

# Detección de *Helicobacter pylori* y caracterización del la región -31 del gen de la Interleucina 1-β humana en pacientes de una población colombiana con enfermedades gastroduodenales

## *Helicobacter pylori* detection and human Interleukin 1-β genotyping in Colombian patients affected by gastroduodenal diseases

María Camila Montealegre Ortiz,<sup>1</sup> Carlos Jaramillo Henao,<sup>2</sup> Mabel Elena Bohórquez Lozano, MD,<sup>3</sup> Gustavo Montealegre Lynett, MD.<sup>4</sup> María del Pilar Delgado.<sup>5</sup>

### RESUMEN

El propósito de este estudio fue investigar la presencia de *Helicobacter pylori*, realizar la caracterización del polimorfismo -31 del gen de la interleucina 1-β humana y establecer si existe asociación entre la presentación de alguno de los genotipos y la severidad de las manifestaciones clínicas en una población colombiana. Se analizaron biopsias gástricas provenientes de 71 pacientes, mediante histopatología y métodos moleculares (PCR y PCR-RFLP). Los resultados mostraron que el 97,2% de los pacientes presentaba alteraciones de la mucosa gástrica. La presencia de *H. pylori* se demostró en 44 pacientes y la frecuencia de los genotipos de IL-1B: TT, CT y CC fue de 12,7%, 60,6% y 26,8% respectivamente. No se encontró asociación entre los genotipos de la región polimórfica -31 del gen IL-1B y el grado de alteración de la mucosa gástrica en la población estudiada.

### Palabras clave

Interleucina 1-β humana, genotipificación, PCR-RFLP, patologías gastroduodenales, Colombia.

### SUMMARY

The aim of this study was to investigate the presence of *Helicobacter pylori* and interleukin 1-β genotyping (IL-1B -31), to determine the relationship between one polymorphism in the -31 region of interleukin 1-β gene and the severity of the clinical manifestations. Gastric biopsies from 71 patients were submitted to histopathological examination and genotyped by molecular methods (PCR y PCR-RFLP). The results indicated that 97.2% of the patients have alterations in the gastric mucosa, the presence of *H. pylori* was demonstrated in 44 patients and TT, CT and CC genotypes were detected in 12.7%, 60.6% and 26.8%, respectively. IL-1B genotypes were not associated with the severity of gastric mucosal damage in the studied population.

### Key words

Human interleukin 1-β, Genotyping, PCR-RFLP, Gastroduodenal diseases, Colombia.

<sup>1</sup> Microbióloga, Profesional Asistente de Proyectos, Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia.

<sup>2</sup> Magíster en Microbiología, Director del Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Bioinformática y Profesor Titular, Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia.

<sup>3</sup> Médico Patólogo. Profesor Asociado, Universidad del Tolima. Ibagué, Colombia.

<sup>4</sup> Médico Gastroenterólogo. Profesor Titular, Universidad del Tolima. Estudiante de Doctorado Rude Colombia. Ibagué, Colombia.

<sup>5</sup> Magíster en Microbiología, Codirectora del Laboratorio de

Diagnóstico Molecular y Bioinformática y Profesora Asociada, Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia.

### Instituciones

• Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Bioinformática, Universidad de los Andes. Carrera 1ª N° 18A-10, Bogotá, DC., Colombia. Universidad Privada.

• Grupo de Citogenética, Filogenia y Evolución de Poblaciones. Universidad del Tolima. Santa Helena, Ibagué, Colombia. Universidad Pública.

Fecha recibido: 07-09-07/ Fecha aceptado: 14-02-08

## INTRODUCCIÓN

*Helicobacter pylori* es un bacilo gram-negativo, curvado, altamente motil que coloniza de manera persistente la mucosa gástrica de humanos (1, 2). La infección con esta bacteria ocurre a nivel mundial y ha sido implicada en la patogénesis de la gastritis crónica, úlcera péptica, linfoma tipo MALT y cáncer gástrico (3-5).

Este patógeno ha evolucionado diversos mecanismos para evadir y regular negativamente la respuesta del hospedero (2). La infección por *H. pylori* ocasiona inflamación de la mucosa gástrica, caracterizada por la infiltración de neutrófilos, macrófagos y linfocitos, así como una producción incrementada de algunas citocinas (2, 6-8).

La IL-1 es una citocina proinflamatoria que involucra tres proteínas diferentes, la IL-1, la IL-1 $\beta$  y el receptor antagonista de IL-1 (IL-1RN). En la infección con *H. pylori*, la IL-1 $\beta$  es regulada positivamente, siendo importante en el proceso de inicio y amplificación de la respuesta inflamatoria (7). El gen de la IL-1 $\beta$ , posee un número de polimorfismos funcionalmente relevantes, que se han correlacionado con una alta o baja producción de IL-1 $\beta$ , lo que se considera un factor clave en la determinación del patrón de gastritis y el riesgo de desarrollar transformaciones malignas (9).

Diferentes estudios han reportado asociación entre polimorfismos en el gen *IL-1B* y el riesgo de desarrollar cáncer gástrico (7, 9-11). El presente estudio describe la caracterización de la región -31 del gen de la interleucina 1- $\beta$  en pacientes de una población colombiana, así como la determinación de asociación entre la presentación de alguno de los genotipos y el riesgo de presentación de patologías gastroduodenales severas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Pacientes

En este estudio se incluyeron 71 pacientes que fueron remitidos a la unidad de endoscopia de la clínica

Manuel Elkin Patarroyo del Instituto de Seguros Sociales (ISS) y un consultorio privado de gastroenterología de la ciudad de Ibagué-Colombia, entre los meses de febrero de 2006 y marzo de 2007. El protocolo de trabajo fue aprobado por los Comités de Ética de las instituciones participantes. A todos los individuos que participaron, se les había indicado la realización de una endoscopia alta como parte del estudio de un cuadro de dispepsia y firmaron el formato establecido para la consecución del consentimiento informado. Se excluyeron pacientes con enfermedades cardiovasculares y respiratorias, y aquellos que hubieran recibido antiácido 12 horas antes del procedimiento, bloqueadores de la bomba de protones y H2 15 días antes de la endoscopia y antibióticos durante los tres meses previos a la toma de la muestra.

Durante el procedimiento endoscópico, se tomó un fragmento de tejido del antro gástrico, destinado a la realización de las pruebas moleculares. Adicionalmente, para la realización del estudio histopatológico, se obtuvieron biopsias del lugar de la lesión, según el criterio del médico gastroenterólogo, exceptuando los pacientes con cáncer, en quienes la biopsia fue extraída de regiones adyacentes. El análisis histopatológico de las muestras fue realizado en cortes histológicos coloreados con hematoxilina-eosina y giemsa.

### Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN a partir de un fragmento de tejido del antro gástrico, usando el kit Aqua Pure Genomic DNA de Bio-Rad®, de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

### Amplificación del gen 16S rADN de *H. pylori*

Para establecer la presencia de *H. pylori* en las biopsias de antro gástrico, se llevó a cabo la amplificación de un fragmento de 537 pb del gen 16S rADN utilizando los iniciadores ACT-1 (5'-CTT GCT AGA GTG CTG ATT A-3') y ACT-2 (5'-TCC CAC

ACT CTA GAA TAG T-3') (14). Como control positivo de la amplificación se usó ADN extraído a partir de la cepa de referencia NCTC 11637 de *H. pylori* y como control negativo se usó agua ultrapura en lugar de ADN. Cada mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 25 µl que contenía 50 mM de KCl, 20 mM de Tris HCl, pH (8,4), 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTPs), 1 pmol/µl de cada iniciador, 1,25 U de Taq polimerasa (Invitrogen TM), y 60 ng/µl de ADN. El perfil térmico consistió en una denaturación inicial a 94°C por 4 minutos; seguido de 37 ciclos de denaturación, anillaje y elongación a 94°C (1min.), 56°C (1 min) y 72°C (1 min), respectivamente, y una elongación final de 10 minutos a 72°C.

### **Amplificación y restricción de la región -31 del gen de la IL-1β humana**

La técnica de PCR-RFLP fue estandarizada para la amplificación de un fragmento de 242 pb del gen de la IL-1β humana, utilizando los iniciadores 5'-AGA AGC TTC CAC CAA TAC TC-3' y 5'-ACC ACC TAG TTG TAA GGA AG-3' (9). La reacción se realizó en un volumen final de 25 µl, que contenía 50 mM de KCl, 20 mM de Tris HCl, pH (8,4), 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTPs), 1 pmol/µl de cada iniciador, 1,25 U de Taq polimerasa (Invitrogen TM), y 60 ng/µl de ADN. El perfil térmico consistió en una denaturación inicial a 94°C por 10 minutos, seguida de 5 ciclos de 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos, continuando con 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C, y 5 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos, con un paso de extensión final a 72°C por 7 minutos.

Los fragmentos amplificados de 242 pb del gen *IL-1B* contienen la región polimórfica -31, reconocida por la endonucleasa de restricción Alu I. La reacción de restricción se llevó a cabo durante 2 horas a 37°C, en un volumen final de 10 µl, que contenía 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1 mM de Dithiothreitol, 1 unidad de enzima y 5 µl de los

productos de amplificación. Con el fin de confirmar que la reacción se completara en su totalidad, se realizó un ensayo de restricción incubando durante la noche a 37°C.

### **Visualización y análisis de los productos de amplificación**

Los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa. La detección y visualización se realizó con bromuro de etidio bajo luz UV, en un sistema de documentación de geles ChemiDoc system XRS de BioRad®. El procesamiento y análisis de las imágenes se realizó con el programa Quantity One de BioRad®.

### **Análisis estadísticos**

Para el análisis estadístico se empleó el programa SPSS versión 14.0. Se utilizó un modelo de regresión multinomial para establecer si la presencia de *H. pylori* y/o los genotipos en la región -31, permiten predecir alguno de los estados de la enfermedad gástrica. Una probabilidad (p) < 0,05 se consideró estadísticamente significativa.

### **Resultados**

En este estudio se analizó la presencia de *H. pylori* y se realizó la caracterización de la región polimórfica -31 del gen de la IL-1β humana, a partir de ADN extraído de biopsias de antro gástrico, provenientes de 71 pacientes de una población colombiana, 30 hombres y 41 mujeres, con edad promedio de 54,2 ± 15,3 años.

La evaluación histopatológica reveló que 2 pacientes (2,8%) no presentaban alteraciones de la mucosa gástrica. Se diagnosticó gastritis no atrófica en 47 (66,2%), gastritis atrófica multifocal en 4 (5,6%), metaplasia intestinal y displasia en 6 (8,5 %) y cáncer gástrico en 2 (2,8%). El diagnóstico de úlcera se basó en los hallazgos endoscópicos, que indicaron que 10 pacientes (14,1%), presentaban esta patología (tabla 1).

**Tabla 1.** Frecuencia de *H. pylori* y de los genotipos de la región -31 del gen de la IL-1 $\beta$  humana (TT, CT y CC), según la patología gastroduodenal, en pacientes de una población colombiana.

Diagnóstico	Población	Genotipo IL-1B -31			H. pylori
	n (%)	TT n	CT n	CC n	n
Ausencia de patología	2 (2,8)	0	1	1	2
Gastritis	47 (66,2)	6	27	14	28
Gastritis atrófica	4 (5,6)	0	3	1	3
Úlcera	10 (14,1)	2	6	2	7
Metaplasia/ Displasia	6 (8,5)	1	4	1	3
Cáncer	2 (2,8)	0	2	0	1
Total n (%)	71 (100)	9 (12,7)	43 (60,6)	19 (26,8)	44 (62)

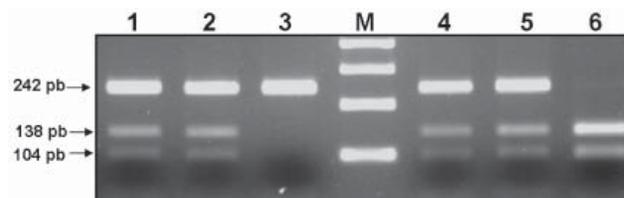
La presencia de *H. pylori* se detectó en 44 de las 71 muestras analizadas (62%) (tabla 1), mediante la amplificación de un fragmento del gen 16S rADN especie-específico de *H. pylori*. No se encontró evidencia estadística que indicara relación entre la infección con *H. pylori* y el grado de alteración de la mucosa gástrica en la población estudiada.

Asimismo, se llevó a cabo la caracterización de la región -31 del gen de la IL-1 $\beta$  humana por medio de la aplicación de la técnica de PCR-RFLP. El alelo T fue designado si se obtenían dos bandas, una de 138 y otra de 104 pb y el alelo C por la presencia de una única banda de 242 pb (figura 1). La frecuencia de los genotipos en la región polimórfica -31, indica una mayor proporción del alelo -31\*C en la población estudiada. Se encontró que el 60,6% de los pacientes analizados son heterocigotos (CT) y la frecuencia de los genotipos CC y TT fue de 26,8% y 12,7% respectivamente (tabla 1). No se encontró relación estadísticamente significativa entre la presencia de alguno de los genotipos y el grado de alteración del tejido gástrico, lo que sugiere que la región polimórfica -31, no representa un marcador de riesgo en el desarrollo de patologías gastroduodenales severas en la población estudiada.

## Discusión

El diagnóstico de la infección por *H. pylori* es de gran importancia, dado que su presencia ha sido

asociada con el desarrollo de diferentes enfermedades gastroduodenales. Asimismo factores genéticos del hospedero han sido implicados en el desarrollo diferencial de estas patologías (3-5, 8).



**Figura 1.** Genotipificación de región -31 del gen de la IL-1 $\beta$  humana: electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación y digestión enzimática. M: Marcador de peso molecular de 100 pb, 1, 2, 4 y 5: muestras genotipo C/T, 3: muestra genotipo C/C, 6 muestra genotipo TT.

En este estudio, mediante la aplicación de la técnica de PCR, se detectó la presencia de *H. pylori* en el 62% de los pacientes. Estos resultados son similares a los reportados en otros estudios en Colombia (15, 16), y otros países de Latinoamérica (17, 18).

Diferentes estudios han propuesto que el gen de la IL-1 $\beta$  es un factor clave en la determinación del patrón de gastritis y el riesgo de desarrollar transformaciones malignas. La IL-1 $\beta$  regulada positivamente durante la infección con *H. pylori* es una citocina proinflamatoria, así como un potente inhibidor de la secreción de ácido en el estómago (8, 9).

Se ha reportado que un polimorfismo bialélico en la posición -31 de la región promotora del gen *IL-1B*, está asociado con mayor secreción de citocina, que se va a correlacionar con una disminución en la producción de ácido y la inducción de una potente respuesta inflamatoria, que conduce al desarrollo de atrofia gástrica y cáncer gástrico (6, 7, 11).

En algunas poblaciones, el ser portador del alelo *IL-1B -31\*C* es considerado un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer gástrico (6, 7, 11). No obstante, estudios en otras regiones geográficas no han encontrado correlación alguna entre la presencia de este alelo y la severidad de las manifestaciones clínicas (12). Por el contrario, algunos investigadores sugieren que el alelo T y no el C, está asociado con una

mayor secreción de IL-1 $\beta$  y por ende consideran el alelo T como proinflamatorio (9, 13).

Los resultados de este estudio no indican asociación entre la presentación de patologías gastroduodenales severas y el genotipo de la región polimórfica -31 del gen de la IL-1 $\beta$  humana.

## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias de la Universidad de los Andes, por haber financiado este proyecto. A los estudiantes de medicina de la Universidad del Tolima que participaron en la consecución de las muestras. Al laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Cancerología por suministrar las cepas de referencia de *H. pylori*.

## REFERENCIAS

- Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1: 1311-1315.
- Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest* 2004; 113: 321-333.
- Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* Infection. *N Engl J Med* 2002; 347: 1175-1186.
- Hardin FJ, Wright RA. *Helicobacter pylori*: Review and Update. *Hosp Physician* 2002; 38: 23-31.
- Rivas-Traverso F, Hernández F. *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Rev Biomed* 2000; 11: 187-205.
- Rad R, Dossumbekova A, Neu B, Lang R, Bauer S, Saur D, et al. Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation *Helicobacter pylori* during infection. *Gut* 2004; 53: 1082-1089.
- Garza E, Hold G, Pérez G, Bosques F, Tijerina R, Maldonado H, et al. Papel de los polimorfismos de algunas citocinas en el cáncer gástrico en México. *Rev Gastroenterol Mex* 2003; 68: 107-112.
- Fox JG & Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest* 2007; 117: 60-69.
- Zeng Z, Hu J, Hu S, Pang R, Chen M, Sung J. Association of interleukin 1B gene polymorphism and gastric cancers in high and low prevalence regions in China. *Gut* 2003; 52: 1684-1689.
- Ruzzo A, Graziano F, Pizzagalli F, Santini D, Battistelli V, Panunzi S, et al. Interleukin 1B gene (IL-1B) and interleukin 1 receptor antagonist gene (IL-1RN) polymorphisms in *Helicobacter pylori* negative gastric cancer of intestinal and diffuse histotype. *Ann Onc* 2005; 16: 887-892.
- El-Omar EM. The importance of interleukin 1 $\beta$  in *Helicobacter pylori* associated disease. *Gut* 2001; 48: 743-747.
- Alpizar-Alpizar W, Pérez-Pérez GI, Une C, Cuenca P, Sierra R. Association of interleukin-1B and interleukin-1RN polymorphisms with gastric cancer in a high-risk population of Costa Rica. *Clin Exp Med* 2005; 5: 169-176.
- He X, Jiang L, Fu B, Zhang X. Relationship between interleukin-1B and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms and susceptibility to gastric cancer. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi. (Chinese Medical Journal [Chin Med J])* 2002; 82: 685-688.
- Thoreson AC, Borre MB, Andersen LP, Elsborg L, Holck S, Conway P, et al. Development of a PCR-based technique for detection of *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995; 10: 325-333.
- Bravo LE, Cortés A, Carrascal E, Jaramillo R, García LS, Bravo PE, et al. *Helicobacter pylori*: patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. *Colomb Med* 2003; 34: 124-131.
- Martínez JD, Henao SC, Granados C. La gastritis crónica atrófica corporal y la edad. *Rev Col Gastroenterol* 2007; 22: 17-22.
- Castillo G, Mazarí M, López Y. *Helicobacter pylori*: Focus on CagA and VacA major virulence factors. *Salud Publica Mex* 2004; 46: 538-548.
- Araya JC, Anabalón L, Roa I, Bravo M, Villaseca MA, Guzmán P, et al. Relación de la genotipificación de *Helicobacter pylori* con la forma e intensidad de la gastritis en población adulta portadora de patología gástrica benigna. *Rev Méd Chile* 2004; 132: 1345-1354.