



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**DETERMINACION DE LOS GENES *vacA* Y *cagA*
DE *Helicobacter pylori* EN PACIENTES CON DIVERSAS ENFERMEDADES
GASTRODUODENALES**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A:
BLANCA AZUCENA GARCIA ALCANTARA

ASESORES:
Q.F.I ANDREA BECERRIL OSNAYA
M. EN C. MARGARITA CAMORLINGA PONCE



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.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por todo.

Gracias Dra. Margarita Camorlinga Ponce, por brindarme la oportunidad de realizar tesis en el laboratorio de la UIMEIyP, por la enseñanza y asesoría.

Gracias profesora Andrea Becerril por el apoyo y tiempo brindado desde Bacteriología Diagnóstica hasta la asesoría de la tesis.

Gracias por los conocimientos, consejos, comprensión y paciencia de Dr. Gerardo González Valencia, Adriana, Carolina, Araceli, Irma, Normita y Carmina.

DEDICATORIAS

A los forjadores de mi esencia: **A mis padres**, por darme fe, esperanza, amor y sobre todo la oportunidad de lograr mis sueños a costa de los suyos.

A Raquel y Lorena: Dueñas de mí fuerza y debilidad. Raquel por ser compañera y amiga en todo momento. Lorena por ser motivación y luz en la oscuridad “mí pequeña niña”.

A David: Mí querido sobrino.

A Mineli: una verdadera amiga es quien te toma de la mano y te toca el corazón. Tu ejemplo siempre me sirvió para continuar.

Dedicada a Iván, por combatir mí pesimismo y animarme cuando ya no creía poder continuar.

Por aplazar los trámites de titulación y estar en los últimos pasos para llegar al examen profesional por eso y mas: Luis.

Por haber hecho agradable mí estancia en FES-C en CMN SXXI y Cuautitlán Izcalli: Carlos Eduardo, Magda, Miriam, Felipe, Celia, Jeimy, Angeles, Raquel, Esmeralda, Humberto, Hugo Enrique y Jonathan Pais.

Dedicada a las personas que me enseñaron a trabajar bajo presión y en algún momento formaron parte importante en mí vida, pero ahora son una canción desterrada del alma, viento en el mar de un recuerdo (Maritere, Julio, Luis y Paty).

Dedicada al esfuerzo de todos aquellos que presentaron el examen de selección por obtener el lugar que ocupe en la Universidad, el cual no fue desaprovechado.

A todos los que lean la tesis. “A todos pertenece lo que piensas. Solo es tuyo lo que sientes. Si quieres que sea tuyo lo que piensas habrás de sentirlo” (Schill).

INDICE

| | |
|---|----|
| Abreviaturas..... | 05 |
| 1.- Introducción..... | 06 |
| 1.1 Cronología..... | 06 |
| 1.2 Generalidades..... | 08 |
| 1.3 Taxonomía..... | 09 |
| 1.4 Componentes..... | 10 |
| 1.5 Genética..... | 11 |
| 1.6 Transmisión..... | 12 |
| 1.7 Patogénesis..... | 13 |
| 1.8 Factores de virulencia..... | 15 |
| 1.9 Manifestaciones clínicas..... | 22 |
| 1.10 Epidemiología..... | 23 |
| 1.11 Diagnóstico..... | 24 |
| 1.12 Tratamiento..... | 26 |
| 2.- Planteamiento del problema..... | 27 |
| 3.- Objetivos..... | 28 |
| 4.- Hipótesis..... | 29 |
| 5.- Material y métodos..... | 30 |
| 5.1 Antecedentes de la muestra..... | 30 |
| 5.2 Material..... | 31 |
| 5.3 Esquema de trabajo..... | 34 |
| 5.4 Métodos..... | 36 |
| 6.- Resultados..... | 40 |
| 6.1 Resultados generales..... | 40 |
| 6.2 Resultados de los alelos s1/s2 y m1/m2 de <i>vacA</i> por cepa..... | 47 |
| 6.3 Frecuencia de la región 3' de <i>cagA</i> , la relación entre genotipo <i>vacA</i> y <i>cagA</i> y de la variación de tamaño de la región 3' de <i>cagA</i> por cepa..... | 51 |
| 6.4 Resultados de electroforesis en azarosa de productos de PCR... | 55 |
| 6.5 Ejemplo de secuenciación de la región 3' de <i>cagA</i> de la cepa clínica 372-S3-C3 de <i>H. pylori</i> proveniente de un paciente que padece úlcera duodenal..... | 57 |
| 7.- Discusión..... | 58 |
| 8.- Conclusiones..... | 62 |
| 9.- Referencias..... | 63 |
| 10.- Anexos..... | 67 |

ABREVIATURAS

CagA: Proteína del antígeno asociado a la toxicidad

cagA: Gen del antígeno asociado a la toxicidad

cagA PAI: Isla de patogenicidad de cagA

BabA: Proteína de adhesión al grupo sanguíneo antigénico Le^b (Lewis)

babA: Gen de adhesión al grupo sanguíneo antigénico Le^b

DGA: Displasia gástrica

dNTPs: Deoxinucleótidos

GCA: Gastritis crónica atrófica

H.pylori: *Helicobacter pylori*

KDa: Kilo dalton

Kb: Kilo base

Mb: Mega base

m1 vacA: Alelo de la región media tipo 1 de vacA

m2 vacA: Alelo de la región media tipo 2 de vacA

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

s1 vacA: Alelo de la región señal tipo 1 de vacA

s2 vacA: Alelo de la región señal tipo 2 de vacA

TPMs: Motivos de fosforilación en tirosina

VacA: Proteína citotóxica vacuolizante

vacA: Gen citotóxica vacuolizante

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 CRONOLOGÍA

Los primeros datos reportados de *Helicobacter* datan de 1893, Bizzorezo en Turín trabajando con perros reportó “espiroquetas” habitando glándulas gástricas y a nivel de canículos de las células parietales. Ahora se sabe que las “espiroquetas” observadas fueron *Helicobacter canis*, *Helicobacter felis* y *Helicobacter heilmanni*.

Freedberg y Baron en 1940, localizaron al microorganismo en mucosa gástrica de macacos en los Estados Unidos.

Entre 1950 y 1960, Susumo Ito de Harvard Medical School, realizó una descripción anatómica detallada de la mucosa gástrica en microscopio electrónico. Posteriormente publicó fotografías de un microorganismo espiral con flagelos (1967).

En Australia en 1979, Warren Robin observó en la mucosa gástrica de pacientes, un microorganismo de forma espiral al mismo tiempo él y Marshall Barry empezaron un estudio en pacientes con varios síntomas gastrointestinales. Ya en 1981 al usar endoscopia se demostró era Gram-negativa la bacteria.¹ Gracias a este descubrimiento los doctores Marshall y Warren ganaron el premio Nóbel de Medicina en 2005.

Faltaba aislar a la bacteria, fue posible hasta que los investigadores olvidaron los cultivos de biopsias gástricas en la incubadora en Semana Santa y los revisaron hasta el cuarto o quinto día de incubación, al revisar las cajas observaron colonias transparentes (1mm). Posteriormente el bacilo se creció en agar sangre en un ambiente microaerofílico.

El organismo fue cultivado fuera de Australia en septiembre de 1983 por McNulty y Skirrow de un paciente con ulcera gástrica en Warchester, Inglaterra.

En un principio se le consideraba como parte de la familia *Campylobacter*. El microorganismo es parecido a *Campylobacter* en varios aspectos; en la morfología curva, crecimiento en medio rico y en ambiente microaerofílico y sensible a metronidazol. De esta manera en 1985 se conocía como *Campylobacter pyloridis*. En 1987 se tomó la etiología correcta derivada del vocablo latín *pylorus* siendo conocido como *Campylobacter pylori*.

Marcadas diferencias de *Campylobacter pylori* a *Campylobacter spp.* Sugirieron no pertenecía al mismo género. *C. pylori* contiene flagelos en un solo polo y *Campylobacter spp* tiene flagelos en sus dos polos. Otra diferencia es que *C. pylori* contiene una proteína de banda mayor y ácidos grasos.

Subsecuentemente en análisis de secuenciación de 16rRNA mostraron diferencias entre *C. pylori* del verdadero genero *Campylobacter*, por esto en 1989 se clasificó como *Helicobacter pylori*.

Otros datos importantes son los estudios de investigación posteriores, destacando los referentes a la proteína VacA. En 1988, Leunk y colaboradores descubrieron que en un sobrenadante de *H. pylori* existía degeneración vacuolar de varias líneas celulares de mamíferos. Se reconoce una actividad citotóxica, factor importante que induce la enfermedad. En 1992 fue purificada la proteína y nombrada Vacuola Citotóxica. En 1994 se determinó la secuencia amino terminal de la proteína, clonada y secuenciada del gen, designado como *vacA*.¹

En 1994 se clasificó por The World Health Organization Agency a *H. pylori* como un agente carcinogénico clase 1.²

En agosto de 1997 se publicó la secuencia completa del genoma de *H. pylori* 26695. Posteriormente en enero de 1999, se secuenció el genoma completo de J99, otra cepa de *H. pylori*, permitiendo la comparación de los genomas.³

1.2 GENERALIDADES

H. pylori es una bacteria Gram-negativa. Su morfología microscópica es de forma curva, espiral o fusiforme. Se ha reportado que *H. pylori* puede presentar también forma cocoide (in vitro), esto depende de las condiciones a las que se exponga (cultivos viejos, expuestos a aire, pH alcalino y a tratamiento con antibióticos), la forma cocoide no es cultivable pero es viable y metabólicamente activa, se asocia a una forma de resistencia.⁴ El bacilo *H. pylori* mide 0.6 x 3.5 μ m tiene de 4-8 flagelos unipolares de aproximadamente 2.5 μ m de largo, dándole la propiedad de motilidad.

Crece sobre agar sangre de carnero o caballo, en una atmósfera microaerofílica aproximadamente al 10% de CO₂. No crece en condiciones anaeróbicas, y su temperatura ideal es a 37° C, su morfología colonial en medio sólido es de colonias pequeñas, lisas y translúcidas. Es incapaz de crecer en presencia de ácidos biliares. Es ureasa, catalasa y oxidasa positiva. La bacteria presenta un patrón característico de ácidos grasos definidos como patrón cromatográfico del grupo G.

1.3 TAXONOMIA

La familia Helicobacteriaceae (del latín *helicos* espiral y *bacitros* bacilo) se distingue como tal de acuerdo al análisis de las secuencias 16SrDNA/rRNA y se establece la superfamilia rRNA VI, que incluye a los bacilos Gram-negativo curvos. En el análisis filogenético se toma en cuenta la secuencia 23rDNA para separar la superfamilia rRNA VI en *Campylobacter* (rRNA del grupo I), *Arcobacter* (rRNA del grupo II) y *Helicobacter* (rRNA del grupo III).¹ El análisis filogenético usando secuencias de 16SrDNA de *Campylobacter* justifica la formación de un nuevo género.

El árbol filogenético de *Helicobacter*, consta de 18 especies 2 especies candidatas y 9 adicionales, basadas en la secuencia de 16rRNA.¹

| Tabla 1.1 Especies de Helicobacter hospedero y sitio de infección | | |
|---|-----------------------------|----------------------------|
| Especie | Hospedero | Sitio de infección |
| <i>H. pylori</i> | <i>Primate</i> | <i>Estomago</i> |
| <i>H. nemestrinae</i> | <i>Macaco</i> | <i>Estomago</i> |
| <i>H. bizzozeronii</i> | <i>Perro, humano</i> | <i>Estomago</i> |
| <i>H. heilmannii</i> | <i>Algunos mamíferos</i> | <i>Estomago</i> |
| <i>H. felis</i> | <i>Gato, perro</i> | <i>Estomago</i> |
| <i>H. mustelae.</i> | <i>Ferret</i> | <i>Estomago</i> |
| <i>H. salomonis</i> | <i>Perro</i> | <i>Estomago</i> |
| <i>H. rappini</i> | <i>Algunos mamíferos</i> | <i>Intestino, estomago</i> |
| <i>H. hepaticus</i> | <i>Ratón</i> | <i>Intestino, hígado</i> |
| <i>H. bilis</i> | <i>Ratón, perro, humano</i> | <i>Intestino, hígado</i> |
| <i>H. rodentide</i> | <i>Ratón</i> | <i>Intestino</i> |
| <i>H. canis</i> | <i>Perro</i> | <i>Intestino</i> |
| <i>H. fennellide</i> | <i>Humano</i> | <i>Intestino</i> |
| <i>H. pollorum</i> | <i>Pollo</i> | <i>Intestino</i> |
| <i>H. pemetensis</i> | <i>Aves</i> | <i>Intestino</i> |

*Tomada de Principles of bacterial patogenesis pag 520

1.4 COMPONENTES

FLAGELO. El flagelo le confiere motilidad a *H. pylori* y capacita al microorganismo a moverse en su nicho ecológico en la capa mucosa del epitelio gástrico. La bacteria posee de 4 a 8 flagelos unipolares, cada uno mide aproximadamente 2.5 μ m de largo y 30nm de diámetro. El flagelo de *H. pylori* está compuesto de tres elementos estructurales típicos de bacterias entericas: el cuerpo basal, filamento flagelar y gancho. El cuerpo basal está implantado en la pared celular y le da la función de rotación y quimiotaxis. El filamento flagelar funciona como un propel y está constituido de subunidades repetidas de 2 polipeptidos FlaA (53KDa) y FlaB(54KDa). El gancho se encuentra entre el cuerpo basal y el filamento flagelar y contiene una proteína FlgE (78KDa).

PEPTIDOGLICAN. La peptidoglicana de *H. pylori* difiere sustancialmente de *E.coli*. *H. pylori* contiene una alta proporción de muropeptido con un péptido del lado terminal de la cadena en glicina y contiene ácido (1-6)-anhydro-N-acetilmurámico. Carece de lipoproteínas y muropeptidos trimericos.

ACIDOS GRASOS. El contenido de ácidos grasos de *H. pylori* fue uno de los criterios de la exclusión de *H. pylori* del género *Campylobacter*. Los ácidos grasos detectados en *H. pylori* fueron ácido mirístico, ácido palmitico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido β -hidroxipalmitico, ácido graso 19-carboxiclopropano y ácido β -hidroxiestearico.

LÍPIDOS. El contenido lipídico de *H. pylori* consiste en 6% de lípidos neutros, 20.6% de glicolípidos y 73.4% de fosfolípidos correspondientes a fosfatidiletanolamina, cardiolipina y fosfatidilglicerol y en menor cantidad fosfatidilserina. Contiene también tres géneros de glucosidos de colesterol que forman el 25% del total de lípidos. La presencia de glucosidos de colesterol son una característica única de la membrana de *Helicobacter spp.*

LIPOSACARIDO (LPS). EL LPS o endotoxina juega importante rol en la inducción de la respuesta inmune del hospedero vía CD4 mediada por receptores Toll-like (4 estructuras presentes sobre la superficie de leucocitos); además contiene antígenos Lewis x y Lewis y, al expresar antígenos del huésped en su superficie, *H. pylori* puede evadir respuesta inmune. El LPS también estimula la liberación de histamina, lo que incrementa la liberación de ácido.

El LPS está compuesto de lípido A, cadena O y un core (oligosacáridos). El lípido A contiene D-glucosamina, fosfato, etanolamina y ácidos grasos hexadecanoicos, 3-hidroxihexadecanoico, 3-hidroxioctadecanoico y tetradecanoico. *H. pylori* se caracteriza por la ausencia de ácido 3-hidroxitetradecanoico.

OMPs. Las proteínas de membrana externa (OMPs) en *H. pylori* ejecutan funciones esenciales para el metabolismo, mantienen la permeabilidad selectiva de la membrana

externa como a antibióticos. Entre estas se encuentra VacA, CagA, porina (HopA, HopB, HopC, HopE, HopZ), adhesinas (BabA, AlpA, AlpB) y Heme-binding (se unen al grupo hemo).¹

1.5 GENÉTICA

H. pylori posee un cromosoma circular de aproximadamente 1.6-1.7Mb. Se conoce actualmente el genoma completo de dos cepas de *H. pylori*: la cepa 26695 y la cepa J99, siendo diferente el número de pares de bases en ellas (1, 667,867pb y 1, 643,831pb respectivamente). El contenido promedio de G + C en ambas cepas es del 39%.

Han reportado plásmidos (1.5 a 40Kb) en 40% de los aislamientos. *H. pylori* posee dos diferentes secuencias de inserción IS605 y la IS606; la IS605 se ha asociado a genes de virulencia, además se ha encontrado en las cepas de referencia (NCTC11638 y 26695).¹

Los dos genomas secuenciados contienen dos copias de los genes 16S y dos juegos de los genes 5S-23S del ARN ribosomal, además la cepa 26695 contiene un gen extra del 5S ARNr. Ambos genomas codifican para 36 especies de ARNs de transferencia.¹

Las secuencias del genoma de las cepas J99 y 26695 revelan que la mayoría de los genes son altamente conservados y solo aproximadamente el 6% de los genes que se localizan en una cepa no se encuentran en la otra. Los genes específicos de cepa se encuentran en dos regiones del genoma, en la isla de patogenicidad (*cag* PAI) y la zona variable de plasticidad.³⁴

Existe diversidad en la estructura genómica de las cepas de *H. pylori*, siendo notable en cepas Japonesas en comparación a cepas Norte Americanas. La alta variabilidad puede atribuirse a las mutaciones y recombinación, por la variabilidad alelica dentro de diversos genes (por ejemplo *vacA*) y la presencia de fragmentos de DNA no conservados entre diferentes cepas (por ejemplo *cag* PAI).

1.6 TRANSMISIÓN

Existen varias hipótesis de cómo se transmite la infección. La infección por *H pylori* se adquiere en la infancia, se asocia al contacto cercano con individuos infectados, específicamente por la relación con la madre, el padre y otros niños infectados.

Se descarta la posible existencia de reservorios animales por tanto no existe una zoonosis. Sugiriendo que la manera de transmisión es de persona a persona (oral-oral, fecal-oral o iatrogénica).⁵

La ruta de transmisión oral-oral se sustenta en que se ha identificado DNA de la bacteria de saliva, lengua, paladar, cavidad oral y placa dental, considerándose esta última un potencial reservorio. La vía iatrogénica es un problema ocupacional solo si no existe la correcta desinfección de tubos de endoscopia que han tenido contacto con la mucosa gástrica.⁵

Matay et al. reporta que la leche materna juega un importante papel en la protección contra la adquisición de *H. pylori*, aunque Kitagawa et al. de muestra que si la madre no lava pezones y manos, la infección puede ocurrir de manera horizontal.^{6 y 7}

1.7 PATOGENESIS

El hospedero cuenta con mecanismos que le permiten evitar la colonización bacteriana en el estomago tales como:

- La presencia de ácido gástrico
- El movimiento peristáltico
- El desprendimiento de células
- La capa mucosa.

Un factor importante en la colonización que posee *Helicobacter pylori* es la metaloenzima ureasa que le permite neutralizar el pH estomacal. La ureasa es un hexadimero constituido por dos subunidades UreA y UreB (26.5KDa y 60.3KDa respectivamente), además contiene dos iones Ni^{2+} en el sitio activo.¹ La ureasa cataliza la hidrólisis de urea en amonio y CO_2 . El amonio neutraliza el ácido clorhídrico del estómago, ocasionando transitoriamente aclorhidria en consecuencia un pH neutro; el amonio forma una nube alcalina alrededor de la bacteria. Esto permite que *H. pylori* se movilice y atraviese la capa mucosa para llegar al epitelio gástrico. La presencia de flagelos le permite moverse.

H. pylori puede degradar la capa mucosa gracias a enzimas como mucinasas, proteasas o fosfolipasas llegando de esta manera al epitelio gástrico donde el pH es mas alto que en el lumen.

H. pylori se adhiere al epitelio gástrico gracias a las adhesinas que se unen específicamente a receptores (receptor-ligando). Estudios histológicos sugieren que la mayoría de *H. pylori* viven libres en el moco y menos del 25% se adhieren al epitelio. Para lograr la adherencia *H. pylori* cuenta con proteínas de membrana externa como son HopZ, BabA, AlpA y AlpB, así como hemaglutininas. BabA2 es un factor de adherencia que no se expresa en todas las cepas, se asocia más a las cepas de mayor virulencia, sugiriendo que no son esenciales para la colonización. BabA se une al grupo sanguíneo antigenico Le^b (\square -1,3/4-difucosilado) expresada en la superficie del epitelio gástrico (también en eritrocitos). Las proteínas AlpA y AlpB tienen la función de porina y adhesina; Hop2 se comporta como adhesina y no funciona como porina.

El LPS también participa en la adherencia, puede expresar moléculas que se unen a antígenos Le^x que se encuentran en la superficie del epitelio gástrico.

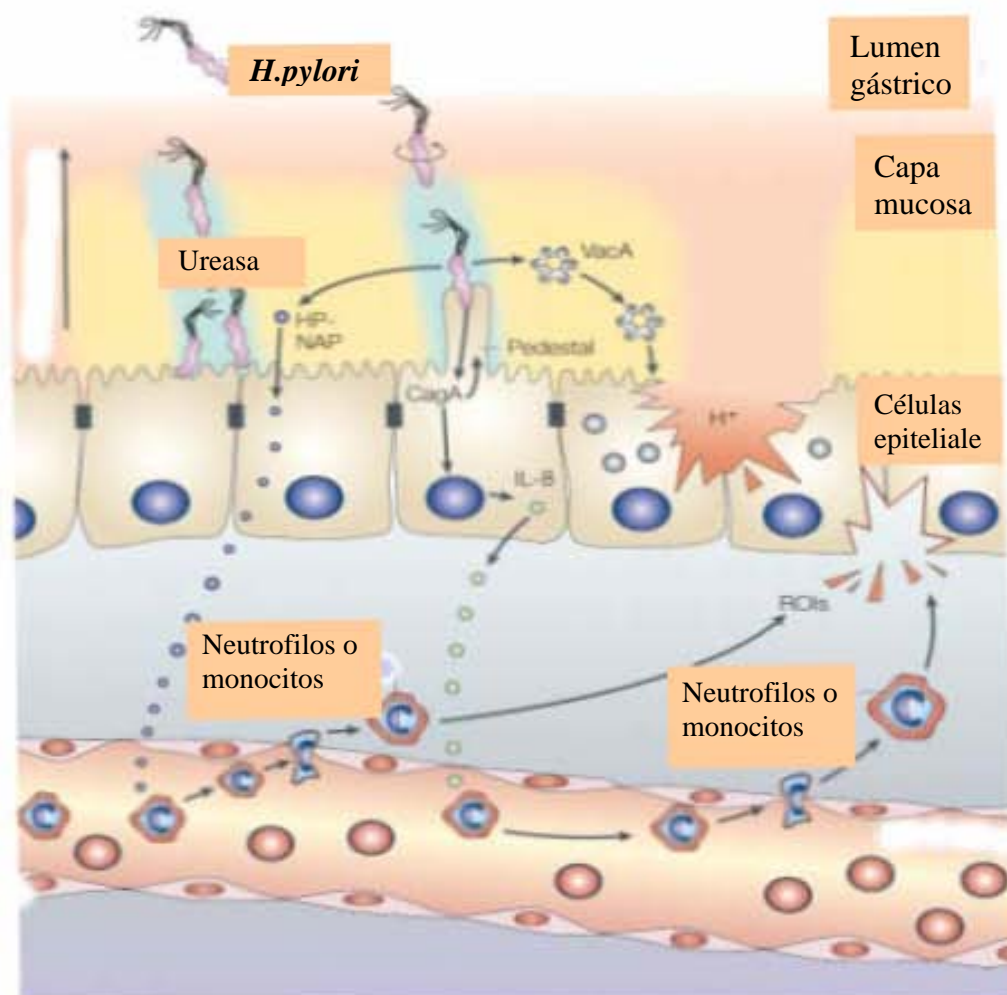


Figura 1. Factores de virulencia de *H. pylori* (Nature vol2 Jun 2001, pag 458)

Durante la infección la bacteria llega al lumen gástrico donde sobrevive al medio ácido gracias a la enzima ureasa. El flagelo de *H. pylori* sirve como propulsores para entrar en la capa mucosa. *H. pylori* inyecta por medio del sistema de secreción tipo IV la proteína CagA dentro de la célula epitelial liberando citocinas que activan neutrófilos o monocitos. VacA induce la formación de vacuolas citotóxicas. La liberación de proteínas activadoras de neutrófilos (HP-NAP) activan neutrófilos o monocitos que liberan intermediarios reactivos de oxígeno (ROIs) causando daño a las células epiteliales.

H. pylori no penetra a las células solo introduce productos que causan daño en el tejido ocasionando inflamación gástrica y posiblemente úlcera péptica, cáncer gástrico o linfoma.⁵

1.8 FACTORES DE VIRULENCIA

Muchos factores contribuyen a la virulencia de *H. pylori* destacando la toxina vacuolizante (VacA), el antígeno asociado a la toxicidad (CagA) y la molécula de adhesión de unión al grupo sanguíneo antigénico (BabA). VacA es una citotoxina (87KDa) que puede inducir vacuolización intracelular en células epiteliales provocando inflamación y muerte celular. Las cepas productoras de VacA de genotipo *vac s1* están asociadas con el incremento a daño gástrico y úlcera péptica.⁸ CagA es un antígeno inmunodominante (120KDa) y puede ser translocado por un sistema de secreción tipo IV en células epiteliales. El fenotipo CagA positiva fue detectada en pacientes con úlcera péptica, gastritis atrófica y cáncer gástrico.⁹ BabA es una molécula de adhesión (75KDa) que dirige la unión de *H. pylori* al antígeno del grupo sanguíneo Le^b sobre células epiteliales. Se han identificado tres alelos del gene *bab* (*babA1*, *babA2*, *babB*); el gene *babA2* codifica la proteína BabA. Se asocia la presencia del gene *babA2* a úlcera duodenal y carcinoma gástrico.^{9 10 11}

Para diferenciar a las cepas virulentas de las poco virulentas se ha clasificado en cepas tipo I o virulentas (*cagA*⁺ y *vacA s1 m1*) y las cepas tipo II o poco virulentas (*cagA*⁻ y *vacA s2 m2*). Las cepas tipo I se han detectado frecuentemente en pacientes con úlcera duodenal, gastritis atrófica y cáncer gástrico.⁵

1.8.1 VacA.

Es un importante factor de virulencia, forma vacuolas ácidas en células HeLa. VacA es codificada por el gene *vacA* y es sintetizada como una protoxina (140KDa) asociada a la membrana externa. Para ser excretada la protoxina debe presentar ruptura en su porción aminoterminal y carboxilo terminal, quedando un monomero de 87KDa. Los monomeros constituyen una toxina madura de estructura oligomérica. Estudios de microscopía electrónica muestran la estructura oligomérica ensamblada en forma de flor de seis a siete pétalos de manera hexagonal con un anillo central de aproximadamente 30nm. La estructura oligomérica de VacA es inactiva y se disocia en monomeros de 87KDa a un pH ácido, los monomeros son los que presentan actividad. La proteína de 87KDa al sufrir proteólisis se divide en dos fragmentos N-terminal de aproximadamente 37KDa y C-terminal de aproximadamente 58KDa. Estudios sugieren que la unión de VacA a células esta mediada por una secuencia de aminoácidos localizados en la porción C-terminal (58KDa). La unión de VacA a las células probablemente comprende la interacción de receptores específicos de la superficie celular o puede unirse a grupos lipídicos de carga negativa.¹

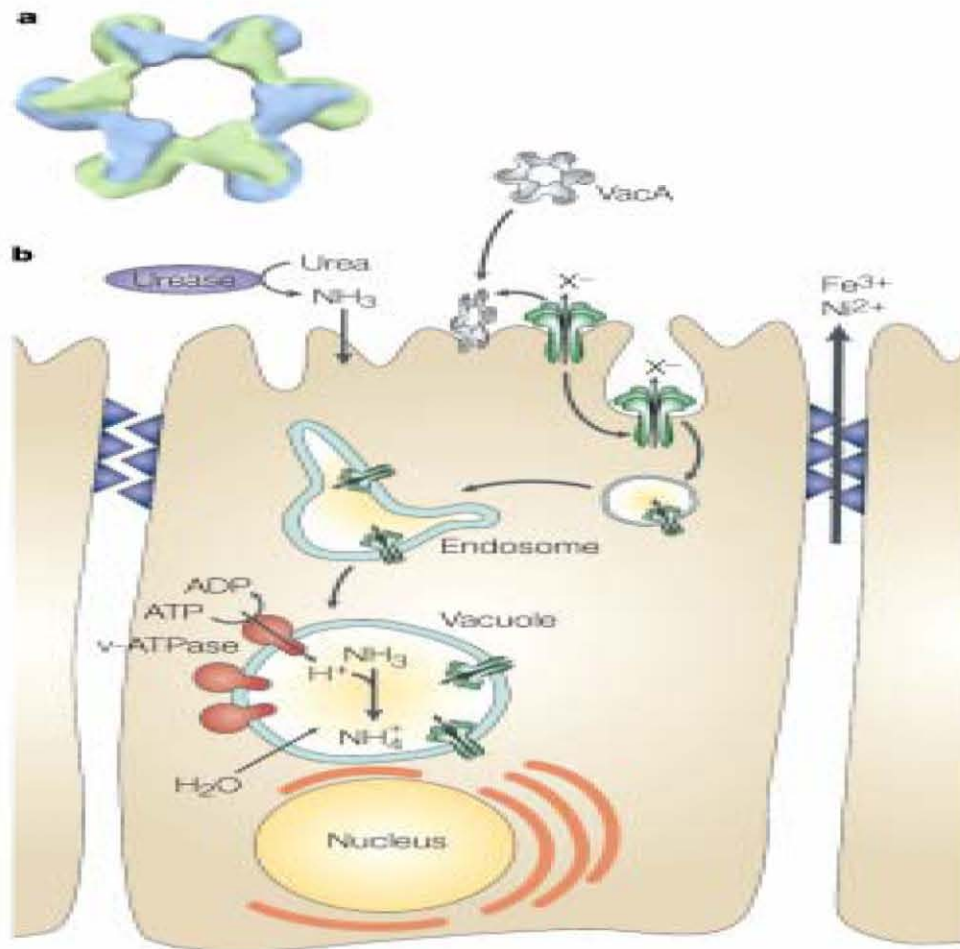


Figura 2. Estructura y función de VacA (Nature, vol 2, Jun 2001, pag 462)

a) VacA es una citotóxica en forma oligomérica. b) Se une a la célula epitelial y penetra a través de endocitosis (Endosoma), estas vacuolas tienen bombas de protones v-ATPasas. Substancias tales como amonio cruzan la membrana y son protonadas incrementando el pH ácido. Las vacuolas atraen agua osmóticamente. Aún no está definido el mecanismo por el cual VacA permite la salida de hierro y níquel así como otros nutrientes necesarios para el desarrollo de *H. pylori*.

Algunos estudios revelan, que VacA al ser sometida a tratamiento ácido aumenta la actividad vacuolizante, pero no significa que incremente la unión a células HeLa o BHK, en contraste la actividad ácida aumenta la unión de la toxina a la línea celular AZ-521, donde se observaron receptores específicos para VacA, es el caso de un receptor proteico β -fosfatas tirosina de 250KDa (RPTP β). También se han localizado otros receptores específicos para VacA, uno en líneas celulares AZ-521 y AGS de 140KDa y un receptor en células de desarrollo de epidermis (EGF) y en células HeLa.¹

Para la internalización de VacA son necesarios los fragmentos 58KDa y 37KDa, los cuales se internalizan a través de un proceso dependiente de energía, se sugiere que penetran por endocitosis. Después de entrar la toxina se localiza en una vacuola; las vacuolas al parecer son híbridos entre lisosomas y componentes del endosoma, esta

contiene una ATPasa tipo-v unido a la membrana de la vesícula así como dos pequeñas proteínas de unión a GTP: Rab7 y Rac1 (asociada al citosol).¹ Fig2

Dentro de la vacuola la bomba de hidrógeno es estimulada por la toxina y crea un ambiente ácido. Substancias tales como amonio, cruzan la membrana y son protonadas lo cual incrementa el pH ácido. Las vacuolas atraen agua osmóticamente de tal manera se incrementa el tamaño y el número de vacuolas provocando se fusionen unas con otras ocasionando la ruptura de la membrana y por tanto halla muerte celular. VacA es codificada por *vacA*. VacA se encuentra en todas las cepas de *Helicobacter pylori*⁹, pero no todas expresan la forma activa; aproximadamente solo el 40% de las cepas exhiben actividad vacuolar citotóxica. Esto se debe a la alta variación de la secuencia de nucleótidos entre cepas. *vacA* contiene variación alelica en dos regiones del gen: la región señal y la región media. En cepas estudiadas en Estados Unidos se encontró que la región señal de *vacA* presenta tres alelos: s1a, s1b y s2 y posibles alelos para la región media: m1 y m2.^{8 12} Otras variantes de la región señal y media sean descrito en otras poblaciones, por ejemplo s1c en la región señal y m1b en la región media en el este asiático.^{13 14} La región media codifica el dominio de unión célula-toxina y la región secuencia señal codifica el péptido señal, la extensión N-terminal en la toxina madura.^{8 15}

Las posibles combinaciones del genotipo son: (1) s2m2, codifica una forma no vacuolizante de VacA; (2) s1m2, codifica una forma de citotoxina que induce vacuolización de manera limitada en líneas de células epiteliales en comparación con s1m1; y (3) s1m1 codifican la forma más tóxica de VacA.¹⁵

El alelo s1 de la región señal de *vacA* codifica la forma mas tóxica que el alelo s2, éste último tiene una extensión corta N-terminal en la toxina madura lo cual elimina la actividad vacuolizante.^{16 17} El alelo s1a se asocia con la presencia de una mayor cantidad de neutrofilos en la mucosa de antro e infiltración de linfocitos a diferencia de s1b y s2.¹³

La cepa m1 *vacA* produce altos niveles de la actividad citotóxica in vitro y un daño mayor en el epitelio estomacal in vivo, que las cepas con el alelo m2.¹⁵ Investigaciones hechas en células epiteliales gástricas se ha encontrado que *vacA* m1 causa vacuolización extensiva en contraste a m2 la cual no causa vacuolización.¹⁸

Estudios realizados en Houston, Texas encontraron el genotipo *vacA* s1b fue predominante en la población Hispana, el genotipo *vacA* s1a fue predominante en la población blanca. Esto coincide con la hipótesis del genotipo predominante de *vacA* en América Central y Sur es similar a la Península Ibérica (s1b) y el genotipo *vacA* en Canadá y Australia son similares al Norte de Europa (s1a).

Encontraron también que el genotipo *vacA* s1bm1 es el mas común en la población afroamericana de Houston, esto coincide con lo dicho por Letley et al. que el genotipo s1bm1 fue predominante en sujetos negros y en la mezcla de razas en Sudáfrica,¹²

sugiriendo que el genotipo tiene origen en África y relación con la Península Ibérica (invasión de Moros).¹⁹

1.8.2 CagA.

Es una proteína de membrana externa así como un importante antígeno inmunodominante de alto peso molecular (120-140KDa).²⁰ Esta proteína es codificada por *cagA*, se encuentra en un segmento de DNA llamado isla de patogenicidad *cag* (*cag* PAI) de 40Kb y contiene de 27 a 31 genes, algunos de estos genes codifican un sistema de secreción tipo IV.²¹ Otros genes importantes dentro de la isla de patogenicidad son *cagE* o *picB*, *cagG*, *cagH*, *cagI*, *cagL* y *cagM*, que in vitro liberan citocinas. *cag* PAI presenta características similares a las de otras islas de patogenicidad encontradas en *E. coli*, *salmonella* y *Yersinia*. Las características de la isla de patogenicidad de *H. pylori* son las siguientes: contiene genes que codifican factores de virulencia y genes para proteínas del sistema de secreción tipo IV así como presenta uno o dos secuencias de inserción (IS605 e IS606). La isla puede estar dividida en dos regiones *cagI* y *cagII* por secuencias del cromosoma bacteriano flanqueado por una secuencia de inserción (IS605).

CagA es translocada al citosol de la célula hospedera mediada por el sistema de secreción tipo IV, en el citosol es fosforilada por una cinasa del hospedero de la familia src, posteriormente ocurre la polimerización de actina ocasionando la formación de pedestal, en la cual la bacteria se une a la célula hospedera.

La estructura *cagA* contiene una región altamente conservada que se encuentra en el extremo 5' y una región variable en el extremo 3', esto explica la variación en peso molecular de la proteína CagA (120-140KDa), debido a la presencia de las diferentes secuencias repetidas en la región variable.²²

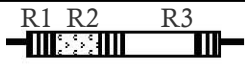

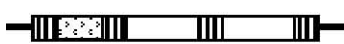
Yamaoka et al, reporta que la región 3' *cagA* en aislamientos de *Helicobacter pylori* en pacientes Japoneses puede clasificarse en 4 tipos (A B, C y D) dependiendo del tamaño y número de regiones repetidas.

| Tabla 1.2. Clasificación de la región 3' del gen <i>cagA</i> , según Yamaoka et al. | | |
|---|---------------------------|--|
| Tipo | Tamaño de producto de PCR | Estructura primaria (regiones repetidas) |
| A | 642-651bp | |
| B | 756bp | |
| C | 813-815bp | |
| D | 756bp | |

Un dato interesante en éste estudio es que en el 86% de las muestras analizadas provenientes de pacientes con cáncer poseían la estructura de tipo C.²¹

Investigaciones realizadas en cepas de *H. pylori* en la provincia Zhejiang en China, se clasificaron 3 subtipos de la región 3' *cagA* de acuerdo al tamaño y número de repeticiones.²³

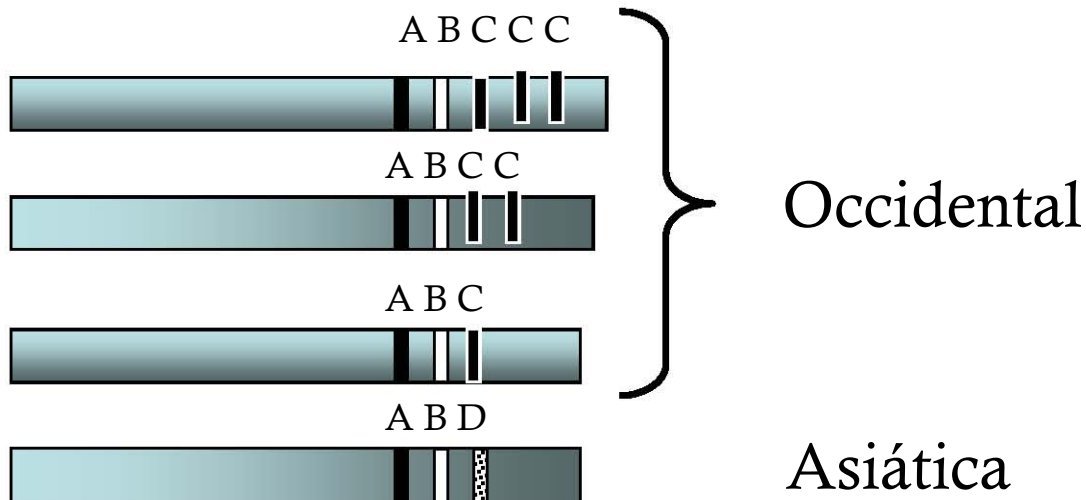
Tabla 1.3. Clasificación de la región 3' del gen *cagA*, según Ran Tao et al.

| Tipo | Tamaño de producto de PCR | Estructura primaria (regiones repetidas) |
|------|---------------------------|--|
| I | 648-650 bp |  |
| II | 705-707 bp |  |
| III | 815 bp |  |

El subtipo I fue localizado en 93.2% de las cepas estudiadas. Este subtipo es parecido al tipo A reportado por Yamaoka et al, y se encontró en 93.5% de las cepas analizadas. El subtipo III es parecido al tipo C y se halló en 2.3% y 4.5% de las cepas respectivamente. En tanto el subtipo II no es similar a los reportados por Yamaoka et al, este subtipo estuvo presente en 4.5% de las cepas estudiadas.²³

Como se mencionó CagA es fosforilada por una cinasa de la familia src en el citosol de las células epiteliales, posteriormente interactúa con la fosfatasa SHP-2 que guía la elongación de las células epiteliales y la formación del fenotipo “hummingbird” (alargamiento de las células en forma de pico, por el rearrreglo de la actina en el citosol).²⁴

Zhang y colaboradores realizaron un estudio en 30 pacientes Chinos sobre la región variable de *cagA*. Ellos encontraron en la mayoría de las cepas poseían un mayor tamaño del gen (~890pb) y en 3 cepas un tamaño menor (~840bp y 770bp). El análisis de secuenciación reveló en las cepas de mayor tamaño de la región 3' de *cagA* contenían 3 motivos de fosforilación en el residuo tirosina (TPMs) y las de menor tamaño 2 TPMs. Las de 3 TPMs se relacionaron a cepas Asiáticas, además se asociaron a un alto grado de fosforilación lo cual fue corroborado en la formación del fenotipo hummingbird en mayor proporción en relación a las de 2 TPMs.²⁵



A
B
 NNNNGLN---EPIYAKKKTGQVASPEVNKEPIYAQVAKKVNAKIDRLNQAASGLGG-
 VGQAGFPLKRHDKVDDLKSVGRSVSEPIYATIDDLGGP---FPLKRHDKVDDLKSV
C

A
B
 NNNNGLKNNTEPIYAQVNKKKTGQATSPEPIYAQVAKKVSADQLNEATSAINRKIDRINKI
 ASAGKGVGGFSGAGRSASPEPIYATIDFDEANQAGFPLRRSAAVNDLSKV

Fig. 3 Motivo EPIYA occidental y asiático (Nature, vol 4, Sep 2004, pag 692)

C

La fosforilación de tirosina de CagA ocurre en el motivo EPIYA (constituido por una secuencia de aminoácidos (Glu, Pro, Ile, Tir y Ala). Presente en la región variable terminal. El motivo EPIYA puede distinguirse en 4 tipos A, B, C y D y se diferencia por aminoácidos presentes antes o después del motivo EPIYA. El caso más común en Europa, Norte América y Australia es el EPIYA A B y el C, este último es exclusivo de esa región y en Asia predomina el tipo D.³³

Diversos estudios realizados en Japón, Corea y China muestran que más del 90% de cepas de *H. pylori* son *cagA*⁺ y en Estados Unidos de América Canadá y Europa el porcentaje es menor.

Investigaciones realizadas en Houston, Texas, detectaron que el genotipo *cagA*⁺ es el más común en los aislamientos de casi todos los grupos étnicos estudiados (afroamericanos 71%, hispanos 74%, blancos 77% y vietnamitas 97%). Todos los aislamientos de vietnamitas presentaron la estructura tipo "Fast Asian" de la región repetida 3' de *cagA* (región JSR), el resto de los grupos étnicos presentaron el tipo "non-Asian" de ésta región (región WSR).

1.9 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

1.9.1 Infección aguda.

La infección aguda por *H. pylori* se adquiere en la infancia y cursa en un principio de manera asintomático, por lo que es difícil percibir esta etapa. Los síntomas y patología gástrica asociada a la infección aguda se conocen porque dos voluntarios ingirieron el organismo y otros casos de infección accidental o inadvertida. La etapa aguda de la infección se caracteriza por náusea y dolor abdominal por dos semanas, gastritis y desarrollo de hipoclorhidria dentro de los siguientes ocho días.

1.9.2 Úlcera duodenal.

Pacientes con gastritis predominantemente en el antro gástrico tienden a tener una secreción alta de ácido y presentan un riesgo mayor de desarrollar úlcera duodenal. El exceso de ácido llega al duodeno donde neutraliza las sales biliares que normalmente inhiben a *H. pylori*; la carga de ácido induce metaplasia gástrica en duodeno. La inflamación y el exceso de ácido dañan la integridad de la mucosa duodenal y favorecen el desarrollo de úlcera.¹

1.9.3 Úlcera gástrica y cáncer.

Cuando la gastritis es predominantemente en cuerpo estomacal se tiene una producción baja de ácido y se desarrolla atrofia gástrica, que puede progresar a úlcera gástrica o a cáncer gástrico distal. Una inflamación crónica prolongada puede terminar en atrofia y daño a células parietales, lo que origina una disminución en la secreción de ácido y desarrollo de aclorhidria; esto favorece la metaplasia intestinal y a su vez a displasia; la displasia se asocia al desarrollo de cáncer gástrico.¹

1.9.4 MALT.

Otra neoplasia estrechamente relacionada con *H. pylori* es el linfoma no Hodgkin en estómago, que tiene enormes similitudes histológicas con el tejido linfoide asociado a mucosa (MALT). En condiciones normales la pared del estómago carece de tejido linfoide, pero como resultado de la infección crónica por el microorganismo los linfocitos empiezan a infiltrarse en la submucosa y se organizan formando un tejido especializado, además el estímulo antigénico constante induce la proliferación monoclonal de linfocitos T. Más adelante y por razones todavía desconocidas, tales células empiezan a exhibir un comportamiento maligno y proliferan sin ningún control, dando lugar al linfoma gástrico.

1.10 EPIDEMIOLOGÍA

La infección por *H. pylori* esta presente en casi toda la población mundial. Aunque es diferente la incidencia en los países desarrollados en relación a los países en vías de desarrollo. Esto sugiere que son importantes las condiciones en las que vive la

población de estos países. Los factores de riesgo para desarrollar la infección por *H. pylori* son la edad, nivel socioeconómico bajo, hacinamiento, vivienda insalubre, agua contaminada y la consanguinidad (se refiere que la infección se transmite de persona a persona y en su mayoría de manera intrafamiliar).

En los países en vías de desarrollo la infección se adquiere tempranamente; a los 5 años más del 20% de los niños están infectados; en cambio en los países desarrollados la infección es rara durante la niñez y la tasa de infección aumenta con la edad. La prevalencia global de *H. pylori* en los niños es de 10% en los países desarrollados, pero en los grupos de nivel socioeconómico bajo puede incrementar de 30 a 40%. En los países en vías de desarrollo la prevalencia oscila entre 80-100%.²⁶

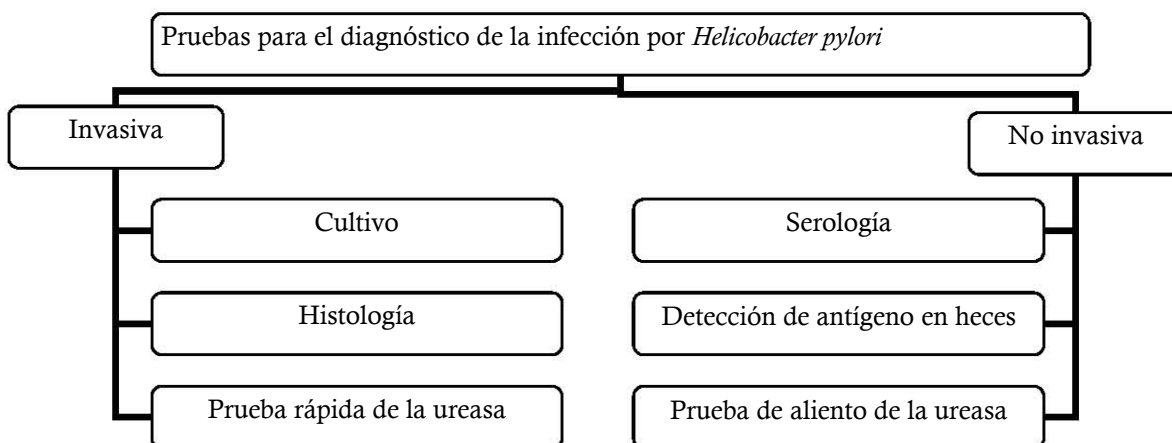
| Tabla 1.4 Manifestaciones clínicas asociadas con <i>Helicobacter pylori</i> (Datos de personas positivas a la infección por <i>Helicobacter pylori</i> en los EE.UU) | | |
|---|---|------------|
| Condición | Definición | Incidencia |
| Gastritis | Inflamación de la mucosa gástrica | 100% |
| Úlcera duodenal | Defecto en la mucosa duodenal | 5-10% |
| Úlcera gástrica | Defecto en la mucosa gástrica | 5% |
| Gastritis atrófica | Perdida de glándulas gástricas | 5-10% |
| Metaplasia intestinal | Mucosa gástrica en epitelio gástrico | 5-10% |
| Displasia epitelial gástrica | Organización y morfología epitelial anormal | <5% |
| Adenocarcinoma gástrico | Tumor gástrico de células epiteliales | <1% |
| Linfoma gástrico | | <1% |

* Tomada de Principles of bacterial pathogenesis, pag 511.

Estudios de prevalencia realizados en México analizando muestras de la Encuesta Sexológica Nacional (1987-1988), ha establecido que 66% de la población general está infectada por *H. pylori*. La distribución de la prevalencia en algunos grupos de acuerdo a cierta edad observada fue: 1-20 años 50%, 1-4 años 25%, 5-9 años 43%, 10-14 años 55% y 15-19 años 65%.

1.11 DIAGNÓSTICO

Las técnicas de diagnóstico de rutina para detectar la infección de *H. pylori* se dividen en métodos invasivos y no invasivos. Las pruebas invasivas emplean biopsia gástrica tomada por endoscopia; las pruebas no invasivas no requieren de endoscopia y se basan en evidenciar de forma indirecta la infección a excepción de la prueba de detección de antígeno en heces.



1.11.1 Pruebas invasivas.

1.11.1.1 Histología.

Las muestras obtenidas por endoscopia se tiñen, ya sea con hematoxilina y eosina, Warthin-Starry o tinción modificada de Giemsa. Esta prueba proporciona información relacionada con la severidad de la gastritis, metaplasia intestinal o displasia de la mucosa gástrica. La sensibilidad y especificidad de esta prueba es de 90%.⁵

1.11.1.2 Cultivo.

Se debe inocular la biopsia (para mejores resultados) en menos de dos horas en medio de transporte de Stuart, caldo Brucella o solución salina isotónica estéril. El homogenizado del tejido se siembra en medio gelosa sangre con o sin antibiótico en atmósfera de microaerofilia a 37° C. la identificación del microorganismo se hace a través de su morfología colonial, tinción de Gram y pruebas bioquímicas (catalasa, oxidasa y ureasa). Esta prueba es 100% específica.⁵

1.11.1.3 Prueba rápida de la ureasa.

Se basa en la enzima ureasa de *H. pylori*. La enzima ureasa hidroliza la urea en amonio y CO₂, el amonio sube el pH, virando el indicador del reactivo. La prueba se encuentra disponible de manera comercial (CLOtest) o se puede preparar en el laboratorio. La sensibilidad y especificidad de la prueba varía ente 90-95%.⁵

1.11.2 Pruebas no invasivas

1.11.2.1 Prueba del aliento de la urea.

Este método implica la recolección de una muestra de aliento antes y otra 30 minutos después de ingerir urea marcada con C^{13} o C^{14} . El fundamento del método se basa en la ureasa (de la bacteria) que hidroliza la urea en amonio y CO_2 , el CO_2 marcado es exhalado en el aliento. Tiene valores de especificidad y sensibilidad de 95%. Pueden existir falsos negativos si el paciente tomó inhibidores de la bomba de protones, bismuto o antibióticos.

1.11.2.2 Serología

La prueba consiste en detectar anticuerpos IgG contra antígenos de *H. pylori* por un ensayo inmunoenzimático (ELISA). Sus valores de sensibilidad y especificidad están entre 85-95%, esto depende de la edad y del estado inmunológico del paciente, sobre todo en niños ancianos y sujetos inmunocomprometidos que no han desarrollado una respuesta inmunológica adecuada a la infección.

1.11.2.3 Detección de antígenos en heces

Es posible en ciertas condiciones aislar *H. pylori* en heces; y se ha desarrollado un método que detecta antígeno de *H. pylori* en heces por un ensayo enzimático. La sensibilidad y especificidad del método es mayor al 90%.⁵

1.12 TRATAMIENTO

El reconocer como uno de los agentes etiológicos a *H. pylori* de padecimientos gástricos tales como gastritis y úlcera péptica, trajo en consecuencia un cambio en la terapia.

Los fármacos usados en el tratamiento para la erradicación de *H. pylori* son 5-nitromidazoles (tinidazol y metronidazol), macrolidos (claritromicina) y β -lactámicos (amoxicilina).

Los 5-nitromidazoles: son profármacos que necesitan activarse dentro de la célula blanco. Dentro del proceso de activación del grupo nitro se reduce generando radicales libres, los cuales dañan la estructura subcelular y causan daño y mutación letal en el DNA.

Macrolidos: la actividad de los macrolidos consiste en penetrar en la célula y unirse a ribosomas. Se une al dominio 23S rRNA, provocando interrupción en la elongación, consecuentemente la bacteria no puede sintetizar proteínas. La resistencia a los macrolidos se encuentra en el cromosoma y es transmitida verticalmente a la descendencia bacteriana.

β -lactámicos: la amoxicilina es el único β -lactámico usado en el tratamiento contra la infección *H. pylori*. *H. pylori* puede ser resistente a la amoxicilina pero a diferencia de las bacterias Gram-negativas, la resistencia no se debe a las β -lactamasas. El mecanismo de resistencia se debe a la alteración de las proteínas de unión a penicilina (PBPs), disminuyendo la permeabilidad del antibiótico en la pared celular bacteriana.¹

2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

H. pylori es un importante patógeno humano, causa gastritis crónica y está asociado al desarrollo de diferentes enfermedades gastroduodenales como son úlcera péptica, metaplasia intestinal, displasia gástrica y cáncer gástrico. En la virulencia de *H. pylori* participan varios factores, los más estudiados son los genes *vacA* y *cagA*, que codifican las proteínas VacA y CagA respectivamente. Se ha reportado la presencia de los alelos s1m1 de *vacA* en aislamientos procedentes de pacientes con úlcera péptica y cáncer gástrico en diversos países. En tanto *cagA* también ha sido detectado principalmente en pacientes con úlcera péptica, gastritis atrófica y cáncer gástrico. En el extremo 3' de *cagA* se han observado variaciones de tamaño en las diferentes enfermedades. Existen estudios referentes a lo anterior en variadas partes del mundo, por lo tanto este trabajo se ha enfocado a pacientes mexicanos con enfermedades gastroduodenales, las preguntas básicas para este fin son:

¿Cuál será la importancia de determinar los alelos de *vacA* así como de *cagA* en cepas de *H. pylori* aislados de pacientes mexicanos que padecen enfermedades gastroduodenales (gastritis, úlcera duodenal, cáncer gástrico, metaplasia intestinal, displasia gástrica y gastritis crónica atrófica)?

¿Cuál será la variación en tamaño de la región 3' de *cagA* en las mismas cepas?

3.- OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar la presencia de los genes *vacA* y la región variable de *cagA* en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con enfermedades gastroduodenales.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Caracterizar los alelos de *vacA* en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con gastritis, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia gástrica, úlcera duodenal y cáncer gástrico.

3.2.2 Estudiar la presencia de *cagA* en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con gastritis, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia gástrica, úlcera duodenal y cáncer gástrico.

3.2.3 Conocer la variación en tamaño de la región 3' de *cagA* en cepas de *H. pylori* de pacientes con diferentes enfermedades gastroduodenales.

3.2.4 Asociar la presencia de los alelos *vacA* y la variación en tamaño de la región 3' de *cagA* en cepas de *H. pylori* a las enfermedades gastroduodenales.

4.- HIPOTESIS

- 4.1 Más del 50% de cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con enfermedades gastroduodenales, poseen los alelos s1 y m1 de vacA.
- 4.2 Las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con enfermedades gastroduodenales que tienen el genotipo s1m1 son positivas para *cagA*.
- 4.3 A mayor tamaño de la región 3' de *cagA* de *H. pylori*, mayor será la posibilidad de que el aislamiento provenga de pacientes con cáncer gástrico.

5.- MATERIAL Y MÉTODO

5.1 ANTECEDENTES DE MUESTRA BIOLÓGICA

Se realizó un estudio de casos y controles en el Hospital General de México (HGM) y Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, en el período comprendido entre octubre de 1999 a julio del 2002.

Los sujetos de estudio fueron seleccionados de pacientes con síntomas gastrointestinales con indicación médica de endoscopia de tubo digestivo alto. Los grupos de diagnóstico fueron integrados en los siguientes grupos: 1) cáncer (carcinoma invasor de estomago) 2) a.- gastritis crónica atrófica (GCA) b.-metaplasia intestinal (MI) y c.- Displasia gástrica (DG), 3) gastritis superficial y 4) úlcera duodenal. En el trabajo se incluyeron el número de pacientes que se muestra en la tabla 5.1

Tabla 5.1 Número de pacientes con enfermedades gastroduodenales.

| Enfermedad gastroduodenal | Número de pacientes |
|---------------------------|---------------------|
| Cáncer | 9 |
| UD | 11 |
| Gastritis | 28 |
| GCA, MI y DG | 15 |
| Total | 63 |

De cada paciente se obtuvieron biopsias de antro (s3) y cuerpo (s4); se aisló *H. pylori* de estas biopsias y se obtuvieron de 3 a 6 clonas de cada aislado.

5.2 MATERIAL

5.2.1 Cultivo (aislamiento e identificación)

I. Material

- Asas microbiológicas
- Placa de 96 pozos
- Tubos para microcentrífuga de 1.5ml estériles desechables
- Porta objetos
- Hisopos estériles desechables
- Homogenizador de vidrio y pistilo de vidrio esmerilado
- Puntas desechables estériles
- Placas petri de plástico desechables (100x15mm de diámetro)

II. Reactivos

- Agar gelosa sangre de carnero 5%

- Agar gelosa sangre de carnero 5% con antibióticos
- Agua salina fisiológica estéril
- Pueba de oxidasa
- Urea
- Peroxido de hidrogeno
- Reactivos para tinción de Gram (Cristal violeta , safranina, alcohol- acetona, yodo)
- Aceite de inmersión
- Caldo Brucella
- Sobres de Campy pack

III. Instrumentos

- Campana de flujo laminar
- Estufa de CO₂
- Microscopio
- Refrigerador de -70° C y 20°C

5.2.2 Extracción de DNA

I. Material

- Tubos para microcentrifuga 1.5ml estériles desechables
- Micropipetas 0.5-10µl, 20-200µl y 100-1000µl
- Puntas estériles desechables de 200µl y 1000µl
- Guantes de nitrilo

II. Reactivos

- Isopropanol
- Etanol al 70%

- TE (IX)

- Solución de lisis de nucleotidos
- RNAasas (20mg/ml)
- Solución de precipitación de proteínas

III. Instrumentos

- Baño de agua 80° C
- Baño de agua 37° C
- Microcentrifuga
- Vortex

5.2.3 Cuantificación de DNA

I. Material

- Tubos para microcentrifuga de 1.5ml estériles desechables
- Micropipetas 0.5-10µl y 100-1000µl

- Puntas estériles desechables de 200µl y 1000µl

II. Reactivos

- Agua desionizada

III. Instrumentos

- Espectrofotómetro

5.2.4 PCR

I. Material

- Tubos para microcentrifuga de 1.5 ml estériles desechables

- Tubos estériles desechables para PCR

- Micropipetas 0.5-10µl, 20-200µl y 10-40µl

- Puntas estériles desechables de 200µl

- Guantes de nitrilo

II. Reactivos

- Agua desionizada estéril

- Solución reguladora para PCR 10X (200mM Tris-HCl pH8.4, 500mM KCl)

- Cloruro de magnesio 50mM

- dNTP

- Taq DNA polimerasa

- Primers

| Gen | Primer | Secuencia (5' a 3') | Referencia |
|-------------------|--------|---|------------|
| <i>vacA</i> s1/s2 | VAG | F-CAATCTGTCCAA TCAAGCGAG R- GCGTEAAATAA TTCCAAGG | 18 |
| <i>vacA</i> s1/s2 | VAI | F- ATGAAAATAC AACAAACACAC R-CTGTTGAATG CGCCAA | 18 |
| 3' <i>cagA</i> | CAGT | F- ACCCTAGTCGG TAATGGG R-GCTTTAGCTTCT GATACTG | 21 |

III. Instrumentos

- Termociclado

5.2.5 Electroforesis.

I. Material

- Micropipetas 0.5-10µl

- Puntas estériles desechables de 200µl

- Espátula

- Matraz 250ml

- Charola de plástico (para colocar el bromuro de etidio)

- Guantes de nitrilo

II. Reactivos

- Agarosa

- Solución reguladora TAE

- Loading buffer 6X

- Marcador de peso molecular de 1Kb Plus DNA Lader

III. Instrumentos

- Fuente de poder

- Cámara para electroforesis

- Balanza analítica

5.2.6 Secuenciación

I. Material

- Tubos para microcentrifuga estériles desechables de 1.5 ml

- Tubos estériles desechables para PCR

- Micropipetas 0.5-10µl, 20-200µl y 10-40µl

- Puntas estériles desechables de 200µl

- Guantes de nitrilo

II. Reactivos

- Agua inyectable

- Reactivos del protocolo Marligen Biosciences inc.

- Reactivos del protocolo DyeEx (2.05 Spin Kit 250) QUIANGEN.

- Reactivos de PCR

III. Instrumentos

- Transluminador

- Concentrador 5301

- Termociclador

- Transluminador

5.2.7 Cepas de referencia.

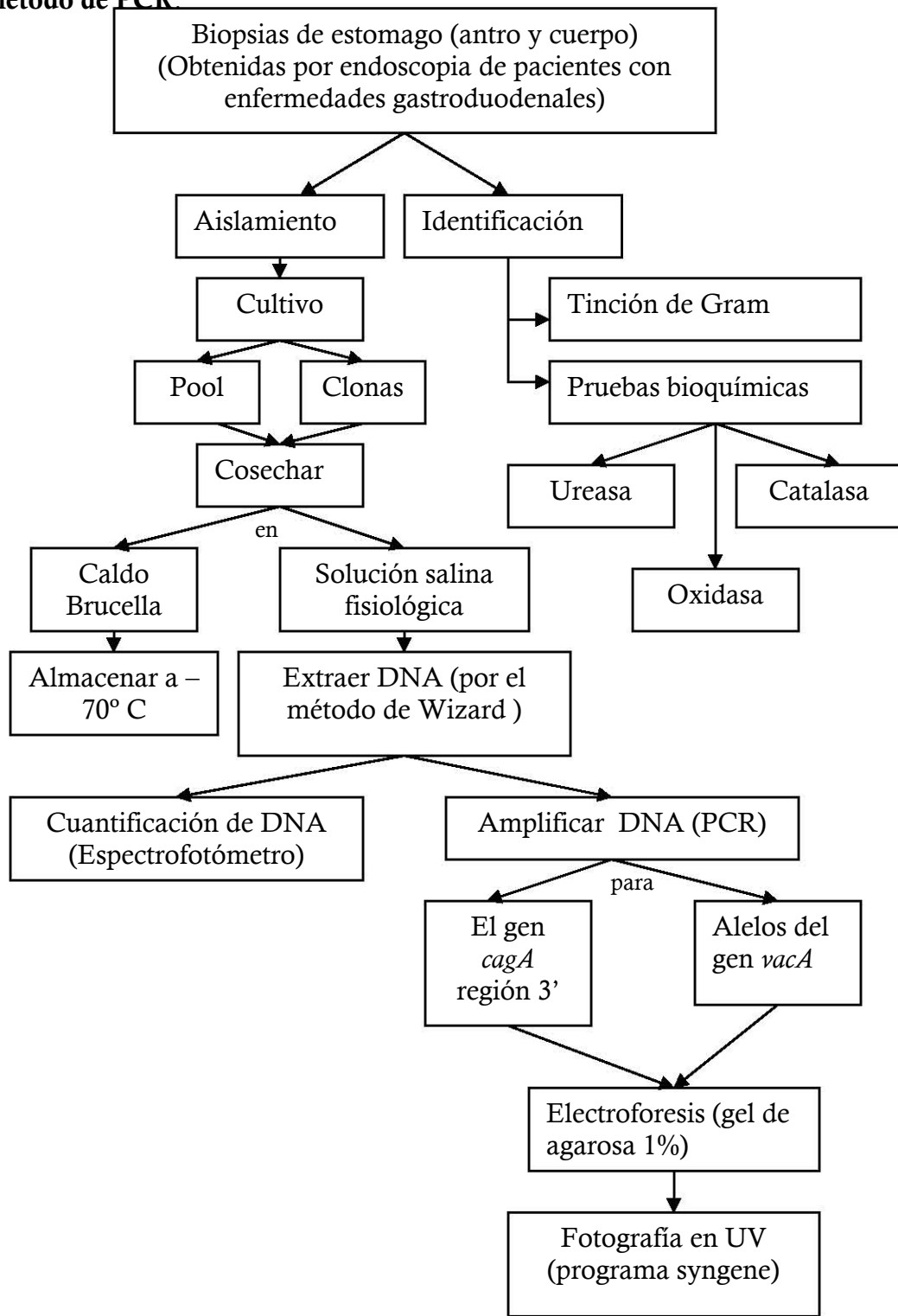
- 8823 positiva para el alelo m1/s1 del gen *vacA*

- 8822 positiva para el alelo m2/s2 del gen *vacA*.

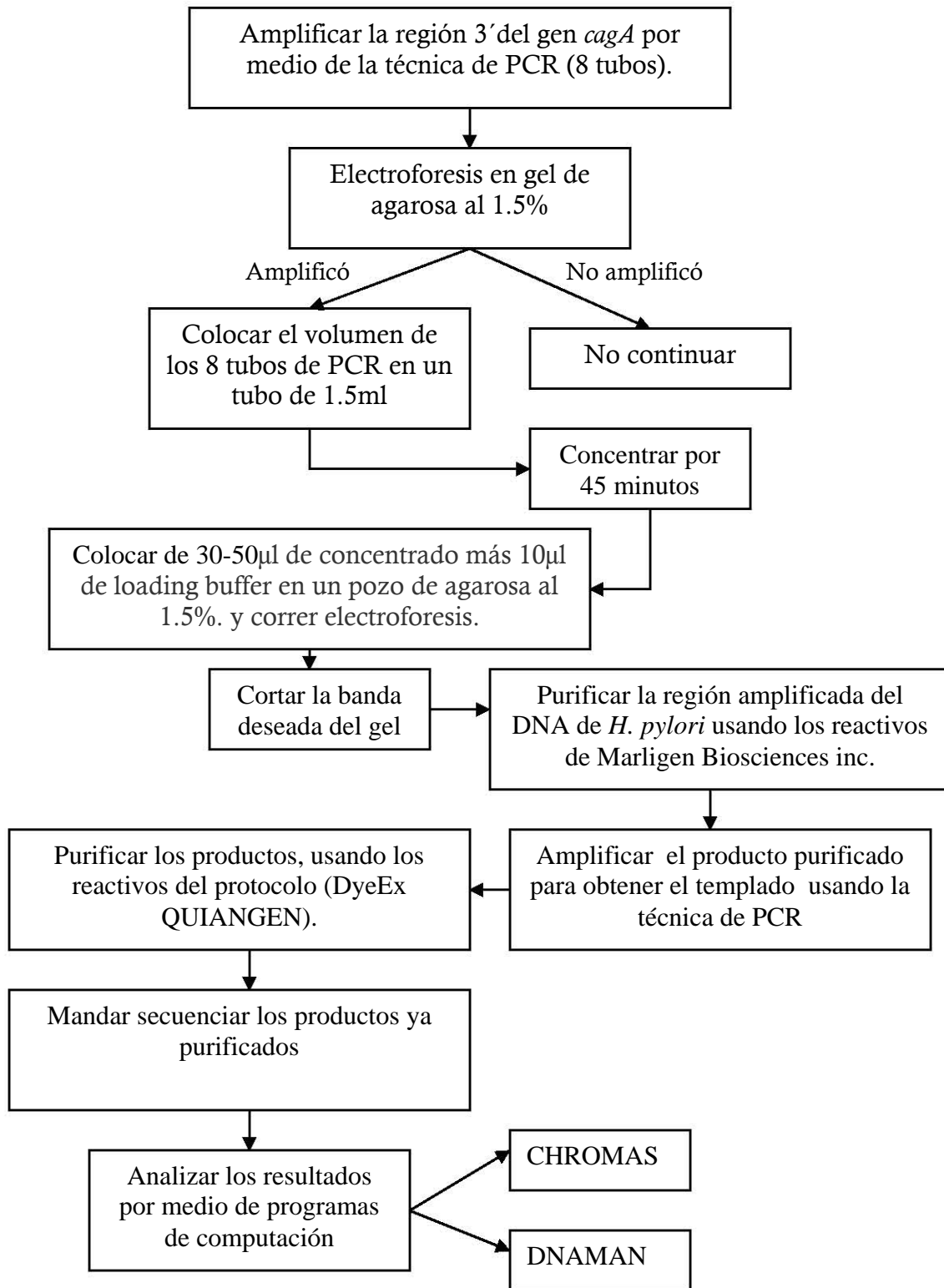
- J99 tiene un tamaño de pares de bases aproximado de 450 para la región 3'.

5.3 ESQUEMA DE TRABAJO

5.3.1 Diagrama de flujo del procesamiento de muestras para amplificar DNA por el método de PCR



5.3.2 Procedimiento para secuenciar la región 3' del gen *cagA* de *H. pylori*.



5.4 MÉTODOS

5.4.1 Cultivo (aislamiento e identificación)

Biopsias

- a) Se coloca la biopsia en el homogenizador más 200 μ l de solución salina fisiológica estéril (se homogeniza lo mas posible)
- b) Se coloca el pistilo en medio agar gelosa sangre 5% de carnero sin antibiótico.
- c) De 40 μ l a 50 μ l del homogenizado se toman con una punta estéril, se colocan en el medio y se estría con un asa bacteriológica estéril.
- d) El resto del homogenizado se coloca en el tubo original que lo contenía para conservarlo en congelación a -70° C.
- e) Incubar en condiciones de microaerofilia (Campy pack o incubadora de CO_2) a 37°C , por lo menos 48 horas.
- f) Aislar e identificar con las pruebas bioquímicas catalasa, oxidasa y ureasa así como tinción de Gram. Propagar en gelosa sangre en las condiciones antes descritas.
- g) Cosechar y guardar a -70° C en criótubos que contengan caldo Brucella glicerol al 15%.

Congelar.

- a) Cultivar (48hrs) en medio gelosa sangre de carnero al 5% sin antibiótico
- b) Identificar *H. pylori* con oxidasa (+), catalasa (+) y tinción de Gram(Gram-negativa).
- c) Cosechar *H.pylori* con un hisopo estéril, resuspender en 1ml de caldo Brucella-glicerol al 15% estéril.
- d) Guardar en criótubos marcados con el número de cepa en el costado y la tapa e inmediatamente colocar a -70° C.

Descongelar

- a) Mantener los criótubos en hielo seco para evitar que se descongelen
- b) Raspar con una punta o asa estéril.
- c) Depositar el inóculo en medio de gelosa sangre de carnero al 5% con antibiótico y sin antibiótico.
- d) Incubar en estufa de CO_2 a 37° C, durante 2 a 5 días.
- e) Regresar al congelador de -70° C los criotubos con la cepa.

5.4. 2 Extracción de DNA (Método de Wizard Genomic prep.)

- a) Centrifugar muestra de *H. pylori* en solución salina fisiológica estéril a 13,000-16,000/g/2min.
- b) Decantar, conservar la pastilla; agregar 600 μ l de solución de lisis.
- c) Incubar a 80° C/5min para lisar las células.
- d) Agregar 1.2 μ l de RNAasas (10mg/ml), mezclar por inversión 25 veces.
- e) Incubar a 37° /40min
- f) Agregar 200 μ l de solución de precipitación de proteínas. Mezclar vigorosamente por 20 seg.
- g) Incubar en hielo 20 min.
- h) Centrifugar a 13,000-16,000xg/3min

- i) Transferir el sobrenadante que contiene el DNA a un tubo para microcentrifuga de 1.5ml que contenga 600 μ l de isopropanol.
- j) Invertir hasta observar hebras blancas que indican la presencia de DNA (Incubar a -20° C/toda la noche)
- k) Centrifugar a 13,000-16,000xg/2min
- l) Retirar el sobrenadante.
- m) Agregar 600 μ l de etanol al 70% y centrifugar a 13,000-16,000xg/3min, decantar y repetir 3 veces este procedimiento.
- n) Secar el DNA, los tubos deben permanecer abiertos. Para evitar contaminación cubrir los tubos con aluminio.
- o) Agregar 150 μ l de TE al tubo para rehidratar.

5.4.3 Cuantificación de DNA

- a) Prepara dilución del DNA 1/10 con TE o con agua desionizada.
- b) Leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 (DNA)
- c) De acuerdo a la concentración de DNA stock, se debe ajustar la concentración a 50ng/ml – 100ng/ml.

5.4.4 PCR

PCR para los alelos s1/s2 y m1/m2 del gen *vacA* y la región 3' del gen *cagA*.

- a) Se prepara la mezcla en un tubo de PCR de la siguiente manera:

Tabla 5.2 Reactivos para la mezcla para la técnica de PCR.

| Componentes | Volumen por tubo/ μ l |
|----------------------------------|---------------------------|
| | IX |
| Agua desionizada estéril | 19 μ l |
| Buffer de PCR 10X | 2.5 μ l |
| Cloruro de magnesio | 0.75 μ l |
| dNTP 10mM | 0.5 μ l |
| Primer F | 0.5 μ l |
| Primer R | 0.5 μ l |
| Taq DNA polimerasa (5U/ μ l) | 0.25 μ l |
| Templete de DNA | 1 μ l |
| Total | 25 μ l |

- b) Introducir en el termociclador a las siguientes condiciones: 94° C/90seg 94° C/30seg, 56° C/60seg, 72° C/90seg y 72° C/5min por 35 ciclos y al final 4∞
- c) Mantener la reacción a 4° C. Las muestras pueden ser almacenadas a -20° C hasta su uso.
- d) Analizar el producto de amplificación a través de electroforesis en gel de agarosa.

5.4.5 Electroforesis.

- a) Preparar solución de agarosa 1.5% en TAE 1X (disolver completamente por calentamiento).
- b) Cuidadosamente verter la solución de agarosa en la cámara de electroforesis.
- c) Insertar el peine aproximadamente 1mm por arriba del fondo de la cámara.
- d) Dejar solidificar el gel. Remover el peine. Agregar un volumen suficiente solución reguladora TAE 1X para cubrir el gel.
- e) En una placa de 96 pozos, mezclar 1µl de loading buffer a 5µl de producto de PCR.
- f) Aplicar con micropipeta 2.5 µl de 1aKb DNA ladder (preparado) a un pozo del minigel.
- g) Aplicar con micropipeta 4-6 µl de muestra (loading buffer más producto de PCR) a pozos individuales del minigel.
- h) Conectar electrodos y encender el voltaje (100V) la electroforesis toma entre 20min a 2horas dependiendo del tamaño de los fragmentos.
- i) Una vez completada la electroforesis, se tiñe el gel en bromuro de etidio por 20min.
- j) Se retira el exceso de bromuro de etidio con agua y se toma una foto del gel utilizando un transiluminador UV para visualizar las bandas teñidas con bromuro de etidio. El gel en esta etapa esta listo para transferirse, purificar fragmentos o desecharse.

5.4.6 Secuenciación.

- a) Amplificar DNA de *H. pylori* por medio de la técnica de PCR ya antes descrita. Usar 8 tubos de PCR con un volumen de 25µl cada uno.
- b) En gel de agarosa al 1.5% correr electroforesis para verificar la amplificación de los productos de PCR.
- c) En un tubo de 1.5ml estéril agregar el volumen de los 8 tubos de PCR (solo si amplificaron) y concentrar por 45 minutos; en caso de concentrar a sequedad hidratar con agua inyectable (50 µl).
- d) En gel de agarosa al 1.5% agregar en un pozo de 30-50 µl del producto de PCR más 10 µl de loading buffer y correr la electroforesis.
- e) Usar transiluminador de UV para apreciar la banda deseada y cortarla con bisturí.
- f) La banda ya cortada se coloca en un tubo de 1.5ml estéril (previamente pesado y rotulado). Posteriormente se vuelve a pesar el tubo y por diferencia de masa se obtienen los miligramos de agar.
- g) La banda cortada se purifica usando los reactivos del protocolo comercial de Marligen biosciences inc.
- h) El DNA purificado se cuantifica en agarosa al 1.5% a través de una electroforesis y usando como marcador µ DNA/hind III.
- i) En dos tubos para PCR estériles preparar la mezcla como se indica usando solo un primer en cada tubo.

Tabla 5.3 Reactivos para amplificar el templado usando la técnica de PCR.

| Reactivos | Cantidad en μ l | Cantidad en μ l |
|-------------------------|---------------------|---------------------|
| Agua inyectable | 5 | 5 |
| Primer 2.5pMol (CAGT-F) | 4 | - |
| Primer 2.5pMol (CAGT-R) | - | 4 |
| BigDye | 3 | 3 |
| DNA | 8 | 8 |

- j) Purificar los productos amplificados usando los reactivos del protocolo DyeEx (2.0 Spin Kit 2509 QUIANGEN).
- k) Enviar las muestras a secuenciar
- l) Analizar los datos usando los programas CHROMAS y DNAMAN.

5.5 METODO ESTADISTICO

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de independencia de χ^2 (programa EPI-INFO (2000)).

6.- RESULTADOS

6.1 Resultados generales.

En el estudio se procesaron para aislamiento de *H. pylori* biopsias de antro y cuerpo de 63 pacientes y se aislaron 244 cepas. El análisis del DNA de estos aislados consistió en determinar la presencia de alelos de *vacA* y del gen *cagA* de *H. pylori*. En la tabla 6.1.1 se presenta en forma de lista los resultados obtenidos por PCR para los genes *vacA* y *cagA* en las cepas y clonas estudiadas.

Tabla 6.1.1 Datos generales de aislamiento de *H. pylori*.

| Enfermedad | No de pacientes | No de cepas región 3 (antro) | No de cepas región 4 (cuerpo) |
|-----------------|-----------------|------------------------------|-------------------------------|
| Gastritis | 28 | 18 | 12 |
| GCA, MI y DG | 15 | 8 | 6 |
| Cáncer* | 9 | 8 | 5 |
| Úlcera duodenal | 11 | 10 | 8 |

*La región 6 es aislada de antro

Tabla. 6.1.2 Resultados generales por cepa de alelos s1/s2 y m1/m2 del *vacA* y la región 3' de *cagA* en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes que padecen gastritis.

| Cepa | Región | Clona | <i>vacA</i> (s/m) | <i>cag A</i> 3'(pb) |
|------|--------|-------|-------------------|---------------------|
| 110 | S3 | 1 | s1m2 | 500 |
| 110 | S3 | 2 | s1m2 | |
| 110 | S3 | 3 | s1m2 | |
| 110 | S3 | 4 | s1m2 | |
| 110 | S3 | 5 | s1m2 | |
| 110 | S4 | 1 | s2m2 | 500 |
| 110 | S4 | 2 | s2m2 | |
| 110 | S4 | 3 | s2m2 | |
| 110 | S4 | 4 | s2m2 | |
| 110 | S4 | 5 | s2m2 | |
| 110 | S4 | 6 | s2m2 | |
| 005 | S4 | 1 | s1m1 | 500 |
| 005 | S4 | 2 | s1m1 | |
| 103 | S3 | 1 | s1m1 | 500 |
| 103 | S3 | 2 | s1m1 | |
| 103 | S4 | 1 | s1m1 | 500 |
| 103 | S4 | 2 | s1m1 | |
| 166 | S3 | 1 | s2m2 | - |
| 166 | S3 | 2 | s2m2 | |
| 147 | S4 | 1 | s2m2 | - |
| 147 | S4 | 3 | s2m2 | |
| 284 | S3 | 1 | s2m2 | - |
| 284 | S3 | 2 | s2m2 | |

Continuación de la tabla 6.1.2

| Cepa | Región | Clona | <i>vacA</i> (s/m) | <i>cag A</i> 3'(pb) |
|------|--------|-------|-------------------|---------------------|
| 284 | S4 | 1 | s2m2 | - |
| 284 | S4 | 2 | s2m2 | |
| 260 | | 1 | s1m1 | 500 |
| 260 | | 2 | s1m1 | |
| 320 | S3 | 1 | s1m1 | 500 |
| 320 | S3 | 2 | s1m1 | |
| 320 | S4 | 1 | s1m1 | 500 |
| 320 | S4 | 2 | s1m1 | |
| 329 | S3 | 1 | s1m1 | 500 |
| 357 | S3 | 3 | s1m1 | |
| 357 | S3 | 4 | s1m1 | |
| 357 | S4 | 1 | s1m1 | |
| 357 | S4 | 2 | s1m1 | |
| 357 | S4 | 3 | s1m1 | |
| 357 | S4 | 4 | s1m1 | |
| 357 | S4 | 5 | s1m1 | |
| 357 | S4 | 6 | s1m1 | |
| 386 | S3 | 1 | s1m1 | |
| 386 | S3 | 2 | s1m1 | |
| 386 | S3 | 3 | s1m1 | |
| 386 | S3 | 4 | s1m1 | |
| 386 | S3 | 5 | s1m1 | |
| 386 | S3 | 6 | s1m1 | |
| 386 | S4 | 1 | s1m1 | 500 |
| 386 | S4 | 2 | s1m1 | |
| 386 | S4 | 3 | s1m1 | |
| 386 | S4 | 4 | s1m1 | |
| 386 | S4 | 5 | s1m1 | |
| 386 | S4 | 6 | s1m1 | |
| 370 | S3 | 1 | s2m2 | 500 |
| 370 | S3 | 2 | s2m2 | |
| 370 | S3 | 3 | s2m2 | |
| 370 | S3 | 4 | s2m2 | |
| 370 | S3 | 5 | s2m2 | |
| 370 | S3 | 6 | s2m2 | |
| 370 | S4 | 1 | s2m2 | 500 |
| 370 | S4 | 2 | s2m2 | |
| 370 | S4 | 3 | s2m2 | |
| 370 | S4 | 4 | s2m2 | |
| 370 | S4 | 5 | s2m2 | |
| 370 | S4 | 6 | s2m2 | |
| 010 | S4 | 1 | s1m1 | 500 |
| 010 | S4 | 2 | s1m1 | |
| 135 | S4 | 1 | s2m2 | - |
| 135 | S4 | 2 | s2m2 | - |
| 139 | | 1 | s1m2 | - |
| 160 | S4 | 1 | s1m1 | 500 |
| 160 | S4 | 2 | s1m1 | |

Continuación de la figura 6.1.2

| Cepa | Región | Clona | <i>vacA</i>(s/m) | <i>cag A</i> 3'(pb) |
|-------------|---------------|--------------|-------------------------|----------------------------|
| 171 | | 1 | s1m1 | 500 |
| 171 | | 2 | s1m1 | |
| 176 | S3 | 1 | s1m1 | |
| 176 | S3 | 2 | s1m1 | |
| 185 | S3 | 1 | s1m1 | |
| 185 | S3 | 2 | s1m1 | |
| 203 | S3 | 1 | s1m1 | |
| 203 | S3 | 2 | s1m1 | 650 |
| 221 | S3 | 1 | s2m2 | |
| 221 | S3 | 2 | s2m2 | - |
| 231 | S3 | 1 | s1m1 | |
| 231 | S3 | 2 | s1m1 | 550 |
| 233 | S3 | 1 | s1m1 | |
| 233 | S3 | 2 | s1m1 | 850 |
| 013 | S3 | 1 | s1m1 | 600 |
| 029 | | 1 | s1m1 | |
| 029 | | 2 | s1m1 | 500 |
| 044 | S3 | A | s1m1 | |
| 044 | S3 | B | s1m1 | |
| 044 | S3 | C | s1m1 | 500 |
| 100 | S4 | 1 | s1m1 | |
| 100 | S4 | 2 | s1m1 | 500 |
| 217 | S3 | 1 | s1m1 | |
| 217 | S3 | 2 | s1m1 | 600 |

Tabla.6.1.3. Resultados generales por cepa de alelos s1/s2 y m1/m2 de *vacA* y la región 3' de *cagA* en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes que padecen gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal y displasia gástrica (GCA, MI y DG).

| Cepa | Región | Clona | <i>vacA</i> (s/m) | <i>cag A</i> 3'(pb) |
|----------------------------|--------|-------|-------------------|---------------------|
| Gastritis crónica atrófica | | | | |
| 011 | S3 | 1 | s1m1 | |
| 015 | S3 | 1 | s1m1 | 500 |
| 015 | S3 | 2 | s1m1 | |
| 031 | S4 | 1 | s1m1 | 500 |
| 031 | S4 | 2 | s1m1 | |
| 033 | S3 | 1 | s1m1 | |
| 033 | S3 | 2 | s1m1 | |
| 080 | S4 | 1 | s1m1 | 650 |
| 080 | S4 | 2 | s1m1 | |
| 084 | S4 | 1 | s1m1 | 650 |
| 084 | S4 | 2 | s1m1 | |
| 021 | S3 | 1 | s1m1 | |
| 032 | S3 | 1 | s1m1 | 450 |
| 032 | S3 | 2 | s1m1 | |
| 036 | S4 | 1 | s1m1 | 600 |
| 036 | S4 | 2 | s1m1 | |
| Metaplasia intestinal | | | | |
| 144 | | 1 | s1m1 | |
| 144 | | 2 | s1m1 | |
| 220 | S3 | 1 | s1m1 | 500 |
| 220 | S3 | 2 | s1m1 | |
| 016 | S4 | 1 | s1m1 | 600 |
| 016 | S4 | 2 | s1m1 | |
| 228 | S3 | 1 | s1m1 | 600 |
| 228 | S3 | 2 | s1m1 | |
| Displasia gástrica | | | | |
| 035 | S3 | 1 | s1m1 | |
| 060 | S4 | 1 | s1m1 | |

Tabla.6.1.3 Resultados generales por cepa de alelos s1/s2 y m1/m2 de *vacA* y la región 3' de *cagA* de *H. pylori* aislada de pacientes que padecen cáncer.

| Cepa | Región | Clona | <i>vacA</i> (s/m) | <i>cag A</i> 3'(pb) |
|------|--------|-------|-------------------|---------------------|
| 188 | S3 | 1 | s1m1 | 650 |
| 188 | S3 | 2 | s1m1 | |
| 188 | S3 | 3 | s1m1 | |
| 188 | S3 | 4 | s1m1 | |
| 188 | S3 | 5 | s1m1 | |
| 188 | S3 | 6 | s1m1 | |
| 188 | S4 | 1 | s1m1 | 650 |
| 188 | S4 | 2 | s1m1 | |
| 188 | S4 | 3 | s1m1 | |
| 188 | S4 | 4 | s1m1 | |
| 188 | S4 | 5 | s1m1 | |
| 188 | S4 | 6 | s1m1 | |
| 206 | S3 | 1 | s1m1 | 400 |
| 206 | S3 | 2 | s1m1 | |
| 377 | S3 | 1 | s1m1 | 500 |
| 377 | S3 | 2 | s1m1 | |
| 377 | S4 | 1 | s1m1 | 500 |
| 377 | S4 | 2 | s1m1 | |
| 401 | S4 | 1 | s1m1 | 600 |
| 443 | S6 | 1 | s1m1 | - |
| 510 | S3 | 1 | s1m1 | 650 |
| 510 | S3 | 2 | s1m1 | |
| 510 | S4 | 1 | s1m1 | 650 |
| 510 | S4 | 2 | s1m1 | |
| 535 | S3 | 1 | | 500 |
| 535 | S3 | 2 | s1m1 | |
| 535 | S4 | 1 | s1m1 | |
| 535 | S4 | 2 | s1m1 | |
| 456 | S4 | 1 | s1m1 | 600 |
| 456 | S4 | 2 | s1m1 | |
| 456 | S3 | 1 | s1m1 | 800 |
| 456 | S3 | 2 | s1m1 | |
| 456 | S6 | 1 | s1m1 | 800 |
| 456 | S6 | 2 | s1m1 | |
| 331 | S3 | 1 | s1m1 | 600 |
| 331 | S3 | 2 | s1m1 | |
| 331 | S3 | 3 | s1m1 | |
| 331 | S3 | 4 | s1m1 | |
| 331 | S3 | 5 | s1m1 | |

Tabla. 6.1.4 Resultados generales por cepa de alelos s1/s2 y m1/m2 de *vacA* y la región 3' de *cagA* en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes que padecen úlcera duodenal.

| Cepa | Región | Clona | <i>vacA</i> (s/m) | <i>cag A</i> 3'(pb) |
|------|--------|-------|-------------------|---------------------|
| 174 | S3 | 1 | s1m1 | 500 |
| 174 | S3 | 2 | s1m1 | |
| 174 | S3 | 3 | s1m1 | |
| 174 | S3 | 4 | s1m1 | |
| 174 | S3 | 5 | s1m1 | |
| 174 | S3 | 6 | s1m1 | |
| 174 | S4 | 1 | s1m1 | 500 |
| 174 | S4 | 2 | s1m1 | |
| 174 | S4 | 3 | s1m1 | |
| 174 | S4 | 4 | s1m1 | |
| 174 | S4 | 5 | s1m1 | |
| 174 | S4 | 6 | s1m1 | |
| 204 | S3 | 1 | s1m1 | 500 |
| 204 | S3 | 2 | s1m1 | |
| 204 | S3 | 3 | s1m1 | |
| 204 | S3 | 4 | s1m1 | |
| 204 | S3 | 5 | s1m1 | |
| 204 | S3 | 6 | s1m1 | |
| 204 | S4 | 1 | s1m1 | 500 |
| 204 | S4 | 2 | s1m1 | |
| 204 | S4 | 3 | s1m1 | |
| 204 | S4 | 4 | s1m1 | |
| 204 | S4 | 5 | s1m1 | |
| 204 | S4 | 6 | s1m1 | |
| 355 | S3 | 1 | s1m1 | 500 |
| 355 | S3 | 2 | s1m1 | |
| 355 | S3 | 3 | s1m1 | |
| 355 | S3 | 4 | s1m1 | |
| 355 | S3 | 6 | s1m1 | |
| 362 | S3 | 1 | s1m1 | |
| 362 | S3 | 2 | s1m1 | |
| 362 | S3 | 3 | s1m1 | |
| 362 | S3 | 4 | s1m1 | |
| 362 | S3 | 5 | s1m1 | |
| 362 | S3 | 6 | s1m1 | |
| 362 | S4 | 1 | s1m1 | 500 |
| 362 | S4 | 2 | s1m1 | |
| 362 | S4 | 3 | s1m1 | |
| 362 | S4 | 4 | s1m1 | |
| 362 | S4 | 5 | s1m1 | |
| 362 | S4 | 6 | s1m1 | |
| 372 | S3 | 1 | s1m1 | 500 |
| 372 | S3 | 2 | s1m1 | |
| 372 | S3 | 3 | s1m1 | |
| 372 | S3 | 4 | s1m1 | |
| 372 | S3 | 5 | s1m1 | |
| 372 | S3 | 6 | s1m1 | |

Continuación de la figura 6.1.4

| Cepa | Región | Clona | <i>vacA</i>(s/m) | <i>cag A</i> 3'(pb) |
|-------------|---------------|--------------|-------------------------|----------------------------|
| 372 | S4 | 1 | s1m1 | 500 |
| 372 | S4 | 2 | s1m1 | |
| 372 | S4 | 3 | s1m1 | |
| 372 | S4 | 4 | s1m1 | |
| 372 | S4 | 5 | s1m1 | |
| 372 | S4 | 6 | s1m1 | |
| 336 | S3 | 1 | s1m2 | - |
| 336 | S3 | 2 | s1m2 | |
| 336 | S3 | 3 | s1m2 | |
| 336 | S3 | 4 | s1m2 | |
| 336 | S3 | 5 | s1m2 | |
| 336 | S3 | 6 | s1m2 | |
| 336 | S4 | 1 | s2m2 | - |
| 336 | S4 | 2 | s2m2 | |
| 336 | S4 | 3 | s2m2 | |
| 336 | S4 | 4 | s2m2 | |
| 336 | S4 | 5 | s2m2 | |
| 336 | S4 | 6 | s2m2 | |
| 300 | S3 | 2 | s1m1 | 400 |
| 387 | S3 | 1 | s2m2 | - |
| 387 | S4 | 1 | s2m2 | 600 |
| 387 | S4 | 2 | s2m2 | |
| 379 | S3 | 1 | s1m1 | 500 |
| 379 | S3 | 2 | s1m1 | |
| 379 | S4 | 1 | s1m1 | 500 |
| 379 | S4 | 2 | s1m1 | |
| 261 | S3 | 1 | s1m1 | 500 |
| 261 | S3 | 2 | s1m1 | |
| 263 | S4 | 1 | s1m1 | 500 |
| 263 | S4 | 2 | s1m1 | |

6.2 Resultados de los alelos s1/s2 y m1/m2 de *vacA* por cepa.

La tabla 6.2.1 y la figura 6.2.1 muestran la frecuencia obtenida de los alelos de *vacA* en todas las cepas estudiadas. Observamos que para el alelo s el que se encontró con mayor frecuencia fue, s1 (84.02%) y para el alelo m el más frecuente fue m1 (79.10%) La tabla 6.2.2 y figura muestran las frecuencias obtenidas para los alelos de *vacA* en relación a la enfermedad. En este estudio encontramos que la variación alelica mas común fue s1 (gastritis 70.59%, cáncer gástrico 100%, GCA, MI y DG 100% y úlcera duodena 88.31%) y m1 (gastritis 64.71%, cáncer gástrico 100%, GCA, MI y DG 100% y úlcera duodena 80.52%). La tabla 6.2.3 y figura 6.2.3 muestran la frecuencia de los combinaciones de los alelos de *vacA*

Tabla 6.2.1 Frecuencia de alelos de *vacA* en cepas de *H. pylori* de aislados de pacientes infectados.

| Alelos | No | Porcentaje % |
|--------|-----|--------------|
| s1 | 205 | 84.02 |
| s2 | 39 | 15.98 |
| m1 | 193 | 79.1 |
| m2 | 51 | 20.9 |

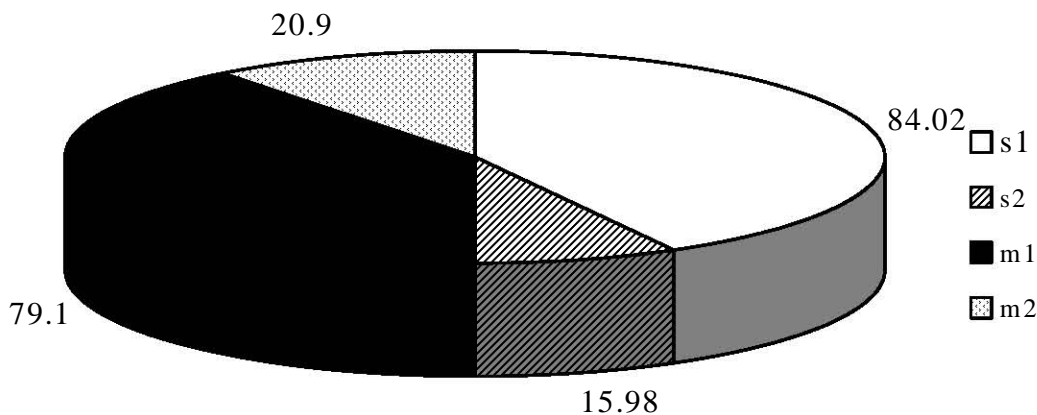


Figura 6.2.1 Presencia de los alelos s1/s2 y m1/m2 de *vacA*, en el total de las cepas (244). El resultado es expresado en porcentaje.

Tabla 6.2.2. Frecuencia de alelos *vacA* en cepas de *H. pylori* aisladas de diferentes enfermedades gastroduodenales.

| ENFERMEDADES GASTRODUODENALES | | | | |
|-------------------------------|----------------------|--------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| Alelo de <i>vacA</i> | Gastritis (n=102) | GCA,DG y MI ^{1,a} (n=26) | Cáncer ^{2,b} (n=39) | UD ^{3,c} (n=77) |
| | positivo (%) | positivo (%) | positivo (%) | positivo (%) |
| s1 | 72 (70.59) | 26 (100) | 39 (100) | 68 (88.31) |
| s2 | 30 (29.41) | 0 (0) | 0 (0) | 9 (11.69) |
| m1 | 66 (64.71) | 26 (100) | 39 (100) | 62 (80.52) |
| m2 | 36 (35.29) | 0 (0) | 0 (0) | 15 (19.48) |

* GCA,DG,MI,cáncer y UD vs gastritis (Alelo s, ¹p<0.00372, ²p<0.00033 y ³p<0.000670) (alelo m ^ap<0.00087, ^bp<0.00004 y ^cp<0.03128).

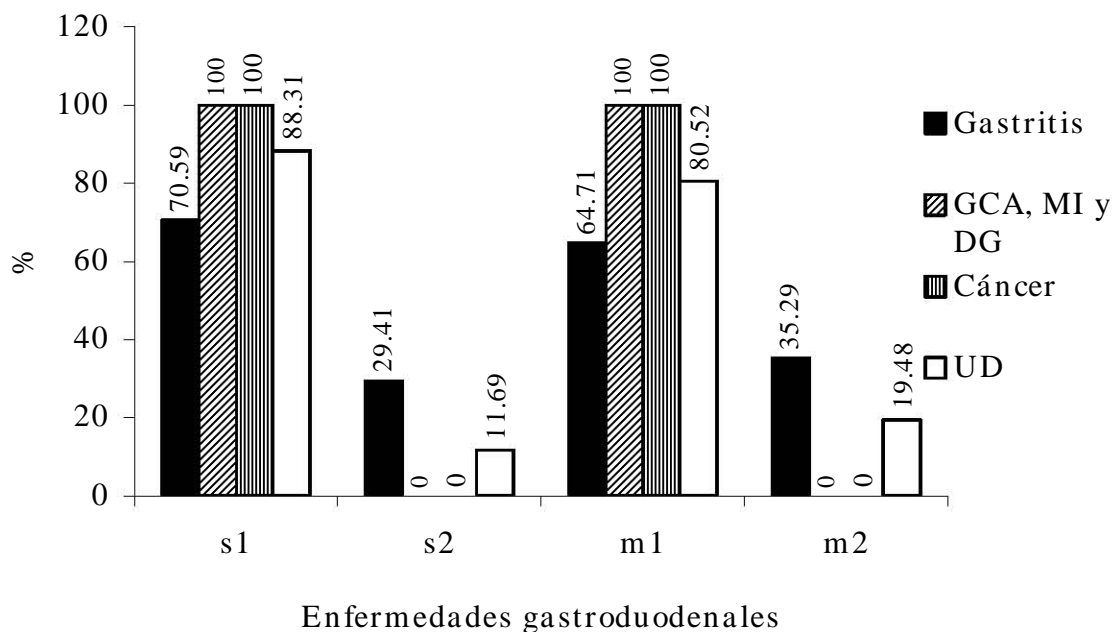


Figura 6.2.2 Presencia de alelos de *vacA* (s1/s2 y m1/m2) en cepas de diferentes enfermedades gastroduodenales. El resultado es expresado en porcentaje.

Tabla 6.2.3 Frecuencia de diferentes combinaciones de alelos de *vacA* (s1m1, s2m2 y s1m2) en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes infectados.

| Genotipo | Número (n=244) | Porcentaje % |
|----------|----------------|--------------|
| s1m1 | 193 | 79.1 |
| s2m2 | 39 | 15.98 |
| s1m2 | 12 | 4.92 |

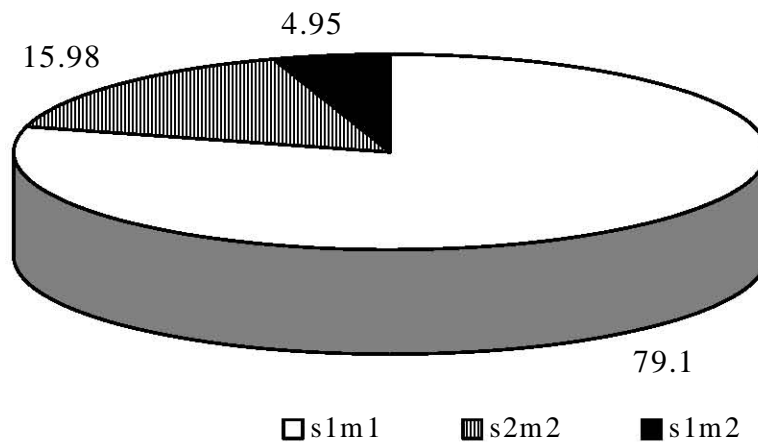


Figura 6.2.3 Frecuencia de diferentes combinaciones de alelos de *vacA* (s1m1, s2m2 y s1m2) en 244 cepas de *H. pylori*. El resultado es expresado en porcentaje.

Tabla 6.2.4 Frecuencia de diferentes combinaciones de alelos de *vacA* (s1m1, s2m2 y s1m2) en cepas de *H. pylori* aisladas de diferentes enfermedades gastroduodenales.

| Genotipo | Gastritis (n=102) | GCA, MI y DG (n=26) | Cáncer (n=39) | UD (n=77) |
|----------|----------------------|---------------------------|------------------|--------------|
| | Positivo (%) | Positivo (%) | Positivo (%) | Positivo (%) |
| s1m1 | 66 (64.71) | 26 (100) | 39 (100) | 62 (80.52) |
| s2m2 | 30 (29.42) | 0 (0) | 0 (0) | 9 (11.69) |
| s1m2 | 6 (5.88) | 0 (0) | 0 (0) | 6 (7.79) |

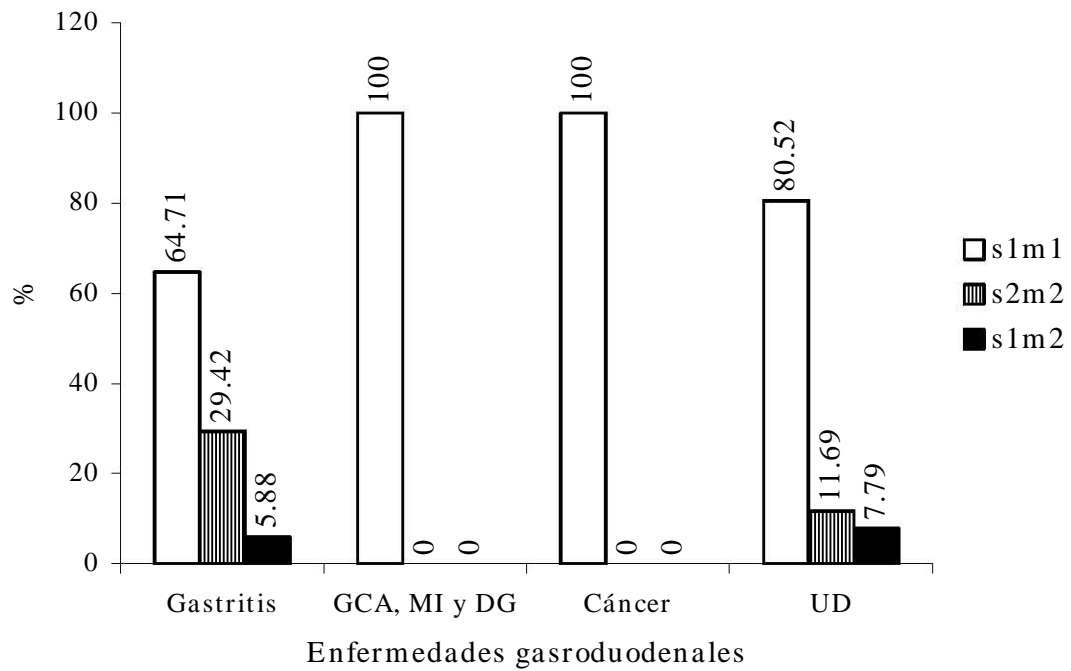


Figura 6.2.4 Presencia de la combinación de alelos de *vacA* (s1m1, s2m2 y s1m2) en diferentes enfermedades gastroduodenales. El resultado es expresado en porcentaje.

6.3 Frecuencia de la región 3' de *cagA*, la relación entre genotipo *vacA* y *cagA* y de la variación de tamaño de la región 3' de *cagA* por cepa.

Observamos en la tabla 6.3.1 y la figura 6.3.1 que el genotipo más común en pacientes mexicanos fue *cagA*⁺ (88.93%). En la tabla 6.3.2 y la figura 6.3.2 la combinación de los alelos de *vacA* y la región 3' de *cagA* con mayor frecuencia en los 4 grupos de enfermedades gastroduodenales es s1m1/*cagA* 3'⁺. En la tabla 6.3.3 y las figuras 6.3.3 y 6.3.4 encontramos el tamaño de productos de PCR de región 3' de *cagA* más frecuente en gastritis y úlcera duodenal fue de 500-599pb y en cáncer gástrico y GCA, MI y DG fue 600-699pb.

Tabla 6.3.1 Frecuencia de la región 3' de *cagA* en cepas de *H. pylori* aisladas de biopsias de pacientes infectados.

| <i>cagA</i> +/- | No (n=244) | Porcentaje % |
|-----------------------------|------------|--------------|
| <i>cagA</i> ⁺ * | 217 | 88.93 |
| <i>cagA</i> ⁻ ** | 27 | 11.07 |

*el signo + indica presencia del gen y ** el signo - indica ausencia.

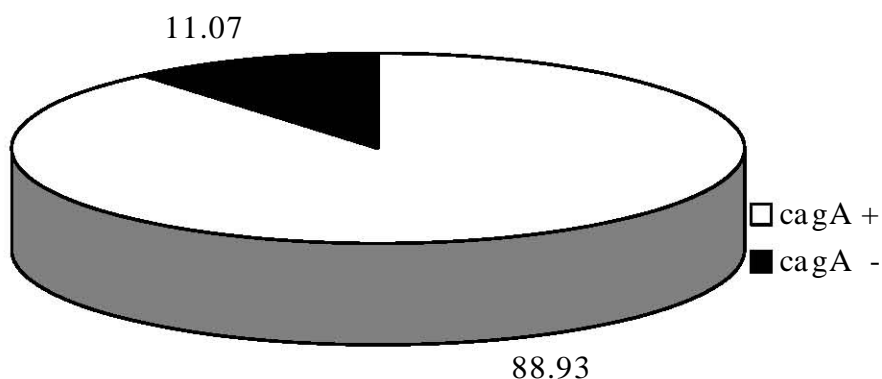


Figura 6.3.1 Presencia de la región 3' de *cagA* en cepas de *H. pylori* en (244). Los resulta son expresados en porcentaje.

Tabla 6.3.2 Frecuencia de la combinación de alelos de *vacA* y la región 3' de *cagA* (+/-) en cepas aisladas de diferentes enfermedades gastroduodenales.

| Enfermedad | s1m1/ <i>cagA</i> + | s1m1/ <i>cagA</i> - | s2m2/ <i>cagA</i> + | s2m2/ <i>cagA</i> - | s1m2/ <i>cagA</i> + | s1m2/ <i>cagA</i> - |
|--------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | Positivo (%) | Positivo (%) | Positivo (%) | Positivo (%) | Positivo (%) | Positivo (%) |
| Gastritis | 66 (64.70) | 0 (0) | 18 (17.64) | 12 (11.76) | 5 (4.90) | 1 (0.98) |
| GCA, MI y DG | 26 (100) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| Cáncer | 38 (97.44) | 1 (2.56) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| UD | 62 (80.52) | 0 (0) | 2 (2.60) | 7 (9.09) | 0 (0) | 6 (7.79) |

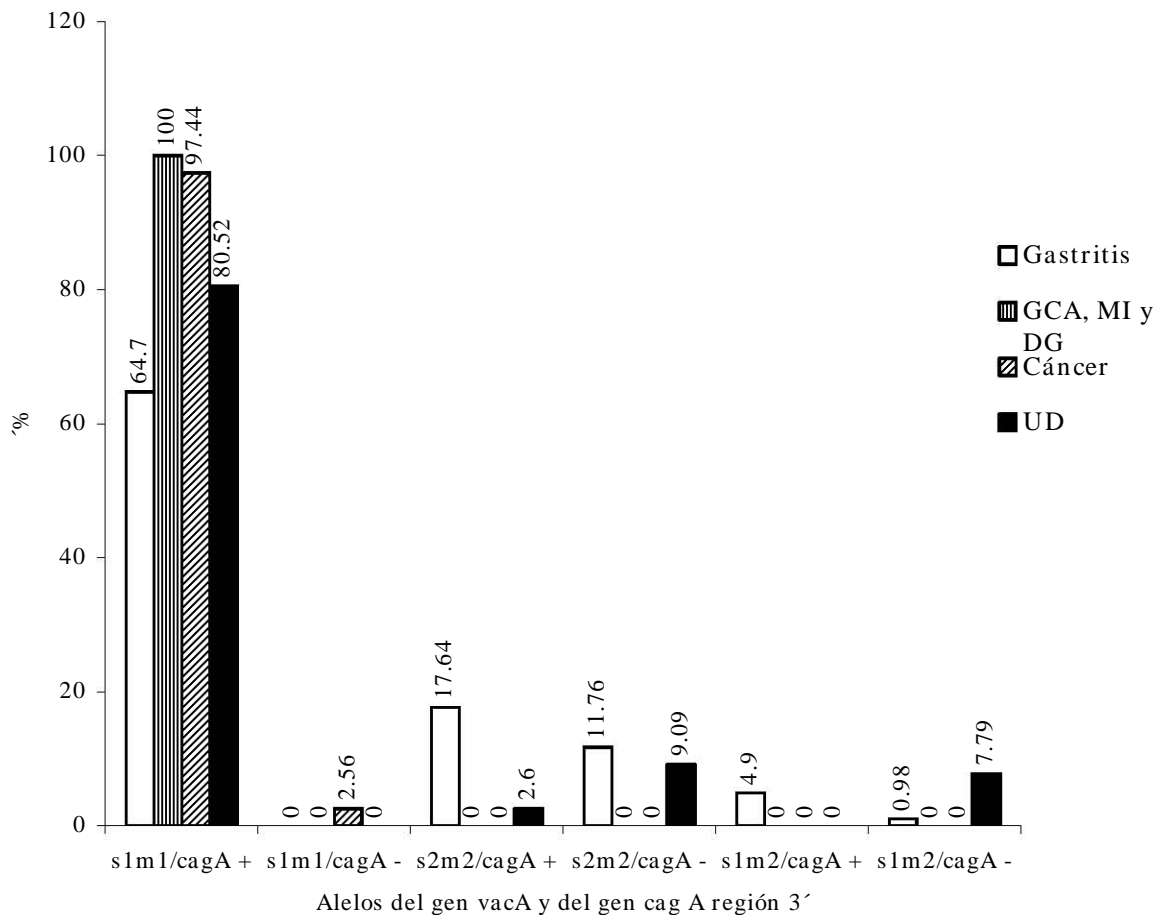


Figura 6.3.2 Relación entre la combinación de alelos de *vacA* (s1m1, s2m2 y s1m2) y genotipo de *cagA* (+/-) (+/-) en cepas aisladas de diferentes enfermedades gastroduodenales.

Tabla 6.3.3 Relación de productos de PCR de región 3' de *cagA* con enfermedades gastroduodenales.

| Enfermedad gastroduodenal | n | Producto de PCR (pb) | | | |
|---------------------------|----|----------------------|------------|-----------|-----------|
| | | 400-499 | 500-599 | 600-699 | 800-899 |
| Gastritis | 28 | 3(10.71%) | 21(75%) | 3(10.71%) | 1(3.57%) |
| GCA, MI y DG | 9 | 1(11.11%) | 3(33.33%) | 5(55.55%) | 0(0%) |
| Cáncer | 13 | 1(7.69%) | 4(30.77%) | 6(46.15%) | 2(15.38%) |
| UD | 15 | 1(6.66%) | 13(86.67%) | 1(6.60%) | 0(0%) |

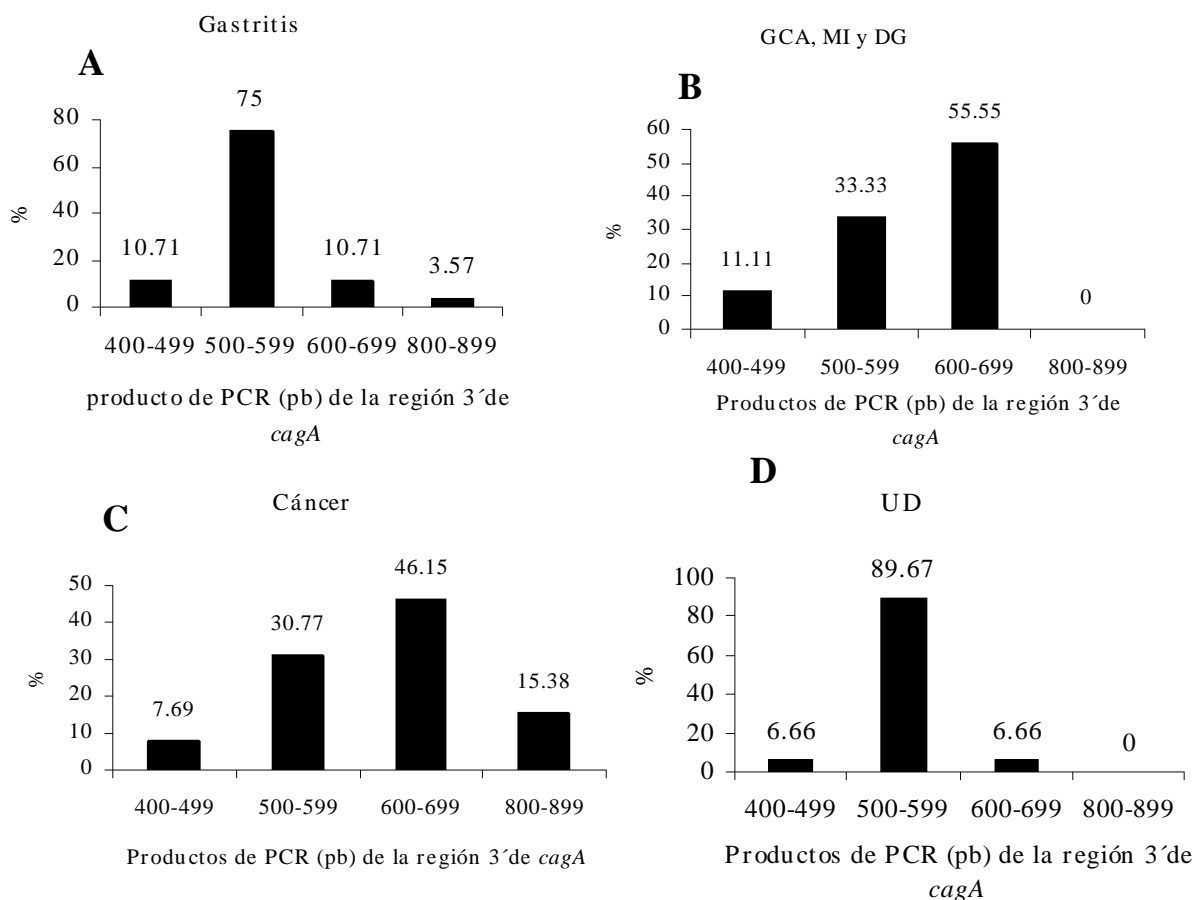


Figura 6.3.3 Variación de productos de PCR de región 3' de *cagA* en diferentes enfermedades gastroduodenales. Grafica A (gastritis), grafica B (GCA, MI y DG), grafica C (cáncer) y grafica D (úlceras duodenales (UD)). El resultado es expresado en porcentaje.

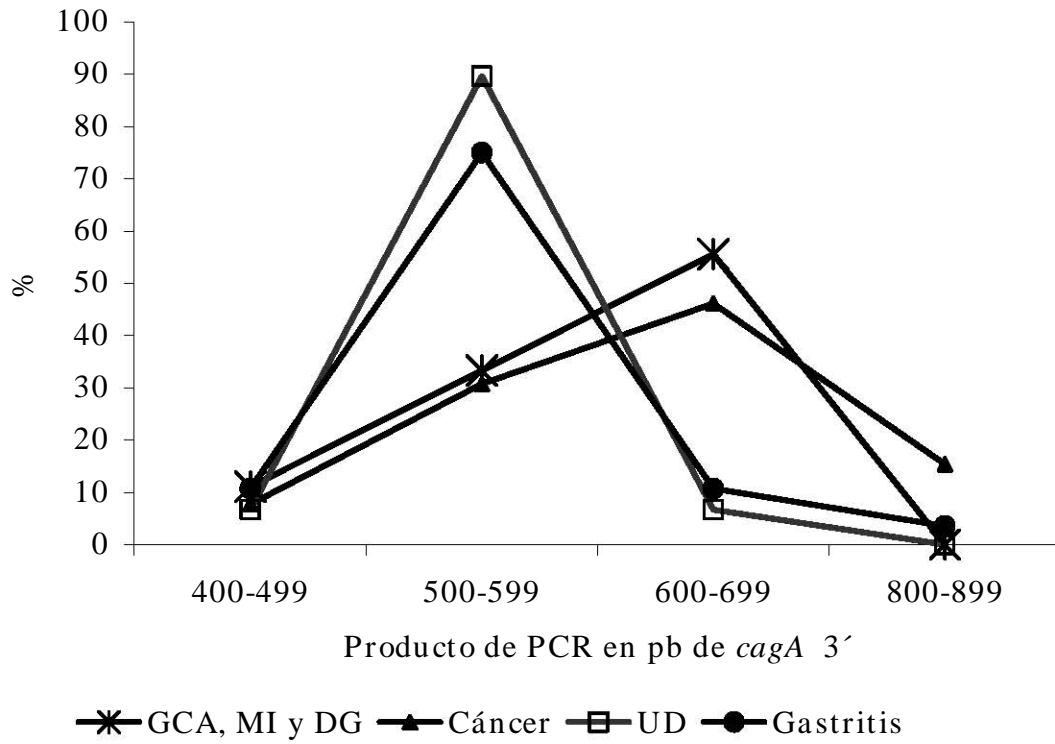


Figura 6.3.4 Grafica de variación de productos de PCR de región 3' de *cagA* en diferentes enfermedades gastroduodenales.

6.4 Resultados de electroforesis en agarosa de productos de PCR.

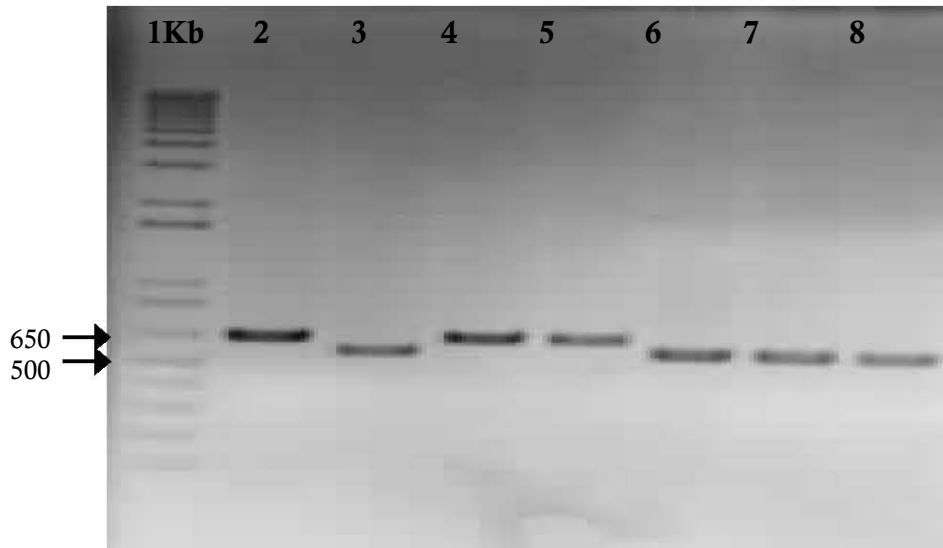


Figura 6.4.1. Gel de agarosa al 1%, electroforesis de productos de PCR del alelo “m” de *vacA*. Línea 1 (marcador de 1KB Plus DNA ladder), línea 2 (control positivo para el alelo m2, cepa 8822), línea 3 (control positivo para el alelo m1, cepa 8823), línea 4 (cepa 221-S3-C1, positivo para el alelo m2), línea 5 (cepa 221-S3-C2, positivo para el alelo m2), línea 6 (cepa 188-S3-C1, positivo para el alelo m1), línea 7 (cepa 188-S3-C2, positivo para el alelo m1), línea 8 (cepa 188-S3-C3, positivo para el alelo m1).

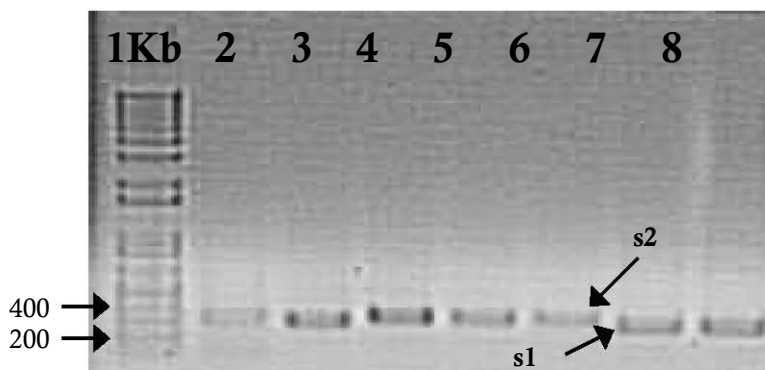


Figura 6.4.2. Gel de agarosa al 1%, electroforesis de productos de PCR del alelo “s” de *vacA*. Línea 1 (marcador de 1KB Plus DNA ladder), línea 2 (control positivo para el alelo s2, cepa 8822), línea 3 (control positivo para el alelo s1, cepa 8823), línea 4 (cepa 387-S3-C1, positivo para el alelo s2), línea 5 (cepa 387-S4-C1, positivo para el alelo s2), línea 6 (cepa 387-S4-C2, positivo para el alelo s2), línea 6 (cepa 188-S3-C1, positivo para el alelo s1), línea 7 (cepa 188-S3-C2, positivo para el alelo s1), línea 8 (cepa 188-S3-C3, positivo para el alelo s1).

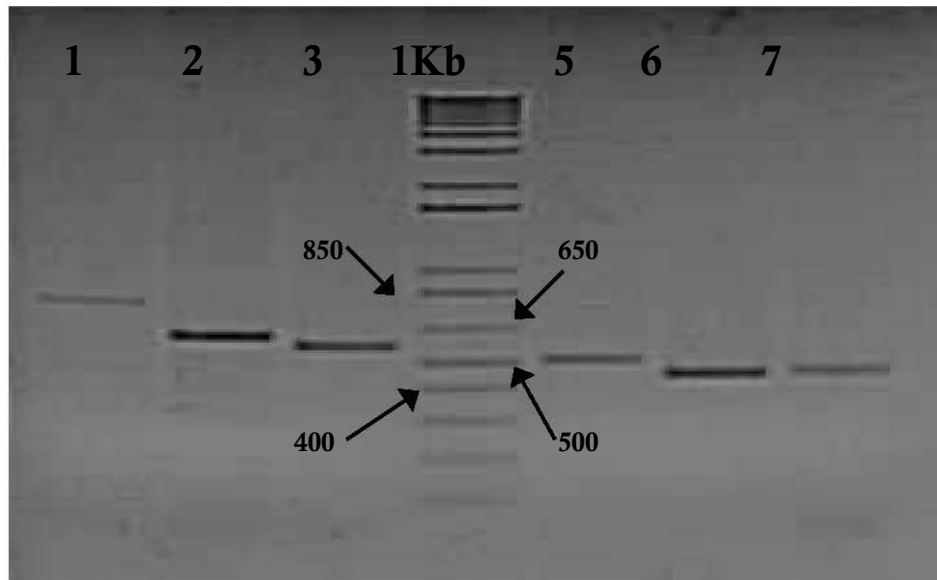


Figura 6.4.2. Gel de agarosa al 1%, electroforesis de productos de PCR de la región 3' de *cagA*. Línea 1 (cepa 456-S4-C1, 800pb), línea 2 (cepa 188-S3-C6, 650pb), línea 3 (387-S4-C1, 600pb), Línea 4 (marcador de 1KB Plus DNA ladder), línea 5 (cepa 372-S3-C3, 500pb), línea 6 (control positivo J99, 450pb), línea 7 (cepa 32-S3-C1, 450pb)

6.5 Ejemplo de secuenciación de la región 3' de *cagA* de la cepa clínica 372-S3-C3 de *H. pylori* proveniente de un paciente que padece úlcera duodenal.

Secuencia de la proteína CagA región 3'

```
1      CAACTCTTTCTAAAACTTTTCGGACATCAAGAAAGAGTTGAATGCAAAACTTGGA AATT
1      T L S K N F S D I K K E L N A K L G N F

61     TCAATAACAATAACAATAATGGACTCAAAAACGAACCCATTTATGCTAAAAGTTAATAAAA
21     N N N N N N G L K N E P I Y A K V N K K

121    AGAAAACAGGACAAGCAGCTAGCCCTGAAGAACCCATTTATACTCAAGTTGCTAAAAAGG
41     K T G Q A A S P E E P I Y T Q V A K K V

181    TGAATGCAAAAATTGACCGACTCAATCAAATAGCAAGTGGTTTGGGTGGTGTAGGGCAAG
61     N A K I D R L N Q I A S G L G G V G Q A

241    CAGCGGGCTTCCCTTTGAAAAAGCATGATAAAGTTGATGATCTCAGTAAGGTAGGGCGAT
81     A G F P L K K H D K V D D L S K V G R S

301    CAGCTAGCCCTGAACCCATTTATGCTACAATTGATGATCTTGGCGGACCTTTCCCTTTGA
101    A S P E P I Y A T I D D L G G P F P L K

361    AAAGGCATGATAAAGTTGATGATCTCAGTAAGGTAGGGCTTTCAAGGAATCAAAAATTGG
121    R H D K V D D L S K V G L S R N Q K L A

421    CTCAG
141    Q
```

7.- DISCUSIÓN

La infección por *H. pylori* esta asociada a serios padecimientos gastroduodenales como son gastritis, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia gástrica, cáncer y úlcera duodenal.

En el trabajo se buscó la presencia de alelos de *vacA* y la región 3' de *cagA* en aislamientos clínicos. Estos genes son importantes factores de virulencia y varios autores los relacionan a enfermedad gastroduodenal severa como úlcera duodenal y cáncer gástrico.

En este trabajo de tesis, se observo que todos los aislamientos clínicos de *H. pylori* estudiados son positivos para *vacA*, predominando en la región señal el alelo s1 en 205 (84.02%) de los aislamientos y solo en 39 (15.98%) el alelo s2; esto fue estadísticamente significativo, $p < 0.0003$. En la región media de *vacA* el alelo sobresaliente fue m1 en 193 (79.10%) de los aislamientos, encontraste al alelo m2 en 51 (20.90%) de los aislamientos, siendo estadísticamente significativo, $p < 0.00004$.

Comparando estos resultados a los de otros países, las cepas mexicanas son similares a lo reportado en Alemania para los alelos de la secuencia señal, donde se observó que s1 de *vacA* esta en 83.1% de los aislamientos y solo en 15.4% el alelo s2; pero son diferentes en los resultados observados para la region media, 36.9% de los aislamientos presentan al alelo m1 y 63.1% al alelo m2.²⁷ En Sudáfrica, de forma similar a lo observado en cepas mexicanas el alelo s1 de *vacA* se presenta en 80% de los aislados, el alelo s2 en 20%, el alelo m1 en 68% y en 32% el alelo m2 de *vacA*²⁸. A diferencia de lo encontrado con cepas mexicanas, en Asia es muy común el alelo m2 de *vacA* en cepas de *H. pylori*, por ejemplo, en China 78 aislamientos de 96 fueron positivos.²⁹

La combinación de alelos de la región señal y media de *vacA* se usan para indicar la capacidad de la toxina (VacA), de inducir vacuolización: s1m1 codifica la forma mas toxica, y son los alelos más relacionados a virulencia y enfermedad, s2m2 codifica una forma que no induce vacuolización y la toxina codificada por s1m2 induce vacuolización limitada.¹⁵

En aislados de pacientes mexicanos infectados por *H. pylori* predomina la combinación s1m1 (79.10%) le sigue s2m2 (15.98%) y por último s1m2 (4.92%). Es diferente la combinación de alelos de *vacA* de *H. pylori* en pacientes mexicanos comparado con otros países. En Nigeria predomina la combinación s1m2 seguida de s1m1 al igual que en Alemania.^{27 30} Aunque en Sudáfrica la combinación predominante fue s1m1 (63%) seguida de s1m2 (15%) y por último s2m2 (5%). Un estudio realizado en cuatro grupos étnicos de Houston Texas, la población blanca y vietnamita presentaron en la mayoría de los casos la combinación s1m2 y la población negra e hispana s1m1.¹⁹ El último dato es similar a resultados en mexicanos porque estos pertenecen a la comunidad hispana.

La diferencia de cepas entre una región y otra se debe a varios factores como son el estado socioeconómico, costumbres, erradicación de la bacteria e incluso el origen de la población.

Diferentes artículos reportan, las cepas productoras de la forma activa de la proteína VacA poseen el alelo s1 y a la vez esta relacionado a mayor daño gástrico.³¹

En la tabla 6.2.2 en cepas de pacientes con cáncer y gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal y displasia gástrica poseen alelo s1 y m1 en 100% de las muestras analizadas y en gastritis que es el grupo control se observó en el 64% de las cepas. Sugiriendo que la presencia de los alelos s1 y m1 de *vacA* se relacionan al aumento de daño gástrico, siguiendo el curso natural de la enfermedad (gastritis, GCA, MI, DG y cáncer). En aislados de pacientes con gastritis hay casos con alelo s2 y m2, esto se debe a que la enfermedad es la menos agresiva comparada con las otras ya citadas

En México se ha reportado que el alelo s1 de *vacA* es común en pacientes adultos con úlcera.³² De igual forma en el estudio se encontró frecuentemente el alelo s1 y m1 de *vacA* en los pacientes con úlcera duodenal (88.3% y 80.52%), comparado a los alelos s2 y m2 (11.64% y 19.48% respectivamente).

En general en pacientes mexicanos infectados con *H. pylori*, *vacA* sirve para diferenciar entre cepas de mayor virulencia y las de menor virulencia, y este alelo se presenta con mayor frecuencia en pacientes con enfermedad gastroduodenal que en controles con gastritis.

En pacientes mexicanos infectados con *H. pylori* puede existir infección con una sola cepa o con mas de una, en el estudio dos pacientes presentaron infección mixta, es decir, hubo aislados en el mismo paciente con mas de un genotipo, ya que, la bacteria que colonizó inicialmente puede sufrir recombinación, mutaciones o delección o bien el paciente fue infectado con diferentes cepas.

Las cepas *cagA*⁺ de *H. pylori* varían en las diferentes regiones del mundo; en el trabajo se observo frecuencia de cepas *cagA* positivas en 88.52% de las cepas estudiadas, comparado con resultados de otros países la frecuencia es diferente; en población alemana y holandesa esta presente en 73.8 y 73% respectivamente y en Corea y China en más del 90%.²¹

En la tabla 6.3.2 la relación alelo *vacA* y región 3' de *cagA* mas común en todas las enfermedades gastroduodenales fue s1m1/*cagA* 3' ⁺, por lo tanto, la cepa tipo I es predominante en nuestro país. En el estudio hecho en Houston Texas la relación mas común de estos genes en población blanca y vietnamita fue s1m2/*cagA*⁺ y en la población negra e hispana s1m1/*cagA*⁺.¹⁹

Diversos autores señalan, que la región 3' de *cagA* presenta variación en tamaño; en los aislamientos clínicos de pacientes mexicanos que estudiamos en este trabajo también existe diversidad de tamaño predominando 500pb, en contraste en cepas asiáticas (mayores a 600pb). En los aislados de gastritis y úlcera duodenal el tamaño frecuente del producto de *cagA* 3' es de 500-599pb. Este tamaño puede representar a menor número de sitios de fosforilación y por tanto menor daño. En úlcera duodenal hay mayor porcentaje que en gastritis del producto de PCR de 500-599pb,

En la siguiente tabla se presentan los resultados de un trabajo realizado en África, donde observamos que hay una cepa de *H. pylori* aislada de gastritis con un producto *cagA* 3' de 700pb, que bien puede deberse a inserciones en el gen o realmente hay un mayor número de sitios de fosforilación.

| Enfermedad | Tamaño de <i>cagA</i> 3' en pb | | |
|----------------|--------------------------------|---------|--------|
| | <600 | 600-700 | >700 |
| Gastritis | 19 (63%) | 10(33%) | 1(3%) |
| Úlcera péptica | 12(92%) | 1(8%) | 0(0%) |
| Cáncer | 6(60%) | 0(0%) | 4(40%) |

*Tomada de la tabla 2 Gut 1999 45:499-502.

Es interesante observar que los productos de *cagA* 3' de 600-699 pb (46.15% y 55.55% respectivamente), son mas frecuentemente observados en las cepas de lesiones precancerosas y cáncer, esto coincide con lo reportado en cepas de pacientes japoneses pero no con las cepas Sudafricanas; en Japón de 30 cepas de pacientes con cáncer 24 poseen un producto de PCR de 642-651pb y en África del Sur de 10 pacientes con cáncer 6 presentan un tamaño menor a 600pb. En pacientes mexicanos encontramos en dos aislamientos de pacientes con cáncer un producto de PCR de 800-899pb, en cepas japonesas encontraron 6 de 30 y África del Sur 4 de 10 presentaron un tamaño mayor a 700pb para la región 3' de *cagA*.

| Tipo de cepa (producto de PCR en pb) | Enfermedad | | |
|--------------------------------------|-------------------|------------------------|---------------|
| | Gastritis (n= 50) | Úlcera duodenal (n=35) | Cáncer (n=30) |
| A (642-651) | 48 | 35 | 24 |
| B(756) | 2 | 0 | 0 |
| C(810-813) | 0 | 0 | 6 |

*Tomada de la tabla 3 J. Clin. Microbiol. 1998; 36:2258-2263.

Diversos autores han asociado la presencia de *cagA* en *H pylori* con cáncer gástrico y atrofia. En este estudio se asocia a cáncer y a enfermedades pre-cancerosas como gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal y displasia gástrica, y no tan solo a la región conservada de este gen, si no también al mayor tamaño en la región variable.

Es preciso aclarar que el tamaño de producto de PCR en la región 3' por si solo no puede indicar el grado de virulencia de las cepas es necesario secuenciar para conocer que tantos sitios de fosforilación (motivos EPIYA) tiene la región variable, porque puede existir un tamaño grande de producto de PCR pero tenga al secuenciar solo un motivo EPIYA sugiriendo posibles inserciones; diversos autores asocian un producto mayor a un número mayor de motivos EPIYA, pero usar el método de PCR por si solo no es indicativo.

En el estudio un paciente presento infección mixta o heterogénea de *H pylori* de acuerdo al tamaño de *cagA* 3', aunque todos los aislamientos son s1m1 *vacA*;

En general podemos decir que las cepas aisladas de diferentes patologías muestran diferentes productos *cagA* 3', las cepas de gastritis presentan productos de 400-499 (10.71%) 500-599pb (75%), 600-699pb (10.71%) y 800-899pb (3.57%), las cepas de lesiones precancerosas de 400-499 (11.11%) 500-599pb (33.33%) u 600-699pb (55.55%), las cepas de cáncer 400-499 (7.69%) 500-599pb (30.77%), 600-699pb (46.15%) y 800-899pb (15.38%), y las cepas de úlcera 400-499 (6.66%) 500-599pb (89.67%) y 600-699pb (6.66%) lo que parece indicar que hay diferente numero de motivos EPIYA en las cepas dependiendo del padecimiento

Se realizó la secuenciación de una sola cepa con un producto de PCR de 500pb proveniente de un paciente con úlcera duodenal, se escogió el tamaño de 500pb porque es el más común en el estudio. Se encontraron 3 motivos EPIYA del tipo A, B y C característicos de la población occidental, aunque son tres motivos EPIYA, se asocia a un grado menor de fosforilación de unión a la proteína SHP2 y presencia del genotipo hummingbird.

8.- CONCLUSIONES

9.1 Conclusión general.

En México las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con enfermedad gastroduodenal son en su mayoría cepas *cagA+* *vacA+*. Por lo que las cepas de *H. pylori* tipo I es predominante en pacientes mexicanos.

9.2 Conclusiones particulares

9.2.1 Las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes mexicanos presentan genes *vacA* y *cagA* en el 100% y 88.5 % de los casos respectivamente.

9.2.2 En cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes mexicanos los alelos *vacA* más frecuentes son: *s1m1* (79.10%) seguido de *s2m2* (15.98%) y finalmente *s1m2* (4.92%).

9.2.3 Las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes mexicanos presentan variación en el tamaño del producto de *cagA* 3' en las diferentes enfermedades gastroduodenales el producto encontrado con más frecuencia es de 500-599pb. El tamaño mayor de la región 3' de *cagA* (800pb) se localizó en pacientes con cáncer y lesiones pre cancerosas.

9.- REFERENCIAS

- 1) Mobley H.L.T, Mendz and Hazell S.I. *Helicobacter pylori*. Physiology and Genetics. ASMI. Press. 2001 Washington D.C. pag. 97-106, 125-131, 179-187, 397-405 y 565-75.
- 2) IARC. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group the Evolution of carcinogen risks to humans. IARC Manogr. Eval. Carcinog Risk. Hum. 1994; 61:1-241.
- 3) Alm RA, Ling L.S, Moir D.T, King D.L, Brown, E.D, Doing P.C. Genomisequence the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature 1999; 397:176-80.
- 4) Osaki T, Yamaguchi H, Taguchi H, Fukado M, Kawakam, Hi Hirano y Kamiyas. Interleukin 8 induction and adhesión of the coccoid form *Helicobacter pylori*. Society for General Microbiology 2002.
- 5) Torres J. Camorlinga P. et al; PAC Infecto-2 (programa de actualización continua en infectología). Intersistemas S.A de C.V. 2001. pag. 491-517.
- 6) Malaty H.M, Logan N.D, Graham D y Ramchatesing *Helicobacter pylori* infection in preschool and school-aged minority children. Effect of socioeconomic indicator and breastfeeding practices. Clin. Infect. Dis. 2001; 32:1387-92.
- 7) Kitagawa M. Natori M. Katok M et al; Maternal transmisión of *Helicobacter pylori* in the perinatal period. J. Obs. Gynaecol. Res. 2001; 27:225-30.
- 8) Atherton J.C, Cao P, Peek R.M Jr, Tummuru M.K, Blazer M.J, Cover T.L. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori* association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. J. Biol. Chem. 1995; 270:1771-77.
- 9) Chin-Ho L, Chun-Hsi, Ya-Chi C, Fang-Yu C, Sek-Kwong P, Chin-Sen C y Wen-Ching W. High prevalence of *cagA* and *babA2* positive *Helicobacter pylori* clinical isolates in Taiwan, J. Clin. Microbiol. 2002; 40:3860-62.
- 10) Goncalves-Oliveira A, Santos A, Guerra J, Aguiar Rocha G, Camargos Rocha , Alvares Cabiol y Magallanes Queiroz D. *babA2* and *cagA* *Helicobacter pylori* strains are associated with duodenal ulcer and gastric carcinoma in Brazil. J. Clin. Microbiol. 2000; 41:3964-66.
- 11) Zambon C.F, Navaglia F, Baso D, Rugge M, Plebani M. *Helicobacter pylori* *babA2* *cagA* and *sl vacA* genes work syergitically in causing intestinal metaplasia. J. Clin. Pathol. 2003; 56:287-91.

- 12) Letley D.P, Lastovica A, Louw J, Hawkey y Atherton J.C. Allelic diversity of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin gene in South Africa, rarity of the *vacA* s1a genotype and natural occurrence of an s2/m1 allele. J. Clin. Microbiol. 1999; **37**:1263-65.
- 13) van Doorn L.J, Figuerredo C, Rossau R, Jonne J, van Asbroeck M, Sousa J. C, Corneiro F y Quint . Typing of *Helicobacter pylori vacA* gene and detection of *cagA* gene by PCR and reverse hibridization in children. Arc. Med. 2000; **31**:431-69.
- 14) Pan Z, Berb D, Vander hulst. Prevalence of vacuolating cytotoxin production and distribution of distinct *vacA* alleles in *Helicobacter pylori* from China. J. Infect. Dis. 1998; **178**:220-6.
- 15) Atherton J.C, Peek R.M, Tham K.T et al. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA* the vacuoling cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. J. Gastroenterol. 1997; **112**:92-9.
- 16) Letley D.P, Atherton J. C, Natural diversity in the N-terminus of the mature vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* determines cytotoxin activity. J. Bacteriol. 2000; **182**:3278-80.
- 17) Letley D.P, Rhead J.L, Twells R. J, Dove B, Atherton J.C. Determinants of non-toxicity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. J. Bacteriol 2003; **278**:26734-41.
- 18) Aviles-Jimenez F, Letley D. P, Gonzalez-Valencia G, Salama N, Torres J y Atherton J. C. Evolution of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin in a human stomach J. Bacteriol. 2004; **186**:518285.
- 19) Yamaoka Y, Nalaty H.M, Osato M.S y Graham D. Conservation of *Helicobacter pylori* genotypes in different ethnic groups in Houston Texas. J. Infect. Dis. 2000; **181**:2086-6.
- 20) Covacci A, Telford J. C, Del Giudice O, Parsonnet J y Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geograpyh. Science 1999; **284**:1-6.
- 21) Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, Graham D y Sepúlveda A. Variants of the 3' region of the associated disease. J. Clin Microbiol. 1998; **36**:2258-2263.
- 22) Rota C. A, Pereira-Lima J.C, Blaya C, Nardi N.B. Consensus and variable region of PCR analisis of *Helicobacter pylori* 3' region of *cagA* gene in isolates from individuals with or without peptic ulcer. J. Clin. Microbiol. 1998; **36**:944-48.

- 23) Ran T, Ping-Chu, Hai-Yan, Yun-Shu, Jian C.A, New subtype of 3' region of *cagA* gene in *Helicobacter pylori* strains isolated from Zhejiang province in China. *J. Gastroenterol.* 2004; **10**:3284-88.
- 24) Argent R, Zhang Y, Atherton J.C. Simple Method for determination of the number of *Helicobacter pylori* *CagA* variable-region EPIYA tyrosine phosphorylation motifs by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **43**:791-795.
- 25) Zhang Y, Argent R, Letley D, Thomas R y Atherton J. C. Tyrosine phosphorylation of *CagA* gastric epithelial cells. *J. Clin. Microbiol.* 2005; **43**:786-790.
- 26) Torres J, Perez-Perez, Goodman K. J, Atherton J. C et al; A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. *Arch. Med. Res.* 2000; **31**:431-69.
- 27) Rudi J, Kolb C, Kuck D, Sieg A, Galle P y Stremel W. Diversity of *Helicobacter pylori* *vacA* and *cagA* genes and relation ship to *VacA* and *CagA* protein expression, cytotoxin production and associated diseases. *J.Clin. Microbiol.* 1998; **36**:944-948
- 28) Kidd M, Lastovica A. J, Atherton J.C, Louw J. A. Heterogeneity in the *Helicobacter pylori* *vacA* and *cagA* genes: association with gastroduodenal disease in South Africa *Gut* 1999; **45**:499-502.
- 29) Zhi-Jun Pan, Beng P. E, van der Hulst et al; Prevalence of vacuolating cytotoxin production and distribution of distinct *vacA* alleles in *Helicobacter pylori* from China. *J. Infect. Dis.* 1998; **178**:220-6.
- 30) Smith S, Kirsch C, Oyedemi K, Coker A, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* *vacA* *cagA* and *iceA* genotypes in Nigerian patients with duodenal ulcer disease. *Society for General Microbiology.* 2002.
- 31) Chih-Ho, Chu-Horen, Ya-Chi C, Fang-Yu C, Sek-Kwong P y Wen-Ching W. High prevalence of *cagA* and *babA2* positive *Helicobacter pylori* clinical isolates in Taiwan. *J. Clin. Microbiology* 2002; **40**:3860-3862.
- 32) Gonzalez-Valencia, Atherton J.C, Muñoz O, Dehesa M, Madrazo A, Torres J. *Helicobacter pylori* *vacA* and *cagA* genotypes in mexican adults and children. *J. Infec. Dis.* 2000; **182**:1450-4.
- 33) Montecucco Cesare y Rappuoli Rino. Living Dangerously: How *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nature Reviews.* 2001; **2**:457-464

- 34) Salama N, Guillermin K, Mc Daniel K T, Sherlock G, Tompkins L y Falkows A. Whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. PNAS, 2000; **97**: 14668-14673.

10.- ANEXOS

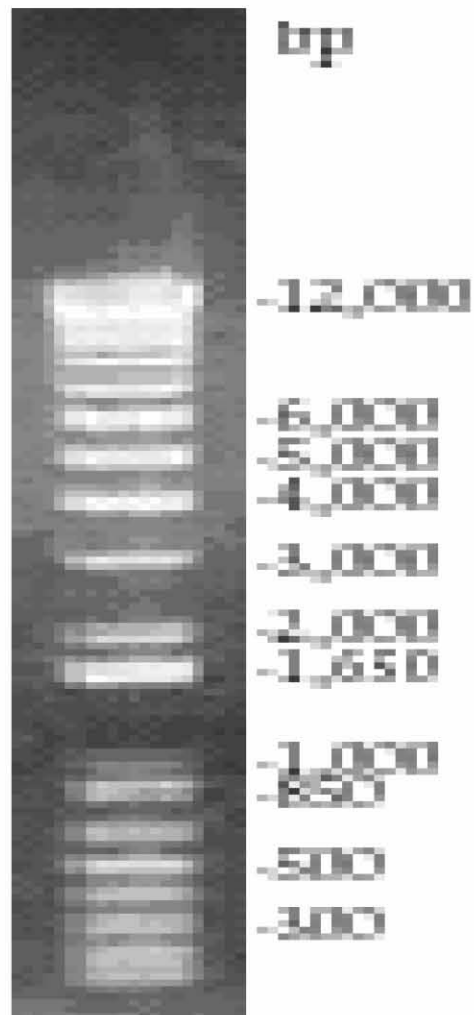
Anexo 1

1. Agar gelosa sangre 5% de carnero con antibiótico. Disolver en 10ml de agua inyectable: ácido nalidixílico 0.1mg, trimetropim 0.05mg, vancomicina 0.03mg y anfotericina B 0.05mg. Agregar 1,8ml de la mezcla a 1 litro de agar gelosa sangre 5% de carnero.
2. Prueba de ureasa. Agregar 0.03g de urea, 50ml PBS 1X (Dulbecco's phosphate buffered salina), 2 gotas de rojo de fenol(para ajustar pH de 7.3-7.4)
3. Caldo Brucella. Agregar 14g de base agar para 500ml de agua más 5ml de glicerina.
4. Solución reguladora TAE (Tris-acetate/EDTA buffer). Para 1 litro de buffer 50X agregar 242g de tris base, 57.1ml de ácido acético glacial, 100ml 0.5M de EDTA pH 8.
5. TE (Tris-EDTA). Para 1 litro de buffer agregar 10Mm de tris y 10Mm de EDTA pH 8.
6. EDTA. Para 100ml, agregar 61g EDTA.2H₂O, agregar 80ml de agua y ajustar a pH 8 con 2g de NaOH.
7. Loading buffer 6X. Agregar EDTA 25mM, azul de bromofenol 0.25% y glicerol 30%.
8. Marcador de 1Kb Plus DNA ladder). Agregar 10 μ l 1Kb plus DNA ladder (900ng/lane), 10 μ l loading buffer 6X y 80 μ l de agua inyectable.
9. dNTP mezcla (dATP 100mM 10mcl, dGTP 100mM 10 μ l, dTTP100mM 10mcl, dCTP 100mM 10mcl y 360 μ l de agua).

Anexo 2

Marcador de pb 1Kb Plus DNA ladder.

1 Kb Plus DNA Ladder



0.8% E-Gel®
0.3 µg/lane