



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE LA
REGIÓN VARIABLE 3' DEL GEN
ASOCIADO A LA CITOTOXINA
(*cagA*) DE *HELICOBACTER PYLORI*
AISLADO DE PACIENTES
MEXICANOS**

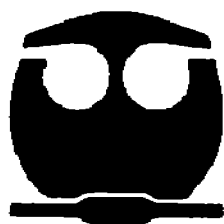
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÈUTICO BIÒLOGO

P R E S E N T A:

FERNANDO VARGAS ROMERO



MÉXICO, DF.



2006

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Prof. Luciano Hernández Gómez

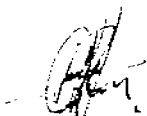
Vocal: Prof. Marco Antonio Cerbón Centeno

Secretario: Prof. Gonzalo Castillo Rojas

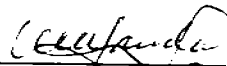
1er. Suplente: Prof. Maria del Carmen Urzúa Hernández

2do. Suplente: Prof. Maria Benita Leonor Fernández Salgado

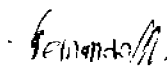
Sitio en donde se desarrolló el tema: Programa de Inmunología Molecular Microbiana, en el 4º piso del Edificio de Investigación de la Facultad de Medicina, UNAM.



Dr. Gonzalo Castillo Rojas
Asesor



Dra. Yolanda López Vidal
Supervisor Técnico



Fernando Vargas Romero
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Gonzalo Castillo Rojas por su asesoría y amistad para el apoyo a realizar y culminar mi tesis, que será ejemplo para mi vida académica.

A la Dra. Yolanda López Vidal por ser parte de apoyo del Programa de de Inmunología Molecular microbiana, agradezco la oportunidad y apoyo para realizar mi tesis.

A la QFB. Rosa Isabel Amieva Fernández por apoyarme con los cultivos de *H. pylori* para la realización de mi tesis.

El proyecto fue parcialmente financiado por DGAPA IN207302, UC MEXUS, Partida Presupuestal del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

Al Dr. Sergio Ponce de León por el reclutamiento de los pacientes con diversas etiologías gástricas para realizar la presente tesis.

DEDICATORIAS

A *DIOS*, por darme la oportunidad de vivir en este mundo, la cual no desaprovecharé.

A la *UNAM*, por formarme en mi vida académica.

A mis *maestros*, por sus enseñanzas a lo largo de mi formación.

A mis *padres*, por brindarme la confianza para poder concluir mi carrera profesional, por su apoyo incondicional y enseñanzas en todo momento; además de su enorme cariño, los quiero mucho.

A *Manuel, Mariano y Aurora*, por sus palabras de aliento a lo largo mi existencia y por los gratos momentos que hemos pasado juntos, los quiero mucho.

A mis *abuelos, tíos, primos*; por sus muestras de confianza y cariño a lo largo de mi vida.

A mis *Amigos* de siempre por su grata compañía y su amistad incondicional.

A todos mis compañeros y amigos con los que pase grandes experiencias tanto buenas como malas en la Facultad de Química, los recordaré siempre.

A Todas y todos mis compañeros del Programa de Inmunología Molecular Microbiana por su amistad, por todos los bonitos momentos que hemos pasado juntos y por permitirme formar parte del grupo, gracias.

INDICE

	Página.
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	iv
INDICE	v
RESUMEN	vi
ABREVIATURAS	viii
INTRODUCCIÓN	2
Características microbiológicas de <i>Helicobacter pylori</i>	3
Epidemiología	4
Diagnóstico de la infección por <i>H. pylori</i>	7
Infección y Patogénesis	8
Patologías	10
Genoma	13
Gen asociado a la citotoxina <i>cagA</i>	14
Isla de patogenicidad <i>cag</i>	17
Región variable 3' del gen <i>cagA</i>	18
JUSTIFICACIÓN	24
OBJETIVOS	26
METODOLOGÍA	28
RESULTADOS	34
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	54
PRESPECTIVAS	56
BIBLIOGRAFÍA	58
ANEXO	63

RESUMEN

Un factor de virulencia importante y ampliamente estudiado en *H. pylori* es la proteína asociada a la citotoxina (CagA), la cual fue identificada como un antígeno inmunodominante, con variabilidad en el tamaño (120 a 145 kDa). El polimorfismo en el gen *cagA* esta dado por la repetición de un segmento de 102 pb en el extremo 3'. Diversos estudios mostraron que la patogénesis de atrofia y cáncer gástrico se asocia a cepas de *H. pylori* con más de 3 regiones repetidas. Estudios recientes muestran que esta región variable presenta una gran heterogeneidad, y se encuentran diferencias nucleotídicas sustanciales entre las cepas aisladas de pacientes occidentales y asiáticos. Estas diferencias estructurales en la proteína CagA podrían estar involucradas con el incremento en el riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico. **Objetivo:** Determinar el polimorfismo de la región variable 3' del gen *cagA* de *H. pylori* en aislamientos de pacientes mexicanos. **Metodología:** Se estudiaron 115 cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con diferentes cuadros clínicos. El DNA fue extraído por el método de GENE CLEAN. Los iniciadores utilizados en el presente estudio fueron diseñados a partir de la secuencia de la cepa de *H. pylori* mexicana 53C5N. Los genotipos fueron visualizados en geles de agarosa, teñidos con bromuro de etidio. **Resultados:** Se observó que el genotipo amplificado más prevalente en las cepas estudiadas fue el corto (77/115), seguido del genotipo mediano (17/115); además, se observó que 20/115 cepas, amplifican ambos genotipos simultáneamente (indicándonos una probable colonización mixta). La distribución en la amplificación del fragmento corto se observó principalmente en el antro (29.8%); seguido por las regiones cuerpo (27.3 %); tumor y su periferia (22.1 %); fondo (12.9 %); incisura angular (7.8%). Con respecto al genotipo mediano observó principalmente en el Tumor y Periferia (35.3%), seguido del fondo (23.5%); antro y cuerpo (17.6%) e incisura angular (5.8%). Además, se observó la amplificación de ambos genotipos principalmente en la región del cuerpo (40%), seguido de antro y región del tumor y periferia con un 25 y 20%, respectivamente; de 10% en incisura angular y 5% en fondo. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Cuando se analizó la frecuencia de los genotipos y el cuadro clínico, se encontró que el genotipo corto estaba presente en todas las patologías estudiadas (cáncer gástrico, úlcera péptica hemorrágica, úlcera péptica, pacientes no ulcero pépticos y

gastritis), en cambio el genotipo mediano se encontró principalmente asociado a gastritis.

Conclusiones: La caracterización de la región variable 3' mostró que el genotipo corto es el más prevalente en los aislamientos, encontrándose principalmente en las regiones anatómicas antro y cuerpo, el genotipo mediano se encontró principalmente en el tumor y periferia y en el fondo. Se observó la coinfección con diferentes genotipos en algunos pacientes, encontrándose principalmente en el cuerpo gástrico.

ABREVIATURAS

<i>cagA</i>	Gen asociado a la citotoxina
CagA	Proteína asociada a la citotoxina
CO ₂	Dióxido de Carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>glr</i>	Gen de la glutamato racemasa
GES	Tiocinato de guanidina-EDTA-n-lauril sarcosinato
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IARC	Agencia internacional para la Investigación en Cáncer
IL-8	Interleucina 8
kDa	Kilodaltons
kb	Kilobases
LPS	Lipopolisacáridos
M	Molar
μl	Microlitros
mm	Micrómetros
NAP	Proteína Activadora de Neutrofilos
N ₂	Nitrógeno
O ₂	Oxígeno
ORFs	Marcos de lectura abiertos
PAI <i>cag</i>	Isla de Patogenicidad <i>cag</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
SSTIV	Sistema de secreción de proteínas tipo IV
VacA	Citotoxina vacuolizante
<i>vacA</i>	Gen de la citotoxina vacuolizante
UV	Luz ultravioleta

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

En el año de 1979 el patólogo Robin Warren, observó por primera vez a *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) en una biopsia gástrica proveniente de un paciente que tenía gastritis crónica activa; intento aislarlo pero sin éxito, no fue hasta el año de 1981 cuando el médico gastroenterólogo, Barry Marshall se unió a la investigación con el Dr. Warren. Sin embargo, no fue hasta 1982 que el microorganismo fue aislado por el Dr. Marshall, introduciéndonos a una nueva era en la microbiología clínica al descubrirse que la úlcera péptica es causada por una bacteria. En el año de 1984 se publicó la asociación de *H. pylori* con la gastritis crónica y por primera vez se sugirió que la úlcera péptica es una etiología infecciosa. ¹ En el año 2005 Robin Warren y Barry Marshall recibirán el premio nobel de medicina, por tan importante contribución.

La bacteria aislada morfológicamente se asemejaba a un *Campylobacter* spp. razón por la cual fue llamada primeramente como *Campylobacter pyloridis*, y por tanto se emplearon medios específicos de aislamiento y las condiciones de crecimiento para *Campylobacter* spp.



Figura 1. *Campylobacter* spp.

H. pylori es una bacteria reconocida como un importante patógeno en humanos. Causa una infección persistente en un alto porcentaje de la población, particularmente en países con un nivel socioeconómico bajo. Una vez adquirida la infección, *H. pylori* persiste en la inmensa mayoría de los individuos por años y posiblemente de por vida.^{2,3}

En la actualidad se conocen otras especies de *Helicobacter* asociados con la mucosa gástrica y mucosa intestinal de diferentes hospederos como *H. acinomyx* aislado de mucosa gástrica de chitas, *H. mustelae* de hurones, *H. nemestrinae* de macacos y *H. suis* de cerdos; sin embargo, la única especie involucrada con el humano y enfermedad es *H. pylori*.^{1,3}

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE *Helicobacter pylori*.

H. pylori es un bacilo gramnegativo, helicoidal o en forma de S, mide 0.3 a 1.0 μm de ancho y 1.5 a 5.0 μm de largo, es microaerofílico (O_2 5%, CO_2 10% y N_2 85%), la temperatura óptima de crecimiento es de 35 a 37° C, aunque algunas cepas son capaces de crecer a 42° C, con una alta humedad puede favorecer el crecimiento del microorganismo.⁵



Figura 2. *Helicobacter pylori*

El tiempo de incubación es de 3 a 5 días y ocasionalmente hasta 7 días para el primoaislamiento. Las características bioquímicas más sobresalientes son la catalasa, la citocromo oxidasa y la presencia de una potente enzima: la ureasa; características que se emplean para la identificación del microorganismo; además, la ureasa neutraliza el pH ácido del estómago, para así crear un microambiente neutro alrededor de ella; de esta forma, la bacteria se protege de la acción ácida del jugo gástrico (pH 3). El amoníaco producido de la hidrólisis de la urea es tóxico para las células de la mucosa gástrica, además la presencia de enzimas líticas, como proteasas y fosfolipasas bacterianas contribuyen a la destrucción el moco protector. La mucosa y su lámina propia son invadidas por un denso infiltrado de células inflamatorias, especialmente neutrófilos.^{2,5} La morfología colonial de *H. pylori* nos muestra; colonias pequeñas, grises, translúcidas y ligeramente hemolíticas en medio agar sangre de caballo.⁵

EPIDEMIOLOGIA.

H. pylori causa infección persistente en aproximadamente un 50% de la población mundial, particularmente en países con un nivel socioeconómico bajo; la prevalencia de *H. pylori* se ve aumentada con la edad y es mayor en ciertas poblaciones étnicas. En algunos países en vías de desarrollo puede ser tan alto como 70-80%.^{2,3}



Facultad de Química, UNAM

Figura 3. Prevalencia mundial de la infección de *H. pylori* en adultos, de acuerdo a región geográfica. ⁴

Una vez adquirida la infección, *H. pylori* persiste en la inmensa mayoría de los individuos por años, décadas y posiblemente de por vida. Sin embargo, la mayoría de los individuos infectados son asintomáticos y sólo de un 10 al 20% de las personas desarrollan úlcera péptica o alguna otra patología como la gastritis crónica atrófica, que es un factor de riesgo para el desarrollo de adenocarcinoma y linfoma gástrico.^{6,7}

Cuando se infecta una persona por *H. pylori* este es un factor de riesgo importante para el desarrollo de cáncer gástrico. La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) reconoce a *H. pylori* como carcinógeno humano tipo I.⁸ Se ha propuesto que *H. pylori* tiene una acción indirecta en el desarrollo del adenocarcinoma gástrico, ya que puede actuar a través de diferentes mecanismos, como son: la inducción de hiperproliferación de células gástricas, interferencia con las funciones de los antioxidantes y el incremento en la concentración de especies de oxígeno reactivas y óxido nítrico, las cuales pueden ser responsables del daño oxidativo de los ácidos nucleicos. Sin embargo, se ha sugerido que *H. pylori* puede estar involucrado con el cáncer gástrico en sólo una pequeña proporción de las personas infectadas con el microorganismo. Esto implica que existen características de las cepas, como son sus factores de virulencia; así como características en el hospedero y del medio ambiente que juegan un papel importante en la patogénesis de la infección por *H. pylori*.³

La incidencia de cáncer gástrico tiene una marcada variación geográfica en países de Latinoamérica como Brasil y Costa Rica se observa una incidencia anual de 45 pacientes con cáncer gástrico asociado a *H. pylori* por cada 100,000 habitantes; en países como México se han observado regiones de mayor riesgo, como en Chiapas con una alta

incidencia de cáncer asociado a esta bacteria, Se ha observado que Japón presenta la más alta incidencia en cáncer a nivel mundial, siendo seis veces mayor que en Estados Unidos, en donde la incidencia anual de infección por *H. pylori* es de alrededor de 0.5 a 1% en niños menores de 10 años de edad, con un intervalo de infección que aumentan a 50% en adultos de alrededor de 60 años; en cambio en ciertos grupos étnicos de Afroamericanos, Hispanos, y nativos de América, son infectados a temprana edad. La transmisión intrafamiliar, es asociada con los niveles socioeconómicos bajos, a una alimentación deficiente. En otros países parece que más de 80% de la población es infectada alrededor de los 10 años de edad, lo que es probablemente relacionado a factores de transmisión intrafamiliar. En México esta incidencia es de 20% en niños de 1 año de edad y una seropositividad hasta de un 50% en niños de 10 años de edad con una tasa de incremento de seropositividad de 5% en los primeros 10 años de vida.²

Diagnóstico de la infección por *H. pylori*.

Las pruebas que se utilizan para diagnosticar esta infección pueden ser directas e indirectas. Las pruebas directas se basan en la identificación del microorganismo en la biopsia gástrica, tales como la histología y el cultivo. Son indirectas, cuando se estudian alguna característica del microorganismo (prueba rápida de la ureasa y prueba de la urea en aliento) o bien los anticuerpos producidos por el paciente (serología). Las muestras utilizadas para el diagnóstico directo se obtienen durante la endoscopia, por lo que también se denominan métodos invasivos.³

El tratamiento se recomienda cuando se asocian cuadros de gastritis crónica con episodios recurrentes de úlcera o cuando los síntomas son severos y se demuestra la presencia de *H. pylori* en el estómago del paciente. La infección se trata durante 7 a 14 días con una combinación de dos o tres antibióticos y un inhibidor de bomba de protones. Es muy importante para el éxito del tratamiento que el paciente lo cumpla de forma estricta.³

INFECCIÓN Y PATOGENESIS POR *H. pylori*.

A pesar de la alta incidencia de la infección por *H. pylori* a nivel mundial, no todas las personas infectadas por *H. pylori* desarrollan enfermedad, al parecer el tipo de cepa bacteriana que se encuentra colonizando la mucosa gástrica tiene una función determinante en el desarrollo de la enfermedad; además de que el desarrollo de una patología esta relacionado con factores etiológicos, la edad, el factor de riesgo mas importante es el bajo nivel socioeconómico, así como el hacinamiento, la vivienda insalubre y el agua contaminada.^{2,3,6,7}

H. pylori puede colonizar únicamente el epitelio de tipo gástrico y no se encuentra en el duodeno normal. Es un microorganismo excelentemente adaptado a su nicho ecológico, descansando en la superficie de las células epiteliales gástricas bajo la capa de moco. La forma espiral y la motilidad conferida por sus múltiples flagelos le ayudan a distribuirse a través de la capa de moco para alcanzar esta superficie. La metaplasia gástrica que es el reemplazo de las células columnares que normalmente cubren el vello duodenal por epitelio de tipo gástrico

rico en mucina neutral, el cual se presenta en más del 90% de los pacientes con úlcera duodenal y permite a la bacteria colonizar el bulbo duodenal.⁴

La colonización de la mucosa duodenal produce inflamación, que vuelve a la mucosa duodenal vulnerable al ataque por ácido, pepsina o bilis, con la ulceración subsiguiente; el grado de metaplasia gástrica en duodeno esta directamente relacionado con el nivel de secreción de ácido gástrico.^{3,8,9}

Un factor de virulencia importante en *H. pylori* es la producción de la ureasa; esta enzima tiene un peso molecular de 550 kDa, esta compuesta de seis subunidades de UreA y seis de UreB, organizadas en un doble anillo de 13 nm de diámetro; es una de las proteínas mas abundantes, ya que constituye el 5% del total de proteínas que origina el microorganismo. Después de ser ingerida, la bacteria tiene que evadir la actividad bactericida del contenido del lumen gástrico e incorporarse a la capa mucosa. La producción de ureasa y la movilidad son esenciales para el primer evento de la infección.¹⁰

La ureasa cataliza la hidrólisis de la urea en bióxido de carbono y amoníaco, necesita de iones níquel para que se fijen en su sitio activo, de tal modo que se permite que *H. pylori* sobreviva en un entorno ácido creando un microambiente de neutralidad alrededor de ella.¹⁰

Este proceso permite que *H. pylori* se mueva rápidamente y atraviese la capa de moco para adherirse al epitelio gástrico; y los flagelos de *H. pylori* median el desplazamiento hacia el nicho gástrico; la bacteria se adhiere a las células epiteliales gástricas a través de distintos componentes y los mejor caracterizados son las adhesinas que son proteínas bacterianas,

glicoconjugados o lípidos bacterianos, que están involucrados en los primeros eventos de la colonización mediados por la interacción entre la bacteria y los receptores de superficie de las células epiteliales, o semejantes a lípidos, proteínas, glicolípidos o glicoproteínas.¹⁰

La adherencia de la bacteria a los receptores de la célula hospedera produce cambios celulares, aumentan la infiltración e inflamación celular, principalmente por neutrófilos y monocitos, así como podrían influir en la permanencia de la bacteria.³ Una de las adhesinas empleadas por la bacteria es la proteína de unión a grupo sanguíneo Lewis b (BabA); presenta un tamaño de 78 kDa que se une al antígeno del grupo sanguíneo de Lewis B fucosilado.¹³

Durante la infección los flagelos de la bacteria permite su desplazamiento sobre la capa mucosa para llegar al dominio apical de las células epiteliales gástricas mediante adhesinas especializadas, una vez adherida la proteína asociada a la citotoxina (CagA) es inyectada a las células gástricas a través del sistema de secreción de proteínas tipo IV (SSPT IV); también se libera la proteína activadora de neutrófilos (Hp-NAP), y la liberación de la citotoxina vacuolizante (VacA) para inducir alteraciones en las células gástricas inductora de la formación de vacuolas en las células epiteliales gástricas (Figura 4).^{3,15}

PATOLOGIAS

H. pylori usualmente se adquiere durante la niñez puede permanecer por años e incluso por décadas en el hospedero de los cuales del 80 a 90% de los sujetos son asintomáticos. La infección aguda de *H. pylori* causa una hipoclorhidria transitoria y es raramente

diagnosticada, la gastritis crónica se puede desarrollar en personas persistentemente colonizadas. Algunos casos sufren cambios morfológicos importantes en mucosa gástrica que van desde un proceso inflamatorio leve, hasta el desarrollo de una gastritis que puede evolucionar a una úlcera, o a lesiones atróficas que pueden terminar en metaplasia, displasia y finalmente en adenocarcinoma gástrico.⁸

H. pylori se distribuye en el estómago lo que podría indicar el tipo de patología que se presente; ya que los pacientes con gastritis predominantemente antral tienden a presentar una secreción normal o elevada de ácido gástrico, lo que podría incrementar el riesgo a desarrollar úlcera duodenal.³

H. pylori es el agente etiológico en el 70-80% de la gastritis crónica. En donde se afecta el antro y el fondo del estómago, con daño histológico que incluye frecuentemente un infiltrado de linfocitos, células plasmáticas y algunos eosinófilos; la inflamación suele estar presente principalmente en antro.^{3,6,4}

Cuando se coloniza principalmente el cuerpo del estómago tienden a desarrollar inflamación que puede derivar en gastritis atrófica que a su vez tiende a desarrollar úlcera gástrica. *H. pylori* puede colonizar únicamente el epitelio de tipo gástrico y no se encuentra en el duodeno normal. *H. pylori* es un microorganismo que se adapta a el estomago debido a sus factores de colonización y a su gran variabilidad genética, descansando en la superficie de las células epiteliales gástricas bajo la capa de moco adherente.^{3,8,4}

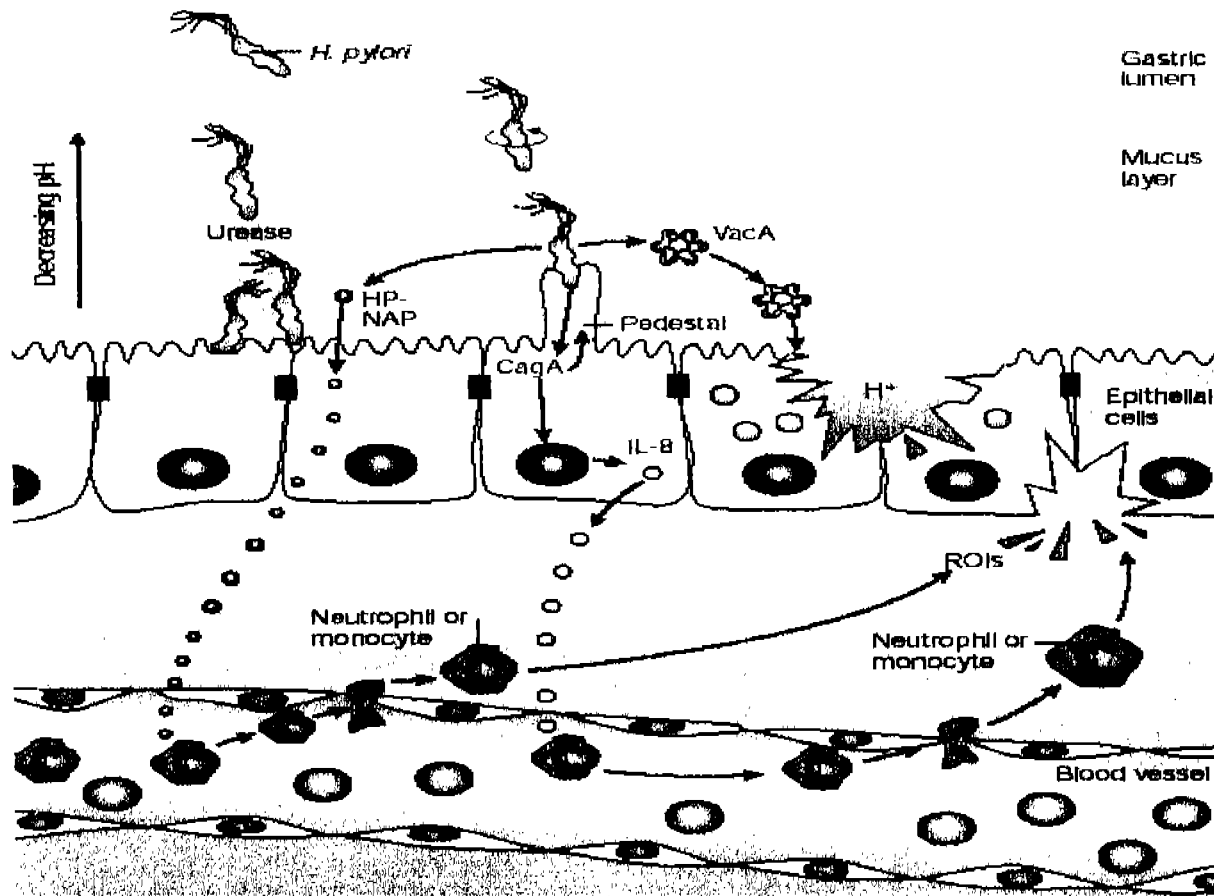


Figura 4. Mecanismos de Patogenicidad de *H. pylori*.³

Los pacientes con una alta producción de acidez están predominantemente en antro, son pacientes con gastritis, presentan una predisposición para desarrollar ulcera duodenal; los pacientes con una baja producción de ácido es mas probable que tengan gastritis en el cuerpo del estomago, estos pacientes presentan predisposición para desarrollar gastritis atrófica y pueden iniciar una secuencia de eventos como son metaplasma intestinal y displasia que en muy raros casos induce cáncer gástrico (Figura 5).³

GENOMA DE *Helicobacter pylori*

Actualmente se tiene la secuencia del genoma completo de dos cepas de *H. pylori*; la cepa Hp 26695 la cual fue aislada en Estados Unidos en el año de 1987 de un paciente con gastritis y la cepa J99 aislada en Estados Unidos en 1994 de un paciente con úlcera duodenal. El cromosoma circular de la cepa 26695 contiene 1,667,867 pb y el de la J99 contiene 1,643,831 pb. Estos tamaños son aproximadamente una tercera parte del de *E. coli*.¹¹

Ambos genomas presentan un contenido de G+C de 39%. El análisis de las secuencias mostró la presencia de 5 regiones en el genoma en la cepa 26695 y 9 regiones en la cepa J99 con diferente composición de G+C. En la región 2 de la cepa 26695 se tiene un contenido de G+C de 35%, esta corresponde a la isla de patogenicidad *cag* (PAI-*cag*), en la cual se encuentra el gen que codifica para la proteína asociada a la citotoxina (*cagA*) y de genes que inducen la expresión de interleucina 8 (IL-8); las 4 regiones restantes, no han sido caracterizadas experimentalmente. En cambio la región 1 y 3 tienen un contenido de G+C de 33%, tienen copias de la secuencia de inserción IS605, de los genes *5S RNAr* y de

una secuencia repetida de 521 pb. La región uno contiene el gen *virB4*, el cual codifica para la proteína involucrada en la transferencia de DNA en *Agrobacterium tumefaciens* y en la secreción de la toxina de *Bordetella pertusis*. La región cuatro la cual contiene un 43% de G+C tiene fusionados los genes *rpoB* y *rpoC* los cuales codifican para las subunidades del RNA polimerasa. Ambos genomas contienen dos copias de los genes *16S* y dos copias de los genes *5S-23S* del RNA ribosomal; además, la cepa 26695 contiene un gen extra del *5S RNA*.¹¹

GEN ASOCIADO A LA CITOTOXINA (*cagA*)

Un factor de virulencia importante y ampliamente estudiado en *H. pylori* es la proteína asociada a la citotoxina (CagA), la cual fue identificada como un antígeno inmunodominante, expuesto en la superficie de la bacteria, que presenta una variabilidad de tamaño de 120 a 145 kDa, y que está presente en aproximadamente el 60% de las cepas de *H. pylori*.¹³

CagA esta codificada en el extremo 3' de la PAI-*cag*. La mayoría de las cepas de *H. pylori* que causan alguna patología se clasifican como tipo I, las cuales contienen la PAI-*cag*, esta es una región cromosómica de aproximadamente 40 kb, posee 30 genes. En la figura 5, se muestra el rearrreglo de los genes de la PAI-*cag* en la cepa 26695, el cual fue el primer genoma de *H. pylori* en publicarse. La PAI-*cag* puede estar dividida en dos partes en algunas cepas, por la presencia de un elemento de inserción (IS605). La mayoría de los genes de la PAI-*cag* están implicados probablemente en el montaje de la maquinaria secretora que transloca a la proteína CagA en el citoplasma de las células epiteliales gástricas.^{11, 13, 14}

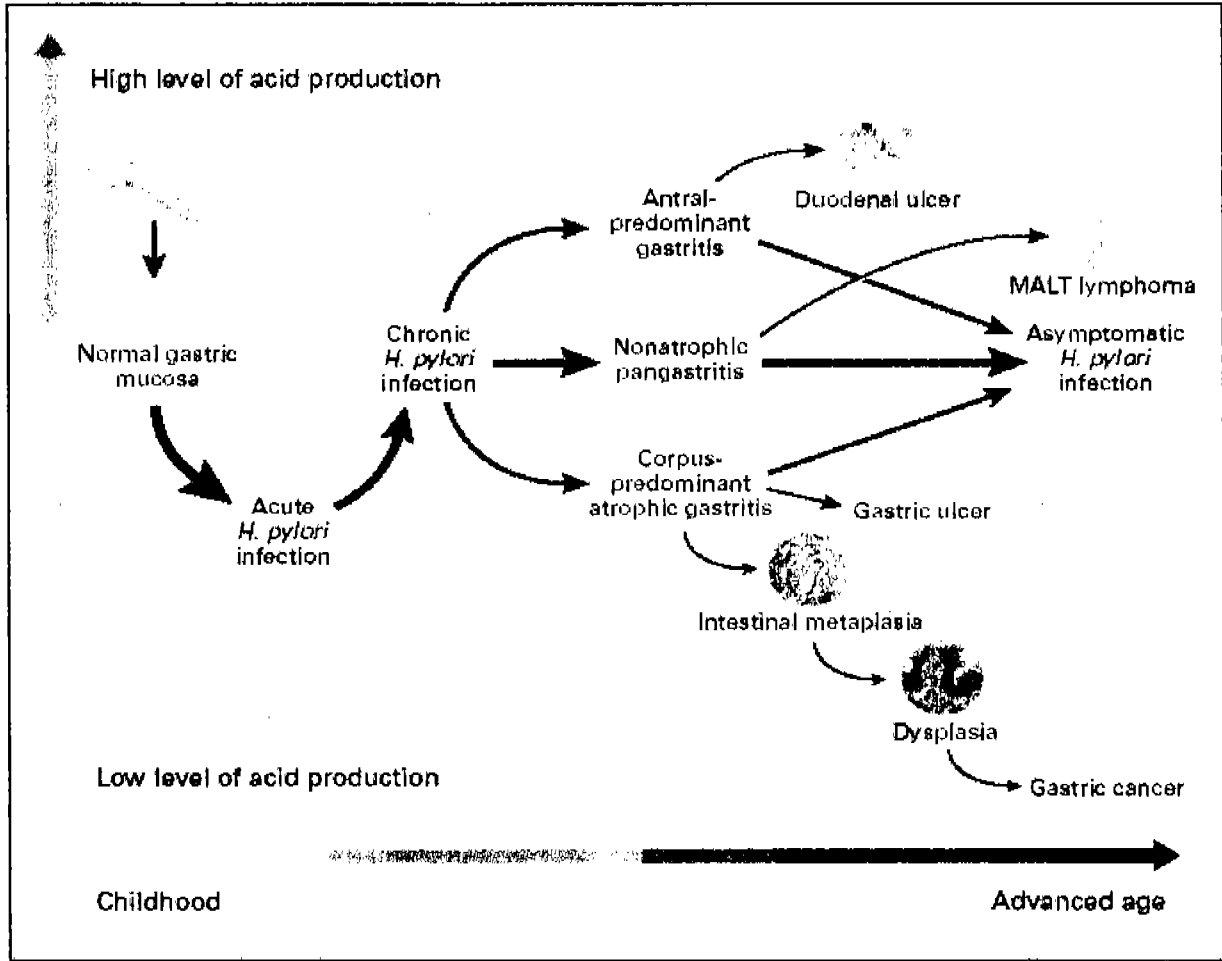


Figura 5. Historia natural de la infección de *H. pylori*.³

En la figura 6 se observa que los genes marcados en naranja, dentro de la PAI-*cag*, presentan similitud a los componentes del SSPT IV de *Agrobacterium tumefaciens*, un patógeno en plantas (proteínas Vir). Las proteínas codificadas por la PAI-*cag* son implicadas en dos procesos importantes: a) la inducción de la producción IL-8 por las células epiteliales gástricas y b) la translocación de la proteína CagA de la bacteria hacia la célula hospedera. Todos los genes representados por las flechas sólidas son esenciales para la inducción de IL-8; las flechas tramadas indican los genes no están implicados en este proceso. Las flechas contorneadas en azul indican a los genes requeridos para el desplazamiento de CagA; las líneas anaranjadas indican a los genes no esenciales para el desplazamiento de la proteína.^{3, 16, 17}

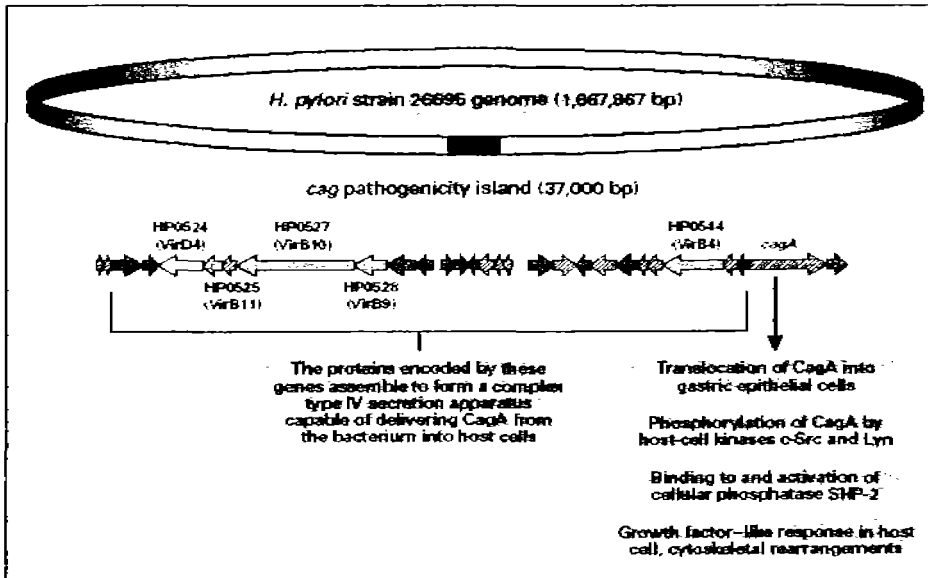


FIGURA 6. La isla de Patogenicidad *cag*.³

La proteína asociada a la citotoxina es codificada por el gen *cagA* que se encuentra localizado en el extremo 3' de la PAI-*cag*. Se han logrado detectar anticuerpos contra la proteína CagA, en donde se han detectado niveles elevados de anticuerpos IgG por ELISA contra esta proteína, por lo que se postula la expresión del gen *cagA* como un marcador de virulencia, esto es debido a que en pacientes infectados con cepas que tienen el gen *cagA* y expresan la proteína CagA, se aprecia una asociación con el desarrollo de gastritis crónica activa, gastritis atrófica, úlcera péptica y con un incremento en el riesgo de desarrollar adenocarcinoma o linfoma gástrico. Las infecciones con cepas que carecen de la expresión de esta proteína se han asociado con patologías menos graves.^{14,16}

ISLA DE PATOGENICIDAD *cag* (PAI-*cag*).

Esta isla esta insertada en el extremo 3' del gen cromosomal de la glutamato racemasa, tiene una secuencia repetida directa de 31 nucleótidos, que participan en la integración del locus de 40 kb en el genoma de *H. pylori*.¹¹ La presencia de la secuencia de inserción 605 (IS605) y un bajo contenido de G+C (35%), con respecto al resto del genoma de *H. pylori* (39%); sugiere que la PAI-*cag* fue adquirida a partir de otro microorganismo por medio de transferencia horizontal.^{11,15} (Figura 7).

Diversos estudios revelan que la PAI-*cag* puede estar presente como una simple unidad continua o dividida en dos regiones (*cag* I y *cag* II) por medio del IS605 o por un segmento de DNA cromosomal.¹¹ Esta variación estructural en la PAI-*cag* explica la existencia de cepas de *H. pylori* PAI-*cag* negativo y PAI-*cag* positivo, existe un operon de genes en la isla de patogenicidad que codifica para el SSPT IV.^{11,15}

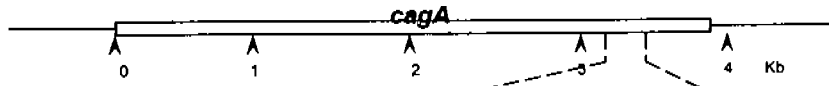
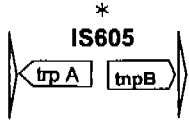
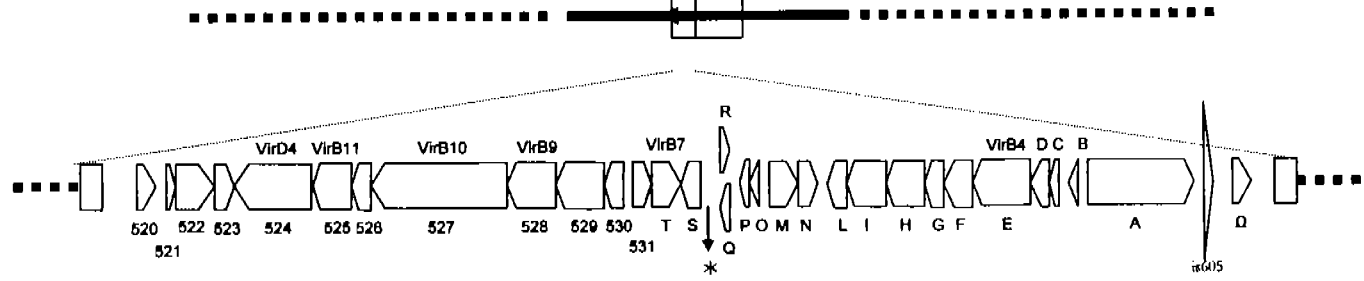
Gran número de patógenos gramnegativos incluyendo *Salmonella*, *Yersinia* y *Shigella* sp; *E. coli* patogénica, y algunos patógenos en plantas usan el SSPT IV para secretar las proteínas bacterianas del citoplasma de la bacteria directamente al interior de la célula hospedera. La translocación de estas moléculas, también llamados efectores, interfiere con una variedad de activación de las señales básicas en la célula hospedera. ^{15, 16}

Los sistemas de secreción de proteínas tipo III y IV son capaces de translocar proteínas efectoras dentro de la célula hospedera. Es importante notar que el origen de la evolución de ambos sistemas es diferente; El sistema de secreción tipo III se desarrolló a partir del sistema flagelar, mientras el tipo IV se origina de un aparato de conjugación. ^{15, 16} Mientras que, los flagelos son órganos de motilidad. Los sistemas de conjugación permiten la transferencia de DNA entre las bacterias. Sin embargo, los dos sistemas tienen signos en común, como lo es que pueden transportar proteínas por una estructura de canal compleja que va desde la bacteria hasta la célula blanco. ¹⁶

REGIÓN VARIABLE 3' DEL GEN *cagA*

El gen *cagA* codifica para una proteína de 1,147 aminoácidos con una masa teórica de 128,012 Da. La repetición de un segmento de 102 pb ¹³, es lo que le confiere la variabilidad de tamaño a la proteína *cagA*. Además, estas repeticiones son ricas en prolina, altamente hidrofílicas con una gran probabilidad de estar expuesta en superficie de la proteína y ser muy inmunogénica. ^{17, 18}

Glutamato racemasa



Gene *cagA*

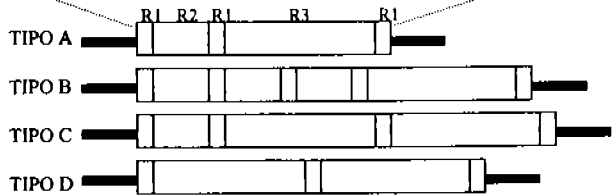
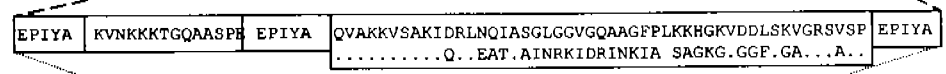


Figura 7. Estructura de la Isla de Patogenicidad *cag*.

Diversos estudios han mostrado que la patogénesis de atrofia y cáncer gástrico se ha asociado a cepas de *H. pylori* con más de 3 regiones repetidas.^{19, 21, 23} Estudios recientes muestran que esta región variable en el extremo 3' del gen es la región con mayor heterogeneidad, por sus diferencias nucleotídicas sustanciales entre las cepas aisladas de pacientes occidentales y de pacientes asiáticos.^{19, 20, 22, 25} Estas diferencias estructurales en la proteína CagA podrían estar involucradas en el incremento del riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico en personas que estén infectadas con cepas de *H. pylori* que expresan la proteína CagA con alta afinidad a SHP-2.³ Por otro lado, la función de la proteína CagA fosforilada es poco entendida aunque se postula participe en proliferación celular y riesgo al desarrollo de cáncer gástrico. Dadas las evidencias anteriormente señaladas para la proteína CagA, no podría eliminarse que el grado de fosforilación sea un marcador epidemiológico.^{24, 29}

En un estudio realizado por Yamaoka *et al*,^{19, 21} en el que estudio las variantes de la región 3' del gen *cagA* en 155 cepas de *H. pylori* aislado de pacientes japoneses con distintas patologías, en el que se encontró 50 pacientes con gastritis, 40 con úlcera gástrica, 35 con úlcera duodenal y 30 con el cáncer gástrico. En este estudio se amplificó por PCR la región variable 3' del gen *cagA* de *H. pylori* y después se secuenciaron estos productos y se encontró que 145 cepas dieron productos de PCR de un peso de 642 a 651 pb; 10 cepas tuvieron un peso molecular de 756 a 813 bp. Además, se encontró que la secuencia de la región 3' del gen *cagA* de las cepas japonesas difirió notablemente de la secuencia primaria de genes de *cagA* del Occidente de Asia; además, se clasificó en cuatro tipos de estructura primaria de gen *cagA* (designados A, B, C, y D) dependiendo del tipo y el número de repeticiones como se observa en la figura 8; encontraron que el tipo C de estructura primaria se asoció a pacientes con cáncer gástrico.²¹

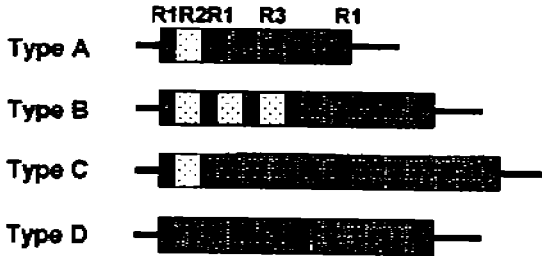


Figura 8.-Estructuras primarias de la región variable 3' del gen *cagA*.^{19,21}

Las cepas que presentan la estructura primaria tipo C se asocian con niveles altos de anticuerpos anti-*cagA* y mayor daño en la atrofia gástrica, en un estudio posterior se encontró que las cepas de *H. pylori* con más de 3 regiones repetidas en la región 3' del gen *cagA* son asociadas con un daño histológico aumentado y con una reducida sobrevivencia en condiciones ácidas; Las cepas *cagA* negativo de *H. pylori* son más resistentes al pH ácido del estomago en comparación con cepas de *H. pylori cagA* positivas.^{30,31}

En otro estudio realizado por Rota *et al.* en donde estudiaron la región variable 3' del gen *cagA* de *H. pylori* en pacientes con y sin úlcera péptica por medio de PCR; se observó que la infección de *H. pylori* se puede asociar al cuadro clínico de acuerdo al genotipo de *cagA*. Para investigar la relación entre el genotipo de *cagA* y la úlcera péptica se estudiaron 113 biopsias gástricas de pacientes infectados con *H. pylori* en Brasil las cuales fueron analizadas por PCR. Existe una variación de subgenotipos de *cagA* en distintas regiones diferentes, por lo cual el análisis de PCR para la región variable 3' se utilizaron los iniciadores según una metodología descrita por Yamaoka *et al.*²¹, para la región consenso 3' del gen *cagA*.

Se observó que *cagA* estaba presente en 53 (71%) de 75 de las cepas de *H. pylori* además se encontró en el análisis de la región del consenso una asociación con la enfermedad de úlcera duodenal y no hubo relación con úlcera gástrica, cuando se compara con pacientes con duodenitis o gastritis. Se encontraron tres tipos de estructuras primarias de *cagA* (A, B/D, y C). Sin embargo, en 8 (18%) de los casos, más de un subtipo estaba presente, además se observó que *cagA* era un marcador en cepas de *H. pylori* para la enfermedad de úlcera duodenal en esa población. La presencia de múltiples subgenotipos de *cagA* se asoció con la úlcera gástrica.^{19,21}

JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACION

Se sabe que *H. pylori* es una cepa altamente heterogénea en el extremo de la región variable 3' del gen *cagA* debido a inserciones, pérdidas y sustituciones de pares de bases lo que hace que la bacteria tenga una alta diversidad genética, además de que pueden haber hasta tres repeticiones del fragmento de 102 pb en este extremo lo que implica que estén presente motivos que son sitios de fosforilación de la tirosina que pueden ser un marcador epidemiológico para el desarrollo de patologías tales como: úlcera péptica y adenocarcinoma gástrico; en México desconocemos la prevalencia o frecuencia de los diferentes genotipos de *cagA* en cepas aisladas de México.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el polimorfismo de los distintos genotipos de la región variable 3' del gen *cagA* de *Helicobacter pylori* aislado de pacientes mexicanos.

Objetivos particulares

*Diseño de los iniciadores para la amplificación de la región variable 3' del gen *cagA* de los aislamientos mexicanos.

*Diseñar un PCR específico para la amplificación de la región variable 3' del gen *cagA*.

*Estudiar el polimorfismo de *cagA* en la región variable 3' de los aislamientos mexicanos.

*Comparar el polimorfismo de la región variable 3' del gen asociado a la citotoxina de acuerdo a la región anatómica del estómago.

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA.

Cepas de H. pylori.

Se trabajo con 115 cepas de *H. pylori* aislada de pacientes que fueron sometidos a una endoscopia por sintomatología diversa (pacientes con úlcera péptica, úlcera péptica hemorrágica, gastritis crónica, dispepsia no ulcerosa y pacientes con cáncer gástrico) en el Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición "Salvador Zubirán, a los cuales se les tomaron múltiples biopsias (antro, incisura angular, cuerpo y fondo gástrico); del Hospital de Alta Especialidad Sur de Petróleos Mexicanos (antro y cuerpo) y del Hospital General "Manuel Gea-González" (antro y cuerpo); además, en los sujetos con cáncer gástrico se tomaron muestras del tumor y periferia; y de los cuales se obtuvieron múltiples aislamientos por sujeto.

EXTRACCIÓN DE DNA.

Se extrajo el DNA de las 115 cepas de *H. pylori* con el método de GENE CLEAN (Bio 101, La joya, CA) a partir de 100 μ L de una suspensión bacteriana de la cepa de *H. pylori*, se le agregaron 500 μ L de solución de Tiocianato de Gunidina-EDTA-Sarcosinato (GES), se mezcla por inversión y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 10 μ L de Glass Milk (BIO 101. La Joya, CA), se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación cada 2 minutos, una vez transcurrida la incubación se centrifugo a 14,000 rpm, durante 20 segundos; se decantó el sobrenadante y la resina se lavó con 300 μ L de solución de lavado (New Wash, BIO 101. La Joya CA),

resuspendiendo la resina con la micropipeta para después centrifugar durante 20 segundos a 14,000 rpm, descartar el sobrenadante, este ultimo paso se repitió dos veces mas y en el ultimo lavado se recuperó el sobrenadante con la micropipeta; se dejó secar durante 10 minutos la resina; se adicionaron 20 μ L de agua desionizada y se incubó en baño maría a 55° C durante 5 minutos; se centrifugo a 14,000 rpm durante 1 minuto para poder recuperar el sobrenadante donde se encuentra presente el DNA, se repitió la elusión una vez más.

DISEÑO DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS PARA LA AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LA REGIÓN VARIABLE 3'.

Para la amplificación de la región variable se utilizaron los iniciadores reportados por Yamaoka *et al.*, 1998; así como también se diseñaron iniciadores nuevos para la amplificación de esta región, para lo cual se empleo la secuencia del gen *cagA* de la cepa aislada de un paciente mexicano (Hp 53C5N) y de las secuencias reportadas en el banco de genes (*H. pylori* CCUG 17874; ATCC 53726; Hp 26695 y Hp J99); para lo cual se emplearon los programas ALIG (Scientific and Educational Software), ClustalW (BCM Search Launcher: Múltiple Séquense Alignments), PRIMER DESIGNER (Scientific and educational software) y BLAST 2.0 (Basic Local Alignmet Serach Tool).

AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN VARIABLE 3' DEL GEN *cagA* POR PCR.

Para la amplificación de la región variable en las cepas aisladas de pacientes mexicanos, se emplearon los iniciadores reportados por Yamaoka y cols. y los diseñados en este estudio (tabla 1 y figura 9). Dos μ L del templado de DNA se adicionaron a 23 μ L de una mezcla de

reacción de PCR, que contiene: Tris-HCl 10 mM (pH 8.3), KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, gelatina 0.01% (peso/vol.), 200 μM de cada uno de los deoxinucleótido (Boehringer, Mannheim), 10 pmol de cada uno de los iniciadores y 1U de *Taq* DNA polimerasa (Platinum Taq DNA Polimerase, Invitrogen. Life technologies). La amplificación por PCR se realizó en un termociclador GeneAmp 9700 (PE, Applied Biosystems). Se emplearon cepas tipo de *H. pylori* para la estandarización de las condiciones de amplificación para cada uno de los juegos de iniciadores, como controles. *H. pylori* ATCC 43504 y Hp 84-183, como controles *cagA* positivos; Hp 86-313 como control *cagA* negativo, la especificidad de la amplificación fue evaluada utilizando DNA de *Escherichia coli* DH5α como control negativo, así como agua como un control negativo de contaminación.

El ciclo de amplificación consiste en una desnaturalización inicial del DNA a 94° C durante 3 minutos seguido de desnaturalización a 94° durante 1 minuto; la temperatura de alineamiento fue de 50° ó 55° C durante 1 minuto y extensión a 72° C durante 1 minuto, durante 35 ciclos. El ciclo final incluye una extensión durante 7 minutos a 72° C. Los productos de la amplificación fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 %, con 0.5X de TBE, teñido con Bromuro de Etidio y examinados en un Transiluminador con luz ultravioleta (UV).

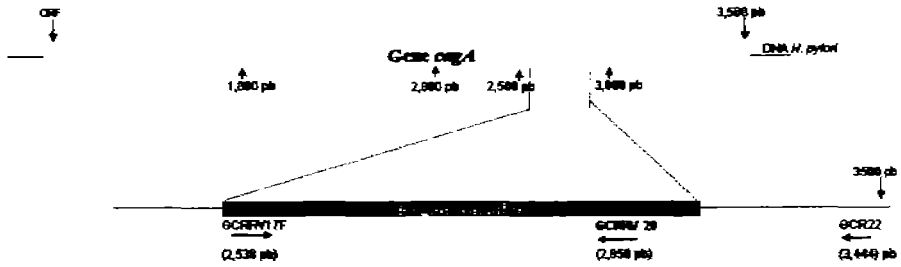


Figura 9. Estrategia de amplificación de la región variable 3' del gen *cagA*.

Tabla 1. Iniciadores para la amplificación de la región variable 3' del gen *cagA* de *H. pylori*.

Nombre	5' → 3'	Posición (pb)	T° Alineamiento	Amplicon
GCRRv17F	ACC CTG GTC GGT AAT GGA TTA TCT	2538	50° C	321
GCRRv20R	AGA TCA TCA ACT TTA TCA TGC C	2859		
GCRRv17F	ACC CTG GTC GGT AAT GGA TTA TCT	2538	55° C	906
GCR 22 R	TTA AGA TTT TTG GAA ACC ACC TTTT	3444		
Yamaoka	ACC CTA GTC GGT AAT GGG TTA	RV	50° C	888-1061
Yamaoka	GTA ATT GTC TAG TTT CGC	RV	50° C	

ESTANDARIZACIÓN DE PCR USANDO DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MAGNESIO.

Se realizó una curva de estandarización de magnesio empleando el mismo cóctel de amplificación descrito arriba, solo se variaron las concentraciones de magnesio (tabla 2).

Tabla 2. Curva de Magnesio.

Tubo Número	1	2	3	4	5	6
Concentración						
final de MgCl ₂	0.8	1	1.2	1.5	1.8	2
Solución de						
MgCl ₂ (25 mM)	0.8 µL	1 µL	1.2 µL	1.5 µL	1.8 µL	2 µL
Agua para PCR	1.2 µL	1 µL	0.8 µL	0.5 µL	0.2 µL	0 µL

CLASIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR AMPLIFICADOS

Se realizó la clasificación de la región variable 3' de *cagA* basado en el estudio realizado por *Karita et al.*³⁰ en el que observo tres tipos de fragmentos y los clasifiqué en base a tamaño, los cuales fueron denominados corto, mediano y largo.

RESULTADOS

RESULTADOS

Se caracterizaron 115 cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes mexicanos de las cuales 87 fueron del Proyecto: Asociación de *H. pylori* en los diferentes estadios de carcinoma gástrico (Cáncer), 6 del Proyecto: Hospital Gea-González (Gastritis); además, 6 de úlcera péptica; 9 de úlcera péptica hemorrágica y finalmente 7 fueron de pacientes control (No ulcero pépticos, todas estas obtenidas de los proyectos de: úlcera péptica hemorrágica y del Hospital PEMEX-Facultad de Medicina, UNAM-INMNSZ; todos los proyectos mencionados anteriormente son del Programa de Inmunología Molecular Microbiana de la Facultad de Medicina a cargo de la Dra. Yolanda López Vidal.

Para la amplificación de la región variable 3' del gen *cagA*, se realizó una búsqueda de los iniciadores en MEDLINE y la publicaciones que reportaron con la región variable 3' del *cagA* son de Yamaoka, Rota, Azuma; se decidió usar los iniciadores de Yamaoka *et al.* 1998, sin embargo, no hubo amplificación de ningún producto; al no obtener éxito en la amplificación con los iniciadores de Yamaoka se decidió diseñar los iniciadores a partir de la secuencia del gen *cagA* de un aislamiento mexicano de *H. pylori* 53C5N, y de las cepas de *H. pylori*: 26695, J99, Hp 15818, F32, ATCC 43526, ATCC 53726, NCTC 11638, NCTC 11637; y se obtuvieron los siguientes iniciadores GCRRV17F, GCRRV18R, GCRRV19F y GCR 22 R.

Inicialmente se trabajó con los iniciadores GCRRV17 y GCRRV18, con un producto de PCR de 338pb, 440pb y de 542 pb y se observó que el par de iniciadores no amplificaban toda la secuencia ya que el iniciador GCRRV18 no amplificaba toda la región variable ya

que esta amplificación era errónea debido a que no podíamos observar la amplificación de la región variable 3' por completo, por lo que se decidió cambiar el iniciador GCRRV 18 por el iniciador GCR22 el cual es un iniciador que amplifica fuera de la región variable 3' con lo que podemos asegurar que esta región variable 3' va a ser amplificada completa, por lo que se trabajo con el par de iniciadores GCRV17 y GCR22 para así poder tener una amplificación de la región variable 3' de *cagA* correcta.

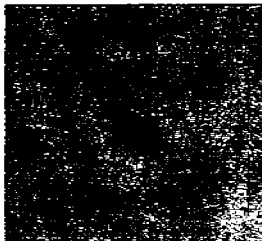
También se logró la estandarización de la amplificación por PCR de la región variable 3' de *cagA* en lo que se obtuvieron que las condiciones óptimas de concentración de $MgCl_2$ fue de 1.5 mM y temperatura de hibridación de 50° C en estas condiciones se observó que no se existían productos inespecificos en la amplificación.

Al realizar la amplificación de la región variable 3' de *cagA* con el par de iniciadores GCRV17 y GCR22 se observó la amplificación completa de la región variable 3' de *cagA* en la que se observó la amplificación de sólo dos fragmentos de *cagA*, los cuales fueron detectados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% revelados con bromuro de etidio y detectados, uno de 906 pb denominado fragmento corto y otro de 1,008 pb denominado fragmento mediano. Además, se observó que algunas cepas contenían los dos tipos de fragmentos tanto el fragmento corto y el fragmento mediano (tabla 3 y figura 10).

Se observó en el gel de agarosa al 1.5% TBE; revelado con bromuro de etidio nuestro a continuación los genotipos encontrados durante la amplificación; en el carril numero uno se observó la banda perteneciente a una cepa de *H. pylori* de cáncer de 906 pb denominada fragmento corto; en el carril número 2 se observó el marcador de peso molecular de en

múltiplos de 100 pb; en el carril número 3 una banda de 1,008 pb proveniente de cepa de *H. pylori* proveniente de cáncer denominada fragmento mediano; finalmente en el carril número 4 se observa la presencia de dos bandas que representan al fragmento corto y mediano proveniente de una cepa de *H. pylori* de cáncer gástrico, posiblemente sea una colonización mixta, ya que se pueden observar ambos tipos de fragmentos identificados tanto el fragmento corto de 906 pb; y el fragmento mediano de 1008 pb.

Tabla 3. Genotipos amplificados de la región variable 3' del gen *cagA*.

	corto
	mediano
	corto y mediano

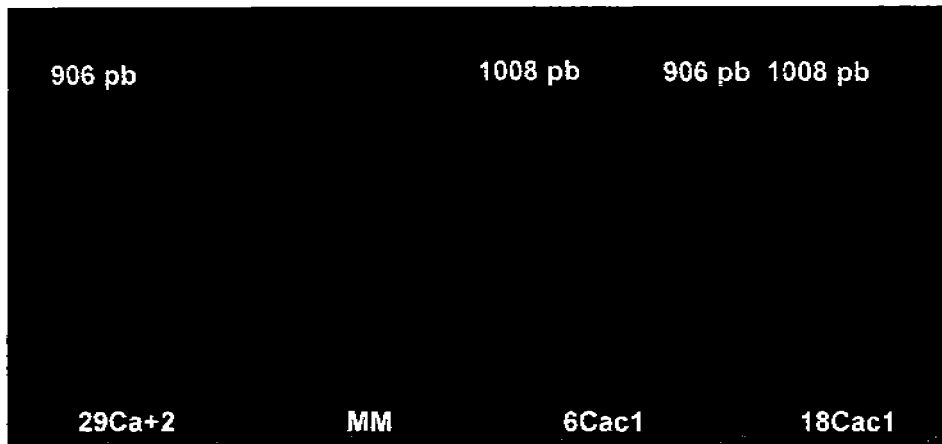


Figura 10. Genotipos de la región variable 3' del gen *cagA*.

En la tabla 4 y figura 11; se muestran los distintos tipos de fragmentos amplificados así como su prevalencia de los distintos genotipos; en la que se el fragmento amplificado mas prevalente en las cepas mexicanas fue el corto de 906 pb presente en 77 de la 115 cepas amplificadas, lo que indicó que estas probablemente no presentan la repetición del segmento de 102 pb en el extremo 3' del *cagA*; el fragmento amplificado denominado mediano de 1,008pb, además se observo que este tipo de fragmento estuvo presente en 17 de las 115 cepas amplificadas; además se observó que 20 de las 115 regiones amplificadas más de un tipo de la región variable, por la presencia de los genotipos corto y mediano simultáneamente.

Tabla 4. Prevalencia de genotipos de la región variable 3' del gen *cagA* de *H. pylori*.

	77(67)
	17(14.8)
	20(17.4)
	1(0.8)

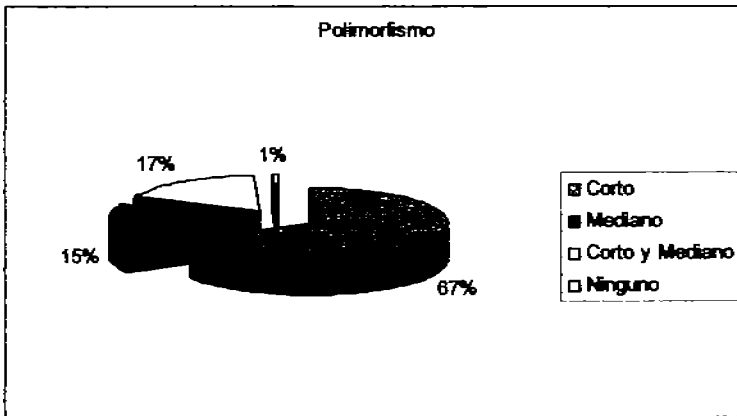


Figura 11. Polimorfismo de la región variable 3' del gen *cagA*.

De acuerdo a región anatómica del estomago la caracterización de las 115 cepas amplificadas, en cuanto al fragmento corto se observó que este estaba localizado principalmente en el Antro con 29.8%; en el cuerpo fue donde hubo mayor prevalencia del fragmento corto con un 27.3 %; además se observó en el tumor y su periferia un predominó del fragmento corto con un 22.1 %; de 12.9 % en el Fondo; y menos prevalente en la región de la Incisura Angular (tabla 5).

Tabla 5. Distribución del genotipo corto por área anatómica del estómago.

Región	corto % (n/nT)
Antro	29.8(23/77)
Fondo	12.9(10/77)
Cuerpo	27.3(21/77)
Incisura Angular	7.8(6/77)
Tumor y Periferia	22.1(17/77)

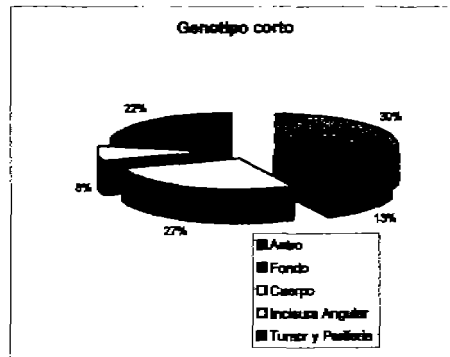


Figura 12. Distribución del genotipo corto por área anatómica del estómago.

En cuanto al genotipo mediano (fragmento mediano) se observó localizado principalmente en el Tumor y Periferia con una alta prevalencia de 35.3% y que además es donde el genotipo mediano fue más prevalente con respecto al corto; también se observó que en el Fondo una prevalencia del 23.5%; en cuanto al antro y el cuerpo se obtuvo una igual

prevalencia del genotipo mediano con un porcentaje de 17.6%; el genotipo mediano con menor prevalencia en la región de Incisura angular del 5.8% (tabla 6).

Tabla 6. Distribución del genotipo mediano por área anatómica del estómago.

	mediano % (n/N)
	17.6(3/17)
	23.5(4/17)
	17.6(3/17)
	5.8(1/17)
Tumor y Periferia	35.3(6/17)

En cuanto al genotipo con colonización mixta que tenía tanto el genotipo corto como el mediano se observó interesantemente que la colonización mixta fue la más prevalente en el cuerpo; con respecto a las otras regiones anatómicas analizadas fue de un 40%; seguida del antro con una prevalencia del 25%; en cuanto al tumor y periferia se observó una presencia de una probable colonización mixta de un 20% respecto a las demás regiones; en cuanto al Fondo encontramos una baja prevalencia de colonización mixta al encontrarse solo una prevalencia de 5% siendo esta la más baja de las regiones anatómicas analizadas (tabla 7).

Tabla 7. Detección de colonización mixta en las cepas de *H. pylori* amplificadas en la región variable del gen *cagA*.

	25(5/20)
	5(1/20)
	40(8/20)
	10(2/20)
	20 (4/20)

El genotipo corto de *cagA* se amplificó principalmente en *H. pylori* de la región de antro y cuerpo; en contraste, el *cagA* genotipo mediano se encontró en la región del fondo y en el tumor y periferia. Por otro lado, la amplificación de ambos genotipos se encontró en cepas de *H. pylori* aisladas de antro y cuerpo, sin significancia estadística; en antro se observó la presencia de cepas que poseían el genotipos corto y el mediano (tabla 8).

Las cepas de *H. pylori* de antro se reportó que presentan principalmente el genotipo corto de *cagA*. Este estudio mostró una combinación de *cagA* en genotipos cortos y medianos, posiblemente un mecanismo de sobrevivencia para la adaptación a las diferentes condiciones de acidez en la mucosa gástrica.

Tabla 8. Polimorfismo de *cagA* asociado a la región anatómica del estomago de las 115 cepas de *H. pylori*.

Genotipo	Grupos de Estudio	Cómo se determinó
29.8(23/77)	17.6(3/17)	25(5/20)
12.9(10/77)	23.5(4/17)	5(1/20)
27.3(21/77)	17.6(3/17)	40(8/20)
7.8(6/77)	5.8(1/17)	10(2/20)
22.1(17/77)	35.3(6/17)	20 (4/20)

El genotipo corto de *cagA* se encontró en todas las patologías estudiadas pero principalmente en Cáncer Gástrico, Úlcera Péptica Hemorrágica, Úlcera Péptica y No Úlcera Péptica; en cambio en Gastritis se observaron ambos fragmentos (corto y mediano), sugiriendo una probable colonización mixta (tabla 9).

Tabla 9. Genotipos de la región variable del gen *cagA* de acuerdo a la patología.

Genotipos	
79.3(69/87)	36.8(32/87)
100(6/6)	83.3(5/6)*
100(6/6)	0(0/6)
100(9/9)	0(0/9)
100(7/7)	0(0/7)

Se realizó un análisis estadístico en donde se observó que en gastritis con la colonización mixta se encontró una *p* significativa de $p=0.0214$. El genotipo mayoritario de *cagA* fue el genotipo corto, este genotipo es más resistente al pH ácido; también se asoció fuertemente en antro, cuerpo; así como en pacientes con cáncer, mismos que presentaron un alto grado de proliferación celular con la presencia de grandes infiltrados inflamatorios.

En cuanto a la Zona tumoral de la lesión en pacientes con cáncer gástrico se observó principalmente el genotipo corto.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

H. pylori causa infección gástrica en un alto porcentaje de la población, aproximadamente el 50% de la población mundial esta infectada, y esta se incrementa en países con un nivel socioeconómico bajo, debido a las bajas condiciones de salud en las que se vive, la infección por *H. pylori* se ve incrementada con la edad en ciertas poblaciones étnicas ². Cuando una persona es infectada por *H. pylori*, esta infección puede persistir por años, décadas y posiblemente de por vida, la mayoría de los individuos infectados por *H. pylori* son asintomáticos y sólo un pequeño porcentaje tienden a desarrollar alguna patología, tales como: úlcera péptica, gastritis crónica atrófica, que es un factor de riesgo para el desarrollo de adenocarcinoma y linfoma gástrico tipo MALT ⁶. Esto implica que existen características de las cepas, como son sus factores de virulencia; así como características en el hospedero y ambientales, que juegan un papel importante en la patogénesis de la infección por *H. pylori*.

H. pylori clasificado por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) como carcinógeno humano tipo I ³³; debido a que puede causar cáncer gástrico solo en humanos mediante distintos mecanismos como pueden ser; inducción de hiperproliferación de células gástricas, además de interferencia con las funciones de los antioxidantes y un incremento en la concentración de especies de oxígeno reactivas y óxido nítrico que pueden ser las causantes del daño oxidativo de los ácidos nucleicos y causar un estrés celular. ³

Un factor de virulencia importante en *H. pylori*, es la proteína asociada a la citotoxina (CagA), la cual durante la patogénesis de la bacteria es secretada mediante un sistema de secreción de proteínas tipo IV; CagA es un antígeno inmunodominante, con una variabilidad

en su masa molecular de 120 a 145 kDa, además está presente en aproximadamente el 60 al 90% de las cepas de *H. pylori*.^{7,13}

La variabilidad en el tamaño de CagA se debe a la repetición de un fragmento de DNA de 102 pb en el extremo 3' del gen como lo describió Covacci *et al* y Telford *et al* estas repeticiones son ricas en prolina, altamente hidrofílicas con una gran probabilidad de estar expuesta en superficie¹³, además esta región variable en el extremo 3' del gen es la región con mayor heterogeneidad, debido a que es donde se han encontrado diferencias nucleotídicas sustanciales entre las cepas aisladas de pacientes occidentales y de pacientes asiáticos.^{19,21}

Estudios realizados por Yamaoka *et al.*, 1998, 1999 y Azuma *et al.* mostraron una asociación entre la región variable y la patogénesis de atrofia y cáncer gástrico, con cepas de *H. pylori* que presentan más de 3 regiones repetidas como fue descrito por Yamaoka *et al*, 1998, Yamaoka *et al*, 1999, Azuma *et al*^{19, 21, 23}; por otro lado, clasificaron el gen *cagA* de acuerdo al número de secuencias repetidas en la región variable 3' y describieron 4 tipos de estructura primaria en base a su secuencia nucleotídica y a su organización estructural, permitiendo identificar cuatro alelos del gen *cagA*, designados como tipos A, B, C y D; en un estudio reciente por Karita *et al.*³⁰ encontraron que las cepas de *H. pylori* con más de 3 regiones repetidas en la región 3' del gen *cagA* se asocian con un mayor daño histológico y con una reducida sobrevivencia en condiciones ácidas; además, las cepas de *H. pylori cagA* negativo son más resistentes al pH ácido del estómago en comparación con cepas de *H. pylori cagA* positivas.³⁰

En nuestro estudio se trató amplificar la región variable 3' del gen *cagA* con los iniciadores reportados para amplificar esta región variable como previamente lo reportó Yamaoka, Rota, Azuma en estudios similares pero sorprendentemente sin amplificación de ningún producto en cepas mexicanas, lo que se puede sugerir la presencia de la gran diversidad de diferencias nucleotídicas debido a que la secuencia de *H. pylori* tiene un bajo contenido de G + C que la hace muy susceptible a sufrir mutaciones.

Debido que no se logro realizar con éxito la amplificación de la región variable 3' del gen *cagA* con los iniciadores de Yamaoka *et al.* se decidió diseñar un par de iniciadores a partir de la secuencia de la cepa mexicana 53C5N para así obtener los iniciadores que amplificara correctamente la región variable 3' del gen *cagA* de cepas mexicanas, mediante el uso de los iniciadores GCRrv17 y GCR22 que amplifican de la posición 2,538 pb a 3,444 pb, por lo que se obtuvo productos de amplificación de la región variable de aproximadamente 906 pb y de 1,008 pb, debido a una repetición de 102 pb en el extremo 3' del gen.

Debido a que la amplificación de la región variable 3' no se tenía estandarizada con los iniciadores diseñados se decidió realizar una curva de estandarización de magnesio, en la que la concentración ideal para la amplificación fue de 1.5 mM de magnesio y se empleó esta concentración, ya que fue en la que no se observaron productos inespecíficos, además durante la elaboración del programa de amplificación se observó que la temperatura de alineamiento ideal de los iniciadores fue de 50° C.

Se trabajaron con aislamientos de *H. pylori* de las regiones anatómicas del estómago ya que se sabe que en distintas patología se ve predisuestas para el antro y el cuerpo del

estómago, las cuales fueron las regiones anatómicas en las que más se observaron los genotipos cortos amplificadas; así como, los aislamientos con la colonización mixta; se sabe que son genotipos que produce un gran daño histológico; además de que la inflamación es mayor en antro que en el cuerpo. *H. pylori* se suele distribuir en distintas regiones anatómicas del estómago; para los pacientes con gastritis predominantemente se localiza en antro y esta región tiende a presentar una secreción normal o elevada de ácido gástrico lo que podría incrementar el riesgo a desarrollar úlcera duodenal.

Cuando se tiene colonización en el cuerpo del estómago tienden a desarrollar inflamación que puede derivar en gastritis atrófica que induce a úlcera gástrica, esta región tiende a presentar una secreción normal o baja de ácido gástrico; se sabe que a lo largo de la infección se llevan a cabo cambios morfológicos importantes en mucosa gástrica, que puede ser una inflamación leve o bien desarrollo de la gastritis atrófica. Con ello iniciar una secuencia de eventos como son metaplasma intestinal y displasia que en muy raros casos llega a cáncer gástrico

Cabe mencionar que la mayoría de las personas infectadas con *H. pylori* logran tener solo una infección asintomática. La infección con *H. pylori* induce la formación de mucosa-asociada a tejido linfoide (MALT) en la mucosa gástrica. Durante la amplificación se observó la presencia de dos productos de amplificación uno de un tamaño de 906 pb y otro de 1,008 pb lo que coincidía con un estudio realizado por Yamaoka *et al.*²¹ En él se observó variantes de la región 3' del gen *cagA* aislado de pacientes japoneses en el que encontró cuatro tipos de estructura primaria de gen *cagA* (designados A, B, C, y D) dependiendo del

tipo y el número de repeticiones cabe resaltar que en este mismo estudio se encontró que el tipo C estaba presente principalmente en pacientes con cáncer gástrico.

De acuerdo a Yamaoka *et al.*²¹ las estructuras primarias, que él clasificó se sabe que la de tipo A es una estructura con una sola repetición del fragmento de 102 pb y que sería un fragmento corto, en cuanto a las estructura primarias B y D que son fragmentos medianos pueden tener dos repeticiones del fragmento de 102 pb de la región variable 3', en cuanto a la estructura primaria tipo D, se describió que esta es perteneciente a un fragmento largo que consta de 3 repeticiones del fragmento de 102 pb.

Karita *et al.*³⁰ analizó el tamaño de *cagA* basado en las secuencias en su estudio, en el que se observaron tres tipos de fragmentos que fueron clasificados en fragmento corto, mediano y largo esto de acuerdo a su tamaño; por lo que se decidió clasificar los fragmentos amplificados en este estudio de acuerdo a la clasificación de Karita *et al.*, y Yamaoka *et al.*²¹ se observaron principalmente dos diferentes tipos de genotipos uno de 906 pb y otro de 1,008 pb, basado principalmente en la clasificación de Karita *et al.*, el fragmento de 906 pb como un fragmento corto y el fragmento de 1,008 pb se clasificó como fragmento mediano, no encontrándose un fragmento largo en los aislamientos estudiados de las cepas mexicanas; así como también se observaron dos aislamientos con ambos genotipos corto y largo (906 pb y 1,008pb), lo que se atribuye a la presencia de dos cepas de *H. pylori* por la variabilidad de su región.

El genotipo corto fue el mayoritario de *cagA*, este fragmento es más resistente al pH ácido; además este se asoció fuertemente en antro, cuerpo y en pacientes con cáncer. El genotipo

corto se presentó con un alto grado de proliferación celular con la presencia de un gran infiltrado inflamatorio.

Por lo que en los aislamientos clínicos de cepas de *H. pylori* se observaron principalmente dos tipos de estructuras primarias de la región variable 3' del gen asociado a la citotoxina *cagA* y se decidieron clasificar de acuerdo a su tamaño como fragmentos cortos a los que tienen un peso de 906 pb y a los fragmentos con un peso de 1008 pb se decidieron clasificar como fragmentos medianos.

Doyle *et al.* reportaron que la diversidad en la región variable del gen *cagA* de *H. pylori* se debe a una repetición en la secuencia de un fragmento de 102 nucleótidos; esta repetición se observó comparando el tamaño de los productos de PCR obtenidos de 54 diferentes aislamientos de *H. pylori*, los iniciadores designados para amplificar a *cagA* se esperaba obtener un producto de alrededor de 1,059 nucleótidos y se observó que los productos variaban considerablemente de 1,110 a 1,822 nucleótidos, pero la mayoría estaban alrededor de 1,335 nucleótidos, se secuenciaron 9 productos de PCR representativos y otros 4 de secuencia conocida para compararlos y se observó que dentro de la región variable, del gen *cagA*, había dos regiones adyacentes variables, una distal y una proximal; la región proximal presenta un motivo con 4 a 6 residuos de asparagina y 7 aminoácidos repetidos en la secuencia (KIDQLNQ); la región distal está entre la secuencia KIDQLNQ y una duplicación bien conservada de esta.^{13, 28, 30}

En un estudio donde se analizó el tamaño de *cagA* basado en las secuencias repetidas se estudiaron cepas de *H. pylori cagA* positivas aisladas de cuerpo y antro de distintas patologías

del estomago por medio de PCR se encontró un patrón de repetición en la región variable 3' estos tipos de fragmentos fueron clasificados en fragmentos cortos (970 pb), fragmento mediano (1,100 pb) y fragmento largo (1,300 pb) además estas cepas con este tipo de fragmentos se estudio su resistencia al pH donde se encontró que las cepas con el fragmento corto son más resistentes al pH ácido comparado con las cepas con fragmentos largos la presencia del fragmento largo se asocia a un mayor daño histológico.³⁰

Higashi *et al.*²⁰, estudiaron la actividad biológica de CagA determinando que la variación en los sitios de fosforilación de la tirosina, en la que observó a CagA fosforilada midiendo la actividad de la fosfatasa específica SHP-2, la cual induce la transformación morfológica de células. Se observo que las proteínas CagA de cepas de *H. pylori* aisladas de Occidente tiene una sucesión de 34 aminoácidos que se repite variablemente entre estas cepas. En este estudio se vio que esta repetición contiene sitios de fosforilación de la tirosina.^{28, 29} Se observo que las cepas que contenían mas sitios de fosforilación de la tirosina exhibían más actividad de fosfatasas SHP-2 e inducía mayores cambios morfológicos en las células gástricas; también se observo que los aislamientos de *H. pylori* de Asia Oriental en donde el cáncer gástrico es mas predominante se encontró que las regiones de fosforilación de la tirosina correspondían a los aislamientos de CagA de Occidente^{26, 27}, lo que nos indica que si se tienen más sitios de fosforilación de tirosina puede ser un predictor para individuos que desarrollen cáncer gástrico.²⁰

En el este de Asia se observó que había una unión más alta de SHP-2 y más cambios morfológicos en las células gástricas que en el Occidente.²⁷ Lo que indica que en este estudio se encontró la importancia del potencial de CagA con la célula huésped, que determina el grado de unión a SHP-2, la cual depende del número y repeticiones de los sitios de fosforilación de la tirosina, lo que ayuda a comprender las diferencias de las cepas en regiones y prevalencia de una patología de una región a otra.^{28,32}

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Los genotipos de *cagA* mediante la amplificación de la región variable 3' de *Helicobacter pylori* aislado de pacientes mexicanos fueron determinados.
- El fragmento *cagA* con el genotipo corto fue el más prevalente de todos los aislamientos.
- El genotipo corto de *cagA* se encontró principalmente en la región anatómica del estomago de antro y cuerpo, el genotipo de *cagA* mediano se encontró principalmente en fondo.
- La combinación de genotipos cortos y medianos de *cagA* se identificó principalmente en cuerpo.
- La coinfección con diferentes genotipos de *cagA* se observó en algunos pacientes.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

Numerosos estudios han mostrado que las cepas de *H. pylori* con fragmentos largos en la región variable del gen *cagA* son más virulentas que las cepas con fragmentos cortos. Sin embargo, en nuestro estudio se observó un predominio del fragmento corto, por lo que la detección de la región variable parece ser un buen predictor de enfermedad en la infección por *H. pylori*. Por otro lado, la diversidad en la secuencia de aminoácidos en los sitios de fosforilación de tirosina de la proteína CagA, pueden proveer una de las más importantes variables en el resultado de la infección por *H. pylori*, por lo que deberá determinarse si las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con cáncer gástrico presentan una mayor grado de fosforilación de tirosina en la proteína, comparadas con cepas aisladas de gastritis crónica y úlcera péptica. Así como también, determinar si existe alguna relación con la diversidad de los motivos de fosforilación de tirosina en la proteína CagA.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Mobley HM, Mendz G.M, Hazell SH. Overview. *Helicobacter pilory: Physiology and Genetics*. 2001. Capitulo 1. pág. 3-6.
2. Mitchell HM. Epidemiology of Infection; *Helicobacter pilory: Physiology and Genetics*.2001. Capitulo 2. Pág. 7-18.
3. Syerbaums SS, Michetti PM. *Helicobacter pylori* Infection; Review article. N Engl Med 2002;347:1175-1186.
4. Censini SC, Stein MS, Covacci A. Cellular responses induced after contact with *Helicobacter pylori*. Curr Opin Microbiol 2001;4:41-46.
5. Percivla LPA, Wadstrom TW. Basic Bacteriology and Culture. *Helicobacter pilory: Physiology and Genetics*. 2001. Capitulo 4. Pág. 27-38.
6. Blaser M, Atherton JA. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. J Clin Investig 2004;113:321-333.
7. Castillo G, Mazari M, Lopez Y. *Helicobacter pylori*: Focus on CagA and VacA major virulence factors. Salud Publica Mex 2004;46:538-548.
8. Masahiro A, Antonia S, Toshiro S, David G. Gastric Cancer. *Helicobacter pilory: Physiology and Genetics*. 2001. Capitulo 40. Pág. 481-491.
9. Leung W, Lin S, Ching Y, Chan L, Lau JYW, Sung JJY. Factors predicting progression of gastric metaplasia: results of a randomized trial on *Helicobacter pylori* eradication. Gut 2004;54:1244-1249.

10. Mobley HM. Urease. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. 2001. Capítulo 16. Pág. 179-191.
11. Alm R, Nooan B. The Genome. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. 2001. Capítulo 27. Pág. 1295-1311.
12. Wang G, Humayun Z, Taylor DE. Mutation as an origin of genetic variability in *Helicobacter pylori*. Trends Microbiol 2000;8:57-68.
13. Evans D, Queiroz D, Mendez E. Diversity in the Variable Region of *Helicobacter pylori* *cagA* Gene Involves More Than Simple Repetition of a 102-Nucleotide Sequence. Biochem Biophys Res Comm 1998;245:780-784.
14. Ikenove T, Maeda S, Ogura K, Mitsuno Y, Imai Y, Haruhiko Y, Yasushi S, Masao O; Determination of *Helicobacter pylori* Virulence by Simple Gene analysis of the *cag* pathogenicity island. Clin Diag Lab Immunol 2001;8:181-187.
15. Laila A, Silja W, Tanja H, Sabine K, Wolfgang F, Christian W, Rainer H, Albert R. Analysis of the type IV secretion system-dependent cell motility of *Helicobacter pylori*-infected epithelial cells. Biochem Biophys Res Comm 2004;322:860-866.
16. Kist A, Rappuoli R, Covacci A. The *cag* pathogenicity Island; *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. 2001. Capítulo 31. Pág. 345-353.
17. Peters TM, Owen RJ, Slater E, Varea R, Teare EL, Saverymuttu S. Genetic diversity in the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island and effect on expression of anti-CagA serum antibody in UK patients with dyspepsia. J Clin Pathol 2001;54:219-223.
18. Akopyants N, Clifton S, Kersulyte D, Crabtree J, Youree B, Reece A, Bukanov N, Drazek S, Berg D. Analysis of the *cag* Pathogenicity Island. Mol Microbiol 1998;28:37-53.

19. Yamaoka Y, El-Zimaity HM, Gutierrez O, Figura N, Kim JG, Kodama T, Kashima K, Graham DY. Relationship between the *cagA* 3' repeat region of *Helicobacter pylori*, gastric histology, and susceptibility to low pH. *Gastroenterol* 1999;117:342-349.
20. Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, Hatakeyama M, Yamaoka Y, El-Zimaity HM, Gutierrez O, Figura N, Kim JG, Kodama T, Kashima K, Graham DY. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:14428-14433.
21. Yamaoka Y, Kodomo T, Kashimik K, Sepulveda AR. Variants of the 3' Region of the *cagA* Gene in *Helicobacter pylori* Isolates from Patients with Different *H. pylori*-Associated Diseases. *J Clin Microbiol* 1998;36:2258-2263.
22. Rota C, Pereira JC, Blaya C, Boyer M. Consensus and Variable Region PCR Analysis of *Helicobacter pylori* 3' Region of *cagA* Gene in Isolates from Individuals with or without Peptic Ulcer. *J Clin Microbiol* 2001;39:606-612.
23. Takeshi A, Akiyo Y, Shiho Y, Kanako F, Masahiro O, Yoshiyuki I, Yukinao Y, Masaru K. Correlation between Variation of the 3' Region of the *cagA* Gene in *Helicobacter pylori* and Disease Outcome in Japan. *J Infec Dis* 2002;186:1621-1630.
24. Backerts S, Scharz TS, Mienlke S, Kisk C. Functional Analysis of the *cag* Pathogenicity Island in *Helicobacter pylori* Isolates from Patients with Gastritis, Peptic Ulcer, and Gastric Cancer. *Infect Immun* 2004;72:1043-1056.
25. Yong Z, Shu Z, Qin D, Ke-Da Q, Ping-Chu F. Characterization of CagA variable region of *Helicobacter pylori* isolates from Chinese patients. *J Gastroenterol* 2005;11:880-884.

26. Zhou W, Yamazaki S, Yamakawa AA, Higashi H, Ohtani M, Yoshiyuki I, Yoshihide K, Jianmin S, Takeshi A; The Diversity of *vacA* and *cagA* genes of *Helicobacter pylori* in East Asia. *FEMS Immun Med Microbiol* 2003;40:81-87.
27. Kersulyte D, Mukhopahyay A, Velapatiño B, Wanwen S, Zhinjun P, Claudia G, Hernandez V, Valdez Y, Mistry RS, Gilman RH, Yuan Y, Gao H, Alarcon T, Lopez-Brea M, Balakrish Nair G, Chowdhury A, Datta S, Shirai M, Nakazawa T, Ally R, Segal I, Wong BC, Lam SK, Olfat FO, Boren T, Engstrand L, Torres O, Schneider R, Thomas JE, Czimn S, Berg DE. Differences in Genotypes of *Helicobacter pylori* from Different Human Populations. *J Bacteriol* 2000;182:3210-3218.
28. Momoyo A, Takeshi A, Shigeji I, Yoshiyuki I, Hiroyuki S, Yukifumi N, Misao T, Yumi T, Shin M, Masao O, Toshihiko S. *Helicobacter pylori* CagA Protein Can Be Tyrosine Phosphorylated in Gastric Epithelial Cells. *J Exp Med* 2000;191:593-602.
29. Richard H, Youli Z, John C. Simple Method for Determination of the Number of *Helicobacter pylori* CagA Variable-Region EPIYA Tyrosine Phosphorylation Motifs by PCR. *J Clin Microbiol* 2005;43:791-795.
30. Karita M, Matsumoto S, Kamei T. The Size of *cagA* Based on Repeat Sequence has the Responsibility of the Location of *Helicobacter pylori* in the Gastric Mucus and Degree or Gastric Mucosal Inflammation. *Microbiol Immunol* 2003;47:619-630.
31. Montecucco C, Rappuoli R. Living Dangerously: How *Helicobacter pylori* Survives in the Human Stomach. *Nature Rev* 2001;2:457-465.
32. Parkin DM, Laara E, Muir CS. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int J Cancer* 1988;41:184-197.

ANEXO

ANEXO

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Las técnicas de DNA recombinante se desarrollaron a principios de la década de los 70's, y en los años posteriores revolucionaron la manera en que los genéticos y los biólogos moleculares dirigían las investigaciones. En 1986, se desarrollo una nueva técnica denominada reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que ha revolucionado enormemente el poder de la investigación del DNA recombinante. El análisis de PCR ha encontrado aplicaciones en un amplio abanico de disciplinas, entre las que se encuentran la biología molecular, la genética humana, la evolución, e incluso la medicina forense.

Uno de los prerequisites para muchas de las técnicas de DNA recombinante es la disponibilidad de grandes cantidades de un segmento específico de DNA. Estos se obtenían a menudo después de un trabajo intensivo y tedioso de clonación y reclonación. El PCR permite la amplificación directa de segmentos de DNA específicos sin clonación, y puede utilizarse en fragmentos de DNA que estén presentes, inicialmente, en cantidades infinitesimalmente pequeñas. El método de PCR se basa en la amplificación de un segmento de DNA utilizando *Taq* DNA polimerasa y oligonucleótidos que hibridan con la cadena complementaria a la secuencia a amplificar. Hay tres pasos fundamentales en la reacción de PCR, la cantidad de DNA amplificado producido sólo está limitado, en teoría, por el número de veces que se repiten estos pasos.

1.-Primero, el DNA que se requiere amplificar se desnaturaliza en cadenas sencillas. Este DNA no necesita estar ni purificado ni clonado, y puede provenir de distintas fuentes, incluyendo DNA geonómico, muestras forenses como sangre seca o semen; muestras almacenadas en registros médicos, pelos, restos momificados, y fósiles. El DNA de doble cadena se desnaturaliza por calor (a unos 90° C) hasta que se disocia en cadenas sencillas (normalmente unos 5 minutos).

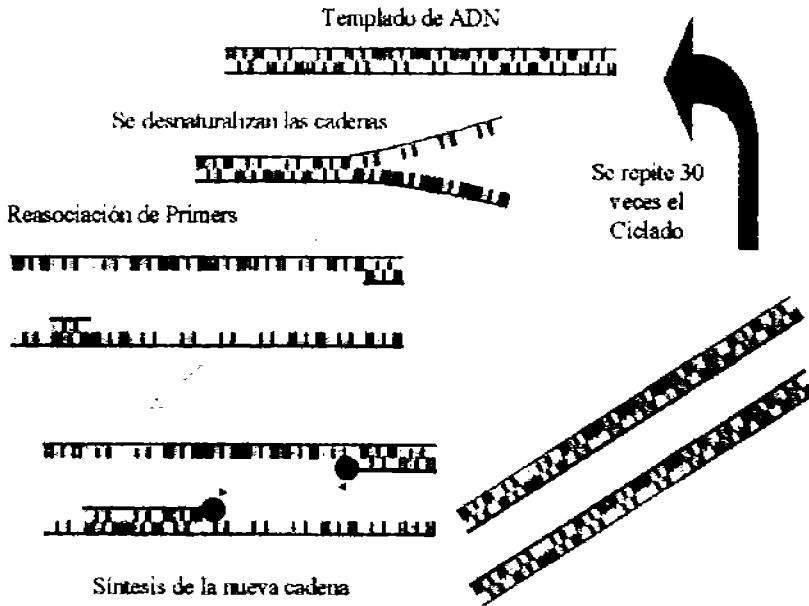
2.-Los cebadores hibridan al DNA de cadena sencilla. Estos cebadores son oligonucleótidos sintéticos que hibridan con las secuencias flanqueantes del segmento a amplificar. Generalmente se utilizan dos cebadores diferentes. Cada uno de ellos tiene la secuencia complementaria a una de las dos cadenas del DNA. Los cebadores se alinean con sus extremos 3' encarados ya que hibridan a cadenas opuestas. La utilización de cebadores sintéticos significa que se debe tener alguna información de la secuencia de DNA a amplificar.

3.-A la mezcla de reacción se le añade una *Taq* DNA polimerasa resistente al calor. La polimerasa extiende los cebadores en dirección 5'-3', utilizando como molde al DNA de cadena sencilla unido al cebador. El producto es una molécula de DNA de doble cadena con los cebadores incorporados en el producto final.

Cada grupo de tres pasos (desnaturalización del producto de doble cadena, hibridación de los cebadores, y extensión por la polimerasa) se denomina ciclo. Generalmente, cada paso del ciclo se realiza a una temperatura diferente. El ciclo puede repetirse llevando a cabo

otra vez todos los pasos. Empezando con una molécula de DNA, el primer ciclo produce dos moléculas de DNA, dos ciclos producen cuatro, tres ciclos producen 8, etcétera.

Veinticinco ciclos amplifican varios millones de veces el DNA en cuestión. El proceso es automático y se utiliza una maquina denominada Termociclador, que puede programarse para realizar un número predeterminado de ciclos, produciéndose grandes cantidades de segmentos de DNA amplificado en unas pocas horas.



Bibliografía:

Klug W, Cummings M. Conceptos de Genética. 5ª edición. Prentice Hall. Pág. 475-479.