (Diagnóstica Merck). Estos sistemas de generación contienen bicarbonato de sodio y ácido cítrico para la generación del dióxido de carbono necesario para el desarrollo de *H. pylori*. Las placas se incuban durante 3 a 7 días para observar el desarrollo de colonias (49).

Las colonias desarrolladas se identifican mediante las pruebas de ureasa, oxidasa y catalasa para las cuales *H. pylori* es positivo. Es frecuente que la prueba de ureasa requiera sólo algunos minutos para el cambio de color del indicador por lo que la identificación puede completarse en menos de un día (43).

1.5.1.3 Prueba rápida de ureasa (PRU)

En esta prueba se detecta la ureasa producida por la bacteria directamente de la biopsia para lo cual se coloca una biopsia en un vial de prueba que contiene urea y un indicador de pH. La ureasa producida por la bacteria degrada la urea con producción de amoníaco lo cual incrementa el pH y este cambio es detectado por el cambio de color de indicador luego de una incubación hasta de 24 horas (2, 11).

1.5.1.4 Métodos moleculares

Se emplea principalmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Detecta un pequeño número de bacterias viables o no. Además de poder realizarse en biopsias gástricas, puede realizarse también en muestras de jugo gástrico o heces con lo cual es un método no invasivo (2).

1.5.2 Pruebas no invasivas

1.5.2.1 Prueba del aliento

En esta prueba se detecta la actividad de ureasa empleando urea marcada con ^{13}C ó ^{14}C que se administra oralmente y que luego se detecta en el aliento como CO_2 radioactivo. Esta prueba es simple, segura, precisa y de gran utilidad para el diagnóstico de la infección si la endoscopia no está indicada (2, 11).

1.5.2.2 Detección de anticuerpos totales anti-*H. pylori*.

La detección de anticuerpos IgG anti-*H. pylori* es la prueba no invasiva más ampliamente utilizada para el diagnóstico de la infección ya que es fácil de realizar, sencilla y barata. Puede realizarse mediante aglutinación de partículas de látex o por la técnica del ensayo inmunoabsorbente con enzima unida (ELISA). La sensibilidad y especificidad de las pruebas comerciales de ELISA varían entre el 60 y el 100%. Como resultado de la erradicación de la bacteria los niveles de anticuerpos disminuyen hasta los niveles que se observan en individuos no infectados, sólo que esto ocurre en el curso de algunos años. Algunos estudios han mostrado que la disminución del 40% en el título de anticuerpos en 4

TABLA I

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LAS PRUEBAS MÁS FRECUENTEMENTE
EMPLEADAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE *H. pylori*

Pruebas invasivas		
	Ventajas	Desventajas
Análisis histológico	Detecta la infección y el grado de inflamación	Especificidad y sensibilidad muy variables
Cultivo de <i>H. pylori</i>	Específico, permite el estudio detallado de la bacteria y la realización de pruebas de sensibilidad	Sensibilidad variable
PRU	Bajo costo, sencilla, rápida	
PCR	Alta sensibilidad	Alto costo
No invasivas		
	Ventajas	Desventajas
Determinación de anticuerpos totales	Barata, sencilla No requiere equipo especial	Detecta infecciones pasadas
IgG anti- <i>H. pylori</i>		
Prueba del aliento	Alta sensibilidad y especificidad	Manejo de isótopos radioactivos Alto costo Requiere equipo especial

1.6 Factores de riesgo para el desarrollo de las diferentes patologías gástricas relacionadas con *H. pylori*

La diversidad en las presentaciones clínicas relacionadas con la infección por *H. pylori* se han asociado con la combinación de factores del medio ambiente, características de la bacteria y del hospedero (18, 21, 27, 58).

1.6.1 Factores del medio ambiente

Entre los factores del medio ambiente se ha estudiado consumo de alcohol, tabaco, la exposición ocupacional ambiental, las prácticas de higiene, el hacinamiento y antecedentes familiares de enfermedad gástrica (12, 13).

1.6.2 Factores de la bacteria

Algunas de las características mejor estudiadas de la bacteria son la producción de la citotoxina formadora de vacuolas (VacA) y el producto del gen asociado a la citotoxina (CagA).

1.6.2.1 Citotoxina formadora de vacuolas

VacA es una proteína de 87 kDa que induce la formación de vacuolas ácidas en el citoplasma de células eucariotas, es codificada por el gen *vacA* y es producida por aproximadamente la mitad de los aislamientos clínicos de *H. pylori*, aunque todas las cepas poseen el gen que codifica para la toxina (17). La presencia de anticuerpos anti-VacA se ha

asociado con mayor inflamación a nivel de la mucosa gástrica, un riesgo mayor a desarrollar cáncer gástrico (51, 52), al 66% de los casos de enfermedad úlcera duodenal y al 65% de las úlceras gástricas (21). La producción de VacA no está limitada a las cepas presentes en los pacientes que desarrollan enfermedad ya que se ha demostrado falta de asociación de la infección por cepas de *H. pylori* VacA+ con enfermedad (62).

Se ha reportado una combinación en mosaico de las regiones señal [s] y media [m] del gen *vacA* (figura 2). Las cepas *vacA* s1/m1 producen los niveles más altos de actividad citotóxica, las cepas s1/m2 una actividad parcial y las cepas s2/m2 prácticamente ninguna actividad (3).

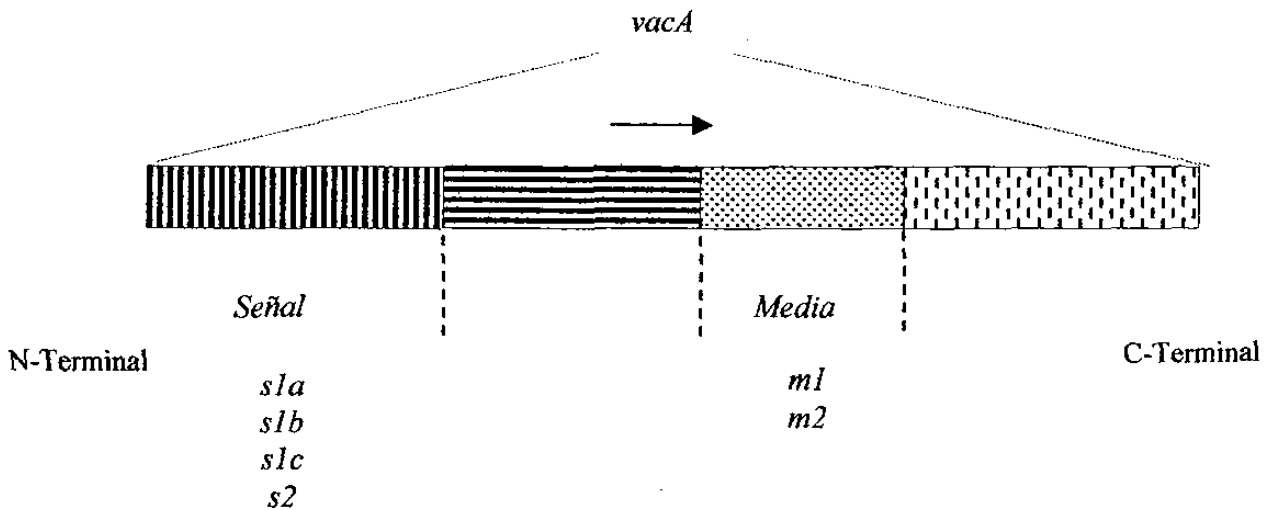


Figura 2. Representación esquemática de la estructura del gen *vacA* de *H. pylori* (3).

1.6.2.2 Gen asociado a la citotoxina

Desde la década de los 80s, se hizo evidente que no todas las cepas producen una proteína de 120 kDa. El gen que codifica para esta proteína fue clonado y llamado gen

asociado a la citotoxina (*cagA*) ya que prácticamente todas las cepas que producen esta proteína producen también VacA (17).

CagA es un antígeno inmunodominante de 120 kDa el cual es un marcador de una isla de patogenicidad (PAI), la cual es un grupo de genes presente en *H. pylori*. Estudios recientes han mostrado que la adherencia de *H. pylori* a las células epiteliales gástricas induce la entrada de CagA en el epitelio gástrico por un sistema de secreción tipo IV, codificado por la PAI. Dentro de la célula, la proteína es fosforilada por una quinasa del hospedero y altera la fisiología de las células afectadas (28).

La presencia de la PAI se ha asociado con una mayor producción de interleucina-8 y una mayor inflamación de la mucosa gástrica. Diversos estudios han mostrado que las personas infectadas por cepas CagA+ tienen un riesgo mayor a desarrollar cáncer gástrico o úlcera duodenal (4, 10, 15, 22, 31, 39, 61).

CagA parece ser un marcador de virulencia ya que está presente en la mayoría de las patologías gástricas relacionadas con *H. pylori*, sin embargo su presencia no es suficiente ni necesaria para el desarrollo de enfermedad, ya que se ha reportado la infección por cepas de *H. pylori* CagA+ en pacientes asintomáticos y la infección por cepas CagA- en pacientes con alguna de las patologías gástricas antes mencionadas. (34, 56, 62).

1.6.3 Factores del hospedero

1.6.3.1 Sistema de antígenos de leucocitos humanos

1.6.3.1.1 Descripción de HLA. El sistema de antígenos de leucocitos humanos (HLA) es la versión humana del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Se localiza en el cromosoma 6 y contiene alrededor de 200. Los genes que están involucrados con la respuesta inmune corresponden a dos clases (I y II), los cuales son estructural y funcionalmente diferentes (36, 37, 57).

Los genes de clase II codifican para los polipéptidos α y β de las moléculas de clase II. Cada una de las moléculas de clase II (α o β) tiene cuatro dominios: un dominio de unión a péptidos ($\alpha 1$ o $\beta 1$), un dominio similar a inmunoglobulina ($\alpha 2$ o $\beta 2$), una región transmembranal y una porción citoplásmica. Estas moléculas colectan fragmentos de péptidos de 12 a 25 aminoácidos que provienen de proteínas endógenas, como las oncoproteínas o proteínas exógenas tales como los antígenos de microorganismos (32) y los transportan a la superficie celular donde el complejo péptido-HLA es reconocido por los linfocitos T CD4+, los cuales se activan al reconocer el complejo (figura 3). El polimorfismo de HLA está casi completamente confinado al sitio de unión de las moléculas de HLA por lo que determina que péptido será presentado a las células. El polimorfismo y la función de las moléculas de HLA son la parte medular de la asociación entre algunos alelos de HLA y algunas enfermedades (36, 37, 57, 59).

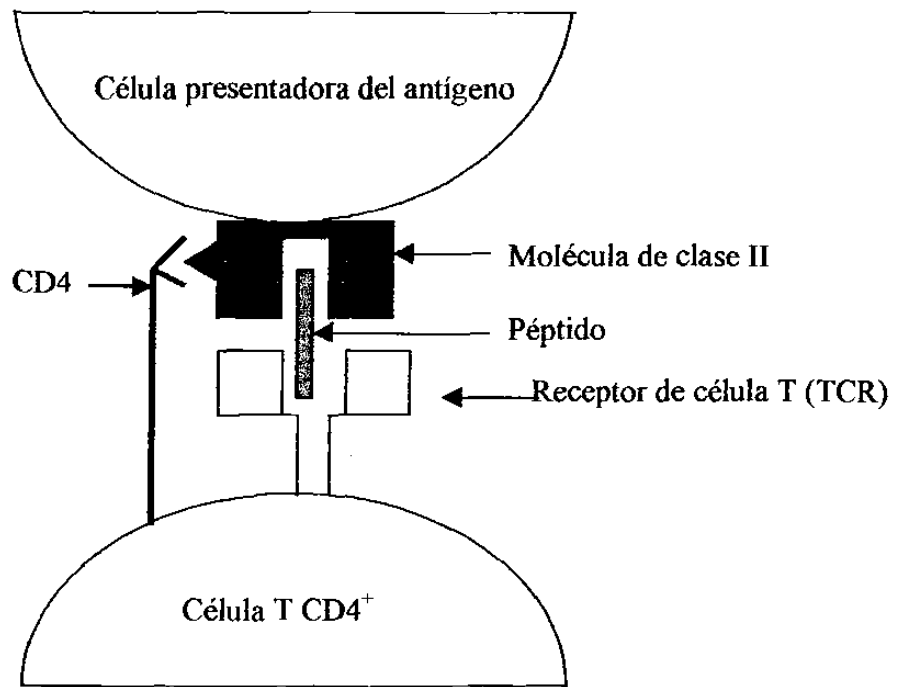


Figura 3. Interacción entre las moléculas de clase II y los linfocitos T CD4+. Las moléculas de clase II son producidas por células presentadoras del antígeno, las cuales presentan péptidos a los linfocitos T CD4+ que interaccionan mediante el receptor de células T.

1.6.3.1.2 HLA en las poblaciones humanas. En ausencia de migración, mutación o selección las frecuencias de los alelos de HLA permanecen constantes de generación en generación en una población grande con apareamiento aleatorio. Esta se conoce como la ley de Hardy-Weinberg (20). En una población en equilibrio de Hardy-Weinberg, la frecuencia de asociación de dos alelos en dos diferentes loci son el producto de las frecuencias individuales en los dos genes. Si el valor observado de las frecuencias de los dos alelos es significativamente diferente de la frecuencia esperada se dice que los dos alelos tienen una asociación en desequilibrio (59).

1.6.3.1.3 Estudio de HLA. El estudio de HLA se ha realizado durante muchos años empleando la tipificación celular. Actualmente se emplean técnicas de biología molecular, entre las cuales se emplea la PCR con iniciadores secuencia específicos (SSP). Los productos amplificados son visualizados por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, tinción con plata o métodos fluorescentes (37).

1.6.3.1.4 Asociación de alelos de HLA-DQ con enfermedades gástricas. Varios estudios han mostrado que algunos alelos de HLA pueden influenciar la respuesta a la infección por *H. pylori*. En la región DQA1 se ha reportado una disminución en la frecuencia del alelo *0102 en pacientes japoneses con gastritis atrófica, enfermedad úlcero péptica o cáncer gástrico (5, 7). Este alelo tiene una asociación significativa negativa, con la seropositividad para la infección por *H. pylori* (40). Por otro lado, en población caucásica con enfermedad ulcero-péptica se observó una frecuencia mayor de alelo DQA1*0301 (6). Sin embargo, otros estudios en población caucásica mostraron que ser portador de los alelos del gen DQA1*0102 o *0301 no modifica ni la susceptibilidad a la infección por *H. pylori*

ni su evolución a úlcera péptica (55). Se ha estudiado además la región DQB1 y se ha observado una frecuencia mayor del alelo *0401 en pacientes japoneses con gastritis atrófica (54) y una frecuencia mayor del alelo *0301 en pacientes con cáncer gástrico (38).

1.6.3.1.5 Frecuencia de los alelos HLA-DQA1 y DQB1 en población mexicana. En estudios de HLA y otras enfermedades, Gorodezki et al reportaron recientemente la frecuencia de los alelos que han sido asociados con el desarrollo de las diferentes patologías gástricas relacionadas con *H. pylori* en poblaciones clínicamente sanas. En uno de los estudios que estudiaron 170 individuos, reportaron una frecuencia de los alelos de DQA1 *0102 y *0301/02 de 30 y 87% respectivamente (1) y una frecuencia del alelo *DQB1 *0301 de 75%. En otro trabajo que incluyó 101 individuos sanos encontraron frecuencias de los alelos DQA1 *0102 y *0301/02 de 14.85% y 89.1% respectivamente (46) y una frecuencia del alelo DQB1 *0301 de 47.5%. Ya que los alelos de HLA DQ que han sido asociados al desarrollo de las diferentes patologías gástricas relacionadas con *H. pylori* en estos países son frecuentes en población mexicana, sería muy interesante estudiar su probable esta asociación con *H. pylori* en nuestra población.

Se han estudiado factores bacterianos y factores del hospedero y ninguno de ellos ha demostrado de manera consistente su asociación con enfermedad (29) por lo que es probable que el desarrollo de enfermedad y la diversidad clínica dependan de la combinación específica de los factores. Su estudio en conjunto permitiría definir más claramente una asociación.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo general

Determinar si existe asociación entre diversas patologías gástricas relacionadas con *H. pylori* y la infección por cepas de *H. pylori* CagA+ y/o VacA+ y alelos de HLA-DQ.

1.7.2 Objetivos específicos

1. Determinar la infección por *H. pylori* en pacientes con gastritis crónica, úlcera gástrica y/o duodenal, displasia, cáncer gástrico así como en pacientes sin patología gástrica.
2. Investigar si los individuos en estudio están infectados por cepas de *H. pylori* CagA+ y/o VacA+ mediante la determinación de anticuerpos anti-CagA y anti-VacA.
3. Genotipificar HLA-DQA1 y HLA-DQB1.
4. Realizar el análisis estadístico de la información obtenida.

1.8 Hipótesis

Existen alelos de HLA-DQ que combinados con la infección por cepas de *H. pylori* CagA+ y/o VacA+ predisponen al desarrollo de las diferentes patologías gástricas relacionadas con *H. pylori*.

1.9 Justificación

- Existe variación geográfica y étnica en la asociación de la infección por *H. pylori* con las diferentes patologías gástricas, sólo un pequeño porcentaje de los pacientes infectados se enferma y las presentaciones clínicas son muy diversas, por lo tanto es probable que la combinación de alelos de HLA-DQ y la infección por cepas CagA+ y/o VacA+ definan el curso clínico.
- No existen estudios integrales de la combinación de las diferentes patologías gástricas, alelos de HLA-DQ y la infección por cepas de *H. pylori* CagA+ y/o VacA+.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Estrategia general

Para la determinación de la asociación entre las diferentes patologías gástricas relacionadas con *H. pylori* con la infección por cepas CagA⁺ y/o VacA⁺ y la presencia de alelos de HLA-DQ se siguió la estrategia general que se muestra en la figura 4. Se identificaron los pacientes de estudio tomando en cuenta los criterios de inclusión y durante el procedimiento de endoscopia superior se tomaron 2 biopsias de antro y dos de cuerpo para cultivo, una biopsia antral para la PRU y 8 biopsias (dos de la curvatura mayor, dos de la curvatura menor, dos de la región prepilórica y dos de la incisura angular) para el análisis histológico. Se obtuvo además muestra de suero para la determinación de anticuerpos IgG totales anti-*H. pylori* por la técnica de ELISA y anticuerpos anti-CagA y anti-VacA por la técnica de Western blot. Se obtuvo además sangre completa para la extracción de DNA y la genotipificación de HLA-DQA1 y HLA-DQB1. Una vez que se tuvieron los resultados de la PRU, el cultivo, el análisis histológico y la determinación de anticuerpos anti-*H. pylori* se realizó la clasificación de los pacientes en grupos de estudio. Por último se realizó el análisis estadístico de la información obtenida tomando en cuenta los grupos de estudio y los resultados de la determinación de anticuerpos anti-CagA y anti-VacA y la genotipificación de HLA-DQA1 y HLA-DQB1.

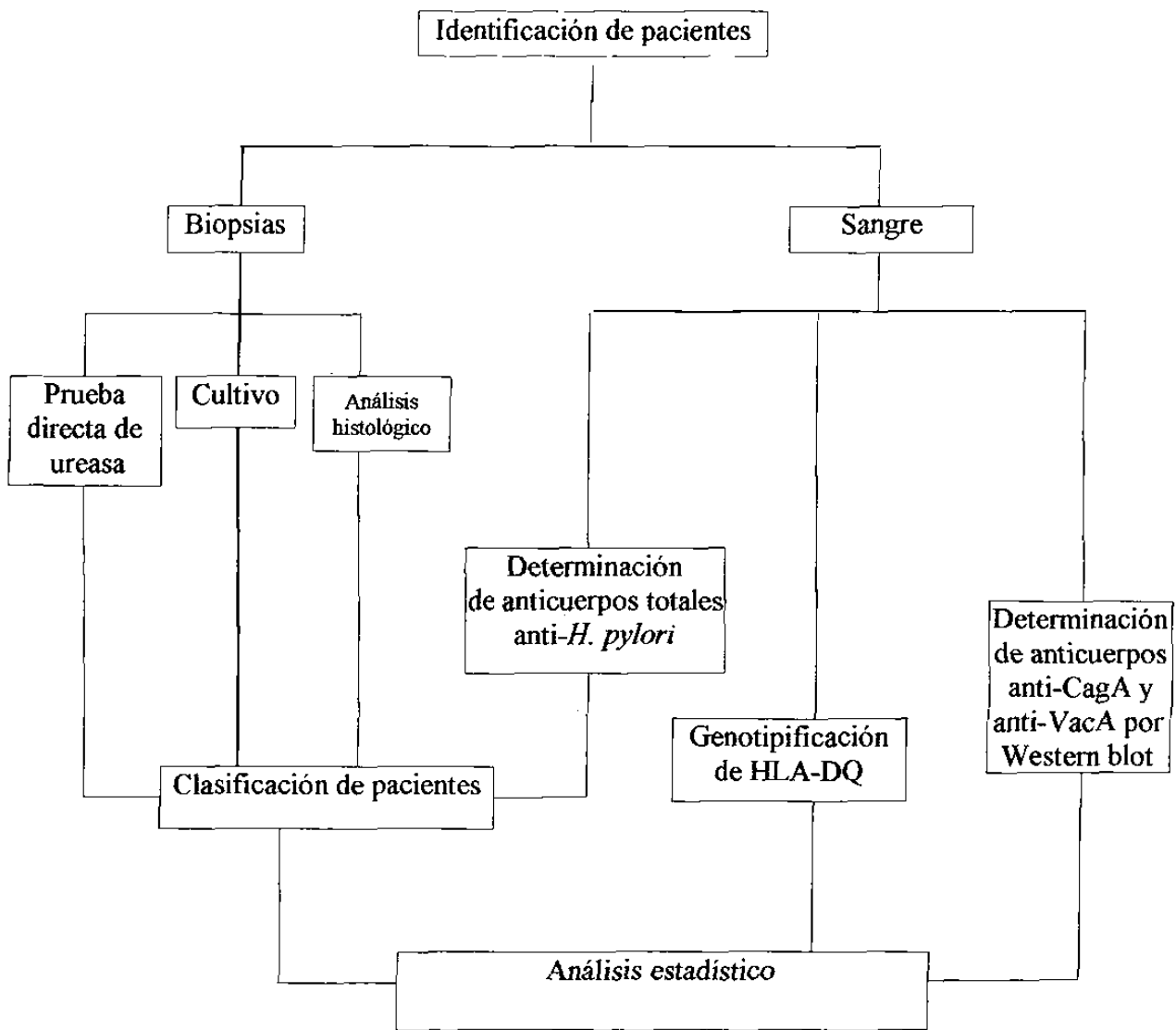


Figura 4. Esquema que muestra la estrategia general seguida para determinar si existe asociación entre las diferentes patologías gástricas relacionadas con *H. pylori* y la infección por cepas CagA+ y/o VacA+ y alelos de HLA-DQ.

2.2 Criterios de inclusión

Se incluyeron pacientes con enfermedad úlcero-péptica, dispepsia no ulcerosa, displasia y cáncer gástrico, infectados o no con *H. pylori*. Pacientes que aceptaron participar en el estudio con consentimiento informado, mexicanos por nacimiento o y con ascendencia mexicana de al menos dos generaciones y que acudieron al Servicio de Gastroenterología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” para la realización de una endoscopia gastroduodenal.

Se revisó que los pacientes integrados a este estudio no hubieran recibido antiinflamatorios no esteroideos, inhibidores de la bomba de protones, sales de bismuto o antibióticos 4 semanas previas al procedimiento endoscópico.

2.3 Endoscopia gastroduodenal

La endoscopia gastroduodenal se llevó a cabo empleando un endoscopio EG-290P (Pentax Precision Instrument Corporation, Orangeburg, NY) bajo anestesia local y con la administración de un sedante intravenoso cuando fue conveniente. Luego de revisar cuidadosamente el esófago, estómago, así como la primera y segunda porción de duodeno se tomaron dos biopsias de antro y dos de cuerpo de estómago para cultivo. Las biopsias fueron colocadas inmediatamente en medio de transporte de Stuart y trasladadas al laboratorio. Se tomó además una biopsia de antro para la realización de la PRU y 8 biopsias para el análisis histológico: dos de curvatura mayor, dos de curvatura menor, dos de región prepilórica y dos de incisura angular. Las 8 biopsias para análisis histológico fueron colocadas directamente de la pinza de biopsia en solución de formol al 10% y se trasladaron al laboratorio de patología para su análisis. Luego del procedimiento

endoscópico, se obtuvo muestra de suero el cual fue congelado a -20°C hasta que se llevaron a cabo las pruebas serológicas. Durante la misma punción se obtuvo muestra de sangre completa la cual se mantuvo en refrigeración por un máximo de tres días antes de la extracción del DNA.

2.4 Cultivo de biopsias gástricas

Una vez en el laboratorio, las biopsias fueron mantenidas en refrigeración por un máximo de 24 horas, las biopsias fueron colocadas en 0.5 mL de caldo Brucella (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville MD) y se trituraron con un aplicador de madera estéril durante 30 s. El sobrenadante se inoculó en placas con agar Columbia (Becton Dickinson Microbiology Systems) con sangre al 10% y el enriquecimiento Iso VitaleX al 1% y una placa con agar Columbia con sangre al 10%, el enriquecimiento Iso VitaleX al 1% y el suplemento selectivo de Skirrow (Merck Diagnóstica). Las placas se incubaron en microaerobiosis empleando el sistema Campy Pouch (Becton Dickinson Microbiology Systems) durante 96 horas a 37°C . Las colonias desarrolladas se identificaron empleando la tinción de Gram y las pruebas de actividades de ureasa, oxidasa y catalasa, para las cuales *H. pylori* es positivo. Las cepas fueron conservadas en caldo Brucella con glicerol al 15% y congeladas a -70°C para investigaciones posteriores.

2.5 Prueba directa de ureasa

Se colocó una biopsia de antro en un vial de prueba (Helytest, Monterrey México) directamente de las pinzas de biopsia. El vial fue incubado a 37°C por un máximo de 24 horas. Un cambio de color de naranja a rosa intenso se interpretó como un resultado positivo, la ausencia de cambio de color se interpretó como un resultado negativo.

2.6 Análisis histológico

Todas las biopsias fueron embebidas en parafina. Se obtuvieron múltiples secciones histológicas de 4 mm de cada fragmento de biopsia y las secciones fueron teñidas con hematoxilina-eosina para la evaluación histológica y detección de *H. pylori*. Las secciones fueron revisadas con objetivo de alto poder (40X) y cuando no se encontraron organismos, las secciones fueron examinadas nuevamente empleando objetivo de inmersión (100X). Un sólo patólogo revisó todas las preparaciones sin conocimiento de los resultados del resto de las pruebas.

2.7 Determinación de anticuerpos anti-*H. pylori*

Para la determinación de anticuerpos totales IgG anti-*H. pylori* se empleó la técnica de ELISA de acuerdo al método desarrollado por Pérez-Pérez et al (48).

2.7.1 Ensayo serológico

2.7.1.1 Preparación del antígeno.

Se preparó una suspensión de antígeno a partir de 5 cepas *H. pylori* las cuales representan un amplio rango de antígenos (47). Una suspensión de las cepas se sonicó, se calentó a 100°C por 5 minutos y la suspensión se ajustó a una concentración de proteínas de 1mg/mL.

2.7.1.2 Prueba de ELISA.

El antígeno se diluyó en amortiguador de carbonatos 0.5 M, pH=9.6 para tener una concentración de 10 µg/mL. Una alícuota de 0.1 mL de esta solución se añadió a celdas de titulación de fondo plano (Dynex Technologies, Chantilly, VA). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante toda la noche y posteriormente se descartó el sobrenadante. Se bloquearon los sitios de unión inespecífica de cada celda con 200 µL de solución bloqueadora pH 7.2-7.4 [solución amortiguadora de fosfatos con timerosal, Tween 80 y gelatina al 0.1% (PBSTTG)], se incubó a 37°C por 3 horas y se decantó el contenido sobre papel absorbente. Se realizaron 2 lavados con 250 µL de solución de lavado pH 7.2-7.4 (PBSTT) y se añadieron 100 µL de suero de cada paciente diluido 1:800 en PBSTTG(PBSTT y globulina al 1%) así como control negativo y positivo. Se incubó a 37°C por una hora, se lavó cada celda dos veces con 250 µL de PBSTT y se adicionaron 100 µL de una dilución 1:4000 de anticuerpos IgG anti-humanos conjugados a peroxidasa (Biosource International, Camarillo, CA) a cada celda. Se incubó por una hora a 37°C y se lavó nuevamente con PBSTT 3 veces para remover los anticuerpos no unidos. Para el

desarrollo de color se adicionaron 100 μL de una solución de desarrollo de color recientemente preparada [2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico, (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)]. Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, se tomó lectura de la absorbancia a 405 nm y la información obtenida se analizó empleando el programa Revelation 2.0. Para corregir la variación de placa a placa, los resultados se expresaron como una relación de densidad óptica (RDO) con respecto a la media de cuatro controles positivos.

$$\text{RDO} = \frac{\text{Densidad óptica del problema}}{\text{Promedio de la densidad óptica de 4 sueros positivos}}$$

2.7.1.3 Interpretación de los resultados.

Un valor de RDO ≥ 1 se consideró positivo, mientras que un valor < 1 se interpretó como un resultado negativo. Para corregir la variación de placa a placa y entre día y día, los ensayos se llevaron a cabo para cada muestra al menos dos veces en días diferentes.

2.7.2 Validación del método

El método se validó con 80 sueros de pacientes que se clasificaron como infectados con *H. pylori* por el resultado positivo del análisis histológico, la PRU y el cultivo. Se incluyeron además 38 pacientes que se clasificaron como no infectados ya que tuvieron un resultado negativo para las tres pruebas mencionadas. Se determinó la sensibilidad, especificidad el valor predictivo positivo, el valor predictivo negativo y la exactitud del método de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

Prueba de ELISA	Infectados con <i>H. pylori</i>	No infectados con <i>H. pylori</i>
Positivo	a	b
Negativo	c	d

Donde:

Sensibilidad $(a/a+c) * 100$

Especificidad $= (d/b+d)*100$

Valor predictivo positivo $(a/a+b)*100$

Valor predictivo negativo $= (d/d+c)*100$

Exactitud $= (a+d/a+b+c+d)*100$

2.8 Clasificación de los pacientes en grupos de estudio

2.8.1 Diagnóstico de la infección

Una vez que se tuvieron los resultados de la PRU, el cultivo, el análisis histopatológico y la determinación de anticuerpos IgG anti-*H. pylori*, los pacientes se clasificaron como *H. pylori* + si se demostró la presencia de la bacteria en al menos dos de las pruebas anteriores. Los pacientes con sólo una prueba fueron eliminados del estudio. Los pacientes con las tres pruebas negativas fueron clasificados como *H. pylori* -.

2.8.2 Grupos de estudio

Una vez que se tuvo el diagnóstico de la infección, el resultado de la endoscopia gastroduodenal y el análisis histológico se clasificaron los pacientes en grupos de estudio

Grupo N	No infectados con <i>H. pylori</i> y sin patología gástrica
Grupo G	Infectados con <i>H. pylori</i> y con gastritis crónica
Grupo U	Infectados con <i>H. pylori</i> y con úlcera duodenal o gástrica
Grupo C	Infectados con <i>H. pylori</i> y con displasia o cáncer gástrico

2.8.3 Tamaño de la muestra

Se incluyeron 30 pacientes en cada grupo de acuerdo con la fórmula para comparación de proporciones de más de dos grupos (16).

2.9 Identificación de anticuerpos anti-CagA y anti-VacA por inmunotransferencia (Western blot)

2.9.1 Ensayo serológico

Se empleó el estuche comercial HelicoBlot 2.1 (Genelabs Diagnostics, Singapore Science Park, Singapore) en el cual los antígenos de *H. pylori* son separados previamente por electroforesis en gel de poliacrilamida y transferidos a papel de nitrocelulosa. Todos los reactivos necesarios están incluidos en el estuche comercial.

Las tiras fueron incubadas al menos 5 minutos a temperatura ambiente con amortiguador de lavado (Tris-tween 20) y posteriormente el amortiguador se removió por aspiración. Las tiras fueron incubadas con suero del paciente diluido 1:100 en agitación

durante una hora a temperatura ambiente. Se analizaron además con cada corrida tanto los controles positivos como controles negativos incluidos en el estuche comercial. Las tiras se lavaron 3 veces por aspiración empleando amortiguador de lavado y se incubaron con IgG anti-humana marcada con fosfatasa alcalina diluida 1:1000 en solución bloqueadora (leche desgrasada al 5% en amortiguador Tris) durante una hora. El conjugado se incubó con las tiras a temperatura ambiente y con agitación constante. Se lavó nuevamente 3 veces con amortiguador de lavado, se añadió el sustrato 5-bromo-4-cloro-2-indoil-fosfato y nitroazul de tetrazolio y se agitó durante 15 a 20 minutos a temperatura ambiente para permitir el desarrollo de color. Las tiras fueron enjuagadas dos veces con agua desionizada para detener la reacción y colocadas en papel no absorbente para eliminar el exceso de agua. Las tiras de los pacientes se compararon con las tiras control para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos anti-CagA y/o anti-VacA. La banda a 120 kDa indicó la presencia de anticuerpos específicos anti-CagA y la banda a 87 kDa indicó la presencia de anticuerpos específicos anti-VacA. Se identificaron además algunas de las bandas características de *H. pylori*: 37 kDa, 35 kDa, 30 kDa (UreA) y 19.5 kDa. En cada tira se incluye además una banda control de adición de suero y un marcador de infección reciente debajo de la banda control.

2.9.2 Validación de la determinación de anticuerpos anti-CagA por Western blot

La validación de la determinación de anticuerpos anti-CagA por Western blot se llevó a cabo mediante la determinación de la presencia del gen *cagA* empleando la técnica de PCR en 50 cepas de *H. pylori* aisladas de los pacientes de estudio y la comparación con

los resultados obtenidos en la determinación de anticuerpos anti-CagA en el suero obtenido de esos pacientes con el resultado de PCR para *cagA* de las cepas aisladas.

2.9.3 Genotipificación de *cagA* empleando la PCR

2.9.3.1 Extracción del DNA

El DNA se extrajo utilizando el método que emplea bromuro de hexadecil-trimetil amonio (CTAB) (45). Una asada de cada cultivo de *H. pylori* se transfirió a un tubo de microcentrífuga con 500 μ l de agua estéril y se centrifugó a 5,000 g por 5 min. El sedimento bacteriano se resuspendió en 560 μ l de amortiguador TE 1X (TrisHCl 10 mM y EDTA 1 mM, pH 8.0), 30 μ l de 10% dodecil sulfato de sodio (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) y 6 μ l de una solución de 10 mg/ml de proteinasa K (Sigma Chemical Co.). La suspensión bacteriana se incubó por 45 min a 37°C y después de la adición de 100 μ l de NaCl 5 M y 80 μ l de CTAB al 10% (Sigma Chemical Co.)/NaCl 0.7 M, la mezcla fue incubada a 65 °C por 10 min. El DNA se extrajo con 700 μ l de cloroformo-isopropanol (24:1) y con una mezcla fenol-cloroformo (1:24). El DNA se precipitó con 0.6 ml de isopropanol, se lavó con etanol al 70% y se dejó secar al aire. El sedimento seco se disolvió en 50 μ l de amortiguador TE 1X, el DNA se cuantificó por emisión fluorescente a 460 nm después de excitación a 365 nm (DyNA Quant Fluorometer, Pharmacia Biotech, San Francisco, CA) y se ajustó la concentración de DNA a 100 ng/ μ L para la investigación de la presencia de *cagA* por PCR.

2.9.3.2 Detección de *cagA*

Se emplearon los iniciadores descritos por Rugge et al (5'- A T A A T G C T A A A T T A G A C A A C T T G A G C G A -3') y (5'- A G A A A C A A A A G C A A T A C G A T C A -3'). Para la PCR de cada muestra, se prepararon mezclas de reacción en un volumen de 50 μ L con una concentración 25 μ M de cada iniciador, 1.5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8.3, 100 μ M de cada desoxinucleósido trifosfato (Qiagen, Santa Clarita, CA), 1 U de *Taq* DNA polimerasa (Qiagen) y 100 ng de DNA genómico. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador automatizado (Perkin-Elmer Corporation, Wellesley, MA) con 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, apareamiento a 52°C por 1 min, y extensión a 72°C por 2 min.

2.9.3.3 Detección de los productos de PCR

Todos los productos amplificados fueron visualizados en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y detectados bajo luz ultravioleta de onda corta. Se emplearon estándares de 100 pares de bases como marcadores de peso molecular (Life Technologies, Ontario, Canada). Se obtuvo una fotografía de cada gel empleando el equipo Eagle eye II Still.

2.9.3.4 Determinación de la sensibilidad y especificidad del ensayo

Se determinaron la sensibilidad y especificidad de la detección de anticuerpos anti-CagA empleando las ecuaciones descritas en la sección 2.7.2.

2.10 Genotipificación de HLA-DQA1 y DQB1

2.10.1 Obtención y preparación del DNA genómico humano

Se extrajo DNA a partir de leucocitos humanos empleando el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (26) para lo cual se colocaron de 300 a 500 μ L de sangre periférica con etilendiaminotetracetato de sodio (EDTA) 0.5 mM como anticoagulante en un tubo Eppendorf de 2 mL. Se centrifugó por 5 minutos a 4,000 r. p. m. (1,306 g) en una centrífuga Eppendorf (Brinkmann Instruments Inc. Westbury, NY), para separar el paquete celular, posteriormente se extrajo el plasma y se descartó. Se añadieron 200 μ L de solución amortiguadora de lisis TSNT (Tritón 100 al 2%, dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH=8, Na₂EDTA 1 mM) al paquete celular y se mezcló suavemente por inversión. Se agregaron 500 μ L de fenol saturado en solución amortiguadora de lisis TSNT y se mezcló perfectamente por inversión hasta la observación de una suspensión homogénea café claro. Se agregaron 100 μ L de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se agitó por 5 min empleando un agitador mecánico. Se añadieron 200 μ L de amortiguador TE 1X, se mezcló perfectamente, se centrifugó por 8 min a 14, 000 r. p. m. (15,996 g) y se transfirió la fase acuosa a otro tubo Eppendorf de 1.5 mL. El DNA se extrajo nuevamente para lo que se agregaron 500 μ L de fenol saturado y se mezcló por inversión. Se agregaron 100 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se agitó empleando un agitador mecánico por 5 min. Se añadieron 200 μ L de amortiguador TE 1X y se mezcló. Se centrifugó por 8 minutos a 14,000 r. p. m. (15,996 g) y se transfirió la fase acuosa a otro tubo Eppendorf de 1.5 mL. El DNA se precipitó agregando 1 mL de etanol al 100% y se mezcló lentamente por inversión hasta

observar la hebra de DNA. Se centrifugó por 8 minutos a 14,000 r. p. m. (15,996 g), se decantó el sobrenadante y se lavó el DNA con 1 mL de etanol al 70%. Posteriormente se centrifugó por 8 min a 14,000 r. p. m. (15,996 g), se dejó secar al aire de 10 a 20 minutos y se resuspendió en 50 μ L de amortiguador TE. Se determinó la calidad y concentración del DNA por determinación de la absorbancia a 260 y 280 nm. El DNA se conservó a -70 °C hasta su empleo.

2.10.2 Amplificación de HLA-DQA1 y HLA-DQB1

Se utilizó el estuche comercial Olerup SSP AB, (Saltsjöbaden, Sweden) que emplea la técnica de PCR-SSP para la identificación de alelos. Se amplificaron regiones de HLA-DQA y HLA-DQB1 por separado para lo cual se prepararon mezclas de reacción de acuerdo a las instrucciones del fabricante (tabla II) en un volumen final de 10 μ L. En el estuche comercial los iniciadores están incluidos deshidratados en cada uno de los tubos de prueba, a los cuales se adiciona la Taq DNA polimerasa, los dNTPs, el amortiguador y el DNA. Para la genotipificación de HLA-DQA1 se prepararon 24 mezclas de reacción y para la genotipificación de HLA-DQB1 se prepararon 8 mezclas de reacción. Para la PCR se empleó un termociclador automatizado Thermal Cycler Hybaid (Franklin, MA, USA) con las mismas condiciones para la amplificación de ambas regiones (tabla III).

TABLA II. COMPONENTES DE LA MEZCLA DE REACCIÓN PARA LA PCR

Taq DNA polimerasa:	0.4 U
dNTPs:	200 μ M
Amortiguador:	KCl 50 mM, MgCl ₂ 1.5 mM, Tris-HCl pH 8.3 10 mM
Iniciadores:	Específicos para algún alelo o grupo de alelos, control positivo.
DNA	50 ng

TABLA III. CONDICIONES EMPLEADAS EN LA PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE HLA-DQA1 Y HLA-DQB1

Paso	Número de ciclos	Temperatura	Duración (s)	
1.	1	94 °C	120	Desnaturalización
2.	10	94 °C	10	Desnaturalización
		65 °C	60	Apareamiento y extensión
3.	20	94 °C	10	Desnaturalización
		61 °C	50	Apareamiento
		72 °C	30	Extensión

2.10.3 Detección de productos amplificados

Una vez corrida la PCR, los productos amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 2% en amortiguador TBE 0.5X (Tris base 0.0445 M, ácido bórico 0.0445, EDTA

10 mM pH=8) para lo cual la agarosa se disolvió en un horno de microondas y se dejó que la solución se enfriara hasta aproximadamente 60°C. Se colocaron los productos de PCR en los carriles correspondientes además de un marcador de peso molecular de 100 pb (Promega, Madison, WI) y control negativo de reacción. La electroforesis se corrió en amortiguador TE 0.5X sin recirculación del amortiguador por 50 minutos a 8-10 v/cm. Una vez corrida la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio (2µg/mL) durante 10 min y fue lavado 3 veces con agua destilada.

2.10.4 Documentación e interpretación del gel

El gel se colocó en un transiluminador UV Vilber Lourmat (Marne-La-valle Cedex 1, France) y se documentó por fotografía utilizando una cámara DC40, (Kodak Digital Science, Rochester NY, USA). La presencia y el tamaño de los productos de PCR específicos fueron registrados y si se detectó la banda control correspondiente y/o se detectó el producto de PCR específico. Se interpretó el tubo como positivo para el alelo o grupo de alelos específicos. Si sólo se detectó la banda control y no se detectó el producto amplificado específico el tubo se interpretó como amplificación negativa para el alelo o grupo de alelos específicos. La amplificación fue repetida en los tubos en los que no se detectó ni banda control ni productos de PCR específicos hasta que se obtuvo amplificación en todos los tubos. Se utilizó el software Helmberg Score (Genovision-Olerup SSP Typing Version, Saltsjöbaden, Sweden) para la interpretación total de la serie de tubos.

2.11 Análisis estadístico

2.11.1 Análisis univariado

Se comparó la media entre los grupos de estudio mediante un análisis de varianza. Se determinó si existían diferencias significativas en el género entre los grupos de estudio mediante la prueba de χ^2 o la prueba exacta de Fisher de dos colas y se aplicó la corrección de continuidad de Yates (16).

Se determinó si existían diferencias en la frecuencia de infección por cepas de *H. pylori* CagA+ o VacA+ entre los grupos de estudio mediante la prueba de χ^2 o la prueba exacta de Fisher de dos colas con la corrección de continuidad de Yates. Se estimaron los valores de razón de momios [OR(odds ratio)] con un intervalo de confianza (IC) del 95% (16).

Se estimaron las frecuencias de cada uno de los alelos y se compararon entre los grupos de estudio mediante la prueba de χ^2 o la prueba exacta de Fisher con la corrección de continuidad de Yates. Se aplicó además la corrección de Bonferroni a los valores de probabilidad (p) para múltiples comparaciones. Se calcularon además los valores de OR con intervalo de confianza del 95%.

Para todas las pruebas estadísticas, un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo (16).

2.11.2 Análisis multivariado

Se construyeron 17 modelos de regresión logística multivariada considerando la presencia de cáncer gástrico o displasia como variable independiente y la infección por *H.*

pylori CagA+, VacA+ el no ser portador del alelo DQA1 *0503, el género (masculino) y la edad (>60 años) como variables independientes. Cada modelo se construyó con diversas combinaciones de estas variables y se calcularon los valores de OR e IC 95% para cada modelo así como el valor de p.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Validación del ensayo serológico

Se incluyeron 80 pacientes que se definieron como infectados con *H. pylori* por el resultado positivo del análisis histológico, la PRU y el cultivo. Se incluyeron además 38 pacientes que se consideraron no infectados con *H. pylori* ya que tuvieron un resultado negativo para las 3 pruebas. Empleando este criterio de diagnóstico, se obtuvo una sensibilidad del 97.5%, una especificidad del 78.9%, un valor predictivo positivo del 90.7%, un valor predictivo negativo del 93.8% y una exactitud de 91.5.

3.2 Diagnóstico de la infección y clasificación en grupos de estudio

3.2.1 Diagnóstico de la infección

El diagnóstico de la infección se realizó por el resultado de la PRU, el cultivo, el análisis histopatológico de biopsias y la determinación de anticuerpos IgG anti-*H. pylori*. Los resultados de las pruebas se muestran en el apéndice E.

3.2.2 Clasificación de los pacientes en grupos de estudio

Una vez que se tuvo el resultado del análisis endoscópico y el diagnóstico de la infección por *H. pylori* se realizó la clasificación de cada uno de los pacientes en grupos de

estudio. Como era de esperarse, la mayoría de los pacientes integrados a este estudio nacieron en los estados de Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas (apéndice F y figura 5).

Se encontró que existen diferencias significativas entre las medias de edades en los grupos de estudio N-C y los grupos N-U ($p < 0.01$). En los grupos U y C se tuvo mayor proporción de hombres que mujeres y por el contrario, en los N y G se encontró que la mayoría de los pacientes fueron mujeres (tabla IV).

TABLA IV. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN EN CADA UNO DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

	Media de edad \pm DS*	Rango de edad	Femenino:Masculino
Normal n=30	39.6 \pm 15.9	16 a 77	2.75
Gastritis n=30	49.0 \pm 18.9	15 a 92	4.80
Úlcera n=30	59.5 \pm 20.5	20 a 90	0.43
Cáncer n=22	62.7 \pm 14.4	33 a 84	0.30
Displasia n=8			

*Diferencias significativas entre grupos Normal-Ulcera y Normal-Cáncer ($p < 0.01$)

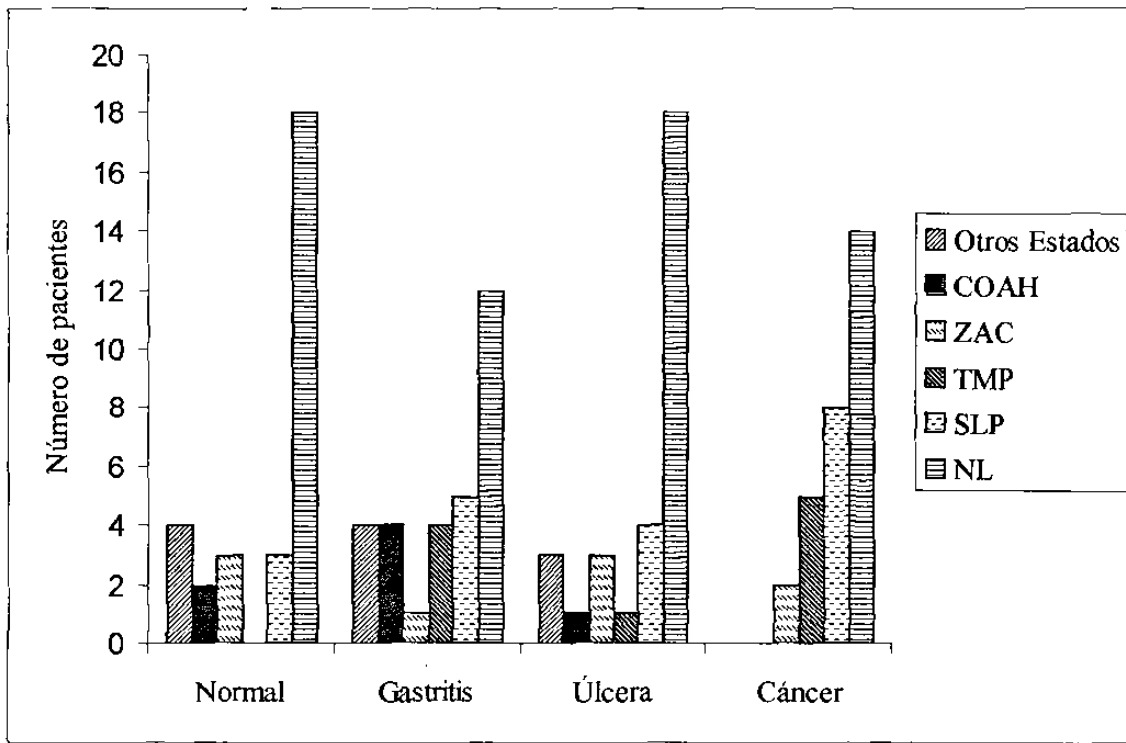


Figura 5. Comparación del lugar de nacimiento de los pacientes entre los grupos de estudio. COAH, Coahuila; ZAC, Zacatecas; TMP, Tamaulipas; SLP; San Luis Potosí; NL, Nuevo león

3.3 Determinación de anticuerpos anti-CagA y anti-VacA por Western blot

Las tiras de Western blot de cada uno de los pacientes se compararon con las tiras control para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos anti-CagA y/o anti-VacA (figura 6). Los resultados obtenidos fueron tabulados y analizados (Apéndice G). La interpretación de cada una de las tiras se realizó además por otra persona ajena a este trabajo y que no tenía información alguna de los demás resultados.

3.3.1 Determinación de la sensibilidad de la determinación de anticuerpos anti-CagA por Western blot

De las 50 cepas estudiadas, 32 (64%) fueron *cagA*⁺ y 18 (36%) fueron *cagA*⁻. Se obtuvo una sensibilidad del 96.9% y una especificidad del 100%.

3.3.2 Frecuencias de la infección por cepas de *H. pylori* CagA⁺ en los grupos de estudio

Se calculó la frecuencia de infección por cepas de *H. pylori* CagA⁺ para cada uno de los grupos de estudio. Las frecuencias se graficaron (figura 7), se determinó si existían diferencias significativas en las frecuencias para la infección por cepas de *H. pylori* CagA⁺ entre los grupos de estudio y se encontraron diferencias significativas entre los grupos G-C (OR=11.76, IC95%=10.37-13.16) (tabla V). No se encontraron diferencias significativas entre las otras posibles combinaciones de grupos de estudio.

Se realizó la determinación de anticuerpos anti-CagA en 10 sueros de pacientes del grupo *H. pylori*- y sin patología gástrica y no se detectó la presencia de anticuerpos anti-CagA en ninguno de los sueros.

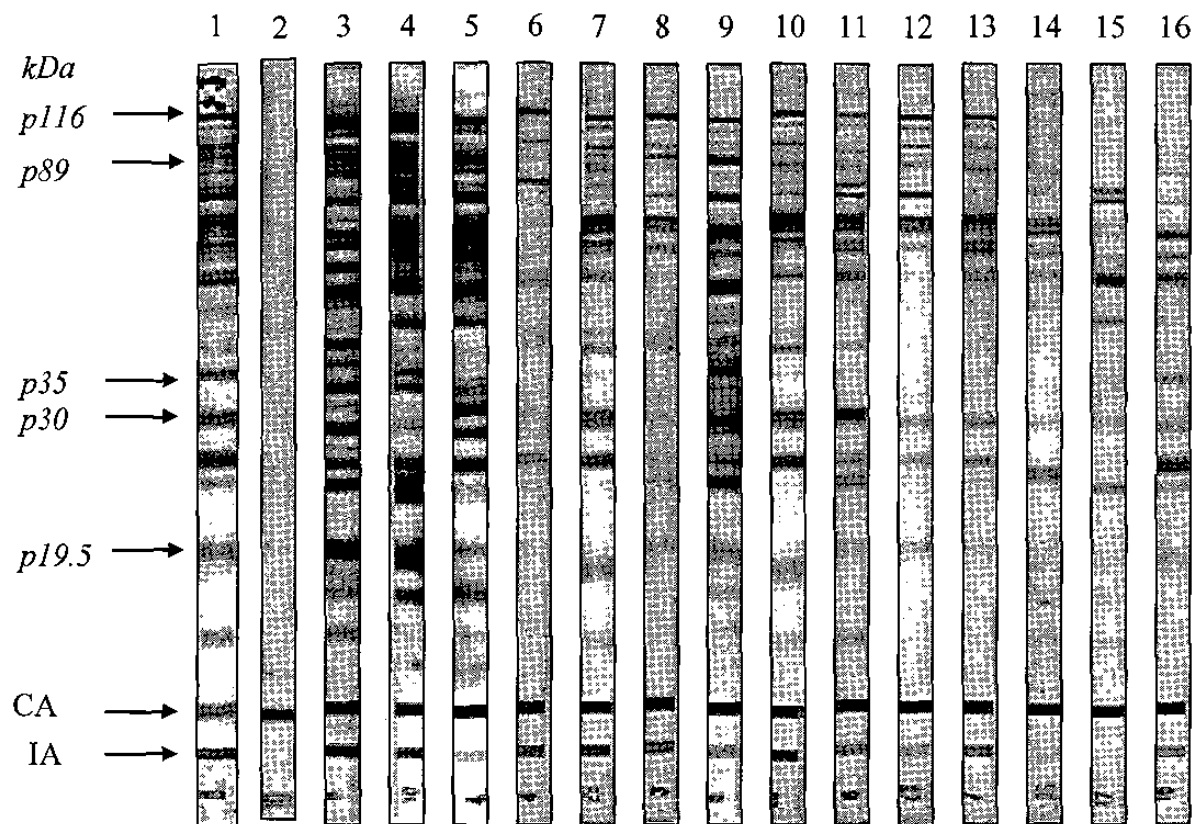


Figura 6. Ejemplo de patrones de Western blot obtenidos con los sueros de 14 pacientes estudiados empleando el estuche comercial HelicoBlot 2.1. La banda de 116 kDa es el producto del gen *cagA*, la banda de 89 kDa es el producto de *vacA*, la banda de 67 kDa es una flagelina, la banda de 30 kDa es una subunidad de ureasa, la banda de 19.5 es una proteína de *H. pylori* de la cual se sabe poco acerca de su función. De acuerdo con instrucciones del fabricante, la banda IA es un marcador de infección activa y la banda CAS es un control de adición de suero. El número 1 representa el suero control positivo, el número 2 el control negativo y los números del 3 al 16 representan pacientes. Los pacientes 3-13, son CagA+, VacA+ y los sueros del 14 al 16 son CagA-, VacA-.

3.3.3 Frecuencias de la infección por cepas de *H. pylori* VacA+ en los grupos de estudio

Se obtuvo la frecuencia de infección por cepas de *H. pylori* VacA+ para cada uno de los grupos de estudio. Las frecuencias obtenidas se graficaron (figura 7), se determinó si existían diferencias significativas entre las frecuencias para la infección por cepas de *H. pylori* VacA+ entre los grupos de y se encontraron diferencias significativas entre los grupos G-C (OR=3.05, IC 95%=2.09-4.08 (tabla V). No se encontraron diferencias significativas entre las otras posibles combinaciones de grupos de estudio.

Se realizó la determinación de anticuerpos anti-VacA en 10 sueros de pacientes del grupo *H. pylori*- y sin patología gástrica y no se detectó la presencia de anticuerpos anti-VacA en ninguno de los sueros.

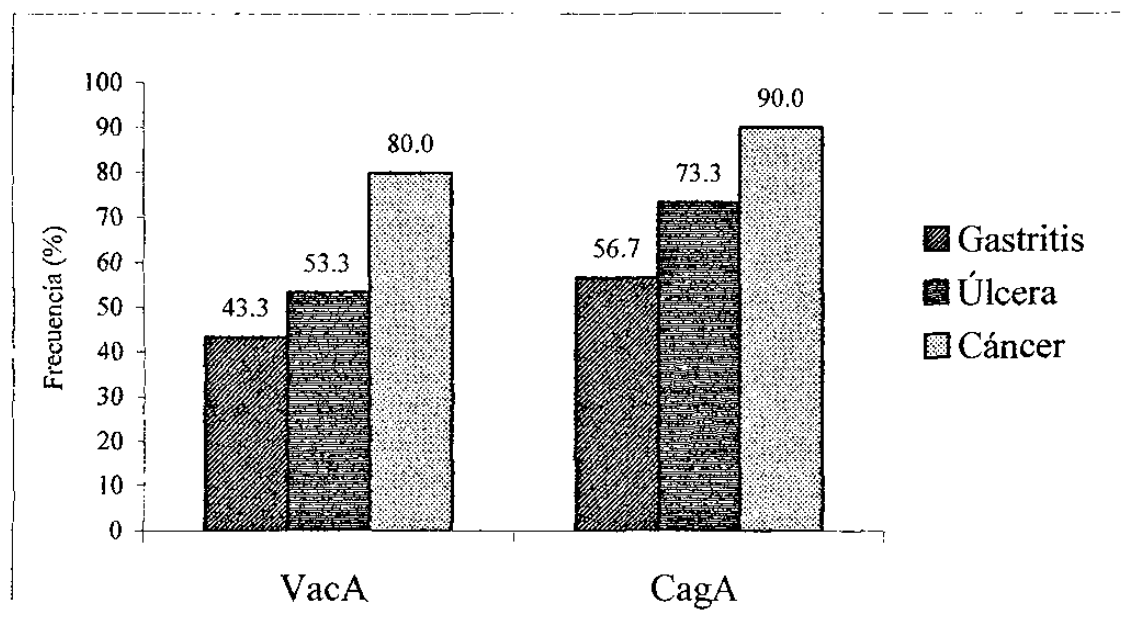


Figura 7. Frecuencias de infección por cepas de *H. pylori* CagA+ y/o VacA+ en los grupos de estudio.

TABLA V. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-CagA ANTI-VacA EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO

	Normal n=10	Gastritis n=30	Úlcera n(%) n=30	Cáncer n(%) n=30
VacA n(%)	0(0)	13(43.3)	16(53.3)	24(80.0)
CagA n(%)	0(0)	17(56.7)	22(73.3)	27(90.0)

3.4 Frecuencias de alelos en las regiones HLA-DQA1 y HLADQB1 en los grupos de estudio

El resultado de la combinación de resultados tanto para la región DQA1 como DQB1 se interpretaron empleando el software Helmberg Score. Algunos ejemplos de genotipificación se muestran en las figuras 8 y 9.

Los resultados de la genotipificación de HLA-DQA1 y DQB1 se tabularon de acuerdo a los grupos de estudio (apéndice H).

Se determinaron las frecuencias de cada uno de los alelos tanto de la región DQA1 (tabla VI) como de la región DQB1 (tabla VII) en los grupos de estudio. En la región HLA-DQA1 se encontraron diferencias significativas en la frecuencia del alelo DQA1*0503 entre los grupos N-C ($p < 0.05$), OR= 0.1071, IC 95% 0.021-0.54. Además, se encontraron diferencias significativas para este mismo alelo entre los grupos G-C ($p < 0.05$), OR= 0.0934, IC 95% 0.02-0.46.

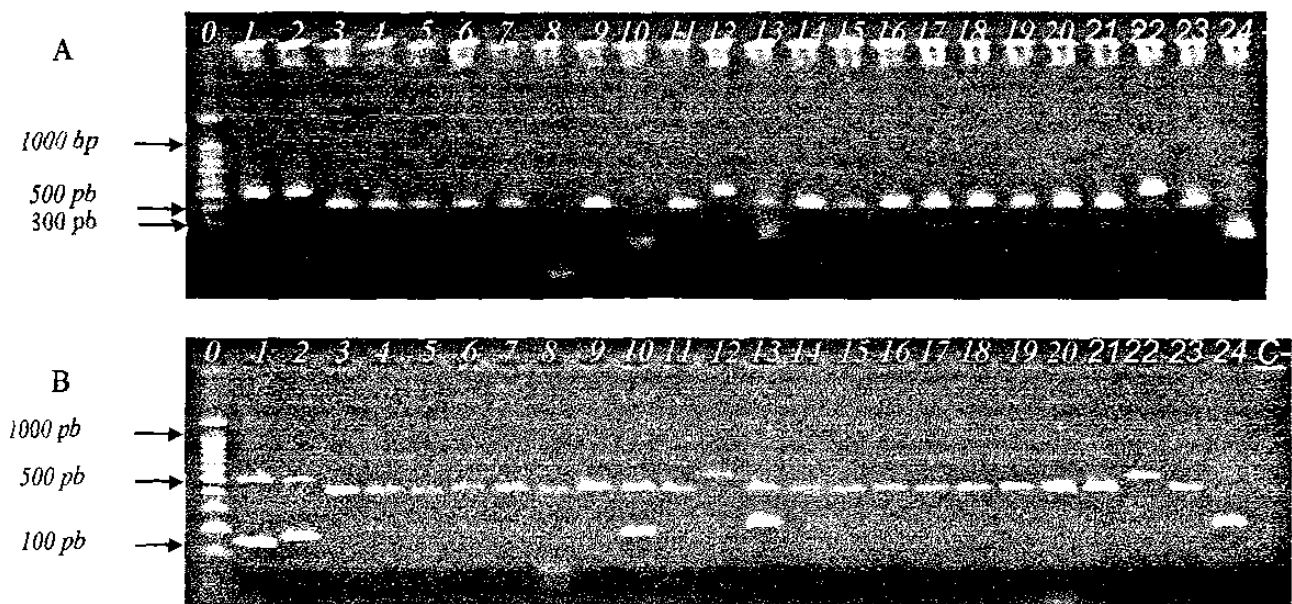


Figura 8. Ejemplo de las genotipificaciones del locus DQA1 empleando el estuche comercial Olerup SSP[®]. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR. La línea 0 corresponde al marcador de peso molecular de DNA de 100 pb (Promega, Life Science). En la figura A sólo se detectan los productos amplificados control en los carriles 1-7, 9, 11, 12 y 14-23. Los carriles 8, 10, 13, y 24 muestran además bandas de 65, 185, 225 y 240 pb respectivamente, que son los productos amplificados esperados para los alelos buscados. La genotipificación es homocigoto para *03011.

En la figura B sólo se detectan los productos amplificados control en los carriles 3-7, 9, 11, 12, 14-19 y 21-23. Los carriles 1, 2, 8, 10, 13 y 24 muestran además bandas de 145, 170, 65, 185, 225 y 240 pb, respectivamente, que son los productos amplificados esperados para los alelos buscados. La tipificación es *0101, *03011.

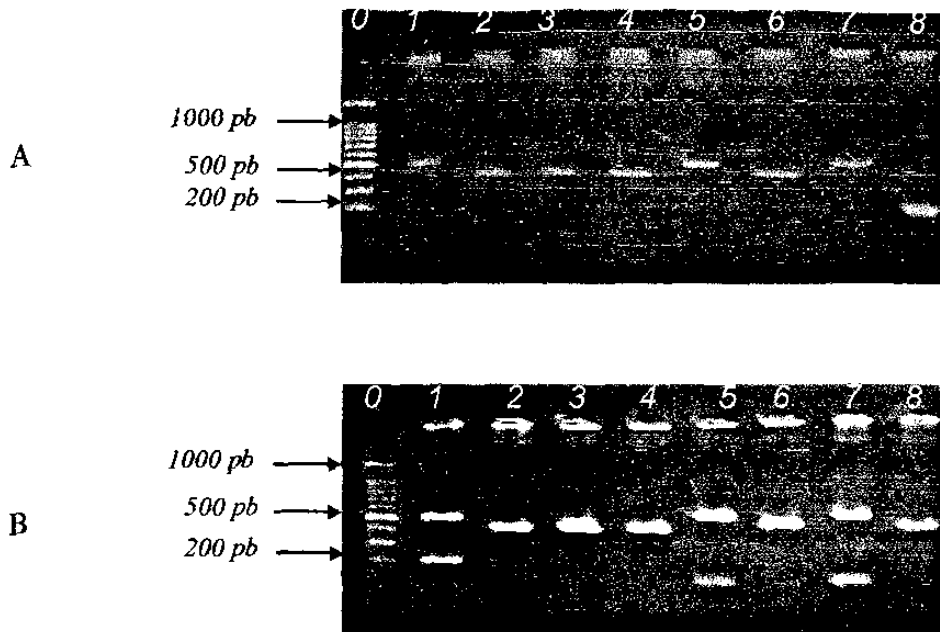


Figura 9. Ejemplo de las genotipificaciones del locus DQB1 empleando el estuche comercial Olerup SSP. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR. A. La línea 0 corresponde al marcador de peso molecular de DNA. Las líneas 1 a 7 representan la amplificación control. La banda 8 indica un resultado positivo para el alelo *04. En este gel se aprecia que el paciente es homocigoto para el alelo *04.

B. La línea 0 corresponde al marcador de peso molecular de DNA. Los carriles 2, 3, 4, 6 y 8 dieron productos solamente amplificados de 430 pb lo cual corresponde a las bandas control por lo que son negativos para los alelos estudiados en cada uno. Los carriles 1, 5 y 7 muestran productos de 515 pb que corresponden a los productos control, pero además dieron productos de 220, 125 y 135 bp respectivamente, por lo que la genotipificación es *05 y 0301,*0309.

No se encontraron diferencias significativas en otros alelos entre los grupos de estudio. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio de algún alelo de HLA-DQB1.

TABLAVI. ALELOS DE DQA1 MÁS FRECUENTES EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO

Alelo	Frecuencia en grupos de estudio			
	n (%)			
	Normal	Gastritis	Úlcera	Cáncer
*0101	8 (13.33)	14 (23.33)	8 (13.33)	12 (20.0)
0102 (0102 + *01021 + *01022)	16 (26.67)	2 (3.33)	8 (13.33)	20 (33.33)
*0103	0 (0.0)	2 (3.33)	4 (6.67)	4 (6.67)
*01012	0 (0.0)	4 (6.67)	2 (3.33)	2 (3.33)
*01041	2 (3.33)	4 (6.67)	6 (10.0)	0 (0.0)
*0201	10 (16.67)	8 (13.33)	10 (16.67)	6 (10.0)
*0303	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (6.67)	4 (6.67)
*03011	20 (33.33)	30 (50.0)	26 (43.33)	20 (33.33)
*0401	38 (63.33)	8 (13.33)	20 (33.33)	20 (33.33)
*0503	24 (40.0)	26 (43.33)	6 (10.0)	4 (6.67)
*0501	2 (3.33)	6 (10.00)	6 (10.0)	0 (0.0)
*0504	4 (6.67)	2 (3.33)	8 (13.33)	2 (3.33)
*05011	2 (3.33)	2 (3.33)	0 (0.0)	8 (13.33)
*05012	6 (10.0)	8 (13.33)	2 (3.33)	10 (16.67)

**TABLA VII FRECUENCIAS DE ALELOS DE HLA-DQB1 ENCONTRADAS PARA
CADA UNO DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO**

DQB	Frecuencia en grupos de estudio			
	n (%)			
	Normal	Gastritis	Úlcera	Cáncer
*02	14 (23.33)	18 (30.0)	18 (30.0)	4 (6.7)
*0301, *0309	24 (40)	20 (33.3)	16 (26.7)	14 (23.3)
*0302, *0304, *0305, *0307, *0308	24 (40.0)	40 (66.67)	36 (60.0)	40 (66.67)
*0303, *0306	6 (10)	6 (10.0)	2 (3.3)	12 (20.0)
*04	26 (43.33)	8 (13.3)	20 (33.3)	20 (33.3)
*05	12 (20.0)	20 (33.3)	18 (30.0)	6 (10.0)
*06	18 (30.0)	8 (13.3)	10 (16.7)	24 (40.0)

3.5 Análisis de regresión logística multivariada

Ya que en el análisis univariado se encontraron diferencias estadísticamente significativas de la edad, el género, la prevalencia de *H. pylori* CagA+, VacA+ y en las frecuencias del alelo DQA1*0503 en relación con el grupo cáncer, el análisis multivariado se dirigió a la combinación de factores en relación con el desarrollo de cáncer gástrico.

Se realizó un análisis de regresión logística tomando en cuenta la presencia de cáncer gástrico o displasia como variable dependiente y como variables independientes la infección por cepas de *H. pylori* CagA+, VacA+, tener más de 60 años, ser del género masculino y no

ser portador del alelo DQA1*0503. Este último factor se había encontrado en el análisis univariado que podría ser un factor protector para el desarrollo de cáncer por lo que se convirtió a factor de riesgo la ausencia del alelo.

Se construyeron 17 modelos de regresión logística con la combinación de variables (tabla IX) y como puede apreciarse en los primeros 5 modelos, los valores de p se incrementan a medida que se incrementan las variables hasta llegar a un modelo de 5 variables independientes en el cual la infección por cepas de *H. pylori* CagA+, VacA+, el no ser portador del alelo HLA-DQA1 *0503, tener más de 60 años y ser del género masculino explica en un 92.93% la probabilidad de padecer cáncer.

El máximo valor de p se obtiene con el modelo 5, el cual incluye las 5 variables estudiadas.

El mínimo valor de p se obtiene con el modelo 17, en el cual se incluyen la infección por cepas de *H. pylori* CagA+, VacA+ y la edad.

Se calcularon además los valores de OR corregidos y los intervalos de confianza para cada una de las variables (tabla IX) y como puede observarse, en el modelo que considera la combinación del mayor número de variables (modelo 5) solamente la edad tiene intervalos de confianza significativos.

La infección por cepas de *H. pylori* CagA+ tiene intervalos de confianza significativos en 9 de los modelos de regresión construidos. La infección por cepas de *H. pylori* VacA+ no es significativa en ninguno de los modelos de regresión estudiados.

TABLA VIII. MODELOS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA CONSTRUIDOS PARA ESTUDIAR LA COMBINACIÓN DE VARIABLES.

Modelo	OR corregida (IC 95%)						p
	Caga +	Vaca +	DQAI *0503 -	Edad (>60 años)	Género masculino		
1	6.88 (1.70-27.7)						61.36
2	3.25 (0.46-22.92)	2.46 (0.47-12.71)					64.86
3	2.99 (0.39-22.56)	3.06 (0.53-17.37)	8.53 (1.51-48.11)				74.13
4	2.74 (0.34-22.08)	3.04 (0.50-18.46)	6.11 (1.03-36.04)	2.94 (0.84-10.29)			83.11
5	2.71 (0.21-34.3)	3.14 (0.34-28.94)	3.15 (0.41-24.95)	15.71 (3.08-74.56)			92.93
6	18.20 (4.61-71.84)						79.89
7	21.63 (4.9-95.53)	1.19 (0.1-13.38)					76.31
8	16.44 (3.59-75.13)	1.13 (0.09-13.22)	1.01 (0.11-9.08)				79.90
9		14.57 (3.05-69.5)	1.04 (0.20-5.25)	4.65 (0.43-49.20)			88.02
10	14.57 (3.07-69.03)		1.05 (0.17-6.5)	4.63 (0.44-48.5)			87.98
11	18.12 (3.84-85.47)	1.14 (0.09-14.97)		0.84 (0.08-8.25)			87.24
12	16.44 (3.59-75.13)	1.13 (0.09-13.22)	1.01 (0.11-9.08)				79.90
13			14.82 (3.5-62.68)	4.61 (0.44-48.16)			87.86
14				4.56 (1.13-18.39)			68.45
15	1.60 (0.36-7.02)			4.56 (1.13-18.43)			68.73
16	3.95 (1.22-12.77)			1.13 (0.29-4.41)			60.31
17	3.98 (1.20-13.0)	1.19 (0.17-8.39)		0.93 (0.16-5.36)			60.12

3.6 Asociación en desequilibrio de los diferentes haplotipos

Se determinaron las frecuencias de los diferentes haplotipos y los coeficientes de asociación en desequilibrio. Se determinó si existía asociación en desequilibrio mediante la prueba de χ^2 . No se encontró asociación en desequilibrio entre los diferentes haplotipos estudiados.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

En este trabajo se empleó un método previamente desarrollado para la determinación de anticuerpos IgG anti-*H. pylori*. El método se validó para conocer su utilidad diagnóstica en la población de estudio. Se obtuvieron valores de sensibilidad del 97.5 y de exactitud del 91.5, los cuales son similares a los obtenidos en otros estudios (2).

En base a que las pruebas para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* no tuvieron sensibilidades y especificidades del 100%, en este trabajo se emplearon 4 pruebas diferentes. Solamente los pacientes con al menos dos pruebas positivas fueron considerados como infectados con *H. pylori* y sólo los pacientes con las cuatro pruebas negativas se consideraron como no infectados.

Una de las preocupaciones principales al iniciar este trabajo fue que resultara difícil completar el grupo de estudio cáncer. Este grupo se completó en 16 meses. El grupo normal se integró en 18 meses.

Es generalmente aceptado que la edad y el género masculino son factores de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico o úlcera (4, 12, 14, 19). Los resultados de este trabajo mostraron claramente esta asociación.

Diversos estudios han sugerido que un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico es la edad de adquisición de la infección. La infección en etapas tempranas de la vida inducen una respuesta inflamatoria más intensa, el desarrollo de gastritis atrófica y un mayor riesgo al desarrollo de cáncer gástrico (9).

Aunque la edad de adquisición de la infección no pudo ser determinada en este trabajo, es probable que la edad esté implícita en la asociación con cáncer gástrico, ya que los

pacientes con cáncer gástrico mostraron una media de edad mayor por lo que es probable que la adquisición de *H. pylori* en nuestra población sea edades tempranas tal como ha sido descrito en otros países en vías de desarrollo (12).

A nivel mundial las tasas de cáncer gástrico y la incidencia de la infección por *H. pylori* están declinando (12). En los países desarrollados actualmente las tasas de infección en niños son menores del 10%. Los cambios en la prevalencia de la infección por *H. pylori*, la industrialización y la mejoría en las condiciones socioeconómicas de muchas poblaciones podrían en un futuro ayudar a explicar los cambios en la epidemiología del cáncer gástrico.

Diversos estudios han mostrado asociación de la infección por cepas de *H. pylori* CagA+ y/o VacA+ con el desarrollo de enfermedad úlcero péptica o cáncer gástrico (4, 10, 15, 21, 22, 31, 39, 51, 52, 61). En lo que respecta a la infección por cepas de *H. pylori* CagA+ y el desarrollo de cáncer, se han reportado valores de OR que van desde 3.1 hasta 10.2. Los resultados de este trabajo confirmaron que la asociación con cáncer gástrico fue estadísticamente significativa e incluso muestran valores similares a los previamente reportados, sin embargo la asociación con el desarrollo de enfermedad úlcero péptica no fue estadísticamente significativa. Es probable que se logre la confirmación si se estudia un tamaño de muestra mayor.

La importancia clínica de los factores de virulencia relacionados con la bacteria es todavía motivo de un controversial debate. La información actual sugiere una considerable variación genética en diferentes regiones geográficas y también diferentes tasas de prevalencia de enfermedad. Si bien es claro que la infección por *H. pylori* es probablemente el factor crítico en el inicio de la inflamación, aun no se conocen factores bacterianos que invariablemente se asocien con enfermedad. Los factores del hospedero pueden, al menos

parcialmente determinar la respuesta a la infección por *H. pylori*. Los factores del medio ambiente pueden tener también un papel importante en la presentación clínica.

Tanto el desarrollo de úlcera como el cáncer gástrico tienen antecedentes familiares, lo cual podría explicarse ya sea por la infección por *H. pylori* entre los miembros de la familia por la misma cepa virulenta o por las características inmunogenéticas de los hospederos.

Algunas investigaciones han mostrado asociación entre algunos alelos de HLA-DQA1 o DQB1 con las diferentes patologías gástricas relacionadas con *H. pylori*, sin embargo no han logrado reproducir esta asociación en grupos étnicos diferentes.

Los resultados de este trabajo muestran que el ser portador del alelo DQA1 *0503 podría representar un factor protector para el desarrollo de cáncer gástrico o displasia. Es importante mencionar que esta asociación no había sido descrita previamente e incluso no se había descrito la asociación de este alelo con alguna otra de las patologías gástricas relacionadas con *H. pylori*. Es necesario investigar la frecuencia del alelo DQA1*0503 en otras poblaciones para establecer si la asociación es consistente tanto experimental como epidemiológicamente.

En el análisis univariado, la edad, el género masculino, la infección por cepas de *H. pylori* CagA+, VacA+ y el alelo DQA1 *0503 mostraron asociaciones significativas con los pacientes con cáncer gástrico o displasia. En cada una de estas variables se obtuvieron OR con valores de IC 95% muy significativos, con lo cual se mostró una clara asociación de estas variables con el desarrollo de cáncer gástrico o displasia.

Para el análisis multivariado se construyeron 17 modelos de regresión logística considerando todas las variables con OR e IC 95% significativos en el análisis univariado. En cada uno de los modelos se observa que no todas las variables tienen IC 95% significativos. Solamente el modelo modelo 11 incluye dos variables con IC 95%

significativos, los modelos 1, 3 al 10 y 12 al 17 tienen sólo una variable significativa y el modelo 2 no tiene variables significativas.

En el modelo que incluye la infección por cepas de *H. pylori* CagA+, VacA+ y el no ser portador del alelo DQA1 *0503 solamente la ausencia de alelo tiene IC significativos (OR= 8.53, IC 95%= 1.51-48.1).

En el modelo que incluyó el mayor número de variables, solamente la edad (>60 años) tiene IC 95% significativos (OR= 15.71 IC 95%= 3.08-74.56). Esto nos muestra que la edad es la variable que tiene mayor participación en la combinación de factores.

Es interesante además que la infección por cepas de *H. pylori* CagA+ es la variable que tiene el mayor número de IC 95% significativos en los modelos estudiados, lo cual le da consistencia como factor de riesgo. Otra variable muy interesante es la infección por cepas de *H. pylori* VacA+, ya que no presenta IC 95% significativos en ninguno de los modelos de regresión estudiados. Esto podría sugerir que la asociación de enfermedad no es con la presencia de anticuerpos anti-VacA sino tal vez con alelos de *vacA*, tal como ha sido propuesto (3).

Estos modelos no habían sido construidos previamente en otros trabajos, por lo que no es posible comparar los resultados con estudios previos

En el análisis multivariado los valores de p nos muestran en qué medida se puede explicar el desarrollo de cáncer con la combinación de variables en cada modelo. De acuerdo con el modelo que involucra el mayor número de variables, si los pacientes están infectados por cepas de *H. pylori* CagA+, VacA+, no son portadores del alelo DQA1*0503, tienen más de 60 años y son del género masculino se explica en un 92.93% la probabilidad de padecer cáncer gástrico. Probablemente la edad a la cual los pacientes adquirieron la infección tiene una influencia importante en el valor de p.

En este trabajo se estudio la asociación de factores bacterianos y factores del hospedero con las diversas presentaciones clínicas relacionadas con *H. pylori*, el cual no había sido previamente reportado. Aunque la asociación con la infección con cepas de *H. pylori* CagA+ y/o VacA+ ya había sido descrita, en este trabajo se describe por primera vez la probable participación del alelo DQA1 *0503, ya que los estudios previos de asociación de alelos de HLA DQ con las presentaciones clínicas relacionadas con *H. pylori* han descrito la probable participación de otros alelos (5-7, 40, 55).

Los conceptos actuales del estudio de los factores de riesgo del hospedero muestran una probable participación de los polimorfismos de la IL- β para el desarrollo de cáncer gástrico (19), el estudio de polimorfismos en esta población podría permitir la definición de una asociación más clara.

La infección por *H. pylori* es cosmopolita. Las manifestaciones clínicas relacionadas con la infección parecen ser el resultado de interacciones complejas entre los factores de virulencia de la bacteria, la edad de adquisición de la infección, factores del hospedero y probablemente también factores ambientales y de la dieta. La definición de la participación de cada uno de ellos requiere estudios posteriores.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

1. La edad es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico.
2. El cáncer gástrico es más frecuente en el género masculino que en el género femenino.
3. El desarrollo de enfermedad úlcero-péptica es más frecuente en el género masculino que en el género femenino.
4. Los pacientes infectados por cepas de *H. pylori* CagA⁺ tienen mayor riesgo al desarrollo de cáncer que los individuos infectados por cepas de *H. pylori* CagA⁻.
5. Los pacientes infectados por cepas de *H. pylori* VacA⁺ tienen un riesgo mayor al desarrollo de cáncer que los individuos infectados por cepas de *H. pylori* VacA⁻.
6. La presencia del alelo HLA-DQA1*0 503 podría representar un factor protector al desarrollo de cáncer gástrico.
7. Con base en estos resultados, ningún alelo de HLA-DQB1 parece ser un factor de riesgo o protector al desarrollo de las diferentes patologías gástricas relacionadas con *H. pylori*.
8. La infección por *H. pylori* CagA⁺, VacA⁺ y no ser portador del alelo DQA1*0503 explica una probabilidad del 74.13% de padecer cáncer gástrico o displasia. Si se considera además el tener más de 60 años la probabilidad aumenta al 83.11%. Si se considera además el ser del sexo masculino la probabilidad aumenta al 92.93%.

REFERENCIAS

1. Alaez C, Mora M del P, Arellanes L, Cano S, Pérez-Luque E, Vázquez MN, Olivo A, Burguete A, Hernández A, Pedroza M, Gorodezky C. Strong association of HLA Class II sequences in Mexican with Vogt-Koyanagi-Harandas disease. *Human Immunol.* 1999; 60: 875-82.
2. Andersen LP, Kiilerick G, Pedersen G, Thoreson AC, Jorgensen F, Rath J, Larsen NE, Borup O, Krogfelt K, Scheibel J, Rune S. An analysis de seven different methods to diagnose *Helicobacter pylori* infections. *Scan J Gastroenterol.* 1998; 33: 24-30.
3. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem.* 1995; 270: 17771-7.
4. Axon ATR. Are all Helicobacters equal? Mechanisms of gastroduodenal pathology and their clinical implications. *Gut.* 1999; 45(Suppl. I): I1-4.
5. Azuma T, Ito S, Sato F, Yamazaki Y, Miyaji H, Ito Y, Suto H, Kuriyama M, Kato T, Kohli Y. The role of the HLA-DQA1 gene in resistance to atrophic gastritis and gastric adenocarcinoma induced by *Helicobacter pylori* infection. *Cancer.* 1998; 82: 1013-8.
6. Azuma T, Konishi J, Ito Y, Hirai M, Tanaka Y, Ito S, Kato T, Kohli Y. Genetic differences between duodenal ulcer patients who were positive or negative for *Helicobacter pylori*. *J Clin Gastroenterol.* 1995; 21(Suppl. 1): S151-4.
7. Azuma T, Konishi J, Tanaka Y, Hirai M, Ito S, Kato T, Kohli Y. Contribution of HLA-DQA gene to host's response against *Helicobacter pylori*. *Lancet.* 1994; 343: 542-3.

8. Basso D, Navaglia F, Brigato L, Piva MG, Toma A, Greco E, Di Mario F, Galeotti F, Roveroni G, Corsini A, Plebani M. Analysis of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes and serum antibody profile in benign and malignant gastroduodenal diseases. *Gut*. 1998; 43: 182-6.
9. Blaser MJ, Chyoy PH, Nomura A. Age of establishment of *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma, gastric ulcer and duodenal ulcer risk. *Cancer Res*. 1995; 55: 562-5.
10. Blaser MJ, Perez-Perez G, Kleanthous H, Cover T, Peek RM, Chyou PH. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res*. 1995; 55: 2111-5.
11. Braden B, Caspary WF. Detection of *Helicobacter pylori* infection: when to perform wich test? *Ann Med*. 2001; 33: 91-7.
12. Brown LM. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev*. 2000; 22:283-97. Review.
13. Brenner H, Rothenbacher D, Gunter B, Guido A. Relation of smoking and alcohol and coffee consumption to active *Helicobacter pylori* infection: cross sectional study. *Br Med J*. 1997; 315: 1489-92.
14. Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Am J Surg Pathol*. 1995; 19: S37-S43.
15. Cover TL, Glupczynski Y, Lage AP, Burette A, Tummuru MK, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Serologic detection of infection with *cagA*⁺ *Helicobacter pylori* strains. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 1496-500.
16. Dawson B. Trapp RG. *Bioestadística Médica*. Ed. El Manual Moderno. México DF. 1993.

17. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev. 1997; 10: 720-41.
18. Enroth H, Nyren O, Engstrand L. One stomach-one strain; does *Helicobacter pylori* strain variation influence disease outcome? Dig Dis Sci. 1999; 44: 102-7.
19. Ernst PB, Gold BD. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. Annu Rev Microbiol. 2000; 54: 615-40.
20. Falconer DS. Introducción a la genética cuantitativa. Ed. Continental 10ª reimpresión, México. 1980.
21. Fallone CA, Barkun AN, Gottke MU, Beech RN. A review of the possible bacterial determinants of clinical outcome in *Helicobacter pylori* infection. Can J Microbiol. 1998; 44: 201-10.
22. Figueiredo C, Quint W, Nouhan N, Munckhof H, Herbrink P, Scherpenisse J, de Boer W, Schneeberger P, Perez-Perez GI, Blaser MJ, van Dorn L. Assessment of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes and host serological response. J Clin Microbiol. 30; 1339-44.
23. Forman D. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. Lancet. 1993; 341: 1359-62.
24. Forman D. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. Scand J Gastroenterol. 1996; 31(Suppl 214): 31-33.
25. Forman D. *Helicobacter pylori*: the gastric cancer problem. Gut. 1998; 43 (Suppl 1): S33-4.

26. Guerrero Olazarán M, Viader Salvadó JM. Manual del curso teórico práctico “Técnicas de biología molecular de aplicación en el laboratorio microbiológico”. Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, 1999.
27. Go MF. What are the host factors that place an individual at risk for *Helicobacter pylori*-associated disease? *Gastroenterology*. 1997; 113(Suppl. 6): S15-S20.
28. Gordon D. CagA protein from *Helicobacter pylori* is a Trojan Horse to epithelial cells. *Gastroenterology*. 2000; 118:817.
29. Graham DY, Yamaoka Y. Disease-specific *Helicobacter pylori* virulence factors: the unfulfilled promise. *Helicobacter*. 2000; 5: S3-S9.
30. Graham DY. *Helicobacter pylori* infection in pathogenesis of duodenal ulcer and gastric cancer: a model. *J Gastroenterol*. 1997; 113: 1983-91.
31. Gunn MC, Stephens JC, Stewart JA, Rathbone BJ, West KP. The significance of *cagA* and *vacA* subtypes of *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of inflammation and peptic ulceration. *J Clin Pathol*. 1998; 51: 761-4.
32. Holcombe C. *Helicobacter pylori*: The African enigma. *Gut*. 1992; 33: 429-31.
33. Hunt RH, Tytgat G. *Helicobacter pylori*. Basic Mechanisms to clinical cure 2000. Kluwer Academic Publishers and Axcan Pharma The Netherlands.
34. Jenks PJ, Megraud F. Clinical outcome after infection with *Helicobacter pylori* does not appear to be reliably predicted by the presence of any of the genes of the *cag* pathogenicity island. *Gut*. 1998; 43: 752-8.

35. Kemppainen H, Ismo R, Harry K, Sourander L. Characteristics of *Helicobacter pylori* -negative and positive peptic ulcer disease. 1998; 27: 427-31.
36. Klein J, Sato A. The HLA System Part I and II. New England J Med. 2000. 343: 702-709 and 782-787.
37. Lechler R, Warrens A. HLA in health and disease. Academic Press. USA.
38. Lee JE, Lowy AM, Thompson WA, Lu M, Loflin PT, Skibber JM, Evans DB, Curley SA, Mansfield PF, Reveille JD. Association of gastric adenocarcinoma with the HLA class II gene DQB1*0301. Gastroenterology. 1996; 11: 426-32.
39. Maeda S, Ogura K, Yoshida H, Kanai F, Ikenoue T, Kato N, Shiratori Y, Omata M. Major virulence factors, VacA and CagA, are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. Gut. 1998; 42: 338-43.
40. Magnusson PKE, Enroth H, Eroksson I, Held M, Nyrén O, Engstrand L, Hansson LE, Gyllensten UB. Gastric Cancer and Human leukocyte antigens: distinct DQ and DR alleles are associated with development of gastric cancer and infection by *Helicobacter pylori*. Cancer Res. 2001; 61: 2684-9.
41. Marshall B, Warren R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. 1984. Lancet i: 1311-15.
42. McNulty C, Wyatt JJ. *Helicobacter pylori*. J Clin Pathol. 1999; 52: 338-44.
43. Murray PR, EJ Baron, MA Pfaller, FC Tenover, RH Tenover. Manual of Clinical Microbiology. 1999. ASM Press. 7th edition.
44. NIH consensus Statement. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. JAMA 1994;272: 65-9.

45. Peek RM, Miller GG, Tham KT, Perez-Perez GI, Zhao X, Atherton JC, Blaser MJ. Heightened inflammatory response and cytokine expression *in vivo* to *cagA*⁺ *Helicobacter pylori* strains Lab Invest. 1995; 73: 760-70.
46. Pérez-Luque E, Malacara JM, Olivo Díaz A, Aláez C, Debaz H, Vázquez-García M, Garay E, Nava LE, Burguete A, Gorodezki C. Contribution of HLA class II genes to end stage renal disease in Mexican patients with type 2 diabetes mellitus. Humman Immunol. 2000; 61: 1031-8.
47. Pérez Pérez GI, Blser MJ, Conservation and diversity of *Campylobacter pyloridis* major antigens. Infect Immun. 1987; 55:1256-63.
48. Perez-Perez GI, Dworkin BM, Chodos JE, et al. *Campylobacter pylori* antibodies in humans. Ann Intern Med. 1988;109:11-7.
49. Perez-Perez GI. Accurate diagnosis of *Helicobacter pylori*. Culture, including transport. Gastroenterology Clinics of NorthAmerica. 2000; 29:879-84.
50. Peter E, Gold B. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal and gastric cancer. Annu Rev Microbiol. 2000; 54: 615-40.
51. Rocha GA, Oliveira AMR, Queiroz DM, Carvalho A, Nogueira MMF. Immunoblot analysis of humoral response to *Helicobacter pylori* in children with and without duodenal ulcer. J Clin Micorbiol. 2000; 38:1777-81.
52. Rudi J, Kolb C, Maiwald M, Zuna I, von Herbay A, Galle PR, Stremmel W. Serum antibodies against *Helicobacter pylori* proteins VacA and CagA are associated with increased risk for gastric adenocarcinoma. Dig Dis Sci. 1997; 42: 1652-9.

53. Rugge M, Busatto G, Cassaro M, Shiao YH, Russo V, Leandro G, Avellini C, Fabiano A, Sidoni A, Covacci A. Patients younger than 40 years with gastric carcinoma: *Helicobacter pylori* genotype and associated gastritis phenotype. *Cancer*. 1999; 85: 2506-11.
54. Sakai T, Aoyama N, Satonaka K, Shigeta S, Yoshida H, Shinoda Y, Shirasaka D, Miyamoto M, Nose Y, Kasuga M. HLA-DQB1 locus and the development of atrophic gastritis with *Helicobacter pylori* infection *J Gastroenterol*. 1999; 11(Suppl. 11): 24-7.
55. Santolaria S, Barrios Y, Benito R, Piazueta E, Quintero E, Lanas A. *Helicobacter pylori* y factores inmunogenéticos del huésped: relevancia de los alelos HLA-DQA *0102 y *0301 en la úlcera péptica. *Gastroenterol Hepatol*. 2001; 24:117-21.
56. Shyu RY, Jiang SY, Lai CH, Hsu CT, Young TH, Yeh MY. High frequency of cytotoxin-associated gene A in *Helicobacter pylori* isolated from asymptomatic subjects and peptic ulcer patients in Taiwan. *J Clin Gastroenterol*. 1998; 27: 54-9.
57. Svejgaard A, Ryder LP. HLA and disease associations: Detecting the strongest association. *Tissue antigens*. 1994; 43: 18-27.
58. Thanh NN, Barkun AN, Fallone, CA. Host determinants of *Helicobacter pylori* infection and its clinical outcome. *Helicobacter*. 1999. 4: 185-97.
59. Tiwari JL, Terasaki PI. HLA and disease associations. Springer-Verlag New York, Inc. 1985.
60. Torres J, Leal-Herrera Y, Pérez-Pérez GI, Gomez A, Camorlinga-Ponce M, Cedillo-Rivera R, Tapia-Conyer R, Muñoz O. A community-based seroepidemiological study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *J Inf Dis*. 1998. 178: 1089-94.

61. van Doorn, LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer W, Quint W. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1998; 115: 58-66.
62. Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, Graham DY. Antibody against *Helicobacter pylori* CagA and VacA and the risk for gastric cancer. *J Clin Pathol.* 1998; 52: 215-18.

APÉNDICES

APÉNDICE A

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Prueba de ureasa

Inocular la cepa de estudio de agar urea de Christensen por picadura y estría.

Incubar a 37°C por un máximo de 6 horas

Observar el medio de cultivo e interpretar la prueba

Interpretación:	Positivo	color rojo en el medio de cultivo
	Negativo	no hay cambio en el color del medio.

Prueba de catalasa

Tomar una asada de la cepa de estudio y sumergirla en 1 mL de H₂O₂ al 30%

Observar e interpretar la prueba

Interpretación:	Positivo	formación de burbujas
	Negativo	no hay formación de burbujas.

Prueba de oxidasa

Impregnar un papel filtro con una gota de reactivo de oxidasa (cloruro de N, N, dimetil-p-fenilendiamina al 1% en agua)

Tomar una asada de la bacteria de estudio teniendo cuidado de no arrastrar medio de cultivo

Extender la colonia en el papel filtro empapado en el reactivo de oxidasa

Observar e interpretar la prueba:

Interpretación:	Positivo	formación de color rosa-morado-negro.
	Negativo	No hay cambio de color

APÉNDICE B

TINCIONES

- **Tinción de Gram**
 - Se tiñe con cristal violeta durante un minuto
 - Enjuagar con agua destilada
 - Cubrir la preparación con solución de lugol y se deja actuar durante un minuto
 - Se enjuaga con agua destilada para eliminar el exceso de lugol
 - Decolorar con alcohol al 70% durante 10 segundos
 - Cubrir la preparación con safranina durante 30 segundos
 - Enjuagar con agua destilada
 - Se deja secar al aire y se observa la preparación con objetivo de 100 X

APÉNDICE C

MEDIOS DE CULTIVO O DE TRANSPORTE

- Agar Columbia con sangre al 10% y el enriquecimiento Iso VitaleX al 1%
Pesar 39 g de polvo y se agrega 1 L de agua destilada pH=7
Calentar hasta ebullición hasta disolución del agar
Esterilizar en autoclave a 121°C, 15lb por 15 min
Enfriar a aproximadamente 45°C y se agregan 10 mL de enriquecimiento Iso VitaleX
Agregar 100 mL de sangre y mezclar evitando la formación de burbujas
Vaciar en pacas Petri y dejar solidificar a temperatura ambiente.
Incubar 24 h a 37°C para verificar la pureza del medio.

- Medio de transporte de Stuart
Se pesan 19 g de medio y se disuelven en 1 L de agua destilada pH=7
Se disuelve el medio calentando a ebullición
Dispensar en tubos de vidrio de tapón de rosca de 13X 100mm
Esterilizar en autoclave a 121°C, 15lb por 15 min

APÉNDICE D

PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES

Ácido cítrico 0.1M

Pesar 9.6 g de ácido cítrico y disolver en 500 mL de agua destilada

Agarosa al 8%

Disolver 0.4 g de agarosa en 50 mL de TBE 1X calentando en microondas o en una plancha de calentamiento.

Amortiguador de carbonatos 0.05 M pH 9.6

Pesar 1.59 g de Na_2CO_3 , 2.93 g de NaHCO_3 y 0.2 g de NaN_3 y diluir en 1 L de agua destilada

Amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.2 a 7.4

Solución A. 30 g de NaH_2PO_4 y disolver en 500 mL de agua destilada

Solución B. Pesar 35.5 g de Na_2HPO_4 y disolver en 500 mL de agua destilada

Mezclar 60 mL de la solución A y 200 mL de la solución B

Amortiguador McIlvans.

Mezclar 9.35 mL de Na_2HPO_4 0.2 M con 10,65 mL de una solución de ácido cítrico 0.1M.

Bromuro de etidio 0.5 mg/mL (solución stock)

Disolver 25 mg de bromuro de etidio en 40 mL de agua ultrapura. Aforar a 50 mL y almacenar a 4°C protegido de la luz en un recipiente de vidrio ámbar.

Bromuro de etidio 2 µg/mL (solución de trabajo)

Preparar una dilución 1:250 de la solución stock para teñir los geles (1 mL de la solución stock más 249 mL de agua ultrapura).

Cloroformo-alcohol isoamílico 24:1

Mezclar 24 mL de cloroformo y 1 mL de alcohol isoamílico.

EDTA 500 mM pH=8

Disolver 18,612 g de Na₂EDTA en 40 mL de agua ultrapura, ajustar el pH a 8.0 con lentejas de NaOH y aforar a 100 mL con agua ultrapura. Esterilizar en autoclave.

Etanol al 70%

Mezclar 35 mL de etanol al 100% y 15 mL de agua destilada estéril.

Fenol saturado

Fundir el fenol a temperatura de 68°C (destilar si su aspecto fundido no es cristalino).

Equilibrar el fenol a pH mayor de 7.8

Agregar hidroxiquinoleína a una concentración final de 0.1%

Añadir un volumen de solución amortiguadora Tris-HCl 0.5 M pH=8 y mezclar con una barra magnética hasta que el pH de la fase fenólica sea mayor que 7.8

Agitar durante 48 horas a temperatura de refrigeración.

Dejar que se separen las fases y eliminar la fase acuosa utilizando una pipeta conectada a una línea de vacío con trampa o un embudo de separación.

Repetir la misma operación pero utilizando solución amortiguadora Tris-HCl 0.1 M pH=8

Eliminar la fase acuosa final y añadir 0.1 volúmenes de Tris-HCl 0.1 M pH=8 conteniendo b-mercaptoetanol a una concentración final de 0.2%.

Almacenar en un frasco oscuro a -20°C. Conservar el fenol en uso a 4°C

Fosfato de sodio monoácido de sodio 0.2 M

Pesar 14.2 g de Na_2HPO_4 y disolver en 500 mL de agua destilada

Jugo azul 6X (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30%)

Disolver 235 mg de bromofenol, 25 mg de xilencianol y 3 mL de glicerol en TE 1X pH=8.

Aforar a 120 mL. No esterilizar.

Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1%

Mezclar 5 mL de una solución de SFDS al 10% en 50 ML de agua destilada.

Esterilizar en autoclave.

PBSTT (Solución de lavado)

Pesar 165.7 g de NaCl, 2 g de timerosal, y disolver en 400 mL de amortiguador de fosfatos.

Añadir 10 mL de tween 20 y aforar a 20 L con agua destilada.

PBSTTG (Solución bloqueadora)

Pesar 1 g de gelatina y disolver en PBSTT calentando en un baño de agua a 50 a 60°C hasta disolución total. Dejar enfriar antes de usar.

Solución amortiguadora de lisis TSNT

(Tritón 100 al 2%, SDS al 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH=8, EDTA 1mN).

Disolver 500 mL de tritón 100 en 125 mL de agua destilada

Disolver 146.25 mg de NaCl, agregar 2.5 mL de SDS al 10%, 500 mL de Tris:HCl 500 mM pH=8 y 50 mL de EDTA 500 mM y aforar a 25 mL

Esterilizar en autoclave.

Solución de desarrollo de color

Inmediatamente antes de usar, mezclar 20 mL de amortiguador de McIlvains, 20 mg de 2-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico (ABTS), y 32 μ L de H₂O₂ al 30%.

TBE 10 X

Solución stock (Tris-base 89 mN, ácido bórico 89mM, EDTA 20 mN pH=8)

Disolver 54 g de Tris-Base, 27.5 g de ácido bórico en 20 mL de EDTA 0.5 M pH=8 y aforar a 500 mL con agua ultrapura.

TBE 1X.

Solución de trabajo (Tris-base 0.089 M, ácido bórico 0.089 M, EDTA 2 mM pH=8)

Mezclar 500 mL de Tris-HCl 500 mM pH=8 y 50 mL de EDTA 500 mM en agua destilada

Ajustar el pH a 8 y aforar a 25 mL.

Esterilizar en autoclave.

Tris-HCl 500 mM pH=8 (Solución stock)

Disolver 30.3g de trisma base en 300 mL de agua ultrapura

Ajustar el pH con HCl 12F y aforar a 500 mL

Esterilizar en autoclave.

APÉNDICE E

(1/4)

Resultados obtenidos en las pruebas empleadas para el diagnóstico de la infección por
H. pylori

Clave	Cultivo	PRU	Histología	RDO ELISA IgG	Interpretación ELISA
1	Negativo	Negativo	Negativo	0.38	Negativo
2	Negativo	Negativo	Negativo	0.21	Negativo
3	Negativo	Negativo	Negativo	0.24	Negativo
4	Negativo	Negativo	Negativo	0.26	Negativo
5	Negativo	Negativo	Negativo	0.25	Negativo
6	Negativo	Negativo	Negativo	0.32	Negativo
7	Negativo	Negativo	Negativo	0.34	Negativo
8	Negativo	Negativo	Negativo	0.23	Negativo
9	Negativo	Negativo	Negativo	0.33	Negativo
10	Negativo	Negativo	Negativo	0.16	Negativo
11	Negativo	Negativo	Negativo	0.42	Negativo
12	Negativo	Negativo	Negativo	0.19	Negativo
13	Negativo	Negativo	Negativo	0.52	Negativo
14	Negativo	Negativo	Negativo	0.33	Negativo
15	Negativo	Negativo	Negativo	0.20	Negativo
16	Negativo	Negativo	Negativo	0.22	Negativo
17	Negativo	Negativo	Negativo	0.35	Negativo
18	Negativo	Negativo	Negativo	0.39	Negativo
19	Negativo	Negativo	Negativo	0.67	Negativo
20	Negativo	Negativo	Negativo	0.04	Negativo
21	Negativo	Negativo	Negativo	0.32	Negativo
22	Negativo	Negativo	Negativo	0.05	Negativo
23	Negativo	Negativo	Negativo	0.09	Negativo
24	Negativo	Negativo	Negativo	0.09	Negativo
25	Negativo	Negativo	Negativo	0.37	Negativo
26	Negativo	Negativo	Negativo	0.14	Negativo
27	Negativo	Negativo	Negativo	0.38	Negativo
28	Negativo	Negativo	Negativo	0.36	Negativo
29	Negativo	Negativo	Negativo	0.42	Negativo
30	Negativo	Negativo	Negativo	0.40	Negativo

APÉNDICE E

(2/4)

Resultados obtenidos en las pruebas empleadas para el diagnóstico de la infección por
H. pylori

Clave	Cultivo	PRU	Histología	RDO ELISA IgG	Interpretación ELISA
31	Positivo	Positivo	Positivo	2.77	Positivo
32	Positivo	Positivo	Positivo	3.02	Positivo
33	Positivo	Positivo	Positivo	4.05	Positivo
34	Positivo	Positivo	Positivo	2.73	Positivo
35	Positivo	Positivo	Positivo	1.06	Positivo
36	Positivo	Positivo	Positivo	1.57	Positivo
37	Positivo	Positivo	Positivo	4.48	Positivo
38	Positivo	Positivo	Positivo	2.56	Positivo
39	Positivo	Positivo	Positivo	4.39	Positivo
40	Negativo	Positivo	Positivo	0.39	Negativo
41	Positivo	Positivo	Positivo	5.85	Positivo
42	Positivo	Positivo	Positivo	3.83	Positivo
43	Positivo	Positivo	Positivo	4.84	Positivo
44	Positivo	Positivo	Positivo	2.74	Positivo
45	Positivo	Positivo	Positivo	2.96	Positivo
46	Positivo	Positivo	Positivo	4.19	Positivo
47	Positivo	Positivo	Positivo	3.05	Positivo
48	Positivo	Positivo	Positivo	4.13	Positivo
49	Positivo	Positivo	Positivo	2.60	Positivo
50	Positivo	Positivo	Positivo	3.89	Positivo
51	Positivo	Positivo	Positivo	6.33	Positivo
52	Positivo	Positivo	Positivo	4.29	Positivo
53	Positivo	Positivo	Positivo	2.57	Positivo
54	Positivo	Positivo	Positivo	4.66	Positivo
55	Positivo	Positivo	Positivo	6.01	Positivo
56	Positivo	Positivo	Positivo	2.45	Positivo
57	Positivo	Positivo	Positivo	3.15	Positivo
58	Positivo	Positivo	Positivo	2.07	Positivo
59	Positivo	Positivo	Positivo	4.73	Positivo
60	Positivo	Positivo	Positivo	4.13	Positivo

APÉNDICE E

(3/4)

Resultados obtenidos en las pruebas empleadas para el diagnóstico de la infección por
H. pylori

Clave	Cultivo	PRU	Histología	RDO ELISA IgG	Interpretación ELISA
61	Negativo	Positivo	Positivo	4.78	Positivo
62	Positivo	Positivo	Positivo	5.04	Positivo
63	Positivo	Positivo	Negativo	3.97	Positivo
64	Negativo	Negativo	Positivo	2.50	Positivo
65	Negativo	Negativo	Positivo	1.45	Positivo
66	Positivo	Negativo	Positivo	2.00	Positivo
67	Positivo	Positivo	Positivo	1.25	Positivo
68	Positivo	Positivo	Positivo	1.97	Positivo
69	Positivo	Positivo	Positivo	1.23	Positivo
70	Positivo	Positivo	Positivo	3.83	Positivo
71	Negativo	Negativo	Positivo	3.53	Positivo
72	Positivo	Positivo	Positivo	4.29	Positivo
73	Positivo	Positivo	Negativo	2.08	Positivo
74	Negativo	Negativo	Positivo	4.47	Positivo
75	Positivo	Positivo	Positivo	4.26	Positivo
76	Positivo	Positivo	Positivo	2.65	Positivo
77	Negativo	Negativo	Positivo	4.64	Positivo
78	Positivo	Positivo	Positivo	4.59	Positivo
79	Negativo	Negativo	Positivo	4.48	Positivo
80	Positivo	Positivo	Positivo	1.55	Positivo
81	Negativo	Negativo	Positivo	1.83	Positivo
82	Positivo	Positivo	Positivo	3.05	Positivo
83	Negativo	Positivo	Positivo	2.82	Positivo
84	Positivo	Positivo	Positivo	1.44	Positivo
85	Positivo	Positivo	Positivo	2.89	Positivo
86	Positivo	Positivo	Positivo	1.14	Positivo
87	Negativo	Negativo	Positivo	1.42	Positivo
88	Positivo	Positivo	Positivo	1.98	Positivo
89	Positivo	Positivo	Positivo	2.96	Positivo
90	Positivo	Positivo	Positivo	1.51	Positivo

APÉNDICE E

(4/4)

Resultados obtenidos en las pruebas empleadas para el diagnóstico de la infección por
H. pylori

Clave	Cultivo	PRU	Histología	RDO ELISA IgG	Interpretación ELISA
91	Negativo	Positivo	Positivo	4.76	Positivo
92	Negativo	Negativo	Positivo	1.77	Positivo
93	Negativo	Negativo	Negativo	4.90	Positivo
94	Negativo	Positivo	Positivo	2.38	Positivo
95	Negativo	Negativo	Positivo	4.29	Positivo
96	Positivo	Positivo	Positivo	2.72	Positivo
97	Negativo	Negativo	Positivo	1.49	Positivo
98	Negativo	Negativo	Positivo	2.37	Positivo
99	Positivo	Positivo	Positivo	5.22	Positivo
100	Negativo	Negativo	Positivo	1.23	Positivo
101	Positivo	Positivo	Negativo	1.26	Positivo
102	Positivo	Positivo	Negativo	4.22	Positivo
103	Negativo	Negativo	Positivo	3.81	Positivo
104	Positivo	Positivo	Positivo	1.18	Positivo
105	Negativo	Negativo	Positivo	1.06	Positivo
106	Negativo	Negativo	Positivo	3.30	Positivo
107	Negativo	Negativo	Positivo	3.47	Positivo
108	Positivo	Positivo	Positivo	1.72	Positivo
109	Negativo	Negativo	Positivo	1.29	Positivo
110	Positivo	Positivo	Positivo	3.53	Positivo
111	Positivo	Positivo	Positivo	2.75	Positivo
112	Positivo	Positivo	Positivo	1.20	Positivo
113	Positivo	Negativo	Positivo	1.10	Positivo
114	Positivo	Negativo	Positivo	1.23	Positivo
115	Positivo	Negativo	Positivo	1.45	Positivo
116	Negativo	Negativo	Positivo	2.20	Positivo
117	Positivo	Positivo	Positivo	2.10	Positivo
118	Negativo	Negativo	Positivo	2.30	Positivo
119	Positivo	Positivo	Positivo	5.70	Positivo
120	Positivo	Positivo	Positivo	2.10	Positivo

APÉNDICE F

(1/4)

Características de los pacientes incluidos en el estudio

	Diagnóstico histológico	Edad	Género	Lugar de Nacimiento	Lugar de Nacimiento AM	Lugar de Nacimiento AP
1	SA	27	F	Nuevo León	Ags y Jalisco	Guanajuato
2	SA	53	M	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
3	SA	50	M	Zacatecas	Zacatecas	Zacatecas
4	SA	23	F	Nuevo León	Zacatecas	Tamaulipas
5	SA	23	F	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
6	SA	38	M	Nuevo León	San Luis Potosí	Coahuila
7	SA	41	F	San Luis Potosí	San Luis Potosí	San Luis Potosí
8	SA	36	F	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
9	SA	48	F	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
10	SA	17	M	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
11	SA	52	F	Coahuila	Coahuila	Coahuila
12	SA	40	F	San Luis Potosí	Distrito Federal	San Luis Potosí
13	SA	28	F	Nuevo León	Guanajuato	Guanajuato
14	SA	40	F	Zacatecas	Zacatecas	Zacatecas
15	SA	21	M	Michoacán	Jalisco	Jalisco
16	SA	69	F	Zacatecas	Zacatecas	Zacatecas
17	SA	47	F	Veracruz	Veracruz	Veracruz
18	SA	18	F	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
19	SA	54	F	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
20	SA	21	M	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
21	SA	16	F	Distrito Federal	Distrito Federal	Distrito Federal
22	SA	70	F	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
23	SA	50	F	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
24	SA	30	M	Sinaloa	Sinaloa	Sinaloa
25	SA	57	F	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
26	SA	35	F	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
27	SA	57	F	Coahuila	Coahuila	Coahuila
28	SA	77	M	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
29	SA	34	F	Nuevo León	Puebla	Michoacán
30	SA	17	F	San Luis Potosí	San Luis Potosí	San Luis Potosí

M, masculino; F, femenino; AM, abuelos maternos; AP, abuelos paternos.; SA, sin

alteraciones; Ags, Aguascalientes

APÉNDICE F

(2/4)

Características de los pacientes incluidos en el estudio

	Diagnóstico histológico	Edad	Género	Lugar de nacimiento	Lugar de nacimiento AM	Lugar de nacimiento AP
31	Gastritis	43	F	Tamaulipas	Tamaulipas	Tamaulipas
32	Gastritis	43	F	San Luis Potosí	San Luis Potosí	San Luis Potosí
33	Gastritis	60	F	Coahuila	Coahuila	Coahuila
34	Gastritis	16	F	Nuevo León	Jalisco	San Luis Potosí
35	Gastritis	75	M	Tamaulipas	Tamaulipas	Tamaulipas
36	Gastritis	67	F	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
37	Gastritis	55	F	San Luis Potosí	San Luis Potosí	San Luis Potosí
38	Gastritis	57	F	Puebla	Puebla	Puebla
39	Gastritis	64	F	Guanajuato	Guanajuato	Guanajuato
40	Gastritis	69	F	Zacatecas	Zacatecas	Zacatecas
41	Gastritis	61	F	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
42	Gastritis	58	F	Coahuila	Coahuila	Nuevo León
43	Gastritis	50	F	Tamaulipas	Tamaulipas	Tamaulipas
44	Gastritis	47	F	San Luis Potosí	San Luis Potosí	San Luis Potosí
45	Gastritis	50	F	Nuevo León	Coahuila y San Luis Potosí	San Luis Potosí y Nuevo León
46	Gastritis	76	F	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
47	Gastritis	76	M	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
48	Gastritis	55	F	Coahuila	Coahuila	Coahuila
49	Gastritis	46	F	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
50	Gastritis	24	F	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
51	Gastritis	92	F	San Luis Potosí	San Luis Potosí	San Luis Potosí
52	Gastritis	22	F	San Luis Potosí	San Luis Potosí	San Luis Potosí
53	Gastritis	29	F	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
54	Gastritis	55	M	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
55	Gastritis	57	F	Coahuila	Zacatecas	Zacatecas
56	Gastritis	37	F	Nuevo León	Zacatecas	Zacatecas
57	Gastritis	15	M	Michoacán	Michoacán	Michoacán
58	Gastritis	38	F	Tamaulipas	Tamaulipas	Tamaulipas
59	Gastritis	55	F	Durango	Durango	Durango
60	Gastritis	26	M	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León

M, masculino; F, femenino; AM, abuelos maternos; AP, abuelos paternos.

APÉNDICE F

(3/4)

Características de los pacientes incluidos en el estudio

	Diagnóstico	Edad	Género	Lugar de nacimiento	Lugar de nacimiento AM	Lugar de nacimiento AP
61	Úlcera	43	M	Nuevo León	Coahuila	Zacatecas
62	Úlcera	30	F	Estado de México	Nuevo León	Jalisco
63	Úlcera	54	F	Zacatecas	Zacatecas	Zacatecas
64	Úlcera	90	F	Coahuila	Coahuila	Coahuila
65	Úlcera	60	M	Nuevo León	Sonora	Nuevo León
66	Úlcera	63	M	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
67	Úlcera	44	M	Nuevo León	Coahuila	Nuevo León
68	Úlcera	45	M	San Luis Potosí	San Luis Potosí	San Luis Potosí
69	Úlcera	87	F	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
70	Úlcera	63	M	Nuevo León	San Luis Potosí	San Luis Potosí
71	Úlcera	87	F	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
72	Úlcera	79	M	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
73	Úlcera	20	M	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
74	Úlcera	82	F	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
75	Úlcera	84	F	Zacatecas	Zacatecas	Zacatecas
76	Úlcera	49	M	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
77	Úlcera	43	M	Chihuahua	Chihuahua	Chihuahua
78	Úlcera	80	M	Zacatecas	Zacatecas	Zacatecas
79	Úlcera	53	F	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
80	Úlcera	38	M	Veracruz	Veracruz	Veracruz
81	Úlcera	38	M	Tamaulipas	Tamaulipas	Tamaulipas
82	Úlcera	78	M	Nuevo León	Distrito Federal	Distrito Federal
83	Úlcera	21	M	San Luis Potosí	San Luis Potosí	San Luis Potosí
84	Úlcera	50	M	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
85	Úlcera	75	M	San Luis Potosí	San Luis Potosí	San Luis Potosí
86	Úlcera	57	F	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
87	Úlcera	44	M	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
88	Úlcera	80	M	San Luis Potosí	San Luis Potosí	San Luis Potosí
89	Úlcera	70	M	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
90	Úlcera	77	M	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León

M, masculino; F, femenino; AM, abuelos maternos; AP, abuelos paternos.

APÉNDICE F

(4/4)

Características de los pacientes incluidos en el estudio

	Diagnóstico	Edad	Género	Lugar de nacimiento	Lugar de nacimiento AM	Lugar de nacimiento AP
91	Cáncer	60	F	Tamaulipas	Tamaulipas	Tamaulipas
92	Displasia	49	M	Tamaulipas	Guanajuato	Guanajuato
93	Displasia	80	M	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
94	Cáncer	72	M	San Luis Potosí	San Luis Potosí	San Luis Potosí
95	Displasia	75	M	Querétaro	Querétaro	Querétaro
96	Cáncer	66	M	San Luis Potosí	San Luis Potosí	San Luis Potosí
97	Cáncer	36	F	Tamaulipas	San Luis Potosí	San Luis Potosí
98	Displasia	63	M	San Luis Potosí	San Luis Potosí	San Luis Potosí
99	Cáncer	70	F	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
100	Displasia	84	M	San Luis Potosí	San Luis Potosí	San Luis Potosí
101	Cáncer	44	M	Tamaulipas	Tamaulipas	Tamaulipas
102	Cáncer	55	M	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
103	Cáncer	71	M	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
104	Cáncer	74	M	Zacatecas	Zacatecas	Zacatecas
105	Cáncer	33	F	Nuevo León	San Luis Potosí	San Luis Potosí
106	Cáncer	58	F	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
107	Cáncer	70	M	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
108	Cáncer	70	M	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
109	Cáncer	54	M	Zacatecas	Zacatecas	Zacatecas
110	Cáncer	55	M	San Luis Potosí	San Luis Potosí	San Luis Potosí
111	Cáncer	62	M	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
112	Cáncer	40	F	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
113	Cáncer	77	M	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
114	Cáncer	62	M	San Luis Potosí	Nuevo León	Nuevo León
115	Displasia	44	M	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
116	Displasia	84	M	Tamaulipas	Tamaulipas	Tamaulipas
117	Cáncer	77	M	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
118	Cáncer	80	M	Nuevo León	Nuevo León	Nuevo León
119	Displasia	47	M	San Luis Potosí	San Luis Potosí	San Luis Potosí
120	Cáncer	68	F	San Luis Potosí	San Luis Potosí	San Luis Potosí

M, masculino; F, femenino; AM, abuelos maternos; AP, abuelos paternos.

APÉNDICE G

(1/3)

Resultados de la determinación de anticuerpos anti-CagA y anti-VacA por Western blot

	Grupo de estudio	Anticuerpos anti-CagA	Anticuerpos anti-VacA
31	Gastritis	Positivo	Positivo
32	Gastritis	Positivo	Positivo
33	Gastritis	Negativo	Negativo
34	Gastritis	Positivo	Positivo
35	Gastritis	Positivo	Negativo
36	Gastritis	Negativo	Negativo
37	Gastritis	Negativo	Negativo
38	Gastritis	Positivo	Positivo
39	Gastritis	Positivo	Negativo
40	Gastritis	Positivo	Positivo
41	Gastritis	Positivo	Positivo
42	Gastritis	Negativo	Negativo
43	Gastritis	Positivo	Positivo
44	Gastritis	Negativo	Negativo
45	Gastritis	Negativo	Negativo
46	Gastritis	Negativo	Negativo
47	Gastritis	Negativo	Negativo
48	Gastritis	Positivo	Negativo
49	Gastritis	Positivo	Positivo
50	Gastritis	Negativo	Negativo
51	Gastritis	Positivo	Negativo
52	Gastritis	Positivo	Positivo
53	Gastritis	Negativo	Negativo
54	Gastritis	Negativo	Negativo
55	Gastritis	Negativo	Negativo
56	Gastritis	Positivo	Positivo
57	Gastritis	Negativo	Negativo
58	Gastritis	Positivo	Positivo
59	Gastritis	Positivo	Positivo
60	Gastritis	Positivo	Positivo

APÉNDICE G

(2/3)

Resultados de la determinación de anticuerpos anti-CagA y anti-VacA por Western blot

	Grupo de estudio	Anticuerpos anti-CagA	Anticuerpos anti-VacA
61	Úlcera	Positivo	Positivo
62	Úlcera	Positivo	Positivo
63	Úlcera	Positivo	Positivo
64	Úlcera	Negativo	Negativo
65	Úlcera	Negativo	Negativo
66	Úlcera	Negativo	Negativo
67	Úlcera	Positivo	Positivo
68	Úlcera	Positivo	Positivo
69	Úlcera	Positivo	Positivo
70	Úlcera	Positivo	Positivo
71	Úlcera	Positivo	Positivo
72	Úlcera	Positivo	Positivo
73	Úlcera	Positivo	Negativo
74	Úlcera	Positivo	Positivo
75	Úlcera	Negativo	Negativo
76	Úlcera	Positivo	Negativo
77	Úlcera	Positivo	Positivo
78	Úlcera	Negativo	Negativo
79	Úlcera	Negativo	Negativo
80	Úlcera	Positivo	Positivo
81	Úlcera	Positivo	Positivo
82	Úlcera	Positivo	Negativo
83	Úlcera	Positivo	Positivo
84	Úlcera	Positivo	Positivo
85	Úlcera	Negativo	Negativo
86	Úlcera	Positivo	Positivo
87	Úlcera	Positivo	Negativo
88	Úlcera	Positivo	Negativo
89	Úlcera	Positivo	Negativo
90	Úlcera	Negativo	Negativo

APÉNDICE G

(3/3)

Resultados de la determinación de anticuerpos anti-CagA y anti-VacA por Western blot

	Grupo displasia-cáncer	Anticuerpos anti-CagA	Anticuerpos anti-VacA
91	Cáncer	Positivo	Positivo
92	Displasia	Positivo	Positivo
93	Displasia	Positivo	Positivo
94	Cáncer	Positivo	Positivo
95	Displasia	Positivo	Positivo
96	Cáncer	Negativo	Negativo
97	Cáncer	Positivo	Positivo
98	Displasia	Positivo	Positivo
99	Cáncer	Positivo	Positivo
100	Displasia	Positivo	Positivo
101	Cáncer	Positivo	Positivo
102	Cáncer	Negativo	Negativo
103	Cáncer	Positivo	Positivo
104	Cáncer	Positivo	Negativo
105	Cáncer	Positivo	Positivo
106	Cáncer	Positivo	Negativo
107	Cáncer	Positivo	Negativo
108	Cáncer	Positivo	Positivo
109	Cáncer	Positivo	Positivo
110	Cáncer	Positivo	Positivo
111	Cáncer	Positivo	Positivo
112	Cáncer	Positivo	Positivo
113	Cáncer	Positivo	Positivo
114	Cáncer	Positivo	Positivo
115	Displasia	Positivo	Positivo
116	Displasia	Positivo	Positivo
117	Cáncer	Positivo	Positivo
118	Cáncer	Positivo	Positivo
119	Displasia	Positivo	Positivo
120	Cáncer	Negativo	Negativo

APÉNDICE H

(1/4)

Genotipos de HLA-DQA1 y DQB1 obtenidos en los pacientes de estudio

	DQB1		DQA1	
1	*02	*0304	*0201	*0503
2	*06	*0301, *0309	*0102	*0505
3	*0301, *0309	*0301, *0309	*0503	*0503
4	*04	*06	*0102	*0401
5	*04	*06	*01041	*05
6	*06	*0301, *0309	*05012	*0502
7	*04	*0301, *0309	*03011	*0401
8	*02	*02	*0101	*0201
9	*0304	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	*0503	*0503
10	*06	*0301, *0309	*0102	*0503
11	*0301, *0309	*0301, *0309	*0503	*0503
12	*02	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	*0201	*03011
13	*05	*05	*0102	*0105
14	*0301, *0309	*0301, *0309	*05012	*0505
15	*05	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	*0201	*0301
16	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	*04	*03011	*0401
17	*0301, *0309	*04	*0503	*0503
18	*06	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	*0102	*0503
19	*04	*04	*0401	*0401
20	*06	*04	*0102	*0102
21	*05	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	*03011	*0401
22	*05	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	*0101	*0504
23	*06	*04	*0102	*0401
24	0303, 0306	0303, 0306	*0201	*0504
25	*06	*0301, *0309	*0101	*0503
26	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	0303, 0306	*03011	*03011
27	*02	*04	*05011	*05012
28	*02	*04	*0101	*0501
29	*04	*02	*03011	*0401
30	*05	*04	*03011	*0105

APÉNDICE H

(2/4)

Genotipos de HLA-DQA1 y DQB1 obtenidos en los pacientes de estudio

	DQB1	DQA1
31	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308
32	*05	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308
33	*02	*02
34	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	0303, 0306
35	*05	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308
36	*05	*05
37	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	0303, 0306
38	*06	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308
39	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308
40	*0301, *0309	*0301, *0309
41	0303, 0306	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308
42	*0301, *0309	*0301, *0309
43	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308
44	*05	0303, 0306
45	*0301, *0309	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308
46	*02	*0301, *0309
47	*05	*05
48	*04	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308
49	*05	*0301, *0309
50	*05	*04
51	*02	*04
52	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308
53	*02	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308
54	*06	*02
55	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	0303, 0306
56	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	*0301, *0309
57	*02	*04
58	*05	*0301, *0309
59	*02	*02
60	*04	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308

APÉNDICE H

(3/4)

Genotipos de HLA-DQA1 y DQB1 obtenidos en los pacientes de estudio

	DQB1	DQA1
61	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308*04	*0401 *0401
62	*06	*0103 *0501
63	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	*03011 *03011
64	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308*04	*3011 *0504
65	*05	*0101 *01012
66	*05	*0103 *0504
67	*06	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308*03011 *05012
68	*06	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308*0401 *0401
69	*05	*02
70	*04	*0101 *0201
71	*04	*0102 *03011
72	*05	*0301, *0309
73	*06	*0102 *0303
74	*02	*0102 *0102
75	*02	*0301, *0309
76	*05	*0201 *0503
77	*05	*02
78	*05	*01041 *0501
79	*02	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308*0101 *0*01041
80	*02	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308*03011 *0501
81	*0301, *0309	*0301, *0309
82	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	*01041 *03011
83	*05	*0301, *0309
84	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308*04	*0101 *0601
85	*02	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308*03011 *05012
86	*02	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308*0201 *03011
87	*0304	*04
88	*0302, *0304, *0305, 0307, 03080303, 0306	*0303 *0401
89	*04	*0401 *0401
90	*02	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308*0201 *03011
91	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308*04	*03011 *0401
92	*02	*0301, *0309
93	*02	*0401 *0401
94	*02	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308*03011 *0501
95	*05	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308*03011 *05
96	*0301, *0309	*0301, *0309
97		*0201 *0503

APÉNDICE H

(4/4)

Genotipos de HLA-DQA1 y DQB1 obtenidos en los pacientes de estudio

	DQB1	DQA1
91	*06	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308
92	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	0303, 0306
93	*0301, *0309	*0301, *0309
94	*04	*04
95	*05	*04
96	*06	*04
97	0303, 0306	*0301, *0309
98	*06	*06
99	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	*04
100	*06	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308
101	*02	*04
102	*06	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308
103	*06	*06
104	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	*04
105	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	*04
106	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308
107	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308
108	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308
109	*02	*0301, *0309
110	*05	*06
111	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308
112	*04	*04
113	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308	0303, 0306
114	*06	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308
115	*06	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308
116	*05	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308
117	0303, 0306	*0301, *0309
118	0303, 0306	*0301, *0309
119	0303, 0306	*0301, *0309
120	*06	*0302, *0304, *0305, 0307, 0308

