

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS -56C/T DEL GEN IFNGR1 Y -336A/G EN
CD209 EN POBLACIÓN INFECTADA CON Helicobacter pylori

Disertación previa a la obtención del Título de
Licenciado en Ciencias Biológicas

RAÚL ALEJANDRO CABRERA ANDRADE

QUITO, 2010

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del candidato Raúl Alejandro Cabrera Andrade ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Oscar Pérez

Director de la Disertación

Quito, 19 de noviembre del 2010

*A mis padres,
a mis hermanos,
a mi ángel Adelaida*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional, por su amor.

Al Dr. César Paz-y-Miño, por sus consejos y amistad, por creer en mí, por abrirme las puertas del laboratorio en donde estoy desarrollando mis conocimientos.

Al Dr. Oscar Pérez por la dirección en la elaboración de esta investigación. A la Dra. Iliana Alcocer y M.sc. Alexandra Narváez por sus correcciones y ayuda en el mejoramiento de esta disertación.

Al Dr. Oswaldo Rodríguez por haberme facilitado las muestras de ADN para la investigación y desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Berni, Majo, Andrés, Nadia, Mariu, por su compañía y ayuda en la realización de este trabajo.

A mis amigos de la vida: Basti, Bocho, Loco, Luna, Cuco, Primo, Santi, Melcochas, Churitos, Wendy, Maraya, Gato Perro, Gaby, por su amistad incondicional y sincera.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	v
TABLA DE CONTENIDOS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABLAS.....	xi
LISTA DE ANEXOS.....	xii
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	4
3.1. <i>Helicobacter pylori</i> e incidencia.....	4
3.2. Sistema inmune.....	6
3.3. Etiología y estadios del daño gástrico causado por <i>Helicobacter pylori</i>	7
3.5. Defensa contra la invasión microbiana.....	8
3.5. Receptores de membrana envueltos en la respuesta inmune.....	9
3.5.1. CD209 o DC-SIGN.....	10
3.6. Citocinas y respuesta inmune.....	12
3.6.1. Citocinas expresadas en respuesta inmune contra <i>Helicobacter pylori</i>	13
3.6.2. Interferón gamma y su receptor.....	13

3.7. Polimorfismos en genes iniciadores y reguladores de respuesta inmune.....	16
3.8. PCR en tiempo real (qPCR) y genotipaje.....	17
3.9. Justificación.....	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
4.1. Descripción de la metodología.....	21
4.2. Muestras biológicas.....	22
4.3. Tipo de daño gastrico.....	23
4.4. Análisis del ADN extraído.....	24
4.4.1. Análisis cuantitativo.....	24
4.4.2. Análisis cualitativo.....	25
4.5. Determinación del genotipo (genotipaje).....	25
4.5.1. Reacción en cadena de la polimerasa(PCR).....	26
4.5.2. PCR en tiempo real (qPCR).....	27
4.6. Análisis estadístico.....	30
5. RESULTADOS.....	32
5.1. Parámetros biopatológicos.....	32
5.1.1. Edad.....	32
5.1.2. Sexo.....	32
5.1.3 Tipo de daño gástrico.....	33
5.2. Evaluación de la calidad y concentración del ADN genómico.....	34
5.3. Determinación del genotipo.....	35

5.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa.....	35
5.3.1.1. Amplificación de la región promotora del gen CD209.....	35
5.3.1.2. Amplificación de la región promotora del gen IFNGR1.....	35
5.3.2. PCR tiempo real y sondas TaqMan®.....	36
5.3.2.1. Análisis del polimorfismo -336A/G.....	36
5.3.2.2. Analisis del polimorfismo -56C/T.....	37
5.4. Frecuencia alélica.....	38
5.4.1. -336A/G en CD209.....	38
5.4.1.1. Frecuencias genotípicas del polimorfismo -336A/G asociadas con el grado de intensidad de gastritis.....	39
5.4.2. -56C/T en IFNGR1.....	39
5.4.2.1. Frecuencias genotípicas del polimorfismo -56C/T asociadas con el grado de intensidad de gastritis.....	40
5.5. Análisis estadístico.....	41
5.5.1. Chi-cuadrado del polimorfismo -336A/G.....	41
5.5.2. Prueba de Odds ratio para riesgo de infección relacionado con el polimorfismo -336A/G.....	41
5.5.3. Chi-cuadrado del polimorfismo -56C/T.....	42
5.5.4. Prueba de Odds ratio para riesgo de infección relacionado con el polimorfismo -56C/T.....	42
5.5.5. Prueba de Odds ratio para riesgo de individuos portadores del alelo T a desarrollar patologías gástricas.....	43

5.5.6. Prueba de Odds ratio para determinar riesgo de infección de <i>Helicobacter pylori</i> según el sexo.....	43
6. DISCUSIÓN.....	44
7. LITERATURA CITADA.....	56
8. FIGURAS.....	79
9. TABLAS.....	89
10. ANEXOS.....	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visualización del ADN.....	80
Figura 2. Amplificación de la región promotora del gen CD209.....	81
Figura 3. Amplificación de la región promotora del gen IFNGR1.....	82
Figura 4. Señal procesada por el programa MaxPro de un individuo homocigoto para el alelo A del gen CD209.....	83
Figura 5. Señal procesada por el programa MaxPro de un individuo heterocigoto (AG) para el polimorfismo -336A/G en el gen CD209.....	84
Figura 6. Señal procesada por el programa MaxPro de un individuo homocigoto para el alelo G del gen CD209.....	85
Figura 7. Señal procesada por el programa MaxPro de un individuo homocigoto para el alelo C del gen IFNGR1.....	86
Figura 8. Señal procesada por el programa MaxPro de un individuo heterocigoto (CT) para el polimorfismo -56C/T en el gen IFNGR1.....	87
Figura 9. Señal procesada por el programa MaxPro de un individuo homocigoto para el alelo T del gen IFNGR1.....	88

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros bio-patológicos en individuos diagnosticados con infección de <i>Helicobacter pylori</i> y controles.....	90
Tabla 2. Distribución de la población estudiada de acuerdo al diagnóstico histopatológico y de acuerdo al sexo.....	91
Tabla 3. Frecuencia y distribución del polimorfismo-336A/G.....	92
Tabla 4. Frecuencia y distribución polimorfismo -336A/G según el diagnóstico histopatológico.....	93
Tabla 5. Frecuencia y distribución del polimorfismo -56C/T.....	94
Tabla 6. Frecuencia y distribución polimorfismo -56C/T según según el diagnóstico histopatológico.....	95
Tabla 7. Análisis de Chi-cuadrado para determinar nivel de significación de la variante -336A/G entre individuos casos y controles.....	96
Tabla 8. Análisis de Odds Ratio para determinar el riesgo relativo de individuos con el alelo G (polimorfismo -336A/G en CD209) a portar <i>Helicobacter pylori</i>	97
Tabla 9. Análisis de Chi-cuadrado para determinar nivel de significación de la variante -56C/T entre individuos casos y controles.....	98
Tabla 10. Análisis de Odds Ratio para determinar el riesgo relativo de individuos con el alelo T (polimorfismo -56C/T en IFNGR1) a portar <i>Helicobacter pylori</i>	99
Tabla 11. Análisis de Odds Ratio para determinar el riesgo de individuos portadores del alelo T a desarrollar patologías gástricas.....	100

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Respuesta inmune innata y adaptativa.....	102
Anexo 2. Progresión natural en la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	103
Anexo 3. Estructura del receptor CD209.....	104
Anexo 4. Diagrama de transducción de señales iniciada por IFN γ y su receptor.....	105
Anexo 5. Fases en la detección de fluorescencia en QPCR. <i>Ct</i>	106

1. RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, reconocida como patógeno carcinógeno tipo I según la Agencia Internacional de Investigaciones en el Cáncer y relacionada con gastritis y úlceras. El sistema inmune ayuda en la erradicación de patógenos que desarrollan enfermedades e interfieren con procesos celulares normales. CD209 es un receptor de membrana que reconoce moléculas con carbohidratos; en este caso, lipopolisacáridos presentes en la pared de péptidoglicano de *Helicobacter pylori*, y ayuda en la activación de la respuesta inmune adaptativa. IFN- γ es una citocina que estimula a macrófagos induciendo mecanismos directos antimicrobiales y antitumorígenicos, aumentando la acción de los linfocitos Th1 en la infección por *Helicobacter pylori*. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la relación de los polimorfismos -336A/G (CD209) y -56 C/T (IFNGR1) sobre el sistema inmune y de cómo estas relaciones incrementan el riesgo de infección. Además de su influencia sobre el desarrollo de patologías gastro-duodenales en individuos infectados. El uso de PCR en tiempo real y sondas TaqMan® demostró ser una técnica confiable para el genotipaje. Los resultados obtenidos relacionan un genotipo pro-inflamatorio (alelo T en IFNGR1) con mayor susceptibilidad a infección por *Helicobacter pylori* ($\chi^2=8$; $p<0,05$), además de aumentar el riesgo a desarrollar gastritis crónica atrófica (OR=8,3; $p=0,027$) en personas afectadas. Existe un incremento en el riesgo para desarrollar gastritis crónica no atrófica en heterocigotos y homocigotos pro-inflamatorios TT (OR=1,6 y 2,6 respectivamente); pero no existen diferencias estadísticas, debido tal vez al número de muestra. No se encontraron diferencias significativas al analizar el polimorfismo -336A/G en CD209 ($\chi^2 = 0,787$; $p>0,05$) por lo que no pudo ser asociado con susceptibilidad en la infección.

Palabras clave: células dendríticas, citocinas, *Helicobacter pylori*, IFN- γ , polimorfismo, respuesta inmune.

2. ABSTRACT

The gram negative pathogen, *Helicobacter pylori*, is known as type I carcinogen by the International Agency for Research on Cancer and related to gastritis and ulcers. The immune system helps in the eradication of pathogens that develop diseases and interfere with normal cellular processes. CD209 is a membrane receptor that recognizes carbohydrate molecules-related, like lipopolysaccharide located in the *Helicobacter pylori* peptidoglycan wall, and helps in activating the adaptive immune response. IFN- γ is a cytokine that stimulates macrophage, through inducing antimicrobial/antitumorogenic direct mechanisms, increasing the action of Th1 cells upon infection by *Helicobacter pylori*. The aim of this study was to evaluate the relationship between -336A/G (CD209) and -56 C/T (IFNGR1) polymorphisms on immune system and how this relation increase the risk of infection. Additionally, influence on development of gastro-duodenal diseases in infected individuals. The usage of real-time PCR and TaqMan $\text{\textcircled{R}}$ probes has shown to be a reliable technique for genotyping. The results relate the pro-inflammatory genotype (T allele IFNGR1) with higher susceptibility to infection by *Helicobacter pylori* ($\chi^2=8$; $p < 0,05$), while increasing the risk of developing chronic atrophic gastritis (OR=8,3; $p=0,027$) on affected individuals. There is an increased risk of developing chronic atrophic gastritis in pro-inflammatory TT heterozygous and homozygous (OR=1,6 and 2,6 respectively), but there is not statistical differences, probably due to sample number. No statistical differences were found when analyzing the polymorphism -336A/G (CD209) ($\chi^2=0,787$, $p > 0,05$); consequently it is not possible to associate this polymorphism with the infection susceptibility.

Keywords: dendritic cell, cytokine, IFN- γ , polymorphism, immune response

3. INTRODUCCIÓN

3.1. *Helicobacter pylori* E INCIDENCIA

Helicobacter pylori es un bacilo Gram negativo y microaerófilo que coloniza el estómago humano. Tiene entre cuatro y seis flagelos en uno de sus extremos, los cuales le permiten internalizar en la capa de moco del estómago. Mide de 2,0-4,0 μm de largo y 0,5-1,0 μm de ancho (Romero, 2007). Para su establecimiento, esta bacteria disminuye la producción de ácido en el estómago, por lo que es capaz de generar deficiencias en la absorción de nutrientes y puede comprometer el desarrollo normal del metabolismo en los individuos infectados y vincularse con la aparición de manifestaciones patológicas (Canedo, 2007).

Conocida como *Campylobacter pylori* desde su descubrimiento en la década de los ochentas por Robin Warren y Barry Marshall, ha sido reconocida como patógeno carcinógeno tipo I según la Agencia Internacional de Investigaciones en el Cáncer (Postius, 2001; IACR, 1994). Además, su presencia está relacionada a enfermedades gástricas como úlcera péptica, úlcera duodenal y gastritis (Aravena, 2007; Houghton *et al.*, 2005.; Rafeey *et al.*, 2007). Del 6-20% de individuos infectados desarrollan enfermedades gastroduodenales; aproximadamente el 17% desarrolla úlcera péptica y solo el 1-3% presenta neoplasia (Atherton, 2006; Malaty, 2007).

Helicobacter pylori es una bacteria “oportunista” que se vale de cualquier método de transmisión para colonizar el estómago humano. Rutas gastro-orales (por medio del vómito) o fecal-oral son las más comúnmente utilizadas, aunque también se tiene infección

por la ingesta de alimentos y agua contaminada (Feldman *et al.*, Oshio *et al.*, 2009). Varios estudios respaldan la noción de que la transmisión ocurre dentro de familias afectas y durante los primeros años de vida de los infantes, produciéndose transmisión persona-persona (Malaty, 2007; Sempértegui *et al.*, 2007).

Se ha observado que un nivel socio-económico bajo, una calidad alimentaria pobre y un nivel de higiene disminuida aumentan el nivel de transmisión de *Helicobacter pylori*, aunque de todas formas afecta a cualquier estrato social, etnia, sexo o grupo etario (Pueyo *et al.*, 2009; Sempértegui *et al.*, 2007). La prevalencia de este organismo es del 25,0% al 50,0% en Estados Unidos y Europa con una incidencia anual de 0,5/100 personas, y del 70,0% al 90,0% en países en vía de desarrollo con incidencia de 3/100 personas (Ables *et al.*, 2007; Dunn *et al.*, 1997). Estudios realizados en Ecuador demuestran que la prevalencia fluctúa entre 42,2% y 77,0%. En una población de niños ecuatorianos menores de 15 años, el 42,4% son afectos a *H. pylori*; y su prevalencia aumentó al 71,4% en el grupo relacionado con una condición socio-económica baja (Cabrera *et al.*, 2002). Debets-Ossenkopp *et al.* (2003) encuentra una prevalencia del 71,4% en una población de 86 individuos. En un estudio realizado en el 2004, Garcia *et al.* (2006) determina que el 63,0% de un grupo de individuos hasta los 16 años estuvo infectado por *Helicobacter pylori*, teniendo una mayor tasa de afectos en la región sierra de nuestro país (71,1%). Tamariz (2010) en su investigación determina que el 77,0% de su población bajo estudio está infectada. La alta prevalencia en individuos ecuatorianos soporta la hipótesis de que en países en vía de desarrollo se esperaría una alta tasa de infección por *Helicobacter pylori* (Pueyo *et al.*, 2009; Sempértegui *et al.*, 2007).

En zonas de alta prevalencia, la infección de la bacteria ocurre en edades tempranas, por el contrario en poblaciones con una baja incidencia, las infecciones son bajas en las primeras décadas de vida y aumentan a partir de la 4ta o 5ta década. Infecciones en edades tempranas resultan en el desarrollo de daños celulares en los órganos infectados, promoviéndose cuadros clínicos patológicos más rápidamente que en poblaciones con tasas de incidencias bajas (Feldman *et al.*, 1998; Allaker *et al.*, 2002). Las infecciones de *Helicobacter pylori* se caracterizan por ser persistentes en las personas afectas, las colonizaciones suelen ser reincidentes a pesar del tratamiento aplicado (Suerbaum & Michetti, 2002).

3.2. SISTEMA INMUNE

El ser humano interactúa con el medio ambiente y con los organismos que viven en él, algunos de ellos beneficiosos y otros patógenos. Varios mecanismos se han desarrollado dentro del cuerpo humano para su protección contra estos agentes: barreras externas, como la piel y mucosas; barreras internas que combaten a todos los microorganismos invasores de forma inespecífica (células fagocíticas, células asesinas) y respuesta inflamatoria específica. El sistema inmunológico es un sistema de estructuras y procesos biológicos dentro de un organismo que lo protege de invasiones microbiológicas dañinas externas, y elimina células patógenas y tumorales (Anexo 1) (Sompayrac, 2003).

En respuestas inmunes, una vez que los macrófagos encuentran a sus organismos blanco son activados y adquieren funciones antimicrobianas expresando citocinas proinflamatorias. Aquí se da una inflamación y aislamiento de células inmunes, y la

eliminación del microbio por fagocitosis o por la liberación de metabolitos tóxicos. (Campbell *et al.*, 2002).

3.3. ETIOLOGÍA Y ESTADÍOS DEL DAÑO GÁSTRICO CAUSADO POR *Helicobacter pylori*

El cáncer es la etapa final de una enfermedad gástrica. Varios niveles de daño en el estómago son identificados antes de que la neoplasia se presente, entre ellos la gastritis crónica atrófica y no atrófica, metaplasia intestinal y displasia. Todos ellos en un orden ascendente y clasificados dependiendo del daño celular y el grado de invasión de la enfermedad (Anexo 2) (Houghton y Wang, 2005; Roukus *et al.*, 2002). La gastritis crónica es una entidad histopatológica caracterizada por una inflamación crónica de la mucosa gástrica, siendo no atrófica cuando las células epiteliales gástricas-duodenales no son reemplazadas por otro tipo celular (Correa, 1988). Se determina una gastritis crónica atrófica cuando se da una pérdida de células glandulares gástricas y estas son reemplazadas por epitelio del tipo intestinal, glándulas del tipo pilórico y tejido fibroso. Es un grado variable de inflamación y en ocasiones se observa metaplasia intestinal, en donde se da un reemplazo de las células gástricas normales por células que semejan el epitelio intestinal. (Savarino *et al.*, 1997; Wyatt *et al.*, 1987). La displasia consiste en una mucosa anormal con la capacidad de experimentar una transformación maligna, siendo una etapa previa al desarrollo del cáncer (Ming *et al.*, 1984; Rugge *et al.*, 2000).

El último estadio de daño celular es el cáncer gástrico. Se da un crecimiento celular descontrolado con capacidad de invasión (metástasis) y destrucción de tejidos, siendo los más propensos el esófago e intestino delgado. Las células tumorales pueden infiltrar vasos

linfáticos, diseminarse a ganglios linfáticos, penetrar en el aparato circulatorio y viajar por todo el cuerpo, afectando todos los órganos que se encuentren en el camino (Danesh, 1999; Roukus *et al.*, 2002). Los factores genéticos como mutaciones puntuales, inserciones y deleciones entre otros, juegan un rol importante en la etiología de esta neoplasia, pero también este proceso depende de factores externos (ya sean ambientales, dieta, alcohol, etc.) que aumenten la probabilidad de daño a nivel de ácidos nucleicos (Jones *et al.*, 1997; Segal *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2002).

Los factores de virulencia presentes en *Helicobacter pylori* están asociados con el aumento en el riesgo para desarrollar inflamación ya que aumentan la capacidad de la bacteria para producir infección (Blaser *et al.*, 1995; Gerhard *et al.*, 1999). Factores como las proteínas VacA y CagA aumentan la virulencia y contribuyen al aumento de daño celular en la región afectada (Odenbreit *et al.*, 2000). La producción de adhesinas y otras proteínas de membrana externa, como BabA y SabA, permiten al microorganismo adherirse a células epiteliales e incrementan la interacción con la mucosa gástrica (Ilver *et al.*, 1998; Mahdavi *et al.*, 2002). El proceso de colonización depende mucho de la interacción entre el microorganismo y el huésped. Es importante conocer los factores del patógeno que le ayudan a establecerse en su nicho, pero también es necesario conocer cómo el hospedero responde ante este proceso y que factores influyen sobre el establecimiento del agente colonizador.

3.4. DEFENSA CONTRA LA INVASIÓN MICROBIANA

La función fisiológica del sistema inmunitario es la defensa contra microorganismos infecciosos. La defensa frente a éstos está mediada por las reacciones

tempranas de la inmunidad innata y las respuestas tardías de la inmunidad adaptativa (Abbas y Lichtman, 2004). La inmunidad innata comprende mecanismos de defensa bioquímicos y celulares que reaccionan sólo frente a microorganismos y no frente a otros antígenos. Sus componentes consisten en barreras físicas y químicas como los epitelios y las sustancias microbianas sintetizadas en las superficies epiteliales; células fagocíticas y linfocitos citotóxicos como las células asesinas (o Natural Killers “NK”); proteínas constituyentes del sistema de complemento y proteínas de comunicación celular (citocinas) que regulan y coordinan a las células de la inmunidad innata (Sompayrac, 2003). Una respuesta inmune innata se vuelve adaptativa cuando los antígenos son presentados en forma de arreglos moleculares y se da una respuesta específica hacia distintas moléculas, la inmunidad se adapta al agente invasor. Sus componentes son los linfocitos y sus productos (Medzhitov & Janeway, 2000). Los receptores de membrana de células especializadas en la presentación de antígenos (APCs por sus siglas en inglés “Antigen presenting cells”) son un factor importante para modular ambos tipos de respuestas inmunológicas, inician una respuesta inmune adaptativa y de regulan la intensidad con la que la inflamación se va a llevar a cabo.

3.5. RECEPTORES DE MEMBRANA ENVUELTOS EN LA RESPUESTA INMUNE

Si agentes patógenos se internalizan a las células epiteliales, varios receptores de membrana de linfocitos T reconocerán estructuras moleculares características de los invasores (antígenos generalmente compuestos por proteínas, polisacáridos o glucoproteínas) y desencadenarán una respuesta inmune. Las proteínas de membrana

presentes en diferentes células son estructuras que ayudan en la identificación de agentes patógenos y son iniciadores de una defensa inmune (Campbell *et al.*, 2002).

Los TLRs (Tool-like receptors) y los receptores de lectina tipo C, entre otros, son proteínas de membrana que están en la superficie celular del epitelio gástrico, y reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Los lipopolisacáridos (LPS) que conforman las paredes externas de las bacterias Gram negativas son arreglos reconocidos por estos receptores de membrana. Cuando las APCs reconocen estos antígenos inician un proceso de maduración, internalizan estas estructuras del microorganismo y luego las presentan a linfocitos T; median una comunicación intercelular para la proliferación de linfocitos T y B (Geijtenbeek *et al.*, 2002; Takeda *et al.*, 2001).

3.5.1. CD209 O DC-SIGN

Las células dendríticas (CD) son conocidas como las células más poderosas en la presentación de antígenos. No solo inician una respuesta inmune primaria, sino que además regulan negativamente reacciones inmunes. Son factores iniciales en enfermedades autoinmunes, siendo un medio escape de respuestas inmunes en contra de patógenos y tumores. Sus receptores tienen gran importancia en la regulación de la actividad inmune, son los iniciadores de varios procesos de diferenciación, maduración y comunicación celular. Entre estos, los más importantes y estudiados son los receptores de lectina tipo C (RLC) y los TLRs (Geijtenbeek, *et al.*, 2000). Las CDs inmaduras “monitorean” desde los tejidos periféricos cualquier internalización de microorganismos hacia el cuerpo humano. Si se da una invasión, se captura y procesa el fragmento antigénico obtenido. Mediante señales de activación celular, la CD inicia su maduración y migra hacia órganos linfoides

secundarios para presentar el antígeno a las células T, iniciando una respuesta inmune inducida por antígeno (Sallusto *et al.*, 1999).

CD209 o DC-SIGN (por sus siglas en inglés “Dendritic cell- specific ICAM 3 grabbing non- integrin”) es un RLC (dependiente de Ca^{2+}) y receptor transmembrana tipo II. Fue descubierto en el año 2000 en estudios con el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH). Es expresado principalmente en CD8 maduras e inmaduras (Geijtenbeek *et al.*, 2000). DC-SIGN es un receptor que reconoce patrones moleculares específicos, juega un rol importante en la migración y adhesión de las CD8, activación de células T, iniciación de respuesta inmune, respuesta inflamatoria hacia *Helicobacter pylori* y escape de patógenos y tumores (Zhou *et al.*, 2006).

CD209 está compuesto por 7 exones y 6 intrones, mide alrededor de 13 kb y codifica para una proteína de 404 aminoácidos con un peso molecular de 44kD. Se encuentra en el cromosoma 19p13,23 (Bashirova *et al.*, 2003). La proteína expresada por el gen consiste de un dominio extracelular, región transmembrana y una región citoplasmática. Dentro de la región extracelular se reconocen 2 dominios: uno de reconocimiento de carbohidratos (DRC) y otro denominado Neck. DRC puede reconocer ciertos antígenos con carbohidratos como la lipoarabinomanoza manosilada (ManLAM), presente en especies patogénicas de *Mycobacterium*, y antígenos Lewis. Reconoce residuos con una alta concentración de manosa localizados internamente en la estructura de los glicanos (compuesto presente en las paredes celulares de péptidoglicano de *Helicobacter pylori*) (Anexo 3) (Feinberg *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2004, Li-jun *et al.*, 2008).

3.6. CITOCINAS Y RESPUESTA INMUNE

Las citocinas son proteínas que regulan funciones celulares y activan proliferación y diferenciación celular, crecimiento y modulación de inmunoglobulinas y quimiotaxis. Inducen la activación de receptores membranales específicos e intervienen en la comunicación intercelular. Son expresadas por células endoteliales, epiteliales y del tejido conjuntivo, por macrófagos activados, linfocitos y leucocitos polinucleares (Medzhitov, 2007).

Los macrófagos son células extremadamente versátiles, involucradas en un número de funciones complejas y en procesos de protección y erradicación de agentes dañinos externos. La “activación” del macrófago, también definida como la “adquisición de la competencia para ejecutar acciones complejas” (Munder *et al.*, 1998) es una de las primeras acciones que ocurren en la respuesta inmune innata hacia potenciales patógenos, y esta activación es mediada por la acción de las citocinas. En muchas de las situaciones, los macrófagos adquieren funciones microbicidas y secretan citocinas proinflamatorias, resultando en la activación de células inmunes que inician una respuesta inflamatoria. La importancia de las citocinas radica en su habilidad de iniciar una respuesta inmune o detenerla. Citocinas pro y anti-inflamatorias regulan esta actividad, y de su acción depende una exitosa eliminación de patógenos y la desactivación de inflamaciones locales (Medzhitov, 2007).

3.6.1. CITOCINAS EXPRESADAS EN RESPUESTA INMUNE CONTRA

Helicobacter pylori

Una infección por *Helicobacter pylori* induce una respuesta inmune mediada mayoritariamente por la acción de las células T helper del fenotipo 1 (Th1) (Ernst & Gold, 2000; Shimoyama & Crabtree, 1998). Citocinas características que inducen a una respuesta de Th1 son interferón gamma (IFN- γ), Tumor necrosis factor α (TNF- α), y las interleucinas (IL)-1 β , IL-6, IL-8 e IL-18, todas reguladoras positivas durante inflamaciones crónicas inducidas por esta bacteria (Bodger & Crabtree, 1998; Rad *et al.*, 2002).

Muchas líneas celulares intervienen en la erradicación de agentes patógenos en una respuesta inmune. Biopsias de mucosas gástricas de pacientes con infecciones de esta bacteria revelan una alta concentración de linfocitos T y B, macrófagos, neutrófilos, mastocitos y células dendríticas. Durante respuestas inmunes específicas, diferentes grupos de células T emergen. Células inmaduras T helper (Th0) pueden diferenciarse en 2 tipos: Th1, que producen citocinas como IL-2 e IFN- γ ; y las Th2, que secretan IL-4, IL-5 e IL-10 (Suerbaum *et al.*, 2002).

3.6.2. INTERFERÓN GAMMA Y SU RECEPTOR

Los macrófagos responden hacia un amplio rango de productos celulares producidos en respuestas inmunes innatas y adaptativas. Una de las más representativas es el IFN- γ , originalmente llamado factor activador de macrófagos. Esta citocina induce mecanismos antimicrobianos y antitumorales, además de iniciar vías de procesamiento y presentación de antígenos a células involucradas en respuesta inmune. IFN- γ dirige la

atracción de leucocitos e inicia el crecimiento, maduración y diferenciación de varios tipos celulares (Boehm *et al.*, 1997; Young & Hardy, 1995), además de aumentar la actividad de NK y regular funciones de linfocitos B en la producción de Inmunoglobulinas (Ig) (Carnaud *et al.*, 1999).

El IFN- γ es el único perteneciente a la clase II, con una estructura diferente a los interferones del tipo I. Es una citocina que coordina una serie de programas celulares a través de una regulación transcripcional de genes inmunológicamente relevantes, presente en respuestas inmunes innatas o adaptativas en contra de infecciones virales o bacterianas, y en el control de desarrollo de tumores (Kamradt *et al.*, 2000; Sawai *et al.*, 1999; Young & Hardy, 1995). Es producido por los linfocitos Th1, linfocitos citotóxicos CD8+ (controlada por la producción de citocinas como IL-12 e IL-18), por linfocitos B, NK T y APCs como los monocitos/macrófagos y las CD (Carnaud *et al.*, 1999; Frucht *et al.*, 2001; Jonasch & Haluska, 2001; Munder *et al.*, 1998).

El receptor funcional de IFN- γ (IFNGR) está compuesto por dos cadenas asociadas a la unión del IFN- γ , denominadas IFNGR1; y dos cadenas de transducción de señales llamadas IFNGR2. IFNGR1 y 2 (α y β respectivamente) pertenecen la familia de receptores de citocina de clase II (Bazan *et al.*, 1990). El gen IFNGR1 codifica para una cadena α que se une al IFN- γ , con un peso molecular de 54,2 kDa; mientras que IFNGR2 codifica para la subunidad que interactúa con Jak2 e inicia el proceso de transducción de señales vía Jak-Stat (Subramaniam *et al.*, 2001). IFNGR1 es un gen que se encuentra en el brazo largo del cromosoma 6 y mide 30kb. Consta de 7 exones: los exones 1-5 codifican para el dominio extracelular del receptor; el exón 6 para una porción pequeña del dominio

extracelular, proximal a la membrana, y el resto es una proteína transmembrana; y el exón 7 codifica para el dominio intracelular del receptor (Bach *et al.*, 1997).

IFN- γ induce la señalización Jak-Stat por medio de su receptor. La vía de señalización Jak-Stat envuelve un secuencial aislamiento del receptor y activación de kinasas pertenecientes a la familia de Janus (Jaks: Jak 1-3 y Tyk2) y los STATs (Stat 1-6) para el control de la transcripción de genes blanco vía respuesta a elementos específicos (Anexo 4) (Schroder *et al.*, 2004; Subramaniam *et al.*, 2001).

Ratones modificados genéticamente para una expresión disminuida de IFN- γ , al ser infectados con *H. pylori*, desarrollan una inflamación gástrica menos severa y una colonización de bacterias mucho mayor que en ratones con genotipos salvajes. Esto demuestra que el IFN- γ promueve una inflamación gástrica causada por *Helicobacter pylori* y contribuye en la reducción de su colonización (Akhiani *et al.*, 2002). IFN- γ indirectamente modula la severidad de la gastritis activando macrófagos que producen citocinas proinflamatorias y también regula una disminuida expresión de factores anti-inflamatorios (Suerbaum *et al.*, 2002). Regula la intensidad de la inflamación por vía linfocitos Th1 y la forma en que el huésped responderá hacia un evento de colonización. Es importante estudiar su acción en individuos ecuatorianos infectados por la bacteria y los polimorfismos que inciden en el aumento o disminución en la eficacia de la respuesta inmune.

3.7. POLIMORFISMOS EN GENES INICIADORES Y REGULADORES DE RESPUESTA INMUNE

Variaciones en la secuencia genética y en la región promotora de CD209 han sido descritas, estudiadas y relacionadas con varias enfermedades (Rathore *et al.*, 2008). El polimorfismo -336A/G presente en la región promotora de CD209 puede ser un factor de riesgo para algunos padecimientos como la tuberculosis, alta susceptibilidad de infección con VIH-1 y alta severidad en la fiebre por dengue. Este polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la región promotora afecta a la unión de factores de transcripción como Sp1-like y se reduce la expresión del receptor. Aumenta el riesgo en susceptibilidad ya que la alta expresión del receptor incrementa la tasa de infección, en el caso del VIH-1 y la fiebre por dengue, propagando más rápidamente el virus. El polimorfismo es tomado como factor de riesgo para infecciones por bacterias cuando una producción disminuida del receptor hace ineficiente el reconocimiento de estos agentes colonizadores y no se desarrolla una respuesta inmunitaria adecuada; se aumenta la probabilidad de infección (Sakuntabhai *et al.*, 2005; Vannberg *et al.*, 2008).

SNPs que afecten en la expresión o funcionalidad en genes codificantes para citocinas pueden influenciar la intensidad con la que una respuesta del sistema inmune se da en contra de patógenos invasores en el cuerpo humano, aumentando la severidad de infección microbiana, aún cuando se traten de cepas con virulencia baja, o aumentando la intensidad de la inflamación y promoviendo daño celular (Algood *et al.*, 2006; Döffinger *et al.*, 2000; El-Omar *et al.*, 2000). -56 C/T es un polimorfismo presente en la región promotora del gen IFNGR1 que afecta al sitio mayor de iniciación transcripcional produciendo una disminuida expresión del receptor (Thye *et al.*, 2003). Ha sido

relacionado con aumento en la susceptibilidad a infecciones (Cheong *et al.*, 2006; Koch *et al.*, 2002; Salih *et al.*, 2007), además es tomado como factor de riesgo para desarrollar carcinoma gástrico ya que aumenta las probabilidades de generar daño celular por una alta y prolongada inflamación (Canedo *et al.*, 2008). La importancia en estos genes radica en su función dentro del sistema inmune, iniciando todo el proceso de erradicación y sirviendo como puente entre la inmunidad innata y adaptativa. El efectivo control de agentes patógenos es crucial para la supervivencia del huésped y para mantener el correcto funcionamiento de los órganos colonizados. El estudio de polimorfismos de un solo nucleótido tiene un importante valor científico y médico ya que al relacionar la genética del huésped con susceptibilidades hacia enfermedades e infecciones, se obtiene una valiosa información que permite conocer los procesos que ocurren en los eventos de colonización, y en este caso de *Helicobacter pylori*.

3.8 PCR EN TIEMPO REAL (qPCR) Y GENOTIPAJE

La PCR cuantitativa es una herramienta poderosa para el análisis de la expresión genética. Se determina la concentración de ácido nucleico inicial en la reacción marcando el sustrato con fluorescencia (Anexo 5) (Bowyer, 2007; Finnzymes, 2009). Varios tipos de fluorocromos (o también denominados “químicas”) son utilizados para determinar la cantidad de transcrito expresado en una muestra dada. Se tienen moléculas reportadoras que se unen inespecíficamente a ADN de doble cadena, como el SYBR Green; y sondas de secuencias específicas compuestas por oligonucleótidos marcados con tintes fluorescentes y moléculas inhibidoras (quencher) (Stratagene, 2007).

Las sondas TaqMan® son oligonucleótidos lineares, marcados con un fluorocromo en su extremo 5' y un inhibidor de luz (Quencher) hacia su extremo 3'. En esta conformación, las sondas en un medio acuoso, y aún hibridizadas en un ADN molde o amplicón, no emiten fluorescencia alguna. Durante el paso combinado de anillamiento de cebadores y sondas, y extensión en la reacción de PCR, la polimerasa con actividad exonucleasa 5' va sintetizando la nueva cadena y retirando la sonda anillada. El fluorocromo liberado, y distante del quencher, emite luminiscencia la cual es captada al final de cada ciclo, y proporcional con el aumento de cada evento. Solo una de las sondas, cada una determinando un alelo distinto, anillará en la secuencia que se está amplificando (Higuchi *et al.*, 1993; Holland *et al.*, 1991).

El uso de sondas TaqMan® permite al investigador determinar cambios en zonas específicas dentro del genoma, y en esta investigación la presencia de los alelos A y G en el polimorfismo -336A/G, y los alelos C y T en el polimorfismo -56C/T. Una vez determinados los alelos se genotipificó a los individuos estudiados, entendiendo como genotipaje el estudio del set de alelos presentes en un individuo de un determinado gen (Jessell *et al.*, 2007; Widmaier *et al.*, 2006). El genotipo de cada individuo por polimorfismo en este estudio fue de homocigotos para los alelos silvestres y polimórficos, y el genotipo heterocigoto.

3.9. JUSTIFICACIÓN

En la presente investigación se analizará la frecuencia de los polimorfismos -336A/G en el gen CD209 y -56C/T en IFNGR1 y su relación con la infección por *Helicobacter pylori* dentro de una muestra de individuos ecuatorianos. Dado que existe una

alta prevalencia en países en vía de desarrollo y su presencia está relacionada con enfermedades gastro-duodenales, este trabajo permitirá conocer cómo la genética del huésped influye positiva o negativamente sobre los procesos de colonización, además de relacionar dichos polimorfismos con el aumento en el riesgo a desarrollar daño celular en los órganos afectados cuando la bacteria inicia inflamación. Los resultados aquí obtenidos permitirán conocer como el genotipo de la muestra analizada influye sobre el evento de colonización, y la información aquí obtenida ayudará, si es el caso, a mejorar los tratamientos dados a pacientes afectados y controlar infecciones por *Helicobacter pylori*.

Los objetivos planteados en este estudio fueron:

GENERAL

Analizar los polimorfismos -336A/G y -56 C/T, en las regiones promotoras de CD209 y IFNGR1 respectivamente, en un grupo de individuos ecuatorianos infectados con *Helicobacter pylori*, y relacionar su frecuencia con la infección de éste microorganismo.

ESPECÍFICOS

- Determinar las frecuencias de los polimorfismos -336A/G en CD209 y -56 C/T en IFNGR1 en individuos afectos de *Helicobacter pylori*, así como también en la población control.
- Analizar la relación que tienen estos polimorfismos con infección por *Helicobacter pylori*.
- Analizar la influencia de los polimorfismos estudiados con el daño celular en individuos *Helicobacter pylori* positivo; determinar si existe riesgo a desarrollar

cuadros clínicos gastro-duodenales desfavorables con la presencia de estas variantes genéticas.

- Estandarizar la técnica de PCR tiempo real y el uso de sondas TaqMan® para el genotipaje de SNPs en muestras biológicas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA

En este estudio se analizaron dos polimorfismos en zonas promotoras envueltos en una expresión baja de los genes CD209 e IFNGR1, relacionados con el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos y activación celular en macrófagos respectivamente. Para ello se determinó el genotipo de individuos ecuatorianos diagnosticados con *Helicobacter pylori*, y población control negativa para la presencia de la bacteria; muestras recolectadas en el Hospital del día de Quito No. 1 de la Policía Nacional, Hospital Eugenio Espejo, Hospital Vozandes, Instituto de Gastroenterología Quito y Hospital Pedro Vicente Maldonado. El ADN extraído a partir de biopsias gástricas fue entregado por el Laboratorio de Diagnóstico Molecular de la escuela de la PUCE, a cargo del Dr. Oswaldo Rodríguez. El análisis del genotipo se lo realizó mediante la técnica de PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan®; una sonda para cada variante alélica y marcada en su extremo 5' con diferentes fluorocromos (6-Carboxyfluorescein o FAM; y 6-carboxyhexafluorescein o HEX). La señal de cada sonda fue reconocida por PCR en tiempo real y los datos fueron analizados por el programa MaxPro. El uso de estos fluorocromos fue determinado por previas investigaciones, y su orden y asignación a genotipos silvestres o mutantes no obedece a ninguna razón en particular (Bulat-Kardum *et al.*, 2006; Canedo *et al.*, 2008; Núñez *et al.*, 2006). Una vez determinados los genotipos de toda la población estudiada y recogidos todos los datos clínicos de cada individuo se procedió a realizar los análisis estadísticos para correlacionar los polimorfismos dentro de la muestra, entre casos afectados y controles, y relacionarlos con una predisposición genética para la infección de *Helicobacter pylori*. Se utilizó prueba de chi cuadrado para determinar

la influencia de los polimorfismos sobre la infección de *Helicobacter pylori*, y la prueba de odds ratio (OR) para observar si existe o no riesgo a infección, y en el caso del polimorfismo -56C/T en IFNGR1, para relacionar la presencia del alelo polimórfico con riesgo a daño celular.

4.2 MUESTRAS BIOLÓGICAS

El ADN utilizado en este estudio, así como las historias clínicas de cada paciente, fue proporcionado por el Laboratorio de Diagnóstico Molecular de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) y entregadas al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de las Américas, en donde se realizó la genotipificación de las regiones génicas ya descritas en todas las muestras recibidas.

Todas las muestras analizadas fueron obtenidas a partir de biopsias gástricas, recolectadas en el Hospital del día de Quito No. 1 de la Policía Nacional, Hospital Eugenio Espejo, Hospital Vozandes, Instituto de Gastroenterología Quito y Hospital Pedro Vicente Maldonado. El Laboratorio de Diagnóstico Molecular de la PUCE informó a los pacientes acerca de la participación en este proyecto, y previo al examen endoscópico, cada individuo firmó un consentimiento informado escrito, aprobado por el Comité de Bioética de cada centro de salud mencionado. Los individuos incluidos en este estudio, no debieron recibir un tratamiento con antimicrobianos para *Helicobacter pylori* por lo menos seis meses antes de la biopsia recolectada, además de no presentar esofagitis ni cáncer gástrico (Tamariz, 2010).

La población de estudio consistió en un total de 258 individuos ecuatorianos de sexo masculino y femenino. Dos grupos fueron determinados en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular de la PUCE para correlacionar con los genotipos estudiados: un grupo control que consistió de individuos *Helicobacter pylori* negativo y un grupo de individuos infectados. Los grupos afectados y controles fueron agrupados teniendo en cuenta la presencia o ausencia de *Helicobacter pylori* dentro de las muestras analizadas. Se realizó una PCR específica del gen 16S rRNA para esta determinación (Rodicio *et al*, 2004; Sislema, 2008; Tamariz, 2010).

Fueron entregadas 113 muestras del grupo control. Se obtuvo acceso a los resultados histopatológicos en donde se determinó el estadio de la gastritis de cada paciente, y al historial clínico de cada individuo en donde datos como el sexo, diagnóstico clínico y edad fueron necesarios para estudios estadísticos posteriores.

En cuanto a individuos infectados con *Helicobacter pylori* se realizó el análisis de 145 biopsias. De igual manera, cada paciente presentó una historia clínica completa y el resultado de los exámenes histopatológicos aplicados.

4.3 TIPO DE DAÑO GÁSTRICO

Todas las biopsias estudiadas en esta investigación fueron obtenidas por medio de endoscopías, agrupadas dependiendo de la lesión gástrica que presentaba cada paciente y clasificadas de acuerdo al resultado histopatológico realizado posteriormente. Las observaciones histopatológicas fueron determinadas de acuerdo al Taller Internacional que evaluó y revisó la clasificación del Sistema de Sidney para el reporte de gastritis (Dixon *et*

al., 1997). Fueron determinados 5 estadios dependiendo de la levedad o gravedad del daño observado: Gastritis crónica no atrófica con presencia de úlcera, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia y cáncer gástrico. Los estadios fueron numerados del 1 al 5 para clasificar a los individuos en grupos por daño gástrico, atribuyendo el valor más bajo a una enfermedad gástrica leve. La gastritis crónica fue diagnostica por la presencia de células mononucleares (linfocitos, células plasmáticas y macrófagos) (Tamariz, 2010).

4.4 ANÁLISIS DEL ADN EXTRAÍDO

Para mejorar y obtener buenos resultados en técnicas posteriores para el análisis del genotipaje de las muestras se determinó pureza, concentración y grado de fragmentación del ADN extraído. Contaminantes en el producto obtenido disminuirán la eficiencia y los resultados finales en técnicas moleculares como la Reacción PCR no serán adecuados (Budowle *et al.*, 2000; Paz-y-Miño & Leone, 2002)

4.4.1 ANÁLISIS CUANTITATIVO

El análisis de pureza y concentración de ADN en solución se obtuvo utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UVmini-1240. Para las mediciones se realizaron diluciones 6/3000 μ l (1:500). Se midió la absorción de luz a las longitudes de onda de 260, 280 y 230 nm para luego establecer la cantidad de proteínas presentes en la solución (230 y 280 nm) y la cantidad de ADN (260 nm). Se determinó la relación entre las densidades ópticas (OD por sus siglas en inglés) OD_{260}/OD_{230} para indicar la contaminación de la muestra. Se tiene un buen producto si el valor obtenido se encuentra entre 1,8 y 2,0 (Werman *et al.*, 1996).

La cuantificación de ADN se logró a partir del valor de OD de cada muestra multiplicándolo por el factor de dilución, en este caso 500, y por el factor de extinción molar de ADN de doble cadena. Dicho factor corresponde a una concentración de 50ng/ μ L de ADN en un OD de uno (Budowle *et al.*, 2002).

4.4.2 ANÁLISIS CUALITATIVO

Se determinó la calidad del ADN aplicando electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% y añadiendo bromuro de etidio a una concentración de 25 μ g/ml. Se utilizó como buffer Tris-Borato-EDTA (TBE 1X) con una carga eléctrica constante de 35 miliamperios (mA) durante una hora aproximadamente. La concentración del gel fue al 1% ya que ésta es la idónea para la separación de ácidos nucleicos de alto peso molecular, obteniendo una resolución aproximada de 0,7 kb (Parry & Alphey, 1995).

Los productos de PCR corridos fueron visualizados bajo luz ultravioleta (UV) de 302 nm de longitud de onda. El bromuro de etidio es un agente intercalante que se une al ADN. Bajo luz UV éste reactivo emite fluorescencia, y con un marcador adecuado se analizó la concentración y calidad de la muestra. Para este ensayo se utilizó Low Mass [®] DNA ladder (Invitrogen) (Walker & Gastra, 1983; Sambrook *et al.*, 1989).

4.5 DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO (GENOTIPAJE)

Para establecer el genotipo de los individuos de los polimorfismos -336A/G y -56C/T se realizó una PCR en tiempo real hibridizando sondas TaqMan[®] en la región de ADN deseada. Para cada gen se usaron dos sondas, una para cada polimorfismo; por lo tanto se utilizaron 4 sondas para el análisis de los polimorfismos de ambos genes. Los

resultados fueron analizados mediante el programa computacional MaxPro™ QPCR para el sistema QPCR Mx3005P™. Además se confirmó que en el amplicón resultante no existieran bandas inespecíficas o dímeros de primer aplicando una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. Una vez determinado el genotipo de todas las muestras, se calculó la frecuencia encontrada para los análisis estadísticos posteriores.

4.5.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica utilizada en la biología molecular, descrita en 1986 por Kary Mullis, que permite una rápida clonación y análisis del ADN (Bartlet & Stirlibng, 2003). Este método permite al investigador realizar una amplificación selectiva de secuencias blanco de ADN. La especificidad de ésta reacción viene dada por oligonucleótidos llamados primers, que a temperaturas calculadas (que varían de acuerdo a la cantidad de adeninas, timinas, citocinas y guaninas), se unirán específicamente a secuencias de ADN complementarias. Con la presencia de una ADN polimerasa termoestable y precursores de ADN (deoxinucleótidos, dNTP's) en la reacción, se inicia la síntesis de una nueva cadena de ácido nucleico, complementaria al segmento blanco elegido por el investigador (Strachan & Read, 1999). Al final de la reacción, y luego de unos 25 ciclos, se obtendrán cerca de 10^5 copias de secuencias específicas, las que luego podrán ser observadas en electroforesis con geles de agarosa.

4.5.2. PCR EN TIEMPO REAL (qPCR)

En este estudio se realizó PCR en tiempo real con la adición de sondas TaqMan®. Cada sonda está diseñada de tal modo que se unirá a un alelo determinado, y dependerá del polimorfismo que presenta cada muestra a analizar para que la hibridización se efectúe correctamente y se emita una señal (o color) en el caso de muestras homocigotas, o ambas señales en el caso de heterocigotos.

Para determinar los polimorfismos -336A/G y en CD209 y -56C/T las sondas fueron:

Sonda -336 A

FAM-5'ACTAGGGCAAGGGTAGGCAGGTAGCA 3'

Sonda -336 G

HEX-5'ACTAGGGCAAGGGTGGGCAGGTAGCA 3'

Sonda -56 C

HEX-5'TGGAGGGCAGCGCTGGGCTGGT 3'

Sonda -56 T

FAM-5'TGGAGGGCAGTGCTGGGCTGGT 3'

Las sondas que se unieron por complementariedad a la variante alélica -336 A y -56 T fueron marcadas en su extremo 5' con fluorocromos específicos, y en su extremo 3' con un Black Hole Quencher-1 (BHQ-1).

Las longitudes de onda de excitación para FAM y HEX son de 492 y 535 respectivamente, asimismo las longitudes de emisión son de 516 y 538 (Stratagene, 2007).

El quencher utilizado en este ensayo tiene un rango de absorción entre 480-580 nm (Marras *et al.*, 2002).

La secuencia de los cebadores utilizados para la reacción de PCR fue obtenida a partir de la página web: http://www.finnzymes.com/reagents_index.html.

Para la amplificación de la región promotora de CD209 se utilizaron los cebadores:

CD 209RP - Fw 5' - CCCAAAGTCAGCAGGAATTCCCAA-3'

CD 209RP - Rv 5'-AGAGAAAGCTACTGTGTTACACCC- 3'

Para la amplificación de la misma región en IFNGR1 se utilizaron:

IFNGR1RP - Fw 5' ACAGACCCCGGTGACGGA 3'

IFNGR1RP - Rv 5' ACGGTCGCTGGCTCCAAC 3'

Se analizó la secuencia de cada cebador en el banco génico del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>), descargándose las secuencias de las regiones a amplificar y comprobando la complementariedad de los oligonucleótidos utilizados. El tamaño del amplificado fue de 152 pares de bases para CD209 y de 93 bp para IFNGR1.

La polimerasa utilizada en éste ensayo es una “hot start” *Thermus brockianus* (*Tbr*), inactiva a temperatura ambiente para prevenir extensión durante el desarrollo de la reacción, y con actividad exonucleasa 5²→3³ requerida para la hidrólisis de la sonda. Las concentraciones de reactivos utilizados fueron optimizados a partir de los protocolos descritos por el fabricante (Finnzymes, 2009). Para CD209, el volumen final de reacción fue de 20 µl para cada muestra: 1X de DyNAmoTM Probe qPCR Kit (hot start *Tbr* ADN

polimerasa, buffer PCR, MgCl₂, dNTP mix), 250 nM de cebadores, 600 nM de sondas TaqMan®, 200 ng de ADN molde, y se aforó con agua hasta completar el volumen final.

En el caso de IFNGR1 las concentraciones de los reactivos fueron las mismas, a excepción de las sondas TaqMan® donde su volumen final fue de 250 nM. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador Stratagen Mx3005P equipado con una lámpara halógena para la excitación de los fluorocromos. Los datos fueron analizados en el programa bioinformático MaxPro versión 3.20.

Las condiciones de amplificación para CD209 fueron: denaturación inicial a 94°C por 15 minutos, denaturación a 94°C durante 30 segundos, anillamiento y extensión a 69°C por 1 minuto durante 40 ciclos.

Para IFNGR1: denaturación inicial a 94°C por 15 minutos, denaturación a 94°C durante 30 segundos, anillamiento y elongación a 72°C por 1 minuto durante 40 ciclos. La recolección de fluorescencia fue al término de cada ciclo.

El fragmento amplificado se lo corrió en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. Como buffer se utilizó Tris – Ácido Bórico y EDTA (Buffer TBE 1X). Se aplicó un voltaje de 80V, dando un amperaje aproximado de 30 mA. Los productos de PCR corridos fueron visualizados bajo luz ultravioleta de 302 nm de longitud de onda. Junto con los productos de la PCR se cargó un marcador de peso de ADN de 50bp DNA ladder (Invitrogen™).

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Luego de la determinación del genotipo -336A/G en la región promotora amplificada del gen CD209 y -56C/T en la misma región para IFNGR1 de los individuos estudiados, se calculó la frecuencia de los alelos en grupo afecta con *Helicobacter pylori* y la muestra control. Para aquello, se dividió el número total de alelos alterados para el número total de alelos estudiados en el grupo; siendo el número de alelos, el doble del número de los individuos estudiados ya que cada paciente tiene dos copias de cada alelo.

De la misma forma, se cálculo la frecuencia genotípica para los grupos casos y control. Se la obtuvo para cada genotipo (homocigotos silvestres y mutados, y heterocigotos) dividiendo el número de individuos para el total del grupo estudiado. Para determinar el equilibrio de la población, la suma de las frecuencias genotípicas para un solo locus debe ser igual a uno.

Las frecuencias esperadas fueron calculadas a partir de las frecuencias genotípicas observadas mediante la ecuación $p^2 + q^2$ (Hardy – Weinberg), donde p y q tienen el valor de cada uno de de los alelos. Se tendrá por lo tanto, que el valor de cada uno de los homocigotos viene dado por p^2 y q^2 , respectivamente, y la frecuencia de los heterocigotos es dos veces la frecuencia de cada alelo ($2pq$) (Stephenson, 2003).

Las diferencias significativas entre el grupo infectado con *Helicobacter pylori* y el grupo control con los polimorfismos -336 A/T y -56 C/T fue establecido mediante la prueba de Chi-cuadrado (χ^2), utilizando el programa SPSS©17.0 para Windows®.

Se utilizó la prueba de odds ratio (ORs) para determinar el riesgo de infección a *Helicobacter pylori* para cada genotipo estudiado. También se aplicó la prueba teniendo en cuenta parámetros como sexo y edad. Estos cálculos se los realizó en tablas de contingencia de 2 X 2 (Ponce *et al.*, 2001).

5. RESULTADOS

5.1 PARÁMETROS BIO-PATOLÓGICOS

5.1.1 EDAD

La edad media de los individuos controles fue de 50 años, con un rango de entre 17 y 86 años; la mediana en este grupo fue de 50,5. La distribución de los pacientes con respecto a la media es igual, teniendo que el 50% están sobre el valor y el otro 50% por debajo. En el caso de los individuos afectados se obtuvo una edad media más baja que en los controles, 45 años; y una mediana de 43. El 48% de los individuos estuvo por debajo de la media y el 52% por sobre éste valor. El rango de edad entre afectados es de 15 hasta 88 años (Tabla 1).

El rango de edad de todos los individuos analizados está entre los 15 a los 88 años, cuya media es de 47 años de edad. Los individuos varones están entre los 15 a los 88 años mientras que en las mujeres entre los 17 a los 86 años.

5.1.2 SEXO

Del total de 258 pacientes analizados, 125 de ellos fueron hombres (48%); mientras que el 52% restante fueron mujeres, es decir 133 individuos de la población. En cuanto a los afectados, 70 de ellos fueron hombres (48%) y 75 de ellas fueron mujeres (52%). La mayoría de pacientes en población control fueron mujeres con el 51% (58 casos) y el 49% perteneció al sexo masculino con 55 individuos (Tabla 1).

5.1.3 TIPO DE DAÑO GÁSTRICO

Luego de los resultados histopatológicos, los pacientes fueron clasificados de acuerdo a una escala de severidad de afecciones gastrointestinales donde (1) representa a los individuos con gastritis crónica no atrófica, (2) individuos con gastritis crónica atrófica, (3) pacientes con metaplasia intestinal, (4) pacientes con displasia y (5) pacientes con cáncer gástrico.

En el grupo de casos afectados con *Helicobacter pylori*, el 53,8% (78 individuos) presentaron gastritis crónica no atrófica, el 31,8% (46) gastritis crónica atrófica, 14,4% (21) metaplasia intestinal y no se obtuvieron casos con diagnósticos 4 y 5. Con respecto al sexo, dentro de las mujeres el 57,3% tuvo diagnóstico 1, el 28% diagnóstico 2, y el 14,7% diagnóstico 3. En cuanto a los hombres, el 50% presentó una gastritis no atrófica, 35,7% gastritis atrófica, y el 14,3% de los hombres casos fueron diagnosticados con metaplasia intestinal.

En el grupo control, el 70,8% (80 individuos) fueron diagnosticados con gastritis 1, el 14,2% (16) con gastritis 2, el 12,4% (14) con metaplasia intestinal, el 0,9% (un paciente) y el 1,8% presentaron cáncer gástrico (2 individuos). A nivel de géneros, la proporción de pacientes y el diagnóstico histopatológico no varía en gran medida, se mantienen las proporciones (Tabla 2).

Al comparar las edades medias entre los grupos infectados y controles y agrupando por resultado histopatológico, se notó que existe una media más baja en pacientes *Helicobacter pylori* positivos al compararlos con el grupo control. La edad media de

individuos con gastritis atrófica fue de 42,3 años, para gastritis atrófica 45,2, y para metaplasia intestinal 53,6 años de edad. La edad media en el grupo controle fue de 46,5, 54,5 y 63,1 años para gastritis crónica no atrófica, atrófica y metaplasia intestinal respectivamente (Tabla 2). No se tomaron en cuenta a los individuos con displasia y cáncer gástrico al momento de calcular sus edades medias; su número de muestra es demasiado bajo y los datos resultantes no serán valederos al momento de la discusión.

5.2 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y CONCENTRACIÓN DEL ADN GENÓMICO

Las 145 muestras de ADN de personas diagnosticadas con *Helicobacter pylori* y las 113 muestras entregadas por el Laboratorio de Diagnóstico Molecular de la PUCE fueron corridas en gel de agarosa al 1% junto con el marcador molecular Low DNA Mass Ladder (InvitrogenTM) Se determinó que ADN entregado fue de alto peso molecular y sin degradación. Este producto fue de alta calidad y aseguró los resultados de los procedimientos posteriores (Figura 1).

Se determinó la concentración del ADN obtenido a partir de espectrofotometría. En cuanto a las muestras con presencia de la bacteria los valores de concentración de ADN variaron desde 27,6 ng/ μ L hasta 851 ng/ μ L teniendo una concentración promedio de 204,3 ng/ μ L. Los rangos de concentraciones en muestras control fue de 36,7 ng/ μ L hasta 3598,4 ng/ μ L con un promedio de 262,7 ng/ μ L.

5.3 DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO

5.3.1 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa, o por sus siglas en inglés PCR, se amplificaron las regiones promotoras de los genes CD209 e IFNGR1 a partir de los ADNs extraídos de biopsias gástricas. Por cada ensayo de PCR realizado, se incluyó una reacción sin ADN para cerciorarse que en cada procedimiento no hubiese contaminación de ácidos nucleicos y no se obtengan resultados falsos.

5.3.1.1 AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN CD209

Se realizó la amplificación de la región promotora del gen CD209 obteniendo una banda con peso molecular de 152 pb. Este resultado se obtuvo tanto en los individuos caso como control (Figura 2).

5.3.1.2 AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN IFNGR1

De la misma forma se realizó la amplificación de la región promotora del gen IFNGR1, obteniendo amplicones de 93 pb como resultado final en casos afectos y controles (Figura 3).

5.3.2 PCR TIEMPO REAL Y SONDAS TaqMan®

5.3.2.1 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO -336A/G

Para determinar la presencia o ausencia del polimorfismo -336A/G en la zona promotora del gen CD209 se utilizó el programa bioinformático MaxPro versión 3.20. Este programa determina los genotipos de cada muestra analizada por medio de la fluorescencia, emitida por cada sonda, al finalizar cada ciclo en la PCR corrida. Por lo tanto se obtuvieron 3 distintos resultados dependiendo del genotipo presente:

- a) Se obtuvieron 117 individuos homocigotos para el alelo silvestre A entre casos y controles. En un individuo homocigoto para el alelo A se observa un incremento de fluorescencia en la sonda marcada con FAM (línea roja) a medida que los ciclos avanzan, mientras que la fluorescencia de la sonda marcada con HEX (línea azul) no emite ninguna señal ya que la variante G no está presente en la secuencia amplificada y esta sonda no ha podido hibridizarse por complementariedad. Se captó señal solo de la sonda marcada con FAM (Figura 4).
- b) Se determinaron 135 individuos heterocigotos (AG) entre casos y controles. En un individuo heterocigoto se recibe la señal de fluorescencia de ambas sondas TaqMan a medida que los ciclos avanzan dentro de la PCR. La hibridización de cada sonda se realiza con éxito ya que, tanto el alelo -336A como el -336G, están presentes en la muestra. La polimerasa *Tbr* corta los fluorocromos de cada sonda y se emiten ambas señales. La señal detectada fue de ambas sondas añadidas en cada reacción (Figura 5).
- c) Se encontraron tres individuos homocigotos para el alelo polimórfico G de un total de 255 muestras procesadas, entre casos y controles. Se determinó este genotipo en el

programa MaxPro al recibir solamente la señal de la sonda marcada por el fluorocromo HEX. En un individuo homocigoto para el alelo G se observa un incremento de fluorescencia en la sonda marcada con HEX (línea azul) a medida que los ciclos avanzan, mientras que la fluorescencia de la sonda marcada con FAM (línea roja) no emite ninguna señal ya que la variante A no está presente en la secuencia amplificada (Figura 6).

5.3.2.2 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO -56C/T

De la misma manera, se determinó la presencia del polimorfismo -56C/T con el uso del programa MaxPro versión 3.20. Dependiendo de la señal detectada por el termociclador Stratagen Mx3005P, se genotificaron las muestras estudiadas. Se obtuvieron por lo tanto tres distintos genotipos:

- a) Se obtuvieron 32 individuos homocigotos para el alelo silvestre C entre casos y controles. La señal recogida por el termociclador Stratagen Mx3005P es dada por el fluorocromo HEX únicamente. La sonda se hibridiza con alta especificidad en muestras que solo presenten este genotipo. Gracias a esta unión, la *Tbr* polimerasa libera al fluorocromo anclado en el extremo 5' de la sonda (Figura 7).
- b) De entre el grupo caso y control, 128 fueron individuos genotificados como heterocigotos para el polimorfismo -56C/T. En un individuo heterocigoto se recibe la señal de fluorescencia de ambas sondas TaqMan a medida que los ciclos avanzan dentro de la PCR. La unión de cada sonda a su zona complementaria se da con alta especificidad, y ya que los individuos heterocigotos presentan ambos alelos (C y T), se liberarán ambos fluorocromos al medio (Figura 8).

- c) Se obtuvieron 98 individuos con el genotipo TT luego de procesar muestras de los grupos casos y control. Se observa una alta cantidad de fluorescencia dada por FAM (Sonda que se une por complementariedad a la región génica que presenta el alelo T). La sonda se hibridiza con alta especificidad en muestras que solo presenten este genotipo (Figura 9). Estos individuos pertenecen a la variante polimórfica.

5.4 FRECUENCIA ALÉLICA

5.4.1 -336 A/G EN CD209

Las frecuencias genotípicas obtenidas para los alelos AA corresponden a 0,45, 0,54 para AG y 0,01 para GG, en los individuos controles. Las frecuencias esperadas en este grupo corresponden a 0,51 para homocigotos AA, 0,4 para heterocigotos y 0,08 para homocigotos GG. Las frecuencias alélicas obtenidas para A corresponden a 0,72 y de 0,28 para G. En el grupo de individuos control, las frecuencias genotípicas son de 0,47 para el genotipo AA, 0,51 para el genotipo AG y 0,02 para el genotipo GG. Las frecuencias esperadas para los individuos homocigotos AA corresponde a 0,53, para los heterocigotos AG es de 0,4 y para los homocigotos GG es de 0,08. Las frecuencias alélicas para AA son de 0,73 y para GG es de 0,28 (Tabla 3).

Se encontraron 3 individuos con el genotipo GG, lo que denota una frecuencia genotípica bastante baja entre afectados y controles para la variante polimórfica T dentro de los individuos estudiados.

5.4.1.1 FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DEL POLIMORFISMO -336 A/G ASOCIADAS CON EL GRADO DE INTENSIDAD DE GASTRITIS

Las frecuencias encontradas en individuos afectados con nivel I de gastritis fueron para el homocigoto AA, 0,45; para GG, 0,01; y para AG, 0,54. En gastritis 2, 0,47 para el homocigoto del alelo A y 0,53 para el heterocigoto. En pacientes diagnosticados con metaplasia intestinal, 0,43 para el genotipo AA y 0,57 para el heterocigoto. No se obtuvieron muestras con diagnóstico de displasia y cáncer gástrico en personas *Helicobacter pylori* positivas. Las frecuencias del grupo control fueron de 0,46 para AA, 0,51 para AG y 0,03 para la variante polimórfica GG en personas con diagnóstico 1; 0,5 para el genotipo AA y el mismo valor para los heterocigotos, en individuos con gastritis 2; 0,43 y 0,57 para homocigotos del alelo AA y heterocigotos con metaplasia intestinal; un único individuo diagnosticado displasia presentó el genotipo AA; un individuo AA y un individuo AG fueron diagnosticados con cáncer gástrico. Los porcentajes totales de los individuos, agrupados por las diferentes intensidades de gastritis, se encuentran detallados en la Tabla 4.

5.4.2 -56 C/T EN IFNGR1

Dentro del grupo afecto con *Helicobacter pylori*, las frecuencias genotípicas obtenidas fueron de 0,09 para el genotipo CC, 0,46 para CT y 0,45 para TT. Las frecuencias esperadas en este grupo corresponden a 0,1 para alelos CC, 0,44 para alelos CT y 0,46 para alelos TT. Las frecuencias alélicas obtenidas para C correspondieron a 0,32, y para el alelo T 0,68 para TT. En el grupo de individuos control, las frecuencias genotípicas observadas son de 0,17 para CC, 0,54 para CT y 0,29 para TT. Las frecuencias esperadas

para los individuos homocigotos CC es 0,19; para los heterocigotos CT, 0,49; y para los homocigotos TT, 0,31. La frecuencia alélica para C fue de 0,44 y para el alelo T, 0,56 (Tabla 5).

5.4.2.1 FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DEL POLIMORFISMO -56 C/T ASOCIADAS CON EL GRADO DE INTENSIDAD DE GASTRITIS

En la relación de los alelos normales y mutantes de los polimorfismos versus la escala de severidad de afecciones gástricas, en individuos afectados se encontró una frecuencia de 0,09 para CC, 0,44 para TT y 0,47 para el heterocigoto en el grupo de gastritis 1; 0,13, 0,43 y 0,44 para el genotipo CC, CT y TT respectivamente en los individuos con gastritis 2, 0,52 para TT y 0,48 para el heterocigoto en los pacientes con metaplasia; ningún individuo para displasia y cáncer. Con respecto al grupo control, se encontró una frecuencia de 0,16 para CC, 0,54 para CT y 0,3 para TT con gastritis no atrófica; 0,31, 0,56 y 0,13 para CC, CT y TT respectivamente, en el grupo con gastritis atrófica; 0,07 para el homocigoto del alelo C, 0,43 para el heterocigoto y 0,5 para el homocigoto del alelo T del grupo III de gastritis. En los niveles de gastritis más severas se encontraron tres pacientes, un heterocigoto diagnosticado con displasia y dos heterocigotos con cáncer gástrico. El número de individuos y los porcentajes de pacientes totales encontrados por cada nivel de intensidad de gastritis se encuentran detallados en la Tabla 6.

5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

5.5.1 CHI-CUADRADO DEL POLIMORFISMO -336 A/G

La prueba de chi-cuadro fue aplicada en este estudio para determinar la relación que existe entre el polimorfismo -336A/G del gen CD209 y la infección por *Helicobacter pylori*. Al correlacionar los datos del total de 144 individuos afectados con *Helicobacter pylori*: 65 (45%) homocigotos para el alelo A, 78 (54%) heterocigotos, y un individuo (1%) homocigoto para el alelo G; con los 111 individuos controles: 52 (47%) con el genotipo AA, 57 (51%) heterocigotos AG y 2 individuos (2%) con el genotipo GG, se obtuvo un valor de $\chi^2 = 0,787$, dando diferencias no significativas entre los casos y controles al tomar en cuenta el polimorfismo ($p > 0,05$) (Tabla 7).

5.5.2 PRUEBA DE ODDS RATIO PARA RIESGO DE INFECCIÓN RELACIONADO CON EL POLIMORFISMO -336 A/G

Se utilizó el alelo G como referencia al realizar las tablas de contingencia de 2 x 2. La prueba de OR fue realizada de esta forma para determinar el riesgo de infección en individuos portadores del alelo silvestre A, partiendo del punto que una mayor expresión del receptor aumentará la producción de citocinas en esta respuesta inmune. Aunque los valores no son significativos ($p > 0,05$), se observa que existe un riesgo con los portadores del alelo A (Tabla 8). Los valores no significativos pueden deberse al tamaño de muestra, el número de individuos con el genotipo polimórfico es demasiado bajo.

5.5.3 CHI-CUADRADO DEL POLIMORFISMO -56C/T

Se realizó una prueba de chi-cuadrado entre los grupos casos y controles para determinar si existen diferencias estadísticas. Se obtuvo un valor de $\chi^2 = 8$ al realizar el cálculo con 2 grados de libertad (3 genotipos estudiados – 1). Dicho valor es mayor a 5,99 y menor a 13,8, lo que denota que no existen diferencias altamente significativas ($p > 0,001$), pero si diferencias significativas entre los grupos bajo estudio ($p < 0,05$) (Tabla 9).

5.5.4 PRUEBA DE ODDS RATIO PARA RIESGO DE INFECCIÓN RELACIONADO CON EL POLIMORFISMO -56 C/T

Se realizó tablas de contingencia de 2x2 para determinar el riesgo de los portadores del alelo G con infección a *Helicobacter pylori*. En la prueba del OR se tomó como referencia al alelo polimórfico C, y se compararon con los genotipos CT y TT. La presencia del alelo T incrementa el riesgo de infección, y más aún en individuos homocigotos para T (OR=2,8; IC95%: 1,27-6,53). Se incrementó el riesgo en los portadores del alelo T (CT+TT) más que en los individuos heterocigotos, aunque los valores no son significativos (OR=2,05, $p=0,08$; OR=1,6, $p=0,32$ respectivamente) (Tabla 10).

5.5.5 PRUEBA DE ODDS RATIO PARA RIESGO DE INDIVIDUOS PORTADORES DEL ALELO T A DESARROLLAR PATOLOGÍAS GÁSTRICAS

Se determinó el riesgo del alelo T a desarrollar cuadros patológicos gástricos entre portadores de *Helicobacter pylori* y controles. Se tiene un incremento en el riesgo en pacientes con genotipos TT más que en los heterocigotos, aunque no son valores significativos. Solo en los individuos homocigotos TT de gastritis crónica atrófica se obtuvo un valor significativo, y un riesgo de 8.3 veces a desarrollar este cuadro clínico siendo portadores de *Helicobacter pylori* (OR=8,3; p=0,05) (Tabla 10).

5.5.6 PRUEBA DE ODDS RATIO PARA DETERMINAR RIESGO DE INFECCIÓN DE *Helicobacter pylori* SEGÚN EL SEXO

Se realizó la prueba de OR para determinar si el sexo influyó sobre los individuos bajo estudio a portar *Helicobacter pylori*. Se desarrolló una tabla de contingencia de 2 x 2, donde del total de hombres estudiados (125) 70 fueron afectados y 55 controles; y de las 133 mujeres, 75 afectas y 58 controles. No se obtuvieron diferencias significativas al realizar la prueba de Chi – cuadrado ($\chi^2 = 0,004$ ^{NS}; p>0,05); y no existe riesgo entre hombres y mujeres a portar la bacteria (OR= 0,98 IC95%=0,6-1,61; p>0,05).

6. DISCUSIÓN

Cerca de la mitad de la población mundial está infectada por *Helicobacter pylori* y en Latinoamérica el 60% es portadora, con variaciones de entre el 30% al 90% (Corti, 2009). Su incidencia no es la misma entre regiones geográficas, siendo los países en vías de desarrollo los que presentan una mayor tasa que los países industrializados. La prevalencia de *Helicobacter pylori* en el Ecuador es alta y, aunque no se tiene una estadística clara, se tiene que la infección en individuos ecuatorianos fluctúa entre 42,2% y 77% (Cabrera *et al.*, 2002; Debets-Ossenkopp *et al.*, 2003; García *et al.*, 2006; Tamariz, 2010). La tasa de incidencia depende de factores sociales, económicos y culturales dentro de cada grupo poblacional. En comunidades donde los niveles socio económicos, de higiene y salubridad son bajos y mínimos se espera un alto porcentaje de individuos infectados. El mecanismo de transmisión de la bacteria puede ser vía oral-oral u oral-fecal (Feldman *et al.*, 1998; Hopkins *et al.*, 1993) por lo que niveles socio-económicos y de higiene bajos influyen en la transmisión dentro de grupos familiares y entre comunidades (Graham *et al.*, 1991; Sempértegui *et al.*, 2007).

Poco o casi nada se sabe acerca de variantes polimórficas en genes envueltos en respuesta inmune de individuos ecuatorianos infectados con *Helicobacter pylori*, y su predisposición hacia este evento de colonización. Erradicar o controlar su crecimiento y grado de invasibilidad tiene una gran importancia en el ámbito de la salud ya que su presencia está asociada con el desarrollo de enfermedades gastrointestinales. Ya sea por el nivel socio-económico o el nivel de higiene, el número de pacientes infectados sigue aumentando en nuestro país (Gómez *et al.*, 2004). Resulta de interés el estudio genético en individuos ecuatorianos y el análisis de genes inmersos en la activación de respuestas

inmunes y desarrollo de inflamaciones, con el propósito de crear diagnósticos y tratamientos óptimos para su control o erradicación.

La edad media de los individuos infectados en este estudio fue de 45 años. Al comparar las edades medias entre los grupos y el nivel de daño gástrico (tomando en cuenta solo los estadios 1 al 3), se encontró que el grupo portador tiene edades medias más bajas que el control (Tabla 2). La alta prevalencia de *Helicobacter pylori* en la población ecuatoriana y su exposición en grupos poblacionales con edades bajas promueve el desarrollo de enfermedades gástricas más rápidamente que en países con tasas bajas de infección; cuadros clínicos gástricos adversos se observará en poblaciones más jóvenes. Las infecciones de *H. pylori* en países con incidencias altas ocurren a edades tempranas y muchos de los afectados no presentan ningún síntoma (Kuipers, *et al.*, 2000). La persistencia durante tan largo tiempo y la constante activación de respuestas inmunes para erradicar a la bacteria pueden llegar a causar deterioro en las células gástricas cuando la infección es prolongada, llegando a producir daños a nivel celular en estómago y/o duodeno y el desarrollo de patologías gástricas (Danesh, 1999; Ernst & Gold, 2000; Houghton & Wang, 2005). Si la colonización de *Helicobacter pylori* se presenta en países en vía de desarrollo a edades tempranas, el desarrollo de inflamaciones y daños gástricos se presentarán más rápidamente en poblaciones con tasas de incidencia más bajas; y esto se obtuvo al comparar las edades medias entre los individuos afectados y controles en el grupo de individuos ecuatorianos estudiados. Por el contrario, en países industrializados, la edad media de los individuos con cuadros patológicos gástricos causados por esta bacteria es más alta, denotando que las infecciones a edades tempranas tienden a desarrollar problemas gástricos más rápidamente ya que el sistema inmune ha actuado contra esta bacteria durante más tiempo. (Blaser *et al.*, 1995; Malaty *et al.*, 2002).

No se encontraron diferencias estadísticas al momento de correlacionar el sexo dentro del grupo afectado (48% hombres y 52% mujeres). La transmisión de la bacteria se produce vía oral-oral y/o oral-fecal (Allaker *et al.*, 2002; Feldman *et al.*, 1998), por lo que hombres y mujeres tienen el mismo riesgo de infección. Factores socio-económicos y niveles de higiene son determinantes para aumentar la predisposición de adquisición de esta bacteria y para aumentar el riesgo de infección, el sexo no es un factor que influya sobre la incidencia ni sobre la tasa de contagio dentro de una población (Allaker *et al.*, 2002; Hopkins *et al.*, 1993; Malaty & Graham, 1994).

Solo del 1 al 3% de pacientes que presentan esta bacteria desarrollan a lo largo de muchos años adenocarcinoma gástrico (Parsonnet, 1998; Parkin *et al.*, 1999). El desarrollo de esta neoplasia es atribuida a una prolongada inflamación crónica activa que la bacteria induce dentro del hospedero. En la fase crónica de la gastritis, los cambios inflamatorios dentro de la mucosa pueden progresar durante varios años y bajo la influencia de ciertas cepas virulentas, expresión aumentada de citocinas pro-inflamatorias y cambios genéticos en genes reguladores de crecimiento celular y apoptosis de células hospederas, se llega a etapas avanzadas de la enfermedad. Para el desarrollo de patologías severas es necesaria además, la interacción factores ambientales como dieta, tabaquismo y consumo de alcohol (Danesh, 1999; Davis & Milner, 2009; Houghton & Wang, 2005). El número de individuos con cáncer gástrico fue reducido en este estudio (2) y ambos fueron *Helicobacter pylori* negativo lo que denota que, a pesar de que esta bacteria es un factor de riesgo, no todos los cuadros clínicos gástricos severos están totalmente relacionados con su presencia, y que para el desarrollo de daño celular también intervienen muchos otros factores ya que se trata de una enfermedad multifactorial.

La PCR en tiempo real es una técnica utilizada principalmente para cuantificar ácidos nucleicos (ARN mensajero, ARN de interferencia, entre otros) dentro de una muestra dada, utilizando fluorocromos para determinar esta concentración (Bowyer, 2007; Finnzymes, 2009). El uso de sondas específicas denominadas TaqMan®, además de ser utilizadas en ensayos de cuantificación, en este estudio fueron necesarias para la genotipificación de los individuos estudiados. Demostró ser una técnica eficiente para este propósito, siendo efectiva luego de encontrar una temperatura de anillamiento idónea para cada muestra y dando resultados sin procedimientos post-PCR (no se necesitó correr las muestras en geles de agarosa luego de la reacción, aunque de todas formas se lo hizo para verificar la ausencia de falsos positivos). El quencher de cada sonda utilizado en este ensayo tiene un rango de absorción entre 480-580 nm (Marras *et al.*, 2002), y fue válido para evitar señales erróneas dentro de la reacción ya que cubrió todo el espectro de longitud de onda de los fluorocromos utilizados (492nm para FAM y 535 para HEX). Las señales captadas dentro del termociclador Stratagen Mx3005P fueron procesadas en el programa MaxPro, en donde el genotipo de cada individuo fue dado al final de la reacción.

La frecuencia alélica para -336G es baja en la población estudiada para grupos afectos y control (0,28 y 0,27 respectivamente) lo que denota que los individuos presentan una expresión normal de este receptor en CDs. CD209 -336 está localizado en la región promotora de CD209, a 212pb 5' del mayor sitio de transcripción inicial. Esta región afecta múltiples sitios predecibles de unión para factores de transcripción que se unen a Sp1/GATA1/CACCC-/ y CCA (Liu *et al.*, 2003). Variantes polimórficas en este sitio afectan la unión de factores de transcripción Sp1 y posiblemente otros factores que modulan la actividad de regulación transcripcional de CD209. El alelo G en esta secuencia influirá negativamente en el nivel de expresión de la proteína, dando como resultado un

fenotipo en CDs con menor cantidad de receptores en su membrana celular. Polimorfismos a nivel de regiones promotoras que afectan la unión de factores Sp1 afectan el fenotipo y están relacionados con susceptibilidad a enfermedades (Martin *et al.*, 2004; Sakuntabhai *et al.*, 2005; Sibley *et al.*, 2003).

La alta prevalencia de infección de *H. pylori* no pudo ser asociada con predisposición genética del hospedero al relacionarla con el gen CD209. Si bien éste reconoce los lipopolisácaridos (LPS) presentes en la pared de péptidoglicano de la bacteria, existen otros factores que ayudan al patógeno a no ser reconocido tempranamente si este es el caso. Estudios demuestran que algunas cepas de *Helicobacter pylori* presentan una pared celular menos pro-inflamatoria, modificando los lípidos A de la pared externa y expresando LPS O, que son estructuralmente parecidos a los antígenos del grupo Lewis presentes en el cuerpo humano (Algood *et al.*, 2006). Para la iniciación de una respuesta inmune específica, antígenos deben ser presentados a linfocitos inmaduros para iniciar una proliferación y diferenciación celular. CD209 es un receptor de membrana en las CDs que posee arreglos intracelulares que le permiten internalizar antígenos específicos reconocidos por la región extracelular de la proteína e iniciar respuesta inmune, su expresión es normal en todas las muestras estudiadas (Feinberg *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2004, Li-jun, *et al.*, 2008). No se encontraron diferencias significativas al relacionar el polimorfismo -336A/G entre casos afectados y control ($p > 0,05$). CD209 es un importante mediador entre el reconocimiento de *Helicobacter pylori* y la iniciación de respuesta inmune, en todo caso si bien dentro de la población bajo estudio no se observa una frecuencia alta en el polimorfismo relacionado con una baja expresión del receptor, no es posible asociarla con la alta incidencia de la bacteria. La variante -336 A/G no es un factor de riesgo para la infección en los individuos infectados estudiados, deben existir otras variantes polimórficas

dentro de la misma proteína, o en otros factores moleculares, que se relacionen con la infección.

Variantes alélicas a nivel de regiones promotoras en citocinas donde se influencia su expresión génica han sido relacionadas con susceptibilidad y severidad de varias enfermedades infecciosas (Hurme *et al.*, 1998; Koch *et al.*, 2002). Mientras la inflamación es ventajosa cuando los microbios son eliminados, puede ser perjudicial cuando la infección no es eliminada ya que se conduce a un continuo deterioro de la estructura y función del tejido, y posteriormente en la disminución de la eficacia para realizar una respuesta inmune adecuada. El ataque por parte del hospedero hacia una infección debe tener una acción restringida dentro del tiempo (Rad *et al.*, 2004). La variante -56 C/T de la región promotora de IFNGR1 afecta el sitio mayor de iniciación transcripcional, relacionándose al alelo T con una mayor expresión del gen IFNGR1 que el alelo G (Canedo *et al.*, 2008; Rosenzweig *et al.*, 2004; Merlin *et al.*, 1997). Los resultados obtenidos para IFNGR1 -56 demuestran una alta frecuencia genotipo TT en individuos afectados vs controles (45% vs. 29%, respectivamente), dando diferencias significativas ($p < 0.05$) al momento de confrontar los datos entre los grupos. Los portadores del alelo T presentan riesgo de infección para *Helicobacter pylori* (OR=2,05; IC95%=0,97-4,36; $p=0,08$). El riesgo en individuos homocigotos para T (OR=2,9; IC95%=1,27-6,54; $P=0.018$) demuestra que la sobre-expresión de este receptor está asociada con infección de *Helicobacter pylori* en la población estudiada, y que la respuesta inmune mediada por esta citocina y con este genotipo, no es eficaz para evitar la colonización. No solo se ha visto que este polimorfismo influencia en la infección por *Helicobacter pylori* (Thye *et al.*, 2003), en un estudio en una población de Gambia se relacionó la sobre-expresión de IFNGR1 con el aumento en la susceptibilidad de infección por *Plasmodium falciparum*

(Jülicher *et al.*, 2003), y aunque esta mutación en su forma heterocigota fue asociada con protección a malaria cerebral (Koch *et al.*, 2002), el alelo T influye sobre susceptibilidad a infección de ciertos microorganismos.

La respuesta inflamatoria inducida por *Helicobacter pylori* con el tiempo determinará el tipo y la gravedad de la gastritis. Proteasas y citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α y el IFN- γ son liberadas por células polimorfonucleares y macrófagos en la mucosa gástrica. La activación de neutrófilos y macrófagos durante una respuesta inmune resulta en la producción de moléculas altamente reactivas que dañan a la célula debido a la peroxidación lipídica y a la oxidación de proteínas y ADN (Bodger & Crabtree, 1998; Rad *et al.*, 2002). La infección por *H. pylori* desencadena una respuesta inmune mediada por linfocitos, generándose una gran cantidad de IFN- γ . Además, inicia respuesta por neutrófilos induciendo fagocitosis y activando su capacidad microbicida, y ayuda a su infiltración dentro del área infectada. Se ha propuesto que el causante de daño a nivel de tejido es una consecuencia de esta acción ya que la extensión de la lesión de la mucosa se relaciona con el grado de infiltración de neutrófilos (Pearl-Yafe *et al.*, 2007). En una activación neutrofílica se producen como intermediarios oxígeno reactivo y óxido de nitrógeno (conocidos como mutágenos), jugando un rol patogénico en el desarrollo de afecciones gástricas (Ismail *et al.*, 2003). A pesar de la producción de altas cantidades citocinas pro y anti-inflamatorias y al eficiente reclutamiento de neutrófilos, macrófagos y varias poblaciones de linfocitos en el sitio de la infección, la respuesta inmune del hospedero es normalmente ineficaz para eliminar la infección por *Helicobacter pylori*. Al contrario, una sobreproducción de citocinas pro-inflamatorias, han sido asociadas con incremento del riesgo en cáncer gástrico (Rad *et al.*, 2004; El Omar *et al.*, 2000). La alta frecuencia del alelo T en individuos infectados denota

que la sobreexpresión de esta citocina contribuye a que todos estos procesos, en donde se eliminan factores como radicales libres y varias especies reactivas que promueven daño celular además de una aumentada infiltración de neutrófilos y macrófagos, incidan sobre la disminución en la eficiencia para erradicar a la bacteria.

El IFN- γ tiene un doble rol, interviene en el control de la infección induce cambios neoplásicos en la mucosa gástrica infectada. Estudios realizados en ratones knock out IFN- γ ^{-/-} comparados con ratones normales demuestran una reducción en la inflamación gástrica (Akhiani *et al.*, 2002; Sawai *et al.*, 1999), pero también deficiencia en la resistencia natural a infecciones bacterianas, parasíticas e infecciones virales (Huang *et al.*, 1993; Kamradt *et al.*, 2000., Sawai *et al.*, 1999). Se aumenta la acción de la respuesta inmune gracias a esta citocina pero a su vez se disminuye la eficacia en la eliminación de la infección. El IFN- γ ayuda a controlar la infección por *H. pylori*, pero al mismo tiempo la activación de células CD4+T mediada por esta citocina promueve el desarrollo de lesiones gástricas pre-malignas que pueden derivar en cáncer gástrico (Sayi *et al.*, 2009). El desarrollo de lesiones conlleva una pérdida de funciones celulares provocando una disminución en la eficacia al momento de eliminar una infección.

Se realizó la prueba OR para determinar el riesgo de individuos portadores del alelo T a desarrollar patologías gástricas y se encontró que dicho genotipo aumenta el riesgo a desarrollo de cuadros clínicos (Tabla 11). Canedo (2008) demuestra que el polimorfismo -56C/T está relacionado con un incremento en el riesgo a desarrollar carcinoma gástrico y en este estudio se demuestra que dicho polimorfismo, además de relacionarse con el incremento en la infección, tiene relación con el tipo de daño gástrico cuando *Helicobacter pylori* está presente. Aunque solo se tiene diferencias significativas en el genotipo TT en

gastritis crónica atrófica, se observa claramente que el riesgo aumenta al comparar los genotipos CC con los heterocigotos, y más aún al comparar con el genotipo homocigoto para el alelo T. Tales diferencias no fueron estadísticamente significativas probablemente por el número de muestra estudiado. Una mayor expresión de gen IFNGR1 aumenta las probabilidades de que ocurra daño gástrico en individuos con *H. pylori* y esto se denota en el grupo de individuos ecuatorianos estudiados.

Aunque se esperaría que el alelo T, que produce más citocina pro-inflamatoria, se relacionara con el grupo control por inducir mayor respuesta inmune que el alelo G, los resultados demuestran que no es así. Más bien, los portadores del alelo con mayor expresión para IFNGR1 se encuentran asociados con la presencia de la bacteria, por lo que el polimorfismo -56 C/T aumenta la susceptibilidad e influye sobre la infección por *Helicobacter pylori*, sin tomar en cuenta los factores socio-económicos y niveles de higiene asociados con la incidencia. Alelos de sobreexpresión de IFN- γ se relacionan con patologías gástricas y deficiencia en eliminar infecciones (Akhiani, *et al.*, 2002; Döffinger *et al.*, 2000; Newport *et al.*, 1996), y esto es consistente con los resultados obtenidos al momento de analizar polimorfismos en su receptor. Los resultados del OR de CD209 sugieren que, a una intensidad alta en la respuesta inmune en contra de esta bacteria, se tendrá menor eficiencia en la erradicación. El alelo G está relacionado con una menor expresión del receptor en la membrana celular (Martin *et al.*, 2004; Sakuntabhai *et al.*, 2005; Sibley *et al.*, 2003). Se determinó el riesgo partiendo del punto que una menor expresión del receptor dará como resultado una respuesta inmune menos severa (por esto se tomo al alelo G como referencia) y se compararon a los individuos con genotipos portadores del alelo C. Se observó un OR de más de 2 en todos los genotipos comparados, siempre presente A (Tabla 8), y aunque no existen diferencias significativas, se puede decir

que a una mayor expresión del receptor, mayor es la respuesta inmunológica del hospedero pero también *Helicobacter pylori* es más eficiente en el establecimiento de su nicho. Esto se ha demostrado en otras investigaciones en donde se ha relacionado el polimorfismo -336A/G con aumento en la susceptibilidad de infección (Sakuntabhai *et al.*, 2005; Vannberg *et al.*, 2008). Una respuesta inmune efectiva, erradicará a patógenos invasivos en un tiempo corto, sin la necesidad de dañar células y tejido epitelial durante el proceso (Boehm *et al.*, 1997; Young & Hardy, 1995).

Helicobacter pylori ha utilizado nuestro estómago como nicho ecológico desde hace mucho tiempo atrás. Ha co-evolucionado para colonizar poblaciones humanas hospederas específicas mediante la selección de ciertas propiedades bacteriales, aunque no se sabe con exactitud cuáles fuerzas evolutivas influyen la selección de las cepas (Kirschner & Blaser; 1995). Diferencias étnicas en la frecuencia de los polimorfismos en el genotipo del huésped pueden explicar la distribución de cepas de *Helicobacter pylori* en poblaciones humanas (Rad *et al.*; 2004). Como se ha explicado anteriormente, *Helicobacter pylori* existe dentro de su nicho ecológico como una cuasi especie, una población bacteriana en un estado de continuo flujo génico, lo que le permite una adaptación óptima a condiciones cambiantes. Una exagerada inflamación es perjudicial para la bacteria ya que conlleva daño en la estructura y función del tejido y finalmente la pérdida de su nicho (Boldrick *et al.*, 2002; Suerbaum *et al.*, 2002). Rad *et al.*; 2004 en su estudio demuestra que en pacientes con una baja producción de citocinas anti-inflamatorias (IL-10) se han seleccionado positivamente cepas de *H. pylori* menos virulentas que evitan una inflamación exagerada. No se puede hablar solamente de una predisposición genética por parte del hospedero ni correlacionar variaciones genéticas con una alta incidencia de afección hacia esta bacteria en nuestra población. *Helicobacter pylori* ha acompañado

anat6micamente a los humanos modernos durante sus migraciones desde 1frica atr1s hasta la actualidad (50,000-70,000 a1os) y en el transcurso del tiempo ha ido co-evolucionando en nuestra mucosa g1strica, permiti6ndole desarrollar adaptaciones que le permiten ser viable y persistir dentro de nuestro cuerpo (Linz *et al.*, 2007). Solo se puede relacionar predisposiciones gen6ticas en genes relevantes que influyen sobre la infecci3n y niveles de incidencia, si se toma en cuenta la variabilidad y diversidad de cepas presentes en poblaciones afectadas. Conocer y entender como *Helicobacter pylori* interactúa a nivel celular el hospedero permitir1 diagnosticar e implementar mejores tratamientos en pacientes, logrando as1 disminuir el nivel de desarrollo de enfermedades gastro-duodenales en la poblaci3n ecuatoriana.

Se ha discutido ampliamente el criterio de diagn3stico y tratamiento para las infecciones causadas por *H. pylori*, y aunque se tienen varios m6todos que son altamente espec1ficos (invasivos y no invasivos), muchos de ellos son costosos y poco aplicables en nuestras poblaciones (Rafeey & Nikvash, 2007; Vandenplas *et al.*, 1992). Estudios han demostrado que infecciones de *Helicobacter pylori* protege a nuestro cuerpo del desarrollo de reflujos gastro-esof1gicos y carcinomas esofagales (Ahmed *et al.*, 2005). Es importante entonces conocer la incidencia de cepas virulentas en poblaci3n ecuatoriana mejorando en el diagn3stico brindado a los pacientes, y ser selectivos en la erradicaci3n de aquellas que son factores de riesgo para enfermedades gastro-duodenales y c1ncer g1trico. La erradicaci3n de cepas altamente virulentas en grupos de alto riesgo reducir1 la incidencia en el desarrollo de 1lceras patolog1as g1stricas.

Polimorfismos a nivel de las secuencias repetitivas en t1ndem del ex3n 4, que codifica para el dominio neck necesario para la oligomerizaci3n y soporte del dominio de

reconocimiento de carbohidratos de la proteína CD209, han sido estudiados y asociados con una disminución en la eficiencia de desempeño del receptor, y relacionados con susceptibilidad para infección con VIH-1 (Geijtenbeek *et al.*, 2000; Rathore *et al.*, 2008). Si el dominio de reconocimiento de carbohidratos no puede acoplarse de manera eficiente a patrones moleculares asociados a patógenos, no se iniciará ni desarrollará una respuesta inmune específica, por lo tanto, la viabilidad del agente colonizador será favorable dentro del hospedero. En este estudio solo se tomó en cuenta variaciones a nivel de región promotora, y no polimorfismos relacionados con el aumento o disminución en la eficiencia de la proteína. Resultará de interés observar frecuencias genotípicas en población ecuatoriana a nivel de variantes genéticas en esta región de CD209 y asociarlas con poblaciones afectas a *Helicobacter pylori*. El estudio de citocinas (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, GM-CSF, entre otras) y su variabilidad genética y polimorfismos en poblaciones es de interés al momento de estudiar susceptibilidades en infecciones (Bodger *et al.*, 1998; Bulat-Kardum *et al.*, 2006; Kwiatkowski, 2000; Suerbaum *et al.*, 2002).

7. LITERATURA CITADA

- Abbas, A., Lichtman, A. 2004. Inmunología celular y molecular. Elsevier, Madrid, España.
- Ables, A., Pharm, D., Simon, I., Melton, E. 2007. Update on *Helicobacter pylori* treatment. *American Family Physician* 75(3): 351-358.
- Achtman, M., Azuma, T., Berg, D.E., Ito, Y., Morelli, G., Pan, Z.J., Suerbaum, S., Thompson, S.A., van der Ende, A., van Doorn, L.J. 1999. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Molecular microbiology* 32(3): 459-470.
- Ahmed, N., Sechi, L. 2005. *Helicobacter pylori* and gastroduodenal pathology: New threats of the old friend. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 4: 1-10.
- Akhiani, A., Pappo, J., Kabok, Z., Schön, K., Gao, W., Franzén, L., Lycke, N. 2002. Protection against *Helicobacter pylori* infection following immunization is IL-12-dependent and mediated by Th1 cells. *The Journal of Immunology* 169(12): 6977-6984.
- Algood, H., Cover, T. 2006. *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*. 19(4): 597-613.

- Allaker, R.P., Young, K.A., Hardie, J.M., Domizio, P., Meadows, N.J. 2002. Prevalence of *Helicobacter pylori* at oral and gastrointestinal sites in children: evidence for possible oral-to-oral transmission. *Journal of Medical Microbiology* 51(4): 312-317.
- Aravena, A. 2007. *Helicobacter pylori* y cáncer gástrico. *Gastroenterología Latinoamericana* 18(2): 129-132.
- Atherton, J. 2006. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annual Review of Pathology* 1: 63-96.
- Bach, E., Aguet, M., Schreiber, R. 1997. The IFN γ receptor: A paradigm for cytokine receptor signaling. *Annual Review of Immunology* 15: 563-591.
- Bartlet, J.M., Stirling, D. 2003. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in Molecular Biology* 226: 3-6.
- Bashirova, A.A., Wu, L., Cheng, J., Martin, T., Martin, M., Benveniste, R., Lifson, J., KewalRamani, V., Hughes, A., Carrington, M. 2003. Novel member of the *CD209* (*DC-SIGN*) gene family in primates. *The Journal of Virology* 77: 217-227.
- Bazan, J.F. 1990. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(18): 6934-6938.

- Blaser, M., Chyou, P., Nomura, A. 1995. Age at establishment of *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma, gastric ulcer, and duodenal ulcer risk. *Cancer Research* 55(3): 562-565.
- Blaser, M., Perez, P., Kleanthous, H., Cover, T., Peek, R., Chyou, P., Stemmermann, G., Nomura, A. 1995. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Research* 55(10): 2111-2115.
- Bodger, K., Crabtree, J.E. 1998. *Helicobacter pylori* and gastric inflammation. *British Medical Bulletin* 54(1): 139-150.
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J.C. 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annual Review of Immunology* 15: 749-795.
- Boldrick, J., Alizadeh, A., Diehn, M., Dudoit, S., Liu, C., Belcher, C., Botstein, D., Staudt, L., Brown, P., Relman, D. 2002. Stereotyped and specific gene expression programs in human innate immune responses to bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(2): 972-977.
- Bowyer, V. 2007. Real-Time PCR. *Forensic Science, Medicine, and Pathology* 3(1): 61-63.
- Budowle, B., Smith, J., Moretti, T., DiZinno, J. 2000. *DNA Typing Protocols: Molecular Biology and Forensic Analysis*. Eaton Publishing, Natick, USA.

- Bulat-Kardum, L., Etokebe, G.E., Knezevic, J., Balen, S., Matakovic-Mileusnic, N., Zaputovic, L., Pavelic, J., Beg-Zec, Z., Dembic, Z. 2006. Interferon-gamma receptor-1 gene promoter polymorphisms (G-611A; T-56C) and susceptibility to tuberculosis. *Scandinavian Journal of Immunology* 63(2): 142-150.
- Cabrera, A., Tobar, W., Vega, F., Villacís, P. 2002. Prevalencia de *Helicobacter pylori* en pediatría y su relación con las condiciones socioeconómicas. *Revista Ecuatoriana de Pediatría* 3(2): 8-11.
- Campbell, N., Reece, J. 2002. *Biology*. Sexta edición. Benjamin Cummings.
- Canedo, P., Figueiredo, C., Machado, J.C. 2007. After *Helicobacter pylori*, genetic susceptibility to gastric carcinoma revisited. *Helicobacter* 12(suppl. 2): 45-49.
- Canedo, P., Corso, G., Pereira, F., Lunet, N., Suriano, G., Figueiredo, C., Pedrazzani, C., Moreira, H., Barros, H., Carneiro, F., Seruca, R., Roviello, F., Machado, J.C. 2008. The interferon gamma receptor 1 (*IFNGR1*) -56C/T gene polymorphism is associated with increased risk of early gastric carcinoma. *Gut* 57(11): 1504-1508.
- Carnaud, C., Lee, D., Donnars, O., Park, S. H., Beavis, A., Koezuka, Y., Bendelac, A. 1999. Cutting edge: cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *Journal of Immunology* 163(9): 4647-4650.

- Cheong, J.Y., Cho, S.W., Chung, S.G., Lee, J.A., Yeo, M., Wang, H.J., Lee, J.E., Hahm, K.B., Kim, J.H. 2006. Genetic polymorphism of interferon-c, interferon-receptor, and interferon regulatory factor-1 genes in patients with hepatitis b virus infection, *Biochemical Genetics* 44: 246-255.
- Correa, P. 1988. Chronic gastritis: a clinic-pathological classification. *The American Journal of Gastroenterology* 83(5): 504-509.
- Corti, R. 2009. *Helicobacter pylori*: algunos aspectos epidemiológicos en Latinoamérica luego de un cuarto de siglo. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana* 39(3): 174-176.
- Danesh, J. 1999. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: systematic review of the epidemiological studies. *Alimentary pharmacology & Therapies* 13(7): 851-856.
- Debets-Ossenkopp, Y.J., Reyes, G., Mulder, J., van de Stegge, B.M., Peters, J.T., Savelkoul, P.H., Tanca, J., Peña, A.S., Vandenbroucke-Grauls, C.M. 2003. Characteristics of clinical *Helicobacter pylori* strains from Ecuador. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51(1): 141-145.
- Dixon, M.F., Genta, R.M., Yardley, J.H., Correa, P. 1997. Histological classification of gastritis and *Helicobacter pylori* infection: an agreement at last? *The International Workshop on the Histopathology of Gastritis. Helicobacter* 2(suppl. 1): 17-24.
- Döffinger, R., Jouanguy, E., Dupuis, S., Fondanèche, M.C., Stephan, J.L., Emile, J.F., Lamhamedi-Cherradi, S., Altare, F., Pallier, A., Barcenas-Morales, G., Meinel, E.,

- Krause, C., Pestka, S., Schreiber, R.D., Novelli, F., Casanova, J.L. 2000. Partial interferon-gamma receptor signaling chain deficiency in a patient with bacille Calmette-Guerin and *Mycobacterium abscessus* infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 181(1): 379-384.
- Dunn, B., Cohen, H., Blaser, M. 1997. *Helicobacter pylori*. *Clinical Microbiology Reviews* 10: 720-741.
- El-Omar, E., Carrington, M., Chow, W., McColl, K., Bream, J., Young, H., Herrera, J., Lissowska, J., Yuan, C., Rothman, N., Lanyon, G., Martin, M., Fraumeni, J., Rabkin, C. 2000. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 404(6776): 398-402.
- Ernst, P., Gold, B. 2000. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annual Review of Microbiology* 54: 615-640.
- Feinberg, H., Mitchell, D. A., Drickamer, K., Weis, W. 2001. Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. *Science* 294(5549): 2163-2166.
- Feldman, R.A., Eccersley, A.J., Hardie, J.M. 1998. Epidemiology of *Helicobacter pylori*: acquisition, transmission, population prevalence and disease-to-infection ratio. *British Medical Bulletin* 54(1): 39-53.

- Finnzymes. 2009. Instruction Manual. Brilliant Multiplex QPCR Master Mix. Catalog #600553. Stratagene Products Division. Agilent Technologies, Inc.
- Frucht, D.M., Fukao, T., Bogdan, C., Schindler, H., O'Shea, J.J., Koyasu, S. 2001. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends in Immunology* 22(10): 556-560.
- Geijtenbeek, T.B., Engering, A., Van Kooyk, Y. 2002. DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology. *Journal of Leukocyte Biology* 71(6): 921-931.
- Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S., van Duijnhoven, G., Middel, J., Cornelissen, I., Nottet, H., KewalRamani, V., Littman, D., Figdor, C., van Kooyk, Y. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100(5): 587-597.
- Geijtenbeek, T.B., Torensma, R., van Vliet, S., van Duijnhoven, G., Adema, G., van Kooyk, Y., Figdor, C. 2000. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*. 100 (5): 575-585.
- Gerhard, M., Lehn, N., Neumayer, N., Borén, T., Rad, R., Schepp, W., Miehle, S., Classen, M., Prinz, C. 1999. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(22): 12778-12783.

- Gómez, N., Salvador, A., Vargas, P., Zapatier, J., Álvarez, J. 2004. Seroprevalencia de *Helicobacter pylori* en la población infantil Ecuatoriana. *Revista de Gastroenterología del Perú* 24: 230-233.
- Gonçalves, A., Graças, M., Aguiar, G., Camargos, A., Santos, A., Dani, R., Passo, F., Moreira, L., Abreu, M., Beleza, S., Fonseca, L., Magalhães, D. 2004. *Helicobacter* Species in the intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. *Journal of Clinical Microbiology* 42(1): 384-386.
- Graham, D.Y., Malaty, H.M., Evans, D.G., Evans, D.J., Klein, P.D., Adam, E. 1991. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States: effect of age, race and socioeconomic status. *Gastroenterology* 100(6): 1495-1501.
- Guo, Y., Feinberg, H., Conroy, E., Mitchell, D.A., Alvarez, R., Blixt, O., Taylor, M.E., Weis, W.I., Drickamer, K. 2004. Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nature Structural & Molecular Biology* 11(7): 591-598.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology* (Nature Publishing Company) 11(9): 1026-1030.

- Hofmeyr, S. 2001. An interpretative introduction to the immune system. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., Gelfand, D. H. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88(16): 7276-7280.
- Hopkins, R., Vial, P., Ferreccio, C., Ovalle, J., Prado, P., Sotomayor, V., Russell, R., Wassermann, S., Morris, J.G. 1993. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile: vegetables may serve as one route of transmission. The Journal of Infectious Diseases 168(1): 222-226.
- Houghton, J., Wang, T. 2005. *Helicobacter pylori* and gastric cancers: a new paradigm for inflammation-associated epithelial cancer. Gastroenterology 128(6): 1567-1578.
- Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilcek, J., Zinkernagel, R. M., Aguet, M. 1993. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. Science 259(5102): 1742-1745.
- Hurme, M., Lahdenpohja, N., Santtila, S. 1998. Gene polymorphisms of interleukins 1 and 10 in infectious and autoimmune diseases. Annals of Medicine 30(5): 469-473.

- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1994. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 61: 1-241.
- Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., Frick, I.M., Kersulyte, D., Incecik, E.T., Berg, D.E., Covacci, A., Engstrand, L., Borén, T. 1998. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 279(5349): 373-377.
- Ismail, H.F., Fick, P., Zhang, J., Lynch, R.G., Berg, D.J. 2003. Depletion of neutrophils in IL-10^{-/-} mice delays clearance of gastric *Helicobacter* infection and decreases the Th1 immune response to *Helicobacter*. *Journal of Immunology* 170(7): 3782-3789.
- Jessell, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E., Robertson, E., Smith, J. 2007. Principles of Development. Oxford University Press, New York, USA.
- Jonasch, E., Haluska, F.G. 2001. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *The Oncologist* 6(1): 34-55.
- Jones, N.L., Shannon, P.T., Cutz, E., Yeger, H., Sherman, P.M. 1997. Increase in proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells early in the natural history of *Helicobacter pylori* infection. *The American Journal of Pathology* 151(6): 1695-1703.

- Jülicher, S., Bongartz, M., Luty, A.J., Kremsner, P.G., Kun, J.F. 2003. Functional analysis of a promoter variant of the gene encoding the interferon-gamma receptor chain I. *Immunogenetics* 54: 675-680.
- Kalliomäki, M., Salminen, S., Poussa, T., Isolauri, E. 2007. Probiotics during the first 7 years of life: a cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119(4): 1019-1021.
- Kamradt, A.E., Greiner, M., Ghiara, P., Kaufmann, S. 2000. *Helicobacter pylori* infection in wild-type and cytokine-deficient C57BL/6 and BALB/c mouse mutants. *Microbes and Infection* 2: 593-597.
- Kawakubo, M., Ito, Y., Okimura, Y., Kobayashi, M., Sukara, K., Kasama, S., Fukuda, M., Fukuda, M., Katsuyama, T., Nakayama, J. 2004. Natural antibiotic function of a human gastric mucin against *Helicobacter pylori* infection. *Science* 305(5686): 1003-1006.
- Kirschner, D.E., Blaser, M.J. 1995. The dynamics of *Helicobacter pylori* infection of the human stomach. *Journal of Theoretical Biology* 176(2): 281-290.
- Koch, O., Awomoyi, A., Usen, S., Jallow, M., Richardson, A., Hull, J., Pinder, M., Newport, M., Kwiatkowski, D. 2002. IFNGR1 Gene Promoter Polymorphisms and Susceptibility to Cerebral Malaria. *The Journal of Infectious Diseases* 185: 1684-1687.
- Kuipers, E., Israel, D., Kusters, J., Gerrits, M., Weel, J., van Der Ende, A., van Der Hulst, R., Wirth, H., Höök-Nikanne, J., Thompson, S., Blaser, M. 2000. Quasispecies

development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. *The Journal of Infectious Diseases* 181: 273-282.

Kwiatkowski, D. 2000. Susceptibility to infection. *Clinical review* 321: 1061-1065.

Li-jun, X., Hang-ping, Y., Dan, L., Zhi-gang, W., Liang, C., Nan-ping, W. 2008. Variations of dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabing nonintegrin neck region in HIV infected individuals. *Chinese Medical Journal* 121(3): 265-267.

Linz, B., Balloux, F., Moodley, Y., Manica, A., Liu, H., Roumagnac, P., Falush, D., Stamer, C., Prugnolle, F., van der Merwe, S.W., Yamaoka, Y., Graham, D.Y., Perez-Trallero, E., Wadstrom, T., Suerbaum, S., Achtman, M. 2007. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 445(7130): 915-918.

Liu, H., Yu, W., Liou, L.Y., Rice, A.P. 2003. Isolation and characterization of the human DC-SIGN and DC-SIGNR promoters. *Gene* 313: 149-159.

Mahdavi, J., Sondén, B., Hurtig, M., Olfat, F.O., Forsberg, L., Roche, N., Angstrom, J., Larsson, T., Teneberg, S., Karlsson, K.A., Altraja, S., Wadström, T., Kersulyte, D., Berg, D.E., Dubois, A., Petersson, C., Magnusson, K.E., Norberg, T., Lindh, F., Lundskog, B.B., Arnqvist, A., Hammarström, L., Borén, T. 2002. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* 297(5581): 573-578.

- Malaty, H.M. 2007. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology 21(2): 205-214.
- Malaty, H.M., El-Kasabany, A., Graham, D.Y., Miller, C., Reddy, S., Srinivasan, S., Yamaoka, Y., Berenson, G. 2002. Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: a follow-up study from infancy to adulthood. Lancet 359(9310): 931-935.
- Malaty, H., Graham, D. 1994. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. Gut 35(6): 742-745.
- Marras, S.A., Kramer, F.R., Tyagi, S. 2002. Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. Nucleic acids research 30(21): e122.
- Martin, M., Lederman, M., Hutcheson, H., Goedert, J., Nelson, G., van Kooyk, Y., Detels, R., Buchbinder, S., Hoots, K., Vlahov, D., O'Brien, S., Carrington, M. 2004. Association of DC-SIGN promoter polymorphism with increased risk for parenteral, but not mucosal, acquisition of human immunodeficiency virus type 1 infection. Journal of Virology 78(24): 14053-14056.
- Medzhitov, R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature 449(7164): 819-26.

- Medzhitov, R., Janeway, C.A. 2000. Innate immunity. *New England Journal of Medicine* 343: 338-344.
- Merlin, G., van der Leede, B.J., McKune, K., Knezevic, N., Bannwarth, W., Romquin, N., Viegas-Pequignot, E., Kiefer, H., Aguet, M., Dembic, Z. 1997. The gene for the ligand binding chain of the human interferon gamma receptor. *Immunogenetics* 45(6): 413-421.
- Stratagene. 2007. *Methods and Applications Guide. Introduction to Quantitative PCR*. IN 70200 B, USA.
- Ming, S.C., Bajtai, A., Correa, P., Elster, K., Jarvi, O.H., Munoz, N., Nagayo, T., Stemmerman, G. Gastric dysplasia. Significance and pathologic criteria. *Cancer* 54(9): 1794-1801.
- Munder, M., Mallo, M., Eichmann, K., Modolell, M. 1998. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: a novel pathway of autocrine macrophage activation. *The Journal of Experimental Medicine* 187: 2103-2108.
- Núñez, C., Rueda, B., Martínez, A., Maluenda, C., Polanco, I., López-Nevot, M.A., Ortega, E., Sierra, E., Gómez de la Concha, E., Urcelay, E., Martín, J. 2006. A functional variant in the CD209 promoter is associated with DQ2-negative celiac disease in the Spanish population. *World Journal of Gastroenterology* 12(27): 4397-4400.

- Odenbreit, S., Püls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W., Haas, R. 2000. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 287(5457): 1497-1500.
- Oshio, I., Osaki, T., Hanawa, T., Yonezawa, H., Zaman, C., Kurata, S., Kamiya, S. 2009. Vertical *Helicobacter pylori* transmission from Mongolian gerbil mothers to pups. *Journal of medical microbiology* 58(5): 656-662.
- Owen, R.J., Xerry, J. 2003. Tracing clonality of *Helicobacter pylori* infecting family members from analysis of DNA sequences of three housekeeping genes (*ureI*, *atpA* and *ahpC*), deduced amino acid sequences, and pathogenicity-associated markers (*cagA* and *vacA*). *Journal of medical microbiology* 52: 515-524.
- Parkin, D.M., Pisani, P., Ferlay, J. 1999. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 49(1): 33-64.
- Parry, H.D., Alphey, L. 1995. The utilization of cloned DNAs to study gene organization and expression. *DNA Cloning 1* (D.M. Glover y B.D. Hames, eds) pp. 143-191. Oxford University Press, Ney York, USA.
- Parsonnet, J. 1998. *Helicobacter pylori*: the size of the problem. *Gut* 43(suppl. 1): 6-9.
- Paz-y-Miño, C., Leone, P.E. 2002. Técnicas utilizadas en el análisis de la mutagenicidad y carcinogénesis. En: *Genética Toxicológica y Carcinogénesis* (C. Paz-y-Miño, A. Creus, O. Cabré y P.E. Leone, eds) pp. 245-253. Edición del Laboratorio de Genética Molecular y Citogenética Humana, Quito, Ecuador.

- Pearl-Yafe, M., Fabian, I., Halperin, D., Flatau, E., Werber, S., Shalit, I. 2007. Interferon- γ and bacterial lipopolysaccharide act synergistically on human neutrophils enhancing interleukin-8, interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , and interleukin-12 p70 secretion and phagocytosis via upregulation of Toll-like receptor 4. *Shock* 27(3): 226-231.
- Ponce, E., Martínez, E., Ávila, M. 2001. Estudios epidemiológicos de casos y controles. Fundamento teórico, variantes y aplicaciones. *Salud pública de México* 43(2): 135-150.
- Postius, S. 2001. *Helicobacter pylori*. *Contributions to Microbiology* 8: 35-50.
- Pueyo, A., Huarte, M., Jiménez, C. 2009. Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 21 (suppl. 2): 9-17.
- Rad, R., Dossumbekova, A., Neu, B., Lang, R., Bauer, S., Saur, D., Gerhard, M., Prinz, C. 2004. Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonization during *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 53(8): 1082-1089.
- Rad, R., Gerhard, M., Lang, R., Schöniger, M., Rösch, T., Schepp, W., Becker, I., Wagner, H., Prinz, C. 2002. The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *The Journal of Immunology* 168(6): 3033-3041.

- Rafeey, M., Nikvash, S. 2007. Detection of *Helicobacter pylori* antigen in stool samples for diagnosis of infection in children. Eastern Mediterranean Health Journal 13(5): 1067-1072.
- Rathore, A., Chatterjee, A., Sivarama, P., Yamamoto, N., Dhole, T. 2008. Role of Homozygous DC-SIGNR 5/5 Tandem Repeat Polymorphism in HIV-1 Exposed Seronegative North Indian Individuals. Journal of Clinical Immunology 28: 50-57.
- Rodicio, M.R., Mendoza, M.C. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 22: 238-245.
- Romero, R. 2007. Microbiología y parasitología humana. Tercera edición. Editorial Médica Panamericana, S.A. de C.V. México, D.F.
- Rosenzweig, S., Schäffer, A., Ding, L., Sullivan, R., Enyedi, B., Yim, J., Cook, J., Musser, J., Holland, S. 2004. Interferon-gamma receptor 1 promoter polymorphisms: population distribution and functional implications. Clinical Immunology 112(1): 113-119.
- Roukus, D., Agnantis, N., Fatouros, M., Kappas, A. 2002. Gastric Cancer: Introduction, Pathology, Epidemiology. Gastric & Breast Cancer 1(1): 1-3.
- Rugge, M., Correa, P., Dixon, M., Hattori, T., Leandro, G., Lewin, K., Riddell, R., Sipponen, P., Watanabe, H. 2000. Gastric Dysplasia: The Padova International Classification. The American Journal of Surgical Pathology 24(2): 167-176.

Sakuntabhai, A., Turbpaiboon, C., Casademont, I., Chuansumrit, A., Lowhnoo, T., Kajaste-Rudnitski, A., Kalayanarooj, S., Tangnararatchakit, K., Tangthawornchaikul, N., Vasanawathana, S., Chaiyaratana, W., Yenchitsomanus, P., Suriyaphol, P., Avirutnan, P., Chokephaibulkit, K., Matsuda, F., Yoksan, S., Jacob, Y., Lathrop, G., Malasit, P., Despres, P., Julier, C. 2005. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nature Genetics* 37(5): 507-513.

Salih, M.A., Ibrahim, M.E., Blackwell, J.M., Miller, E.N., Khalil, E.A., ElHassan, A.M., Musa, A.M., Mohamed, H.S. 2007. IFNG and IFNGR1 gene polymorphisms and susceptibility to post-kala-azar dermal leishmaniasis in Sudan. *Genes and Immunity* 8(1): 75-78.

Sallusto, F., Lanzavecchia, A. 1999. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *Journal of experimental medicine* 189(4): 611-614.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.

Savarino, V., Mela, G., Zentilin, P., Lapertosa, G., Ceppa, P., Vigneri, S., Mele, M.R., Mansi, C., Tracci, D., Bisso, G., Celle, G. 1997. 24-hour gastric pH and extent of duodenal gastric metaplasia in *Helicobacter pylori* - positive patients. *Gastroenterology* 113(3): 741-745

- Sawai, N., Kita, M., Kodama, T., Tanahashi, T., Yamaoka, Y., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Imanishi, J. 1999. Role of gamma interferon in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. *Infection and Immunity* 67: 279-285.
- Sayi, A., Kohler, E., Hitzler, I., Arnold, I., Schwendener, R., Rehrauer, H., Müller, A. 2009. The CD4⁺ T cell-mediated IFN- response to *Helicobacter* infection is essential for clearance and determines gastric cancer risk. *The Journal of Immunology* 182: 7085-7101.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology* 75(2): 163-189.
- Segal, E., Lange, C., Covacci, A., Tompkins, L., Falkow, S. 1997. Induction of host signal transduction pathways by *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (14): 7595-7599.
- Sempértegui, F., Díaz, M., Mejía, R., Rodríguez-Mora, O., Rentería, E., Guarderas, C., Estrella, B., Recalde, R., Hamer, D., Reeves, P. 2007. Low concentrations of zinc in gastric mucosa are associated with increased severity of *Helicobacter pylori* - induced inflammation. *Journal compilation* 12: 43-48.
- Shimoyama, T., Crabtree, J.E. 1998. Bacterial factors and immune pathogenesis in *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 43(suppl. 1): 2-5.

- Sibley, K., Rollinson, S., Allan, J.M., Smith, A.G., Law, G.R., Roddam, P.L., Skibola, C.F., Smith, M.T., Morgan, G.J. 2003. Functional FAS promoter polymorphisms are associated with increased risk of acute myeloid leukemia. *Cancer Research* 63(15): 4327-4330.
- Sislema, F. 2008. Optimización de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de *Helicobacter pylori* en muestras de mucosa gástrica de pacientes ecuatorianos, y comparación con el método de histopatología, Tesis previa a obtención del Título de Ingeniera en Biotecnología, ESPE.
- Solnick, J., Hansen, L., Salama, N., Boonjakuakul, J., Syvanen, M. 2004. Modification of *Helicobacter pylori* outer membrane protein expression during experimental infection of rhesus macaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(7): 2106-2111.
- Sompayrac, L. 2003. *How the Immune System Works*, Second edition. Blackwell Publishing Inc. Massachusetts, USA.
- Stephenson, F.H. 2003. *Calculations for molecular biology and biotechnology*. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Strachan, T. & Read, A. 1999. *Human Molecular Genetics 2*. Second edition. BIOS Scientific Publishers Ltd. Oxford, UK.

- Subramaniam, P., Torres, B., Johnson, H. 2001. So many ligands, so few transcription factors: a new paradigm for signaling through the STAT transcription factors. *Cytokine* 15(4): 175-187.
- Suerbaum, S., Josenhans, C. 2007. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nature Reviews Microbiology* 5(6): 441-452.
- Suerbaum, S., Michetti, P. 2002. *Helicobacter pylori* Infection. *The New England Journal of Medicine* 347(15): 1175-1186.
- Takeda, K., Akira, S. 2001. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes to Cells* 6(9): 733-742.
- Tamariz, M. 2010. Detección de la Resistencia antimicrobiana de *Helicobacter pylori* a la claritromicina por medio de métodos moleculares, Tesis previa a la obtención del Título de Licenciada en Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Thye, T., Burchard, G., Nilius, M., Muller-Myhsok, B., Horstmann, R. 2003. Genomewide linkage analysis identifies polymorphism in the human interferon- γ receptor affecting *Helicobacter pylori* infection. *The American Journal of Human Genetics* 72(2): 448-453.

- Vandenplas, Y., Blecker, U., Devreker, T., Keppens, E., Nijs, J., Cadranet, S., Pipeleers-Marichal, M., Goossens, A., Lauwers, S. 1992. Contribution of the ^{13}C -urea breath test to the detection of *Helicobacter pylori* gastritis in children. *Pediatrics* 90(4): 608-611.
- Vannberg, F.O., Chapman, S.J., Khor, C.C., Tosh, K., Floyd, S., Jackson-Sillah, D., Crampin, A., Sichali, L., Bah, B., Gustafson, P., Aaby, P., McAdam, K.P., Bah-Sow, O., Lienhardt, C., Sirugo, G., Fine, P., Hill, A.V. 2008. CD209 genetic polymorphism and tuberculosis disease. *PLoS One* 3(1): e1388.
- Walker, J.M., Gastra, W. 1983. *Techniques in molecular biology*. Macmillan Publishing Company. New York, USA.
- Weiss, J., Mecca, J., Da Silva, E., Gassner, D. 1994. Comparison of PCR and other diagnostic techniques for detection of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients. *Journal of Clinical Microbiology* 32(7): 1663-1668.
- Werman, S.D., Springer, M.S., Britten, R.J. 1996. Nucleic Acids I: DNA-DNA Hybridization. En: *Molecular Systematics* (D. Hillis, C. Moritz y B. Mable, eds) pp. 169-197. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, USA.
- Widmaier, E., Raff, H., Strang, K. 2006. *Human Physiology, The Mechanisms of Body Function*. Mc Graw Hill, New York, USA.

Wyatt, J., Rathbone, B., Dixon, M., Heatley, R. 1987. *Campylobacter pyloridis* and acid induced gastric metaplasia in the pathogenesis of duodenitis. *Journal of Clinical Pathology* 40(8): 841-848.

Young, H., Hardy, K. 1995. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *Journal of Leukocyte Biology* 58: 373-381.

Zhou, T., Chen, Y., Hao, L., Zhang, Y. 2006. DC-SIGN and Immunoregulation. *Cellular & Molecular Immunology* 3(4): 279-283.

8. FIGURAS

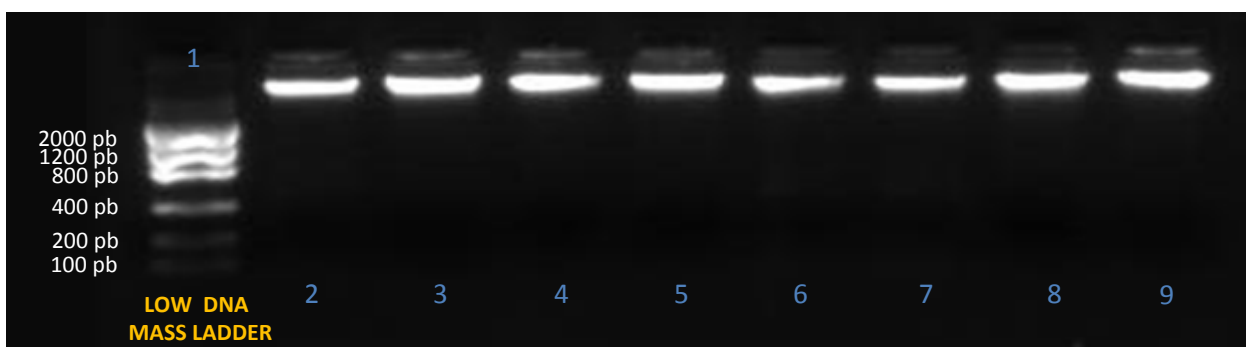


Figura 1. Visualización del ADN. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. El marcador molecular utilizado es Low DNA Mass Ladder de InvitrogenTM, corrido en el primer carril. Del carril 2 al 5 muestras de ADNs control: 2, ADN39; 3, ADN48; 4, ADN79 y carril 5, ADN133. En los pocillos 6 al 9 ADNs de muestras *Helicobacter pylori* positivo: 6, ADN28; 7, ADN42; 8, ADN54 y 9, ADN108. Fotografía tomada bajo luz UV a 302 nm de longitud de onda.

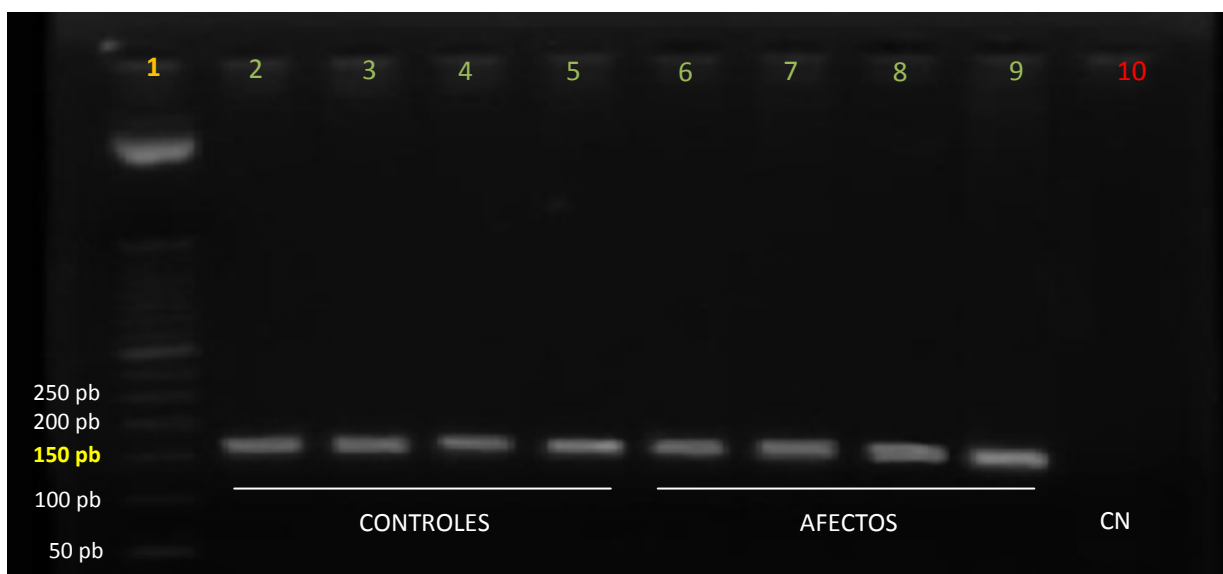


Figura 2. Amplificación de la región promotora del gen CD209. Gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio. En el primer carril se corrió un marcador de peso de 50 pb InvitrogenTM, los siguientes con producto de PCR de 152 pb: carril 2, ADN71; 3, ADN88; 4, ADN148; 5, ADN161; 6, ADN37; 7, ADN112; 8, ADN155 y 9, ADN208. El décimo carril es un control negativo para verificar que en la reacción no hayan existido contaminantes. Fotografía tomada bajo luz UV a 302 nm de longitud de onda.

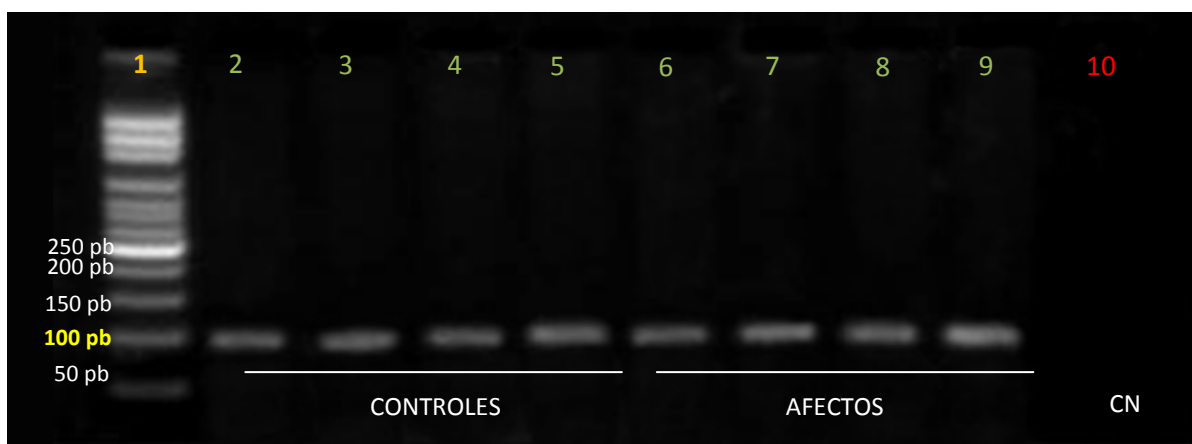
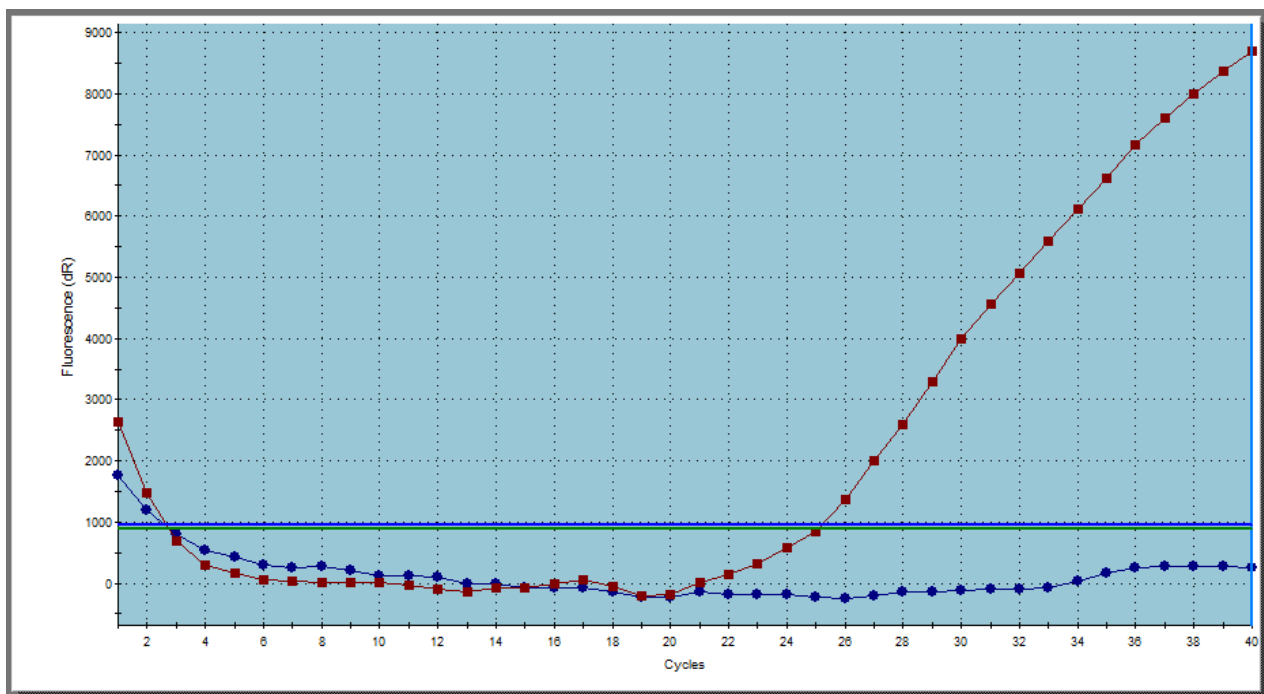


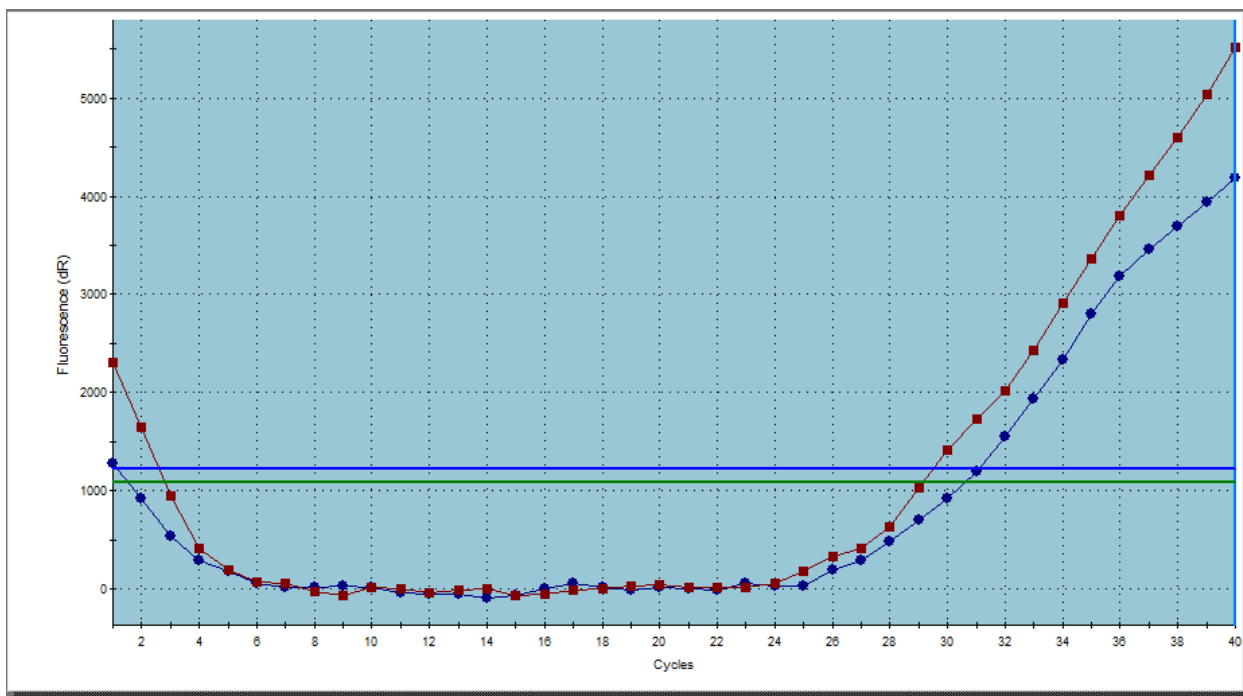
Figura 3. Amplificación de la región promotora del gen IFNGR1. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. En el primer carril se corrió un marcador de peso de 50 pb Invitrogen™, los siguientes con producto de PCR de 93 pb: de grupos controles los carriles 2-ADN70, 3-ADN96, 4-ADN118 y 5-ADN306; en grupos afectados 6-ADN 126, 7-ADN183, 8-ADN196 y 9-ADN307. El último es un control negativo para verificar que en la reacción no hayan existido contaminantes. Fotografía tomada bajo luz UV a 302 nm de longitud de onda.



■ Cantidad de fluorescencia captada para la sonda marcada con FAM (alelo A)

■ Cantidad de fluorescencia captada para la sonda marcada con HEX (alelo G)

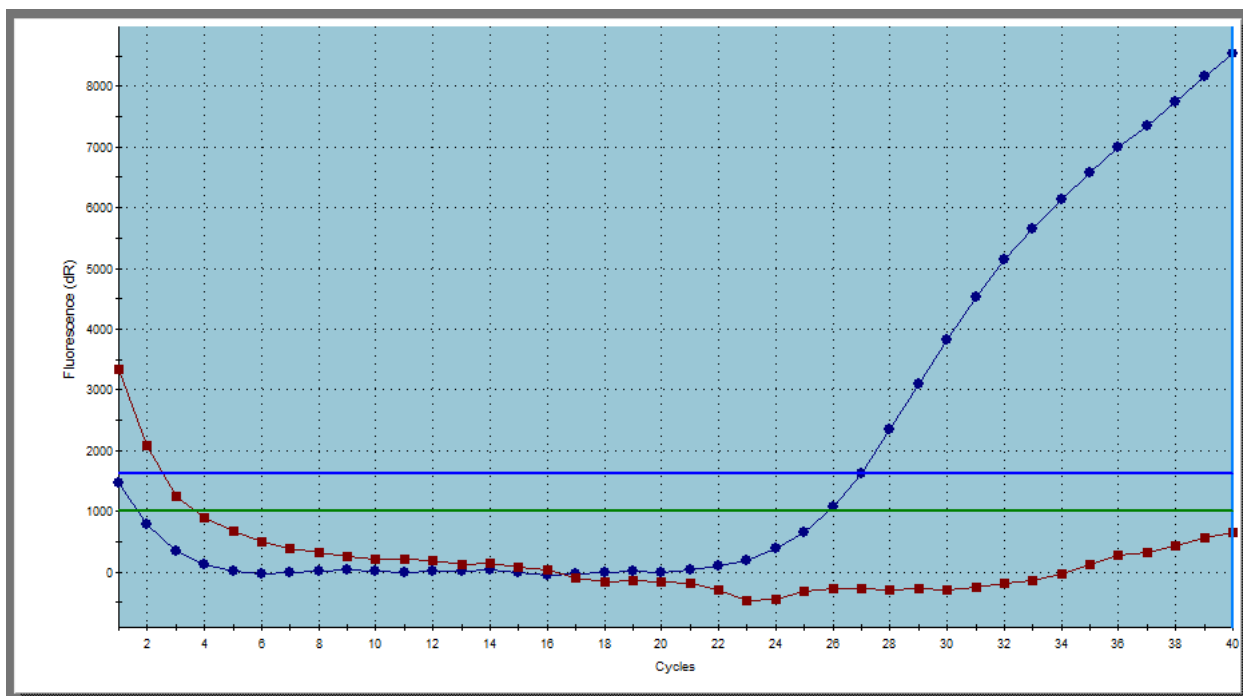
Figura 4. Señal procesada por el programa MaxPro de un individuo homocigoto para el alelo A del gen CD209. En el eje x se muestra el número de ciclos corridos en la PCR mientras que en el eje y se ilustra la cantidad de fluorescencia captada por el termociclador Stratagen Mx3005P. Cada curva muestra la fluorescencia emitida por cada sonda, incrementándose en cada ciclo si se hibridizó por complementariedad.



■ Cantidad de fluorescencia captada para la sonda marcada con FAM (alelo A)

■ Cantidad de fluorescencia captada para la sonda marcada con HEX (alelo G)

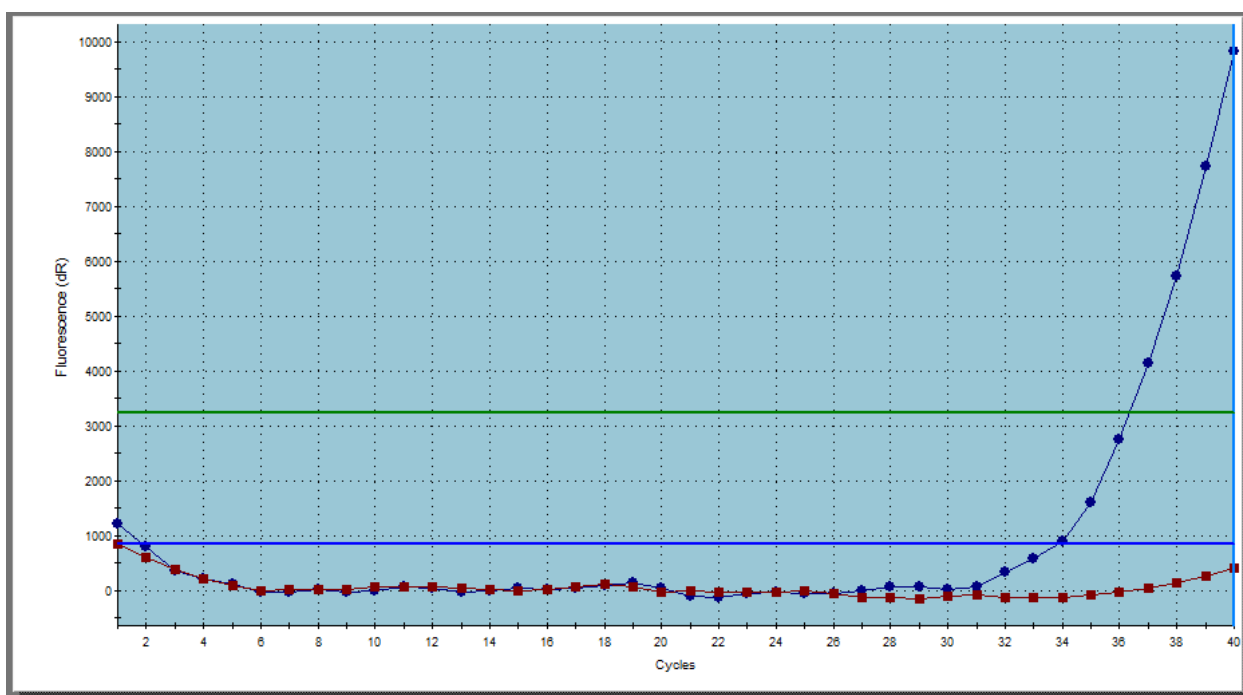
Figura 5. Señal procesada por el programa MaxPro de un individuo heterocigoto (AG) para el polimorfismo -336A/G en el gen CD209. En el eje x se muestra el número de ciclos corridos en la PCR mientras que en el eje y se ilustra la cantidad de fluorescencia captada por el termociclador Stratagen Mx3005P. Cada curva muestra la fluorescencia emitida por cada sonda hibridizada.



■ Cantidad de fluorescencia captada para la sonda marcada con FAM (alelo A)

■ Cantidad de fluorescencia captada para la sonda marcada con HEX (alelo G)

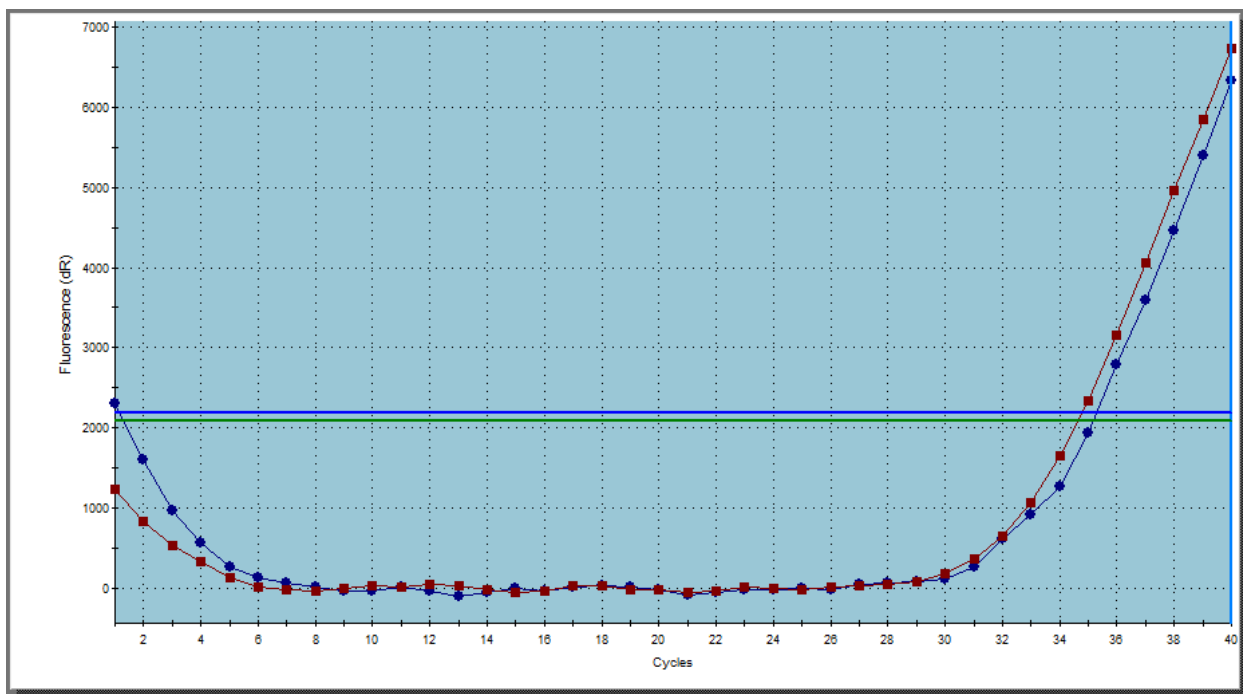
Figura 6. Señal procesada por el programa MaxPro de un individuo homocigoto para el alelo G del gen CD209. En el eje x se muestra el número de ciclos corridos en la PCR mientras que en el eje y se ilustra la cantidad de fluorescencia captada por el termociclador Stratagen Mx3005P. Cada curva muestra la fluorescencia emitida por cada sonda hibridizada.



■ Cantidad de fluorescencia captada para la sonda marcada con FAM (alelo T)

■ Cantidad de fluorescencia captada para la sonda marcada con HEX (alelo C)

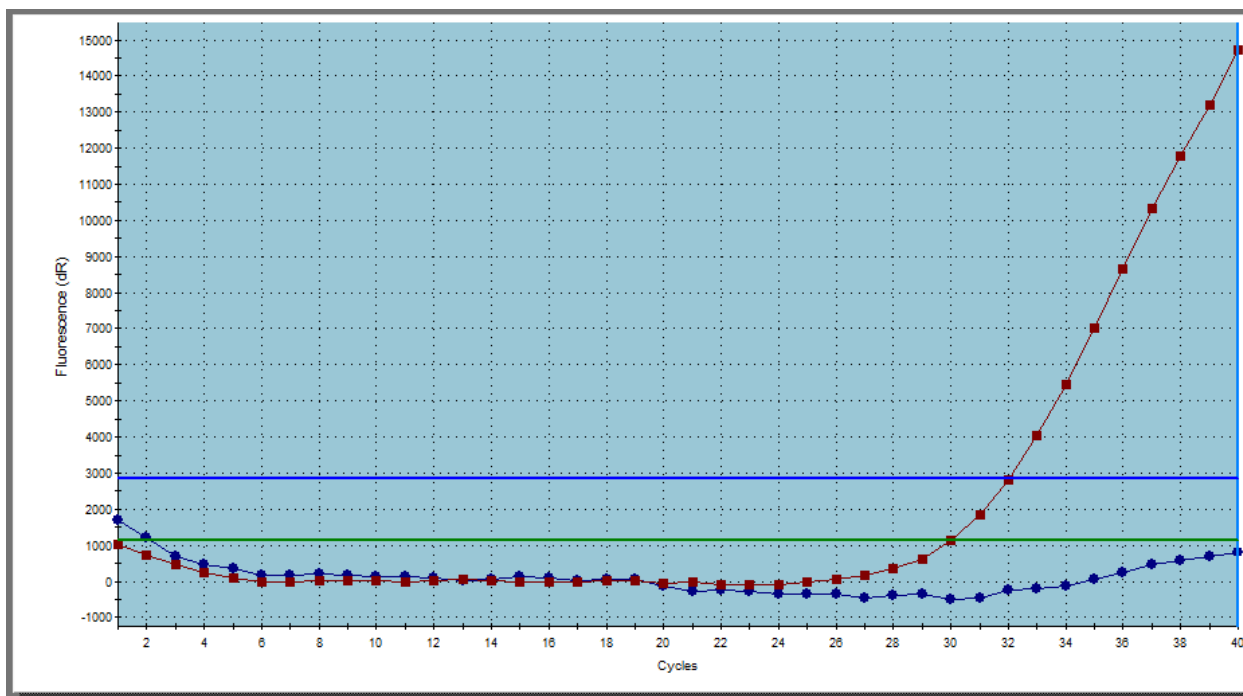
Figura 7. Señal procesada por el programa MaxPro de un individuo homocigoto para el alelo C del gen IFNGR1. En el eje x se muestra el número de ciclos corridos en la PCR mientras que en el eje y se ilustra la cantidad de fluorescencia captada por el termociclador Stratagen Mx3005P. Cada curva muestra la fluorescencia emitida por cada sonda hibridizada.



■ Cantidad de fluorescencia captada para la sonda marcada con FAM (alelo T)

■ Cantidad de fluorescencia captada para la sonda marcada con HEX (alelo C)

Figura 8. Señal procesada por el programa MaxPro de un individuo heterocigoto (CT) para el polimorfismo -56C/T en el gen IFNGR1. En el eje *x* se muestra el número de ciclos corridos en la PCR mientras que en el eje *y* se ilustra la cantidad de fluorescencia captada por el termociclador Stratagen Mx3005P. Cada curva muestra la fluorescencia emitida por cada sonda hibridizada.



■ Cantidad de fluorescencia captada para la sonda marcada con FAM (alelo T)

■ Cantidad de fluorescencia captada para la sonda marcada con HEX (alelo C)

Figura 9. Señal procesada por el programa MaxPro de un individuo homocigoto para el alelo T del gen IFNGR1. En el eje x se muestra el número de ciclos corridos en la PCR mientras que en el eje y se ilustra la cantidad de fluorescencia captada por el termociclador Stratagen Mx3005P. Cada curva muestra la fluorescencia emitida por cada sonda hibridizada.

9. TABLAS

Tabla 1. Parámetros bio-patológicos en individuos diagnosticados con infección de *Helicobacter pylori* y controles

Parámetro Biopatológico	AFECTOS <i>(Helicobacter pylori positivos)</i>		CONTROLES	
	15 - 45 años	45 - 88 años	17 - 50 años	50 - 86 años
EDAD (Todos los individuos)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)
	64 (44)	81 (56)	57 (50)	56 (50)
SEXO (Hombre vs. Mujer)	Hombre <i>n</i> (%)	Mujer <i>n</i> (%)	Hombre <i>n</i> (%)	Mujer <i>n</i> (%)
	70 (48)	75 (52)	55 (49)	58 (51)
TOTAL 258	145 (100%)		113 (100%)	

n, número de muestra; %, porcentaje.

Tabla 2. Distribución de la población estudiada de acuerdo al diagnóstico histopatológico y de acuerdo al sexo

Diagnóstico histopatológico	SEXO		TOTAL	EDAD MEDIA	
	Femenino	Masculino			
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)			
<i>Hp+</i>	1	43 (57,3)	35 (50,0)	78	42.3
	2	21 (28,0)	25 (35,7)	46	45.2
	3	11 (14,7)	10 (14,3)	21	53.6
	4	-	-	0	-
	5	-	-	0	-
<i>Hp-</i>	1	39 (67,2)	41 (74,5)	80	46.5
	2	10 (17,2)	6 (10,9)	16	54.5
	3	7 (12,1)	7 (12,7)	14	63.1
	4	-	1 (1,8)	1	-
	5	2 (3,4)	-	2	-

n, número de muestra; %, porcentaje; *Hp+*, individuos infectados con *Helicobacter pylori*; *Hp-*, grupo control; 1, gastritis crónica no atrófica; 2, gastritis crónica atrófica; 3, metaplasia intestinal; 4, displasia; 5, cáncer gástrico.

Tabla 3. Frecuencia y distribución del polimorfismo-336A/G

Grupo	Genotipo	No. de Individuos <i>n</i> (%)	No. de alelos	Frecuencia genotípica		Frecuencia alélica
				Observada	Esperada	
<i>Hp+</i>	A/A	65 (45)	130	0,45	0,51	0,72
	A/G	78 (54)	156	0,54	0,4	
	G/G	1 (1)	2	0,01	0,08	0,28
	TOTAL	144				
<i>Hp-</i>	A/A	52 (47)	104	0,47	0,53	0,73
	A/G	57 (51)	114	0,51	0,4	
	G/G	2 (2)	4	0,02	0,07	0,27
	TOTAL	111				

n, número de muestra; %, porcentaje; *Hp+*, individuos infectados con *Helicobacter pylori*; *Hp-*, grupo control; A/A, homocigoto silvestre; A/G, heterocigoto; G/G, homocigoto para el polimorfismo -336A/G.

Tabla 4. Frecuencia y distribución polimorfismo -336A/G según el diagnóstico histopatológico

Grupo	Diagnóstico histopatológico	GENOTIPO			% TOTAL
		A/A <i>n</i> (frec.)	A/G <i>n</i> (frec.)	G/G <i>n</i> (frec.)	
<i>Hp+</i>	1	35 (0,54)	42 (0,54)	1 (0,01)	54,2
	2	21 (0,47)	24 (0,53)	-	31,3
	3	9 (0,43)	12 (0,57)	-	14,6
	4	-	-	-	
	5	-	-	-	
<i>Hp-</i>	1	36 (0,46)	40 (0,51)	2 (0,03)	70,3
	2	8 (0,5)	8 (0,5)	-	14,4
	3	6 (0,43)	8 (0,57)	-	12,6
	4	1 (1,0)	-	-	0,9
	5	1 (0,5)	1 (0,5)	-	1,8

n, número de muestra; frec., frecuencia; %, porcentaje; *Hp+*, individuos infectados con *Helicobacter pylori*; *Hp-*, grupo control; A/A, homocigoto silvestre; A/G, heterocigoto; G/G, homocigoto para el polimorfismo -336A/G; 1, gastritis crónica no atrófica; 2, gastritis crónica atrófica; 3, metaplasia intestinal; 4, displasia; 5, cáncer gástrico.

Tabla 5. Frecuencia y distribución del polimorfismo -56C/T

Grupo	Genotipo	No. de Individuos <i>n</i> (%)	No. de alelos	Frecuencia genotípica		Frecuencia alélica
				Observada	Esperada	
<i>Hp+</i>	C/C	13 (9)	26	0,09	0,1	0,32
	C/T	67 (46)	134	0,46	0,44	
	T/T	65 (45)	130	0,45	0,46	0,68
	TOTAL	145				
<i>Hp-</i>	C/C	19 (17)	38	0,17	0,19	0,44
	C/T	61 (54)	122	0,54	0,49	
	T/T	33 (29)	66	0,29	0,31	0,56
	TOTAL	113				

n, número de muestra; %, porcentaje; *Hp+*, individuos infectados con *Helicobacter pylori*; *Hp-*, grupo control; C/C, homocigoto silvestre; C/T, heterocigoto; T/T, homocigoto para el polimorfismo -56C/T.

Tabla 6. Frecuencia y distribución polimorfismo -56C/T según según el diagnóstico histopatológico

Grupo	Diagnóstico histopatológico	GENOTIPO			% TOTAL
		C/C <i>n</i> (frec.)	C/T <i>n</i> (frec.)	T/T <i>n</i> (frec.)	
<i>Hp+</i>	1	7 (0,09)	37 (0,47)	34 (0,44)	53,79
	2	6 (0,13)	20 (0,43)	20 (0,44)	31,72
	3	-	10 (0,48)	10 (0,52)	14,48
	4	-	-	-	
	5	-	-	-	
<i>Hp-</i>	1	13 (0,16)	43 (0,54)	24 (0,3)	70,8
	2	5 (0,31)	9 (0,56)	2 (0,13)	14,16
	3	1 (0,07)	6 (0,43)	7 (0,5)	12,39
	4	-	1 (1,0)	-	0,88
	5	-	2 (1,0)	-	1,77

n, número de muestra; frec., frecuencia; %, porcentaje; *Hp+*, individuos infectados con *Helicobacter pylori*; *Hp-*, grupo control; C/C, homocigoto silvestre; C/T, heterocigoto; T/T, homocigoto para el polimorfismo -56C/T; 1, gastritis crónica no atrófica; 2, gastritis crónica atrófica; 3, metaplasia intestinal; 4, displasia; 5, cáncer gástrico.

Tabla 7. Análisis de Chi-cuadrado para determinar nivel de significación de la variante -336A/G entre individuos casos y controles

Grupo	GENOTIPO			χ^2 (Chi-cuadrado)
	A/A <i>n</i> (%)	A/G <i>n</i> (%)	G/G <i>n</i> (%)	
<i>Hp+</i>	65 (45)	78 (54)	1 (1)	0,787^{NS}
<i>Hp-</i>	52 (47)	57 (51)	2 (2)	

n, número de muestra; %, porcentaje; *Hp+*, individuos infectados con *Helicobacter pylori*; *Hp-*, grupo control; A/A, homocigoto silvestre; A/G, heterocigoto; G/G, homocigoto para el polimorfismo -336A/G; ^{NS}, No significativo.

$$\chi^2_{0,05} (3-1\text{gl}) = 0,787 \rightarrow \chi^2_c < \chi^2_t \rightarrow 0,787^{NS} < 5,99 \rightarrow (p > 0,05)$$

Nivel de significación 0,05

2 grados de libertad

Tabla 8. Análisis de Odds Ratio para determinar el riesgo relativo de individuos con el alelo G (polimorfismo -336A/G en CD209) a portar *Helicobacter pylori*.

CD209 -336A/G	<i>Hp-</i>	<i>Hp+</i>	OR (95% CI)
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	
GG	2 (1.8)	1 (0.7)	referencia
GA	57 (51.3)	78 (54.2)	2.7 (0.24-30.92) (<i>P</i> =0.79)
AA	52 (46.8)	65 (45.1)	2.5 (0.211-28.34) (<i>P</i> =0.86)
GA+AA	109	143	2.6 (0.23-29.31) (<i>P</i> =0.82)
Total	111	144	

n, número de muestra; %, porcentaje; *Hp+*, individuos infectados con *Helicobacter pylori*; *Hp-*, grupo control; GG, individuos portadores del alelo polimórfico G; AA individuos portadores del alelo silvestre A; GA, individuos portadores de ambos alelos; OR, riesgo; CI, intervalos de confianza.

Tabla 9. Análisis de Chi-cuadrado para determinar nivel de significación de la variante -56 C/T entre individuos casos y controles

Grupo	GENOTIPO			χ^2 (Chi-cuadrado)
	C/C <i>n</i> (%)	C/T <i>n</i> (%)	T/T <i>n</i> (%)	
<i>Hp+</i>	13 (9)	67 (46)	65 (45)	8*
<i>Hp-</i>	19 (17)	61 (54)	33 (29)	

n, número de muestra; %, porcentaje; *Hp+*, individuos infectados con *Helicobacter pylori*; *Hp-*, grupo control; C/C, homocigoto silvestre; C/T, heterocigoto; T/T, homocigoto para el polimorfismo -56C/T; *, diferencias significativas ($p < 0,05$).

$$\chi^2_{0,05} (3-1\text{gl}) = 8 \rightarrow \chi^2_c > \chi^2_t \rightarrow 8^* > 5,99 \rightarrow (p < 0,05)$$

2 grados de libertad

Tabla 10. Análisis de Odds Ratio para determinar el riesgo relativo de individuos con el alelo T (polimorfismo -56C/T en IFNGR1) a portar *Helicobacter pylori*.

IFNGR1 -56C/T	<i>Hp</i> -	<i>Hp</i> +	OR (95% CI)
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	
CC	19 (17)	13 (9)	reference
CT	61 (54)	67 (46)	1.6 (0.73-3.52) (<i>P</i> =0.32)
TT	33 (29)	65 (45)	2.9 (1.27-6.54) (<i>P</i> =0.018)
CT+TT	94	132	2.05 (0.97-4.36) (<i>P</i> =0.08)
Total	113	145	

n, número de muestra; %, porcentaje; *Hp*+, individuos infectados con *Helicobacter pylori*; *Hp*-, grupo control; TT, individuos portadores del alelo polimórfico T; CC, individuos portadores del alelo silvestre C; CT, individuos heterocigotos portadores de ambos alelos; OR, riesgo; CI, intervalos de confianza.

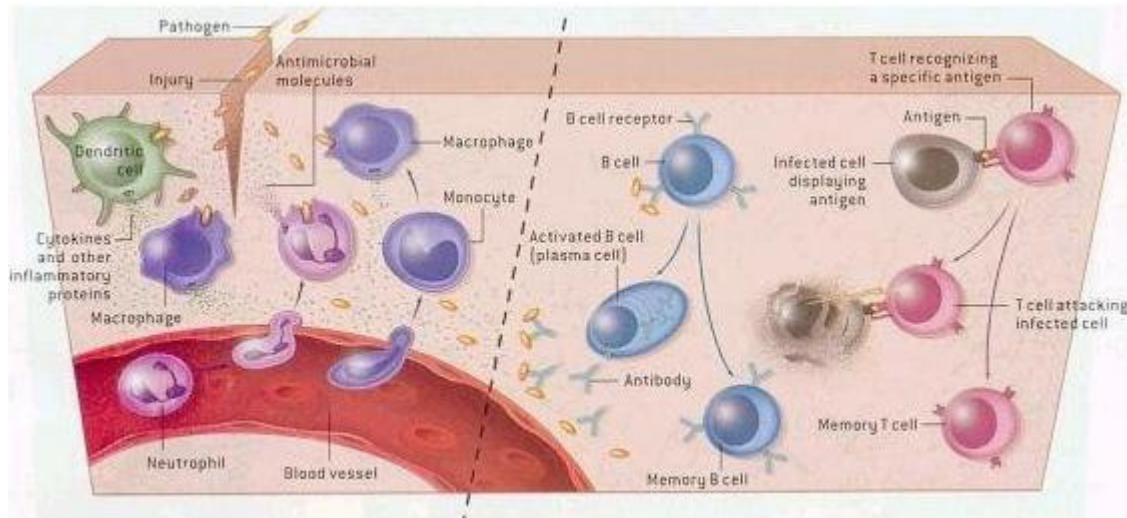
Tabla 11. Análisis de Odds Ratio para determinar el riesgo de individuos portadores del alelo T a desarrollar patologías gástricas.

	Gastritis crónica (%)						Metaplasia Intestinal		
	Controles		No-atrónica	Controles		Atrófica	Controles	n (%)	OR (95% CI)
<i>IFNGR1</i>	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	n (%)	n (%)	OR (95% CI)	n (%)	n (%)	OR (95% CI)
-56									
C/C	13 (16,25)	7 (9)	Referencia	5 (31,3)	6 (13)	Referencia	1 (7,1)	0	Referencia
C/T	43 (53,75)	37 (47,4)	1,6 (0,6 - 4,5) <i>p</i> =0,258	9 (56,3)	20 (43,5)	1,8 (0,4 - 7,7) <i>p</i> =0,31	6 (42,9)	10 (47,6)	2,6 (1,4 - 5) <i>p</i> =0,412
T/T	24 (30)	34 (43,6)	2,6 (0,9 - 7,5) <i>p</i> =0,059	2 (12,5)	20 (43,5)	8,3 (1,2 - 54,4) <i>p</i> =0,027	7 (50)	11 (52,4)	2,5 (1,4 - 4,5) <i>p</i> =0,421
Total	80	78		16	46		14	21	

n, número de muestra; %, porcentaje; TT, homocigoto para el polimorfismo -56 C/T; CC, homocigotos con el alelo silvestre C; CT, individuos heterocigotos; OR, riesgo; CI, intervalos de confianza.

10.ANEXOS

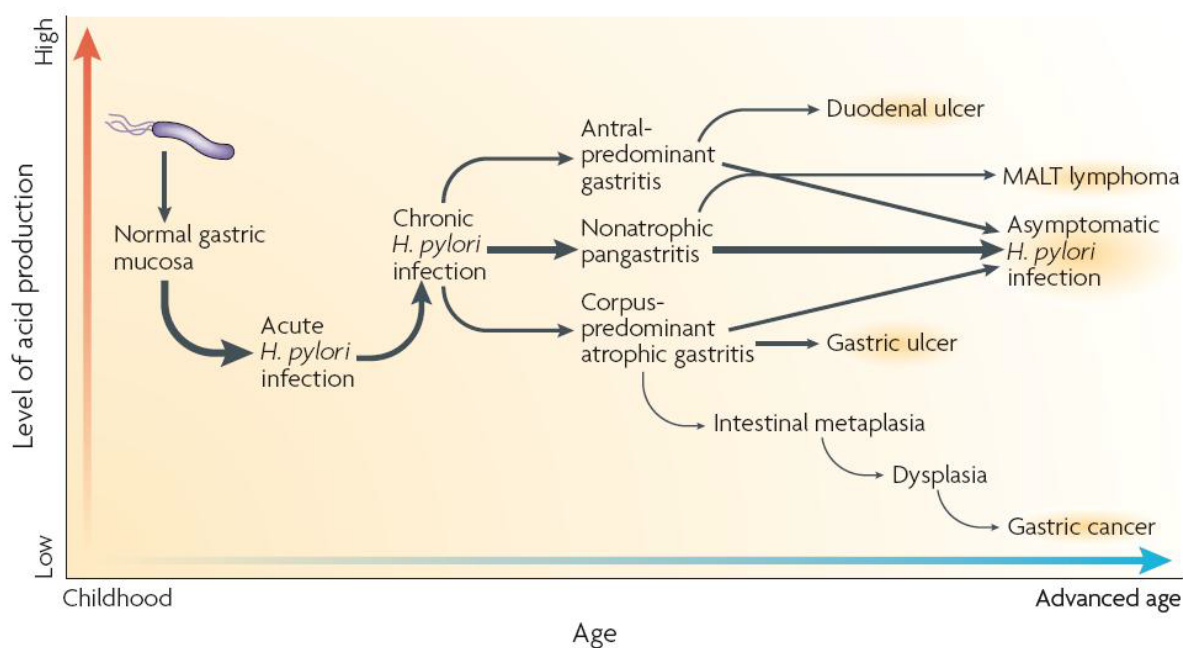
Anexo 1. Respuesta inmune innata y adaptativa



Tomado de <http://www.csa.com/discoveryguides/cancer/review.php> , [Consulta: 12 Septiembre 2010].

En la respuesta inmune innata (izquierda) intervienen ciertos tipos celulares como monocitos, macrófagos y neutrófilos. Este tipo de respuesta identifica patrones moleculares asociados a patógenos y empieza su acción para erradicar a los agentes colonizadores; es una respuesta inespecífica. Las células dendríticas juegan un rol importante en el activamiento de la respuesta inmune adquirida ya que ayuda a la activación de los linfocitos T por medio de la presentación de antígenos, y luego en la producción de anticuerpos para aumentar la defensa por medio de los linfocitos B (derecha). Las citocinas juegan un rol importante en la modulación de toda esta respuesta, activando a todos los tipos celulares inmersos en ambas respuestas y desactivando la respuesta inmune.

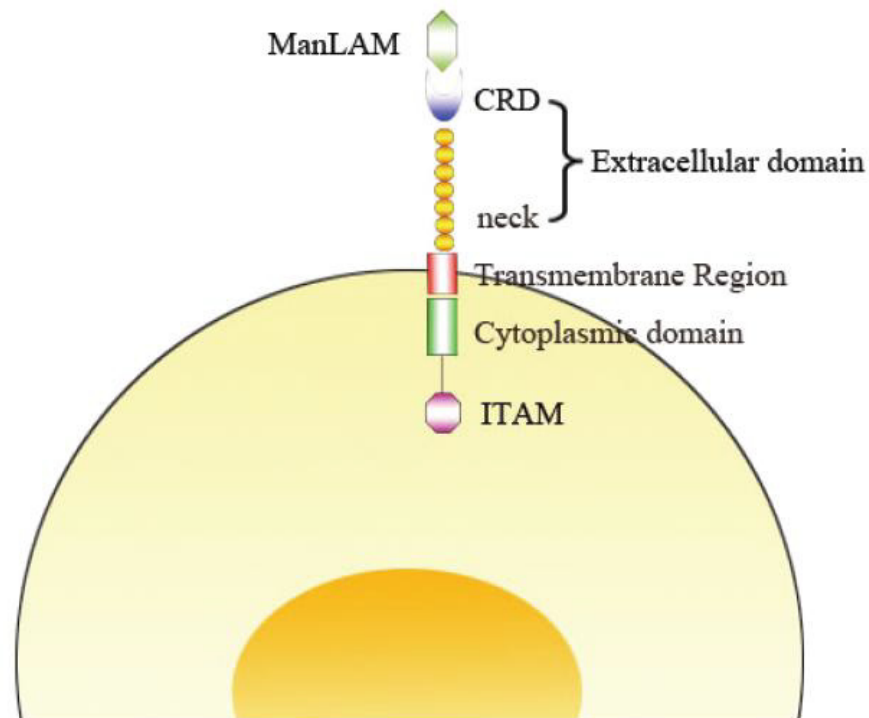
Anexo 2. Progresión natural en la infección por *Helicobacter pylori*.



Tomado del artículo Suerbaum & Josenhans, 2007.

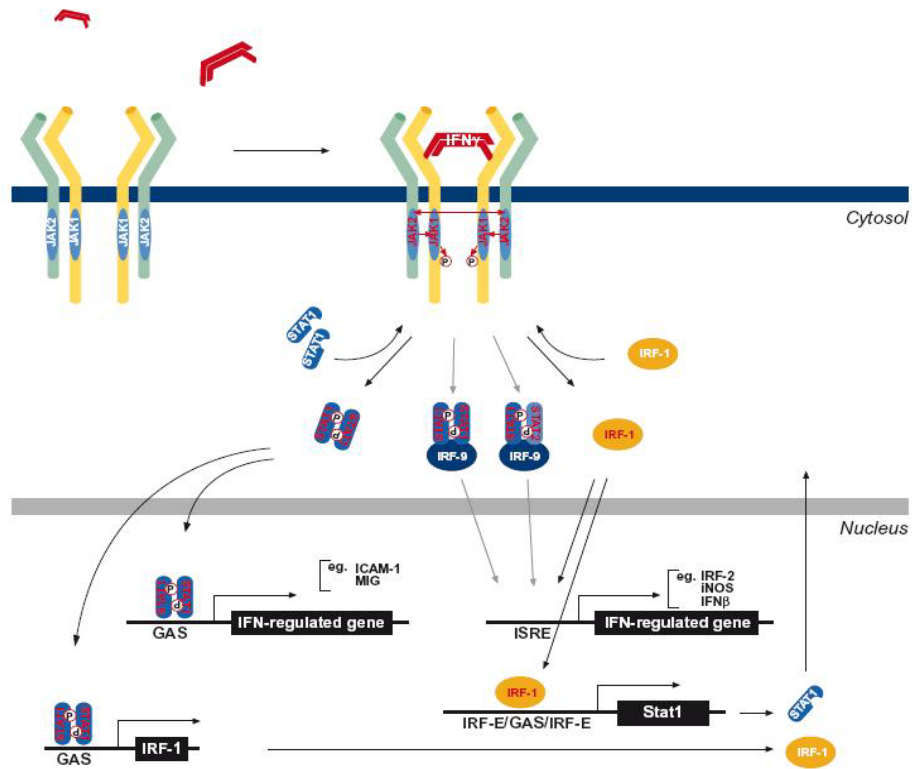
La infección de *Helicobacter pylori* usualmente se da en la infancia del individuo, causando a lo largo del tiempo gastritis aguda. El desarrollo de la infección puede tomar varios caminos dependiendo del individuo y de los factores ambientales que influyen sobre este proceso; del 80 – 90% de personas colonizadas no presentan síntoma alguno. El 10 – 15% de infectados desarrollan úlcera gástrica o duodenal, 1 – 3% carcinoma gástrico y un grupo muy reducido presenta linfoma tipo MALT (por sus siglas en inglés: tejido de linfoma asociado a mucosa). Pacientes con una producción alta de ácido gástrico tienen riesgo a presentar gastritis a nivel del antro del estómago, lo que predispone úlceras duodenales; baja producción de ácido gástrico se relaciona con gastritis en el cuerpo del estómago, predispone el desarrollo de úlceras gástricas y puede iniciar una secuencia de eventos que, en raros casos, conlleva el desarrollo de cáncer gástrico.

Anexo 3. Estructura del receptor CD209

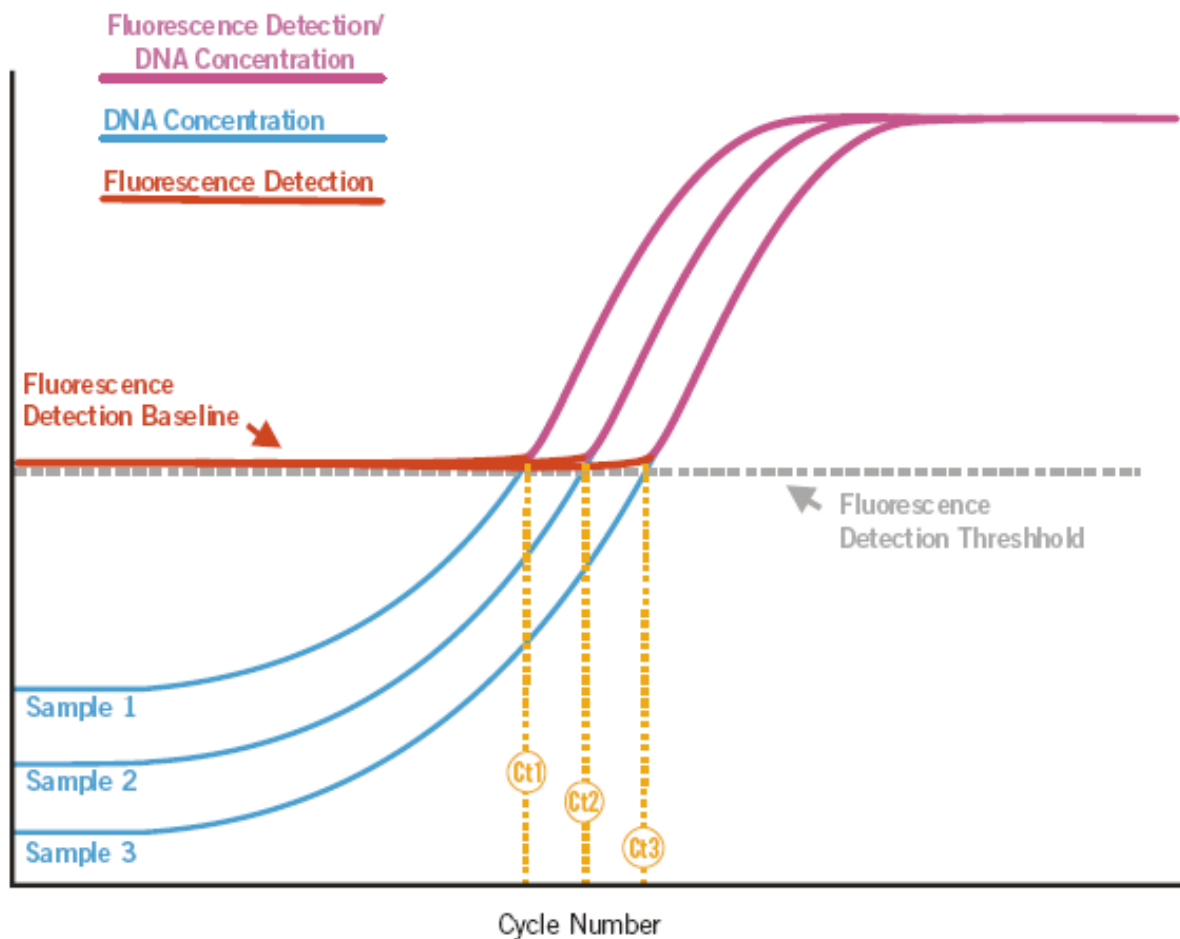


Tres partes se diferencian en el receptor: dominio extracelular, región transmembrana y dominio intracelular o citoplasmático. La región extracelular consta de un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) y el dominio cuello (neck), requerido para la oligomerización y necesario para la especificidad en el reconocimiento de los carbohidratos. Dominio citoplasmático con arreglos moleculares necesarios para: LL (de-leucina) participa en la internalización de antígenos, EEE (cluster tri-acídico) envuelto en transducción de señales y un arreglo inmuno-receptor activado por tirosinas (ITAM por sus siglas en inglés) (Tomada de Zhou *et al.*, 2006).

Anexo 4. Diagrama de transducción de señales iniciada por IFN γ y su receptor



La unión del ligando al receptor causa un cambio conformacional en IFN- γ R (IFNGR1 en amarillo y asociado a Jak1; IFNGR2 en verde, asociado a Jak2). Este cambio inicia una auto-fosforilación en la quinasa Jak2 activándola, permitiendo luego trans-fosforilar a Jak1. La interacción del receptor del IFN- γ puede inducir la formación de homodímeros de Stat1 o la formación de heterodímeros con Stat3. La fosforilación induce separación de estos factores de transcripción del receptor, viajan luego al núcleo y se unen a sitios promotores específicos (GAS: Interferon-Gamma Activated Sequence; ISRE: Interferon Stimulated Response Element) para iniciar o suprimir la transcripción de genes regulados por IFN- γ . Muchos de los genes regulados por este interferón son factores de transcripción (IRF-1: Interferon Response Factor 1, ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1; MIG: monokine induced by IFN- γ ; iNOS: inducible nitric oxide synthase) y son capaces de conducir nuevas vías de regulación para genes importantes en inflamación (Tomada de Schroder *et al.*, 2004).

Anexo 5. Fases en la detección de fluorescencia en QPCR. *Ct*.

Tres fases en la reacción de PCR. El valor Ct será necesario para cuantificar posteriormente la región genética a analizar (Stratagene, 2007).