



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
HOSPITAL DE PEDIATRÍA**

**IDENTIFICACIÓN DE FACTORES GENÉTICOS DEL
HOSPEDERO Y LA BACTERIA EN NIÑOS INFECTADOS
CON *Helicobacter pylori* EN COMPARACIÓN
CON NIÑOS NO INFECTADOS**

T E S I S

**PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA ESPECIALIDAD EN:
GASTROENTEROLOGÍA Y NUTRICIÓN PEDIÁTRICA**

PRESENTA:

DR. SERGIO JAVIER FERNÁNDEZ ORTIZ

TUTORES:

DRA. MARGARITA CAMORLINGA PONCE

DR. JOSÉ ARMANDO MADRAZO DE LA GARZA



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. TÍTULO:

IDENTIFICACIÓN DE FACTORES GENÉTICOS DEL HOSPEDERO Y LA BACTERIA EN NIÑOS INFECTADOS CON *Helicobacter pylori* EN COMPARACIÓN CON NIÑOS NO INFECTADOS.

2. AUTOR:

**TESISTA: DR. SERGIO JAVIER FERNÁNDEZ ORTIZ.
RESIDENTE DE GASTROENTEROLOGÍA Y NUTRICIÓN PEDIÁTRICA.**

TUTOR:

**DRA. MARGARITA CAMORLINGA PONCE.
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES
INFECCIOSAS Y PARASITARIAS. HOSPITAL DE PEDIATRÍA, CMN SIGLO
XXI.**

**DR. JOSÉ ARMANDO MADRAZO DE LA GARZA.
JEFE DEL SERVICIO DE GASTROENTEROLOGÍA Y NUTRICIÓN
PEDIÁTRICA. HOSPITAL DE PEDIATRÍA CMN SIGLO XXI.**

ASESOR:

**DR. JUAN MANUEL MEJÍA ARANGURÉ.
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN EPIDEMIOLOGÍA.**

Proyecto financiado por el IMSS- 2005/1/110

JURADO

Dr. José Armando Madrazo de la Garza
Presidente.-

Dra. Irina Elizabeth Juárez Muñoz.
Secretario.-

Dr. Javier Torres López.
Sinodal.-

Dra. Beatriz González Ortiz.
Sinodal.-

Dr. Guillermo Ramón García.
Sinodal.-

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	4
2. ANTECEDENTES.....	5
3. JUSTIFICACIÓN.....	10
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
5. HIPÓTESIS.....	11
6. OBJETIVOS.....	11
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
8. RESULTADOS.....	18
9. DISCUSIÓN.....	23
10. CONCLUSIONES.....	28
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
12. ANEXOS.....	36

Resumen

Antecedentes. La colonización del estómago por *H.pylori* (*Hp*) induce invariablemente inflamación o gastritis. La infección se adquiere en la niñez y permanece como una infección crónica a lo largo de la vida del sujeto infectado. Cuando la infección se adquiere a menor edad, se incrementa el riesgo de que en el adulto se presenten enfermedades tales como úlcera péptica, ó adenocarcinoma gástrico. Para el desarrollo de enfermedad asociada a *Hp* contribuyen factores de la bacteria, del hospedero y el medio ambiente.

Entre los factores de virulencia que se han asociado con enfermedad severa, los más estudiados son: la isla de patogenicidad (*cagPAI*), estas cepas son aisladas mas frecuentemente de pacientes con úlcera o cáncer gástrico. Otros genes cuya presencia se asocia con enfermedad, incluyen algunos alelos de la citotoxina vacuolizante (*vacA*) y *babA*. Entre los factores del hospedero que pueden participar en el proceso de enfermedad se encuentran factores genéticos e inmunológicos como los antígenos de histocompatibilidad(*HLA*), se han identificado disminución o incremento de algunos haplotipos de *HLA*, asociados con enfermedad gástrica severa en adultos, ningún trabajo relacionado a características genéticas del hospedero se ha hecho en niños.

Objetivos Generales. 1. Evaluar si las cepas de *H pylori* aisladas de niños infectados presentan genes de virulencia asociados a enfermedad severa.

2. Conocer si existen diferencias genéticas de *HLA* entre niños infectados y no infectados con *H pylori*.

Material y Métodos. *Diseño del estudio:* transversal analítico

Población de estudio: 59 Niños con indicación de endoscopia de tubo digestivo alto de 3 a 17 años de edad atendidos en el servicio de Gastroenterología del Hospital de Pediatría del CMN SXXI-IMSS. A los pacientes se les tomaron tres biopsias de antro, 1 de cuerpo y 5 ml. de sangre venosa. Una biopsia de antro se procesó para cultivo, la segunda biopsia de antro y la de cuerpo fue para evaluación histológica, la tercera biopsia fue para extracción de RNA.

Factores bacterianos. En las cepas de *Hp* aisladas se realizó extracción de DNA y por medio de PCR se determinó la presencia de los genes y sus alelos *vacA*, *cagA* y *babA*.

Factores del hospedero. Con el DNA de sangre total se realizó la determinación de *HLAII*.

Resultados: Se incluyeron 59 pacientes al final del estudio, 32 femeninos. La indicación más frecuente de endoscopia superior fue DACR 36(61%), 71.4% resultó positivo para *H. pylori*, se utilizaron 3 métodos diagnósticos resultando positivos 21/59(35.6%), histología 17/21, cultivo 10/21 y serología 9/21. El hallazgo endoscópico más frecuente fue Gastritis antral nodular y no se reportaron pacientes con úlcera gástrica, ni duodenal. Se observó mayor grado de daño histológico en los pacientes infectados con *H. pylori* al compararlos con los no infectados, con significancia estadística. Se aislaron siete cepas de *H. pylori* de las cuales cuatro fueron *cagA* +, tres *babA* + y las siete fueron *vacA* + mostrando diferencias en los alelos de *vacA*. Solamente 2/7 cepas tuvieron los tres factores de virulencia más asociados a enfermedad (*cagA*+/*babA*+/*vacA* s1m1) y 4/7 mostraron la asociación *cagA*+/*vacA*+. No encontramos diferencias significativas de en cuanto a daño histológico entre las cepas *cagA*+ y *cagA*-. Se pudieron caracterizar 28 alelos de *HLADQB1* de 14 pacientes sin poder establecer diferencias entre los pacientes infectads y no infectados.

Conclusiones: Las biopsias de los niños infectados con cepas *cagA*+ *vacA*+*babA*2+ en comparación con las de niños infectados con cepas *cagA* negativas presentaron similares grados de inflamación y actividad.

No se observaron diferencias significativas en la expresión de los alelos de *HLA DQB1* estudiados entre los pacientes infectados y no infectados con el bacilo.

IDENTIFICACIÓN DE FACTORES GENÉTICOS DEL HOSPEDERO Y LA BACTERIA EN NIÑOS INFECTADOS CON *Helicobacter pylori* EN COMPARACIÓN CON NIÑOS NO INFECTADOS.

ANTECEDENTES:

Durante los últimos veinte años *Helicobacter pylori* ha tenido un importante papel como un modelo de bacteria patógena persistente. *H. pylori* infecta la mucosa gástrica de más del 50% de la población a nivel mundial. En México, más del 85% de los adultos y el 50% de los niños mexicanos menores de 10 años de edad están colonizados (Torres J et al 1998). La infección se inicia en la infancia, en la mayoría de los casos, y puede permanecer por décadas en los individuos infectados a pesar de una vigorosa respuesta inmune innata y adaptativa. Los mecanismos por los cuales *H. pylori* infecta al ser humano aún son controversiales. Se sabe que el hospedero desarrolla una respuesta inmune que es inefectiva en eliminar la bacteria, pero puede tener un papel fundamental en la evolución de la infección hacia diferentes formas clínicas desde una gastritis superficial leve a una úlcera péptica o carcinoma gástrico (Agnese DM et al 2002). Aunque el organismo coloniza un porcentaje importante de la población adulta mundial, contrariamente a lo esperado, solo una pequeña proporción de los individuos colonizados desarrollarán enfermedad.

Desde que una persona es infectada por *H. pylori*, la bacteria puede persistir por décadas en el estómago, y a pesar de ser un organismo no invasivo es capaz de inducir una respuesta inflamatoria. Histológicamente, la respuesta del hospedero adulto a la infección por *H. pylori* es una gastritis activa caracterizada por la infiltración de leucocitos polimorfonucleares (PMN), células plasmáticas, linfocitos, monocitos y la presencia de citocinas proinflamatorias como IFN- γ e IL-8 (Bamford KB 1998; Camorlinga PM 2003).

El estudio de la infección por *H. pylori* se ha enfocado a la población adulta, se han realizado pocos estudios en niños donde se presenta la fase aguda de la infección.

Se sabe que en la mucosa gástrica de los niños infectados predomina la presencia de infiltrado mononuclear, también presentan una importante hiperplasia folicular linfoide (Drumm B, 1987). En los niños la infección con *H. pylori* rara vez se asocia con enfermedad severa, y la relación de la presencia de *H. pylori* con dolor abdominal recurrente (DAR) es controversial. Ozen H et al en 2001, reportó que 60.3% de los niños con DAR fueron positivos a *H. pylori* y los síntomas desaparecían después de la erradicación comparada con aquellos que no erradicaron, por el contrario Wewer et al no encontraron ninguna relación causal entre *H. pylori* y DAR.

Los factores que determinan que las lesiones de gastritis crónica permanezcan estables durante períodos muy prolongados de tiempo, en algunos pacientes, mientras que en otros existe ocurre una progresión hacia la atrofia, y las enfermedades relacionadas a la bacteria, no son bien conocidos, pero pueden estar en relación con la heterogeneidad genómica de *H. pylori*, con la susceptibilidad genética o características de la respuesta inmune del propio hospedero y con la edad a que se adquiere la infección. Se ha propuesto que la adquisición temprana de *H. pylori* es un factor de riesgo relevante para el desarrollo de enfermedades gástricas severas o malignas como cáncer gástrico (Blaser M. et al 1995, Camargo MC et al 2004)

Existen muchos métodos mediante los cuales se puede detectar la infección por *H. pylori*, dentro de estos se encuentran métodos tanto invasivos como no invasivos. En años previos se ha hecho énfasis en la validación de estos últimos, sin embargo no se han logrado establecer los rangos de normalidad en la edad pediátrica o se han realizado adaptaciones de los valores de corte en los adultos, teniendo como consecuencia determinaciones poco certeras (Roma-Giannikou et al 2002). Por otra parte diversos estudios han demostrado que a pesar de su alto costo, el uso de sedación y/o anestesia y poca accesibilidad en algunos centros, la endoscopia con toma de biopsia sigue siendo el estándar de oro para el diagnóstico de *H. pylori*, ya que permite diagnosticar otras enfermedades bajo la

visualización directa del tracto digestivo, además de que el cultivo de las biopsias nos muestra los patrones de sensibilidad de la bacteria con fines de erradicación. Existe un consenso general de que el hallazgo endoscópico principal en los pacientes con infección por *H. pylori* es el de nodularidad antral, Luzzo et al. encontraron que este hallazgo tiene una especificidad del 100% y sensibilidad 40% y que además se correlaciona con mayor severidad de la gastritis y la presencia de folículos linfoides. Las biopsias deben ser siempre analizadas por patólogos expertos ya que además de determinar la presencia de *H. pylori* se puede identificar la severidad y la distribución de la gastritis, así como también metaplasia intestinal, gastritis atrófica y linfoma de tejido linfóide asociado a mucosa. Mucho se ha discutido acerca de cuál es el sitio adecuado para aislar *H. pylori*, siendo el antro gástrico en la zona prepilórica donde se tiene la más alta probabilidad de recuperar la bacteria, sin embargo también se ha aislado del cuerpo gástrico y en la zona de transición del cuerpo y antro, por lo que múltiples biopsias deben ser tomadas para el diagnóstico preciso (Gold et al 2000).

Características de la bacteria

Basados en la presencia de dos principales factores de virulencia de *H. pylori*, asociados más frecuentemente con enfermedad ulcero péptica y cáncer gástrico: VacA y CagA se han descrito dos tipos de cepas: cepas tipo I que contienen los genes *cagA* y *vacA* y las cepas tipo II que no contienen estos genes.

El gen *cagA* (gen asociado a la citotoxina) codifica para una proteína CagA de 128 a 140 kDa y esta presente en 60% de las cepas de Estados Unidos, casi en el 100% de las cepas orientales (Peek R 2002); en el 80% de adulto mexicanos con úlcera péptica (González VG et al 2000). Este gen es un marcador de la presencia de una isla de patogenicidad (*cagPAI*). *cagPAI* es un segmento de ADN de 40-kb (*cag PAI*) que contiene al menos 27 genes que codifican para un sistema de secreción tipo IV presente en las cepas de *H. pylori* con una virulencia mayor, lo cual sugiere que la adquisición de esta región es un evento importante en la evolución de *H. pylori* (Covacci A, 2000).

Las personas colonizadas con cepas *cagA*⁺ tienen mayor riesgo de llegar a desarrollar gastritis severa, úlcera péptica o cáncer gástrico que las personas con cepas *cagA*⁻ (Peek R et al 2001).

Por otra parte, todas las cepas de *H. pylori* poseen el gen *vacA* que codifica para la proteína vacuolizante (VacA). Se han descrito variantes alélicas de este gen, para el péptido señal (variantes s1a, s1b y s1c del alelo s1 y el alelo s2), en la porción media de la proteína (alelos m1 y m2). Las cepas que contienen los alelos s1m1 de *vacA* asociado a la presencia de *cagA*, se consideran de mayor potencial citotóxico y con mayor riesgo para inducir úlcera gastroduodenal en pacientes adultos. Las cepas que carecen del gen *vacA* y de *cagPAI* se consideran comensales más que patógenas (Covacci A 1999).

Estudios recientes han proporcionado evidencias sobre factores de adherencia bacteriana que pueden contribuir al tropismo específico y a la patogenicidad de *H. pylori* en el epitelio gástrico humano. La proteína BabA, participa en la adherencia de *H. pylori* al antígeno de grupo sanguíneo humano Lewis^b sobre las células epiteliales gástricas (Gerhard M et al 1999). El gen que codifica para la proteína BabA es *babA*, está formado por una o dos copias denominadas *babA1* y *babA2*, ambos son idénticos en su secuencia de nucleótidos. El gen *babA2* es el encargado de codificar para la proteína funcional BabA, presenta 10 nucleótidos adicionales en el cual se encuentra el codón de inicio ausente en *babA1* y que no presenta actividad por carecer del mismo. (Gerhard M et al 1999, Hening EE et al 2004).

Aunque los factores de virulencia de *H. pylori* se han asociado con enfermedad (*cagPAI*, *vacA*, BabA, CagA) esta correlación con enfermedad no siempre ocurre, por ejemplo en población asiática y africana, posiblemente debido a la gran distribución de estos factores en población asintomática (Owen et al 2001).

La contribución de los diversos genes de virulencia identificados en *H. pylori* y las consecuencias clínicas de la infección ha sido revisado en adultos que han estado

infectados por décadas, poco se sabe sobre la virulencia de las cepas que infectan a los niños en las fases tempranas de la infección. En un estudio realizado en nuestro laboratorio, en 34 cepas de *H pylori* aisladas de niños con dolor abdominal recurrente, encontramos el alelo s1b de vacA en el 62% de las cepas y la presencia del gen cagA en el 47% de las cepas, lo que nos indica que los niños pueden estar infectados por cepas que tienen los genes que se consideran factores de riesgo para enfermedad severa en los adultos. Es necesario estudiar un número mayor de cepas para confirmar estos resultados y estudiar otros genes que también se asocian a patogenicidad.

Factores asociados al hospedero

Entre los factores del hospedero que participan en el desarrollo de la enfermedad se encuentran los antígenos de Histocompatibilidad (HLA), localizados en el brazo corto del cromosoma 6 dentro del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC, Major Histocompatibility Complex). Debido a la función de las moléculas de HLA, procesar y presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T, diferentes enfermedades se han asociado con ellas. Algunos estudios realizados en población adulta japonesa y caucásica han relacionado la ausencia de DQA1*0102, DQA1*0201 y DQB1*0602 con gastritis atrófica, carcinoma y úlcera péptica respectivamente. En cambio, una asociación positiva con los alelos DQB1*0401 y 0301 se ha observado con gastritis atrófica y cáncer gástrico respectivamente. En México se reportó un aumento significativo de DQB1*0501 en cáncer gástrico. Sin embargo, en la población adulta nosotros encontramos una asociación negativa de DQA1*0201 y una asociación positiva de DQB1*0604 con metaplasia intestinal. Este tipo de estudios no se han realizado en niños.

JUSTIFICACIÓN:

A pesar de que más del 50% de la población mundial está colonizada con *H. pylori*, pocos estudios se han enfocado a las fases tempranas de la colonización y a conocer los factores genéticos y el tipo de cepas que colonizan en esta etapa de la infección. Ha sido propuesto que la edad de adquisición de la bacteria es un factor de riesgo importante para el desarrollo clínico posterior. No se conoce, si existen diferencias genéticas entre los niños infectados con *H. pylori* y los no infectados, tampoco existe una caracterización genética completa de los factores de virulencia (*cagPAI*, *vacA*, *babA*) de las cepas de *H. pylori* que infectan a los niños.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Helicobacter pylori es una bacteria gram negativa que infecta crónicamente a más de la mitad de la población adulta mundial. La infección inicia en la infancia y se conservará a través de la vida adulta del individuo a menos que el individuo reciba tratamiento antimicrobiano. La mayoría de los niños colonizados permanecen asintomáticos, las enfermedades severas como úlcera duodenal o gástrica son eventos poco frecuentes en este grupo de edad, mientras que uno, de cada seis adultos infectados, podrá desarrollar úlcera o cáncer gástrico. Para el desarrollo de enfermedad contribuyen muchos factores de la bacteria y del hospedero, siendo los más importantes: el tipo de cepa infectante de *H. pylori*, así como factores genéticos del hospedero.

La colonización con cepas de *H. pylori* *cag*(PAI) positivas, *vacAs1/m1* y *babA2* positivas se consideran factores de riesgo bacterianos para desarrollar enfermedad severa. Se han realizado estudios de caracterización genética de *H. pylori* en adultos de diversas regiones de mundo, pero en niños estos reportes son escasos.

Se ha iniciado el estudio de la caracterización genética de los individuos colonizados o con enfermedad gastroduodenal asociada a *H. pylori*, pero casi todos estos estudios se han realizado en adultos europeos.

Por lo que es necesario estudiar los genotipos de las cepas de *H. pylori* que colonizan a los niños infectados, así como conocer las características genéticas de estos niños para estudiar su posible asociación con susceptibilidad o infección.

Hipótesis

1. Las cepas de *H. pylori* aisladas de niños infectados, presentarán los genes de virulencia *vacA s2m2*, *cagA*- y *babA*- .
2. Los niños infectados con *H. pylori* presentaran características de HLA diferentes a los niños no infectados.

Objetivos generales

1. Evaluar si las cepas de *H. pylori* aisladas de niños infectados presentan genes de virulencia asociados a enfermedad severa.
2. Conocer si existen diferencias genéticas de HLA entre niños infectados y no infectados con *H. pylori*.

Objetivos particulares

1. Determinar diferencias endoscópicas e histológicas entre los niños infectados y no infectados con *H. pylori*.
2. Evaluar la presencia y el polimorfismo de los genes de *H. pylori* (*cagPAI*, *vacA* y *babA*) aislados de niños infectados.
3. Determinar si existe asociación entre el polimorfismo de los genes HLA clase II y la presencia de infección por *H. pylori*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio: Transversal analítico.

Población de estudio

Niños atendidos por indicación de endoscopia de tubo digestivo alto en el servicio de Gastroenterología del Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI.

Lugar de estudio:

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas, Unidad de Inmunología y Departamento de Gastroenterología del Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI.

Criterios de inclusión:

- Pacientes masculinos y femeninos de 3 a 17 años de edad con indicación de endoscopia de tubo digestivo alto.

Criterios de exclusión:

- Pacientes con enfermedades concurrentes como tiroiditis, tirotoxicosis, enfermedad de Addison, agranulocitosis, vitiligo, SIDA, cáncer, insuficiencia renal crónica, lupus eritematosos.
- Pacientes que hayan recibido tratamiento antimicrobiano, sales de bismuto o con inhibidor de bomba de protones un mes previo al estudio.

Variables de estudio:

Variable dependiente: Infección con *H. pylori*. Un paciente infectado fue aquel que resultó positivo para *H. pylori* en cualquiera de las tres siguientes pruebas, cultivo, histología y serología (Del Giudici et al 2001).

Categorías: Positivo o negativo.

Escala: nominal

Variables independientes: Hospedero HLA II, *Bacteria:* cagPAI, vacA, babA.

Muestras biológicas

Biopsias. Por medio de una endoscopia el gastroenterólogo tomó 3 biopsias de antro y 1 de cuerpo. Una biopsia de antro se congeló inmediatamente a 70°C en tubos estériles para extracción de RNA y la segunda biopsia de antro se colocó en solución salina para cultivo de *H. pylori*, la tercera biopsia de antro y la cuerpo se fijó en formalina amortiguada al 10%, posteriormente se incluyó en parafina para histología.

Muestra sanguínea. Se tomaron 5 mL de sangre venosa en tubos con EDTA como anticoagulante, se centrifugaron y el buffy coat se usó para extraer DNA, el plasma se utilizó para determinación de anticuerpos (IgG anti *H. pylori* y anti CagA). Las muestras se conservan congeladas a -20°C hasta su uso.

Cultivo: Una biopsia de antro se homogenizó con solución salina al 0.9% en un homogenizador de vidrio, 50µl se inocularon en medio de gelosa sangre de carnero (BBL, Becton Dickinson, Cockeysville, USA) al 5%, con y sin antibióticos, se incubaron a 37°C en una atmósfera de 9 % de CO₂ durante 2 a 10 días. Se consideró un cultivo positivo cuando se observaron colonias características de *H. pylori* en los medios de cultivo. Se identificó el bacilo de la forma convencional observando la morfología colonial, la morfología microscópica y las pruebas bioquímicas características; positivas para ureasa, catalasa y oxidasa. Las cepas identificadas como *H. pylori* se conservaron en caldo Brucella (BBL, Becton Dickinson, Cockeysville, USA) con glicerol al 15% a -70°C.

Factores bacterianos

A partir del crecimiento puro de las cepas de *H. pylori* en placas de gelosa soya tripticasa con sangre de carnero al 5% se tomó un barrido de múltiples colonias (pool); además se aislaron y propagaron clonas (colonias) aisladas. Las suspensiones de aislados múltiples y de colonias aisladas se suspendieron en solución salina para extraer DNA para estudios de genotipificación.

PCR para tipificar *vacA*, detectar *cagA* y *babA*. Se realizó PCR a DNA aislado de las cepas estudiadas usando juegos de iniciadores específicos (ver tabla 1) de las distintas regiones descritas previamente para el gene *vacA* consistentes en tres diferentes pares de iniciadores para la región señal, s1a, s1b, s2 y dos diferentes pares de iniciadores para región media, m1 y m2. También se realizó PCR para detección de *cagA* con un juego de iniciadores previamente descritos (tabla 1). Las condiciones de amplificación para tipificar *vacA* serán a 95°C por 1 min, 52°C por 1 min y 72°C por 1 min para un total de 35 ciclos. Las mismas condiciones se aplicaron para detectar *cagA* con excepción del alineamiento que se fijó a 55°C. Así mismo, se realizó PCR para detectar el gen *babA*, usando los iniciadores descritos en la tabla 1.

Como controles para genotipificación de *cagA*, *vacA* y *babA* se utilizaron las cepas tipo de *H. pylori* descritas en la tabla 2, cuyos probables factores de virulencia han sido previamente determinados.

Tabla 1. Iniciadores para la identificación de los genes *vacA*, *cagA* y *babA*.

Gen/Alelo	Iniciadores	Secuencia de nucleótidos	Tamaño	Referencia
<i>vacA</i>				Atherton JC y cols. 1995
s1	VA1-F	5'ATGGAAATACAACAAACACAC3'	259	
	VA1-R	5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC3'		
s2	VA1-F	5'ATGGAAATACAACAAACACAC3'	286	
	VA1-R	5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC3'		
s1a	SS1-F ^D	5'GTCAGCATCACACCGCAAC3'	190	
s1b	SS3-F ^D	5'AGCGCCATACCGCAAGAG3'	187	
s1c	P3s1	5'GGGCTATTGGTTAGCATCAC3'		
	P4s1	5'GCTTTAGTAGGGCTATTGGT3'		
m1	VA3-F	5'GGTCAAATGCGGTCATGG3'	290	
	VA3-R	5'CCATTGGTACCTGTAGAAAC3'		
m2	VA4-F	5'GGAGCCCCAGGAAACATTG3'	352	
	VA4-R	5'CATAACTAGCGCCTTGCAC3'		
<i>cagA</i>				
<i>cagA</i> 349	F1	5'GATAACAGGCAAGCTTTTTGAGG3'	349	Tummuru y cols. 1993
	B1	5'CTGCAAAGAATGTTTGGCAG3'		
<i>cagA</i> region 3'	CAG1	5'ACCCTAGTCGGTAATGGGTTA3'		Yamaoka y cols. 1998
	CAG2	5'GTAATTGTCTAGTTTCGC3'	450-850	
<i>BabA2</i>				Pride y cols. 2001
	B1998(F)	5'GCTTGCCAGCGCTCAACC3'	800	
	B1999 (R)	5'GTTAAGCGAGCATGCCTTG3'		

Tabla 2. Cepas de *H. pylori* utilizadas como controles en la PCR de los genes *vacA*, *cagA* y *babA*.

Gen/alelo	Cepas de referencia					Tamaño, pb
	26695	J99	8822	8823	84183	
<i>cagA</i>	+	+	-	+	+	349
<i>babA2</i>	-	+				800
<i>vacA</i> s1a	+	-	-	+	-	259
<i>vacA</i> s1b	-	+	-	-	+	259
<i>vacA</i> s1c	-	-	-	-	-	
<i>vacA</i> s2	-	-	+	-	-	286
<i>vacA</i> m1	+	+	-	+		570
<i>vacA</i> m2	-	-	+	-		645

Mediciones en el hospedero

A las muestras de los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión se les efectuaron las siguientes mediciones basales: Una biopsia de antro se procesó para cultivo de *H. pylori*, una biopsia de antro y una de cuerpo se fijaron en formalina al 10% y se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes seriados y un corte de cada biopsia se procesó para estudios histológicos incluyendo la identificación de *H. pylori*, la cuantificación de la magnitud, progresión de los cambios histopatológicos gástricos. La gastritis se clasificó de acuerdo al sistema Sydney modificado (Pride et al, 2001).

En las muestras negativas se realizó tinción de plata para confirmar el resultado.

Anticuerpos contra extracto total. Para medir anticuerpos contra antígeno de extracto total se usó una técnica previamente descrita (Camorlinga M et al 1998) el antígeno se utilizó en una concentración de 1 µg/pozo con amortiguador de carbonatos (pH 9.6), se adicionó a una placa de 96 pozos y se incubó toda la noche. Después de la incubación se bloqueó la superficie con gelatina al 0.5% en solución reguladora de fosfatos con Tween 20 (PBST) durante 3 h a 37°C, posteriormente se lavó tres veces con PBST y se agregaron los sueros problema a una dilución final de 1:1000. En cada placa se incluyó por cuadruplicado sueros

positivos y negativos. Las placas se incubaron por 1 h a 37°C. Se agregó un anticuerpo monoclonal anti- Ig G humano acoplado a fosfatasa alcalina a una dilución de 1:1000. Se incubó una hora y se agregó el sustrato pNPP a una concentración de 1 mg/ml en regulador de dietanolamina pH 9.8. Se leyó la absorbancia a 405 nm.

Determinación de anticuerpos contra CagA

Para medir anticuerpos contra CagA se agregó CagA recombinante en placas de 96 pozos a una concentración final de 0.5 µg/ pozo, se incubó toda la noche a 4°C, se lavó con PBST y se bloqueó con leche descremada al 2.5%, se incubó una hora a 37°C y se adicionaron los sueros problema a una dilución de 1:400, se incubó una hora a 37°C. Posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario anti IgG humana acoplado a fosfatasa alcalina. Se incubó una hora y se agregó el sustrato pNPP a una concentración de 1 mg/ml en regulador de dietanolamina pH 9.8. Se leyó la absorbancia a 405 nm.

Los resultados se dieron en unidades ELISA.

Polimorfismos en genes del cromosoma 6

Se tipificaron 28 alelos de HLA clase II en DNA de 14 pacientes de los diferentes grupos de estudio.

Extracción de DNA

La extracción del DNA de pacientes y líneas celulares se efectuó por la microtécnica de salting-out. Para esta técnica a cada paciente se le extrajeron 5 ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA. De la sangre se separó el paquete de células blancas utilizando un gradiente de Ficoll (marca) y se congelaron a -20 °C hasta su uso. Tanto las células blancas como una suspensión de células control para cada alelo (ver mas adelante) se procesaron para extracción de DNA. La concentración y calidad del DNA obtenido se evaluó mediante cuantificación espectrofotométrica. Las muestras se llevaron a una concentración de 200 ng/µl y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Estándares de DNA para los diferentes alelos.

Como controles internos en los ensayos, así como en la elaboración de las referencias marcadas con fluoresceína para la tipificación de los alelos HLA-clase II se utilizó DNA de células de un panel de 25 líneas celulares B-linfoblastoide propuestas como estándares internacionales para cada uno de los alelos a estudiar, por el 12TH International Histocompatibility Workshop (IHW). La elaboración de las cadenas de referencia marcadas con fluorescencia (FLR) se realizó mediante la reacción de PCR. El DNA se extrajo a partir de líneas celulares homocigotas y se realizó el PCR usando los iniciadores específicos para cada gen, con la diferencia que uno de los iniciadores fue marcado con fluorocromo Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

Para HLA- DQB1 se utilizaron dos DQB1*0603 (OMW) y DQB1*0604 (WT47) como referencias respectivamente (Wewer V et al 2001).

Análisis Estadístico

Inicialmente se procedió a realizar una base de datos para asentar los resultados y se utilizó estadística descriptiva para el análisis de resultados. Para medir el grado de asociación se utilizó estadística de χ^2 y razón de momios con intervalos de confianza de 95%. El análisis se realizó con el programa de Spss.

Infraestructura disponible

En la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias contamos con la infraestructura en equipo e instalaciones necesarios, para la realización del proyecto. Así como, con personal con la experiencia y conocimientos adecuados. Dentro de las instalaciones del Centro Médico Nacional contamos con dos centrales de instrumentos, pertenecientes a la Coordinación de Investigación en Salud, en las que puede realizarse PCR de tiempo real, citometría de flujo, secuenciación de DNA, microscopia de fluorescencia y análisis de microarreglos. Además, la participación de investigadores de otras unidades de investigación del Centro Médico Nacional, con gran experiencia en sus respectivas áreas, reforzará este proyecto.

RESULTADOS:

En este estudio, se incluyeron en total 59 pacientes pediátricos, con indicación de endoscopia digestiva superior, de los cuales 32(54.2%) fueron del sexo femenino, el promedio de edad de los varones incluidos en el estudio fue de 8.6 con un intervalo de 3 a 16 años, los pacientes del sexo femenino tuvieron un promedio de edad de 9.96 con un intervalo de 3 a 16 años.

Tabla 1.- Diagnósticos más frecuentes en el grupo estudiado.

<i>Diagnóstico</i>	<i>No de pacientes(%)</i>	<i>H. pylori + No.(%)</i>	<i>H. pylori – No.(%)</i>
DACR	36(61%)	15(71.4%)	21(55.3%)
ERGE	6(10.1%)	1(4.8%)	5(13.2%)
Diarrea Crónica	3(5.1%)	0	3(7.9%)
Dispepsia	3(5.1%)	2(9.5%)	1(2.6%)
Otros	11(18.7%)	3(14.3%)	8(21%)
Total	59(100%)	21(100%)	38(100%)

DACR.- Dolor Abdominal crónico recurrente, ERGE.- Enfermedad por Reflujo Gastroesofágico.

En la tabla 1 se describe el diagnóstico por el que ingresaron al Servicio de Gastroenterología del Hospital de Pediatría el grupo de pacientes incluidos en el estudio, también se señala el número y porcentaje de pacientes infectados y no infectados con *H. pylori* en cada diagnóstico.

La tabla 1 muestra la frecuencia encontrada de infección por *H. pylori* y observamos que de 59 pacientes incluidos en el estudio 35.6% estaban infectados. Entre los niños estudiados, el diagnóstico más frecuente fue dolor abdominal crónico recurrente en 36/59 casos (61%), de estos 15/21(71.4%) estuvieron infectados con *H. pylori*, con ERGE hubo seis pacientes, uno con infección (16.7%) y el resto no infectados, la dispepsia se diagnosticó en tres casos y dos presentaron la infección (9.5%). De los tres pacientes que resultaron positivos dentro del rubro de otras enfermedades, tuvieron el diagnóstico de acalasia, estenosis esofágica y malabsorción respectivamente.

Tabla 2.- Métodos de diagnóstico utilizados para determinar la infección por *H. pylori* en pacientes pediátricos con indicación de endoscopia digestiva superior.

	<i>No(%)</i>	<i>Hombres</i>	<i>Mujeres</i>	<i>Media de Edad en años</i>
Cultivo	10 (16.949%)	4	6	10.3
Serología	9 (15.25%)	3	6	11.22
Histología	17 (28.81%)	7	10	11.17

La tabla 2 muestra los tres métodos estudiados, donde se encontró que 21/59 pacientes resultaron positivos al menos por uno de los métodos utilizados. En la población estudiada se obtuvo una prevalencia del 35.6%, considerando como infección los pacientes positivos por cualquiera de los 3 métodos utilizados. Todos los positivos por histología, fueron positivos por cultivo, excepto un paciente que fue positivo por histología pero negativo por cultivo.

En cuanto a los resultados de la serología tres fueron positivos solamente por este método, otros tres lo fueron por los tres métodos diagnósticos y tres positivos por serología e histología. El promedio de edad de los pacientes positivos a *H. pylori* por cualquiera de los métodos fue similar como se observa en la tabla 2.

Durante la endoscopia realizada a los pacientes el diagnóstico más frecuente fue Gastritis antral nodular, no observamos diferencias significativas entre los niños infectados o sin infección. No se observó úlcera gástrica o duodenal en todo el grupo de pacientes estudiados. El 33.3% de los pacientes infectados y el 36.8% de los no infectados mostraron una endoscopia normal.

Tabla 3.- Hallazgos histológicos en las biopsias de antro de los niños estudiados.

	ANTRO, No.(%)	
	<i>H. pylori</i> + No (%)	<i>H. pylori</i> - No (%)
Infiltración de células mononucleares		
Normal	1(4.7)	18(47.4) ¹
Leve	3(14.3)	17(44.7) ¹
Moderada	16(76.2)	3(7.9) ¹
Severa	1(4.7)	0
Presencia de neutrófilos		
Normal	2(9.5)	32(84.2) ¹
Leve	10(47.6)	6(15.8) ²
Moderada	9(42.9)	0
Severa	0	0
Presencia de Metaplasia	0	0
Presencia de Atrofia	0	0
Presencia de Nódulos linfoides		
Presentes	13(61.9)	3(7.9) ¹
Densidad de <i>H. pylori</i>		
Leve	8(38)	0.0
Moderado	4(19)	0.0
Severo	5(24)	0.0
Ausente	4(19)	38(100)

Por χ^2 : Hp+ vs Hp-. ¹. $p < 0.001$; ² $p = 0.008$

En la tabla 3, se muestran los resultados del estudio histopatológico de acuerdo a la clasificación de Sydney. Observamos que los niños infectados con *H. pylori* presentaron infiltración de células mononucleares moderada en la mayoría de los casos. Los niños sin infección presentaron infiltración leve o normal en la mayoría de los casos.

La presencia de neutrófilos fue leve o moderada en la mayoría de los niños infectados, mientras que los niños sin infección no mostraron actividad en la mayoría de los casos estudiados (84.2%).

Fue interesante observar que la presencia de nódulos linfoides fue más frecuente en los niños infectados que en los niños sin infección (61.9% vs 7.9%).

En el grupo de niños incluidos en el estudio no se observó la presencia de metaplasia o atrofia. La densidad de *H. pylori* en las biopsias fue leve en la mayoría de los pacientes infectados 8 (38%).

Tabla 4.- Características genotípicas de las cepas de *H. pylori* aisladas de los niños infectados

GENOTIPO	FRECUENCIA
cagA	No.(%)
(-)	3(42.85%)
(+)	4(57.15%)
babA	
(-)	4(57.15%)
(+)	3(42.85%)
vacA	
s1	1(14.2%)
s1m1	2(28.6%)
s1m2	2(28.6%)
s2m2	2(28.6%)
cagA/babA/vacAs1m1	
(+)	2(28.6%)
cagA/vacA	
(+)	4(57.15%)

Como se observa en la tabla No 4, de los 10 pacientes que fueron positivos por cultivo se aislaron siete cepas de *H. pylori* de las cuales cuatro fueron *cagA* +, tres *babA* + y las siete fueron *vacA* + mostrando diferencias en los alelos de *vacA*. Solamente 2/7 cepas tuvieron los tres factores de virulencia más asociados a enfermedad (*cagA*+/*babA*+/*vacA* s1m1) y 4/7 mostraron la asociación *cagA*+/*vacA*+. De los dos pacientes con la asociación *cagA*+/*babA*+/*vacA* s1m1, uno se reportó endoscópicamente normal, pero con gastritis crónica moderada con actividad leve, sin presencia de nódulos linfoides y con densidad leve de *H. pylori*, mientras que el otro paciente se observó con gastritis antral nodular y con los mismos hallazgos histopatológicos que el anterior excepto por la presencia de nódulos linfoides.

De los cuatro con la asociación *cagA*+/*vacA*+ uno (*cagA*+,*babA*+,*vacA*s1,m1) se reportó con endoscopia normal, otro con pangastritis erosiva de predominio antral

(cagA+,babA+,vacAs1), ambos con gastritis crónica moderada con actividad leve y una densidad leve de *H. pylori*, el primero sin la presencia de nódulos y el segundo con nódulos positivos, dos con gastritis antral nodular, uno (cagA+,vacAs2m2) con gastritis crónica moderada y actividad leve con presencia de nódulos y densidad severa de *H. pylori* y el otro (cagA+,vacAs1m1) con gastritis crónica leve con actividad leve, con presencia de nódulos linfoides y una densidad moderada de la bacteria.

Tabla 5.-Frecuencia de alelos de HLA-DQB1 en pacientes pediátricos mexicanos con infección por *H. pylori*.

DQB1	<i>H. pylori</i> +	<i>H. pylori</i> -
0201	1 (0.036)	1(0.036)
030101	5 (0.18)	4(0.14)
0302	1(0.036)	4(0.14)
0402	0	4(0.14)
050101	3(0.10)	2(0.071)
0602	0	1(0.036)
0604	1(0.036)	1(0.036)
Total	11(0.39)	17(0.61)

En la tabla 5, se presenta la frecuencia de los alelos de HLA-DQB1 encontrados con mayor frecuencia entre los 28 alelos estudiados en el DNA de leucocitos de niños infectados y no infectados con *H. pylori* Los resultados fueron obtenidos de 14 pacientes.

DISCUSIÓN:

La infección por *H. pylori* es una de las más comunes en el humano, actualmente está claro que la infección se adquiere durante la infancia, mucho se ha publicado acerca de la prevalencia de esta bacteria, la cual varía enormemente al comparar a los países industrializados con los países en vías de desarrollo con una prevalencia de los primeros tan baja como 10% hasta una prevalencia tan alta de 80% de estos últimos (Torres 2002). En nuestro estudio encontramos una prevalencia en general de 35.6% (21/59) en pacientes con indicación de endoscopia digestiva superior, cifra que se mantiene constante en comparación con lo reportado por Yañez et al (2000) en un estudio previo realizado en nuestro hospital, Wong et al (2005) también reportaron que la prevalencia en pacientes Chinos sometidos a endoscopia no disminuyó en un periodo de 7 años (1997-2004), lo cual contrasta con la tendencia actual en la disminución de la infección por esta bacteria tanto en países industrializados como lo indica Jacobson et al (2005) en un estudio realizado en Canadá, así como también en zonas urbanizadas de países en vías de desarrollo como sucedió en Sao Paulo, Brasil (Kawakami et al 2004).

En el grupo de niños incluidos en este estudio, encontramos que la principal indicación de endoscopia digestiva superior fue DACR (61%), son muchos los estudios que han tratado de mostrar la asociación entre *H. pylori* y DACR teniendo resultados controversiales, en estos se han reportado prevalencias tan altas de hasta 75% (Hafeez et al 1999) lo cual es muy similar a lo que reportamos en nuestro estudio donde la prevalencia en los pacientes con el diagnóstico de DACR fue 71.4%, sin embargo otros estudios han publicado prevalencias tan bajas de hasta 17.5% (Chen et al 2001), es de importancia también hacer notar que un número significativo de pacientes con DACR 58.3% fueron negativos a la infección por *H. pylori* lo que sugiere que el papel de la bacteria continua siendo poco claro en esta entidad.

Durante el desarrollo del estudio, entre los pacientes infectados por *H. pylori*, no se reportaron casos con úlcera gástrica y/o duodenal lo cual concuerda con otros reportes de los estudios realizados en poblaciones pediátricas, en donde la enfermedad severa secundaria es muy rara y es diferente a los reportes de estudios en niños de Japón y Brasil o reportes de la población adulta donde la incidencia de estas dos entidades es alta. Estos resultados pueden deberse a que en nuestro estudio sólo ingresaron a endoscopia tres pacientes con síntomas de dispepsia, o bien podría deberse a factores individuales de respuesta del hospedero, así como también el genotipo de las cepas de *H. pylori* que infectan a las diferentes poblaciones.

Los métodos invasivos (endoscopia) se han considerado como el estándar de oro para el diagnóstico de *H. pylori*, ya que permiten detectar la bacteria en el cultivo o visualizarla directamente por histología, sin embargo, en la literatura se ha cuestionado el uso de la endoscopia para el diagnóstico de *H. pylori* ya que la presencia de úlceras y cáncer es muy baja en la población pediátrica.

En nuestro estudio encontramos que por medio de la histología se diagnosticaron el mayor número de pacientes con la infección y además coincidió con nueve de los 10 pacientes detectados por cultivos y en seis de los nueve por serología, por lo que la toma de biopsias para cultivo e histología en pacientes con indicación de endoscopia digestiva superior sigue siendo una herramienta valiosa no sólo en el diagnóstico de la bacteria, sino también al tener la bacteria crecida se puede determinar el genotipo de la misma. Así mismo la histología permite evaluar el grado de inflamación provocada por la infección.

El cultivo es un método con poca sensibilidad ya que el establecimiento de *H. pylori* en el estomago no es homogéneo, se localiza en parches, por lo que en los casos con poca colonización se requeriría un número grande de biopsias de diferentes regiones del estomago para lograr su cultivo.

Cuando analizamos los resultados de histopatología, pudimos observar que el grado de infiltración mononuclear y de polimorfonucleares fue de leve a moderado en casi todos los casos de infección por *H. pylori*. Mientras que en las biopsias de los niños sin infección, se observaron con más frecuencia biopsias sin infiltrado inflamatorio, estos hallazgos son diferentes a lo observado en adultos donde la presencia de *H. pylori* favorece un infiltrado inflamatorio de moderado a severo y es muy difícil encontrar mucosa gástrica normal en adultos infectados (Camorlinga, 2003). La presencia de nódulos linfoides correlacionó de manera significativa con la presencia de la bacteria al compararlo con las biopsias de los niños sin infección, lo cual concuerda con lo reportado en un estudio realizado previamente en nuestro hospital. Durante el desarrollo del estudio no se reportaron pacientes con atrofia, ni metaplasia reforzando lo reportado anteriormente en la literatura de que estas lesiones son raras en los pacientes pediátricos (Drumm et al.) y que probablemente sea la exposición a largo plazo con la bacteria lo que permita que se desarrollen estas condiciones (Correa et al 1990, Dimitrov et al 2006).

En los estudios realizados en adultos se ha establecido la importancia de los genes de virulencia de *H. pylori*, *cagA*, *babA* y *vacA*, ya que se ha demostrado su influencia en el desarrollo clínico de la infección asociándose a la presencia de enfermedad ulceropéptica y cáncer gástrico. Sin embargo, pocos son los estudios que han estimado la prevalencia y el impacto de los factores de virulencia en los pacientes pediátricos. En nuestro estudio encontramos que de los 10 pacientes en los que pudimos aislar *H. pylori* por cultivo, 7 se caracterizaron genotípicamente, se encontró que la prevalencia de la cepas *cagA* positivas fue en 4/7 (57.15%) lo cual va de acuerdo a lo reportado por Husson et al 1995 y Gzyl et al 1997 con un rango de 40 a 80% respectivamente, estas mismas cuatro cepas tuvieron la asociación *cagA/vacA* y dos tuvieron los 3 factores de virulencia *cagA/babA/vacA*, debido al número tan bajo de la muestra de cepas aisladas no se pudo correlacionar en busca de significancia estadística con el grado de inflamación histológica, sin embargo todos los pacientes mostraron algún grado de

inflamación crónica: 3 moderada y 1 leve, todas con actividad leve, tres con presencia de nódulos y la densidad varió de leve a severa. Por otra parte es importante mencionar que 3/7 (42.85%) se reportaron como cepas *cagA* negativas, estos pacientes presentaron inflamación crónica moderada y nódulos linfoides, dos con actividad moderada y uno con actividad leve. Estos resultados, contrastan con la mayoría de los estudios realizados en niños donde el grado de daño histológico según la clasificación de Sydney es mayor en los pacientes con cepas *cagA* positivas, (Luzza et al 2002, Korzon et al 1999, Kolho et al 1999, Gallo et al 2003, Elitsur et al 1999.) excepto en el estudio realizado por Lopes et al 2006 donde no hubo diferencia entre ambos. Es necesario ampliar nuestro número de muestras para tratar de establecer los factores de virulencia de *H. pylori* que predominan en la población pediátrica mexicana, lo cual nos permitiría saber si la presencia de los genes *cagA*, *vacA* y *babA* están relacionados con el desarrollo de enfermedad en este grupo de edad como se ha visto que ocurre en los adultos (McColl et al 1997, Parsonnet et al 1997, Blaser et al 1995.)

Los antígenos de Histocompatibilidad se encuentran localizados en el MHC, son un grupo de genes con un gran polimorfismo y se encuentran localizados en el brazo corto del cromosoma 6 y su importancia radica en el reconocimiento y control de ciertas reacciones inmunes, la asociación entre estos antígenos e infección con *H. pylori* se ha tratado de determinar en población adulta. En los adultos se ha reportado una asociación positiva entre los alelos DQB1 0401 y 0301 con la presencia de gastritis atrófica y cáncer gástrico respectivamente (Sakai et al 1999, Lee et al 1996), además Goepfert et al 2003 reportaron asociación entre el primero con gastritis crónica e infección con *H. pylori* en pacientes mexicanos. Pérez et al, 2007, en un estudio realizado en nuestro país demostraron la asociación de los alelos DQB1 0401 y 0501 con cáncer gástrico, sin embargo no existen este tipo de estudios en población pediátrica, durante el desarrollo de nuestro estudio no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los alelos DQB1 e infección con *H. pylori* al compararlo con los pacientes sin infección, sin embargo los alelos 0301 y 0501 se presentaron con

una frecuencia similar, entre los pacientes infectados y no infectados. Por lo que no pudimos establecer una asociación verdadera que pudiera tener implicaciones futuras como riesgo o protección de los niños con los alelos asociados a cáncer en los adultos.

Se necesita un mayor número de pacientes para poder establecer la prevalencia real de los factores de virulencia de *H. pylori* (cagA, babA y vacA) en nuestro medio, al igual que para determinar si los alelos de HLA DQB1 son diferentes entre los pacientes con y sin infección.

CONCLUSIONES:

- 1. Los niños con indicación de endoscopia superior del Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI mostraron una prevalencia de infección con *H. pylori* de 35.6%, similar lo reportado en estudios anteriores en el mismo hospital.**
- 2. La gastritis antral nodular fue un hallazgo endoscópico frecuente en los pacientes infectados con *H. pylori*, mientras que la ausencia de úlcera gástrica y duodenal confirma la baja prevalencia de estas dos entidades en la población pediátrica.**
- 3. La asociación entre DACR e infección por *H. pylori* sigue siendo controversial.**
- 4. El mayor grado de infiltración mononuclear y de actividad, así como la presencia de nódulos linfoides en las biopsias de los pacientes infectados con *H. pylori* en comparación con los no infectados remarca el papel de la bacteria como una de las principales causas de inflamación gástrica.**
- 5. Las biopsias de los niños infectados con cepas *cagA+* *vacA+* *babA2+* en comparación con las de niños infectados con cepas *cagA* negativas presentaron similares grados de inflamación y actividad.**
- 6. No se observaron diferencias significativas en la expresión de los alelos de HLA DQB1 estudiados entre los pacientes infectados y no infectados con el bacilo. El alelo 0402 únicamente se encontró en los niños no infectados.**

Referencias Bibliográficas

1. Agnese DM, Calvano J, Hahm S, Coyle S, Corbett S, Calvano S, Lowry S. Human Toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of Gram negative infections. *J Infect Dis.* 2002; 186:1522-1525.
2. Atherton JC, Peek RM, Tham KT, Cover TL y Blaser MJ. Clinic and pathologic importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol* 1997;112:92.
3. Bamford KB, Fan X, Crowe SE, et al: Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterol* 1998; 114:482-92.
4. Blaser MJ, Chyou PH, Nomura A. Age at establishment of *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma, gastric ulcer, and duodenal ulcer risk. *Cancer Res* 1995; 55:562-565.
5. Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A. *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995; 55:2111-2115.
6. Camorlinga-Ponce M, Torres-Lopez J, Perez-Perez G, Leal-Herrera Y, González Ortiz B, Madrazo de la Garza A, Gomez A, and Muñoz O. Validation of a serologic test for the diagnosis for *Helicobacter pylori* infection and the immune response to urease and Cag A in children. *Am. J. Gastroenterol.* 1998; 93: 1264-1270.

7. Camorlinga-Ponce M, Aviles Jiménez F, Cabrera L, Hernández Pando R, Muñoz O y Torres J. Intensity of inflammation, Density of colonization and interleukin-8 response in the gastric mucosa of children infected with *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2003;8:554-560.
8. Camargo MC, Yopez MC, Ceron C, Guerrero N, Bravo Luis E, Correa P, Fontham ET. Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: Comparison of two areas with contrasting risk of gastric cancer. *Helicobacter*. 2004;9:262-270.
9. Chen MH, Lien CH, Yang W, Wu CL. *Helicobacter pylori* infection in recurrent abdominal pain in children—a prospective study. *Acta Pediatr Taiwan*. 2001;42(5):278-281.
10. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Zavala D, Fontham E, Zaruma G, Tannenbaum S, Collazos T, Ruiz B. Gastric precancerous process in a high risk population: cohort follow up. *Cancer Res* 1990;50:4737-4740.
11. Covacci A, Telfort J, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappouli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*. 1999.284: 1328-1333.
12. Covacci A. *Helicobacter pylori* pathogenicity: the bacterium and the host. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2000 Sep;12(9):1050-2.
13. Del Giudice G. The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. *Ann. Rev. Immunol*. 2001; 19:523-563.
14. Dimitrov G, Gottrand F. Does gastric atrophy exist in children? *World J Gastroenterol* 2006;12(39):6274-6279.

15. Drumm B, Sherman P, Cutz E y M Karmali. Association of *Campylobacter pylori* on the gastric mucosa with antral gastritis in children. N Engl. J. Med 1987;316:1557-1561.
16. Elitsur Y, C Neace, MC Werthammer, and WE Triest. Prevalence of CagA A, VacA antibodies in symptomatic and asymptomatic children with *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter 1999;4:100-105
17. Gallo N, Zambon C, Navaglia F, Basso D, Guariso G, Grazia M, Greco E, Mazza S, Fogar P, Rugge M, DiMario F, Plebani M. *Helicobacter pylori* Infection in Children and Adults: A Single Pathogen But a Different Pathology. Helicobacter 2003;8:21-28.
18. Gerhard M, Lehn N, Neumayer M, et al. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood –group antigen-binding adhesin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.1999; 96:12778-93.
19. Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Boren T, Rad R, Schepp W, Miehke S, Classen M, and Prinz C. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. PNAS;1999, 96:12778-12783.
20. Goepfert R, Zúñiga J, Hernández-Guerrero A, Rodríguez-Reyna T, Hosannilla N, Ruiz-Morales J, Vargas-Alarcón G, Yamamoto-Furusho J, Mohar-Betancourt A, Hernández-Pando R, Granados J. Asociación del alelo HLA-DQB1*0501 del complejo mayor de histocompatibilidad con cáncer gástrico en México. Gac Méd. Méx, 2004;140(3):299-303.
21. Gold B, Colleti R, Abbott M, Czin S, Elitsur Y, Hassall E, McArthur C, Snyder J, Sherman P. *Helicobacter pylori* infection in children: Recommendations for diagnosis and treatment. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2000; 31(5):490-497.

22. González VG, Atherton JC, Muñoz O, Dehesa M, La Garza AM, Torres J. *Helicobacter pylori* vacA and cagA genotypes in Mexican adults and children. J. Infect Dis. 2000;182:1450-1454.
23. Gzyl A, Berg DE, Dzirzanowska D. Epidemiology of cagA-vacA genes *H. pylori* isolated from children and adults in Poland. J Physiol Pharmacol, 1997;48(3): 333-343.
24. Hafeez A, Ali S, Hassan M. Recurrent abdominal pain and *Helicobacter pylori* infection in children. J Pak Med Assoc. 1999;49(5):112-114.
25. Henning EE, Mernaugh R Edl J, Cao P and Timothy L. Cover. Heterogeneity among *Helicobacter pylori* Strains in Expression of the Outer Membrane Protein BabA. Infection Immun.2004;72: 3429-3435.
26. Husson MO, Gottrand F, Bachee A, Dhaenens L, de La Salle EM, Turck D, Houcke M, Leclerk M. Importance in diagnosis of gastritis of detection by PCR of cagA gene in *Helicobacter pylori* strains isolated from children. J Clin Microbiol 1995;33:3300-3303.
27. Jacobson K. The changing prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Canadian: Should screening be performed in high-risk children? Can J Gastroenterol 2005;(19):415-420.
28. Kawakami E, Machado R, Ogata S, Scuiasiato M, Araf L, Portorreal A, Escobar M, Neto U. Decreasing trends of *Helicobacter pylori* infection prevalence in children submitted to the digestive endoscopy at an industrial city from developing country. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2004;Vol.39 Supplement 1; ps 381.

29. Kolho K, Karttunen R, Heikkilä P, Lindahl H, Rautelin H. Gastric inflammation is enhanced in children with *cagA*-positive *Helicobacter pylori* infection. *Pediatr Infect Dis J*, 1999; 18(4): 337-341.
30. Korzon M, Sikorzka G, Jankowski Z, Kur J, Banach P. Clinical and Pathological importance of *cagA*-positive *Helicobacter pylori* strains in children with abdominal complaints. *Helicobacter* 1999; 4(4): 238-242.
31. Lee J, Lowy A, Thompson W, Lu M, Loflin P, Skibber J, Evans D, Curley S, Mansfield P, Reveille J. Association of gastric adenocarcinoma with the HLA Class II gene DQB1-*0301. *Gastroenterology* 1996; 111: 426-432.
32. Lopes A, Palha A, Monteiro L, Olcastro M, Pelerito A, Fernandes A. *Helicobacter pylori* genotypes in children from a population at high gastric cancer risk: No association with gastroduodenal histopathology. *A J Gastroenterol* 2006; 101:2113-2122.
33. Lizza F, Pensabene L, Imeneo M, Mancuso M, Giancotti L, LaVecchia A, Costa M, Strisciuglio P, Pallone F. Antral nodularity and positive *cagA* serology are distinct and relevant markers of severe gastric inflammation in children with *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2002;7:46-52.
34. McColl KEL, El-Omar EM, Guillen D. The role of *H. pylori* infection in the pathophysiology of duodenal ulcer disease. *J Physiol Pharmacol* 1997;48:287-295.
35. Owen RJ, Peters TM, Varea R, Teare EL, Saverymuttu S. Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori* in England: prevalence of *cag* pathogenicity island markers and IS605 presence in relation to patient age and severity of gastric disease. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2001 Feb;30(1):65-71.

36. Ozen H, Dinler G, Akyon Y et al. *Helicobacter pylori* infection and recurrent abdominal pain in Turkish children. *Helicobacter* 2001;6:234-238.
37. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelman H. Risk of gastric cancer in people cagA positive or cagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1997;40:297-301.
38. Peek, R. GG Miller, KT Tham, G Perez-Perez, X Zhao, JC Atherton, and MJ Blaser. Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA+ *Helicobacter pylori* strains. *Laboratory Investigation*. 1995; 71: 760-770.
39. Peek Jr RM, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:28-37.
40. Pérez M, 2007. Comunicación Personal.
41. Pride D, Meinersmann RJ and Blazer MJ, Allelic Variation within *Helicobacter pylori* baba and babB. *Infec Immun* 2001;69:1160-1171.
42. Roma-Giannikow E, Shcherbakov P. *Helicobacter pylori* infection in pediatrics. *Helicobacter* 2002; 7: 50-55.
43. Torres J, Perez-Perez GI, Leal-Herrera Y, Muñoz O. Infection with CagA+ *Helicobacter pylori* strains as a possible predictor of risk in the development of gastric adenocarcinoma in Mexico. *Int. J Cancer* 1998; 78: 298-300.
44. Torres J. aspectos epidemiológicos y clínicos de la infección por *H. pylori* en niños. *Rev Gastroenterol Mex* 2000; 65(Supl2):13-19.

45. Tummuru MK, Cover TL, Blazer MJ. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*; evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun*. 1993 May;61(5):1799-809.
46. Wewer V, Andersen LP, Paerregaard A et al. Treatment of *Helicobacter pylori* in children with recurrent abdominal pain. *Helicobacter* 2001; 32:608-610.
47. Wong KY, Chung PHY, Lan LCL, Lin SCL, Tam PKH. Trends in the prevalence of *Helicobacter pylori* in symptomatic children in the area of eradication. *J Ped Surg* 2005;40:1844-1847.
48. Yamaoka Y, Kodama T, Graham DY, Kashima K. Comparison of four serological tests to determine the CagA or VacA status of *Helicobacter pylori* strains. *J Clin Microbiol*. 1998 Nov;36(11):3433-4.
49. Yañez P, Madrazo-de la Garza A, Perez-Perez G, Cabrera L, Muñoz O, Torres J. Comparison of invasive and non invasive methods of diagnosis and evaluation of eradication of *Helicobacter pylori* infection in children. *Archive of Medical Research* 31(2000):415-421.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
COORDINACION DE INVESTIGACION EN SALUD

UNIDAD DE INVESTIGACION MÉDICA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y PARASITARIAS.

CARTA DE CONSENTIMIENTO

México, D.F. a _____ de _____ de 200__

IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DEL HOSPEDERO Y LA BACTERIA ASOCIADOS A LA INFECCIÓN CON *Helicobacter pylori* EN NIÑOS INFECTADOS EN COMPARACIÓN CON NIÑOS NO INFECTADOS

Helicobacter pylori es una de las bacterias mas comunes en el hombre. La infección se adquiere en la niñez y causa una infección crónica a lo largo de la vida. Aun no se conoce si hay diferencia genéticas entre los individuos infectados con la bacteria y los no infectados. Existen algunas variantes de la bacteria que pueden condicionar el desarrollo de diferentes enfermedades.

Objetivo: Evaluar factores de virulencia de Hp, factores genéticos y de respuesta inmune, en niños infectados y no infectados con *Helicobacter pylori*.

Participación. *Se solicita la participación en el estudio anteriormente descrito con el objeto de conocer algunas características genéticas, inmunológicas del paciente y características de virulencia de la bacteria H pylori para lograr esto se tomaran entre 3 a 5ml de sangre venosa del paciente y 2 biopsias más de antro y 1 de cuerpo del estomago.*

Beneficios: Este procedimiento confirmará el diagnóstico y permitirá saber que tipo de bacteria esta causando la infección de mi hijo, lo que permitirá darle un mejor tratamiento. Además proporcionará conocimientos sobre la enfermedad asociada a *H pylori* en niños, esto ayudará a desarrollar nuevos tratamientos y vacunas para eliminar o prevenir la infección.

Posibles daños: Se puede presentar dolor de unos segundos en el brazo, en el momento de tomar la sangre o se puede producir un pequeño hematoma que desaparece por si solo. Los riesgos asociados a la endoscopia incluyen sangrado. Pero esto es muy raro que ocurra.

Los investigadores me han informado que recibiré información detallada sobre cualquier duda que tenga en cualquier momento del estudio, aun cuando esta información me haga cambiar de opinión y decida abandonar el estudio. Entiendo que estoy en mi derecho de que mi hijo abandone el estudio y esta decisión no afectará en nada la atención que recibo por parte del IMSS.

También se me ha informado que la identidad de mi hijo, serán confidencial todo el tiempo y no se divulgará en ningún tipo de publicación.

Investigador responsable: M. en C. Margarita Camorlinga Ponce
Tel. 56 27 69 00 ext. 22407

Nombre

Firma

Padre o tutor del paciente

Testigo

Testigo
