



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**“ESTUDIO DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS DE TIPO IgG
DIRIGIDOS CONTRA LA CITOTOXINA VACUOLIZANTE (VacA)
DE *Helicobacter pylori* EN SUERO DE PACIENTES MEXICANOS
INFECTADOS”.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

HUMBERTO SANTAMARIA BASILIO

ASESOR: Dr. FRANCISCO AVILÉS JIMÉNEZ
ASESOR: M. en. C. ANDREA A. BECERRIL OSNAYA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

C. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

Estudio de la respuesta de anticuerpos de tipo IgG dirigidos
contra la citotoxina vacuolizante (VacA) de Helicobacter
pylori en suero de pacientes mexicanos infectados.

que presenta el pasante: Humberto Santamaría Basilio
con número de cuenta: 09723285-0 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 7 de junio de 2007.

PRESIDENTE	MC. Andrea Angela Becerril Osnaya	
VOCAL	Dra. Susana E. Mendoza Elvira	
SECRETARIO	Dr. Victor Manuel Zendejas Buitrón	
PRIMER SUPLENTE	MC. Ana Laura Vázquez Martínez	
SEGUNDO SUPLENTE	QFB. Jonathan P. Paredes Juárez	

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A Dios por darme la fortaleza necesaria para seguir superándome y la perseverancia para alcanzar mis grandes sueños y anhelos.

A mis padres José y Domitila !!MIL GRACIAS!! en verdad no hay forma de agradecerles todo el apoyo brindado a lo largo de mis estudios, por la enorme paciencia y comprensión brindada en lo que refiere a mi carrera. Porque gracias a todo su apoyo y consejos recibidos he realizado y culminado un sueño más, siendo a la vez, algo muy importante en mi vida ¡Gracias por comprenderme y darme lo mejor!.

A mis queridos sobrinos Ulises, Luis Nestor, Leda y Julio César esperando que esto sea una gran motivación para su superación.

A la UNAM, mi querida y gran Universidad que sigue y seguirá siendo la máxima casa de estudios. ¡¡GRACIAS UNIVERSIDAD NACIONAL!! por haberme dado la oportunidad de estar en tus aulas brindándome tus conocimientos, a todo su profesorado por la enorme formación recibida que me han llevado a ser un gran profesional universitario que me llena de un gran orgullo y satisfacción.

A mis amigos de la carrera de “QFB generación 27” de la FES CUAUTITLAN-UNAM por la enorme amistad brindada, por haber disfrutado de cada momento compartiendo alegrías, diversión y mucho trabajo: Verónica, Jonathan, Jesús (Chuy), Nayeli Gordillo, Beatriz, Anita, Azucena y (Hugo 26). A Jessica, Miriam, Oscar Jimmy, Marycruz, Luis Alberto (El morro), Cecilia Ávalos, Soledad, Alberto (El dick), Ulises (El ardilla) e Iván por compartir y disfrutar intensamente los mejores momentos durante los primeros semestres de la carrera y a pesar del tiempo y la distancia estarán en mis recuerdos. A Nadia, Jorge (El chavito), Julieta, Araceli, Elizabeth Jiménez, Alexia y Juan Carlos por su amistad y simpatía. !!GRACIAS PORQUE TAMBIÉN A LOS AMIGOS SE LES AGRADECE, POR ESO Y MÁS!! ¡QFB. 27!.

A mis amigos de otras generaciones: Guadalupe, Carlos, Anita, Tanía, Vicky, Cuauthémoc, Angel Benavides, Felipe, Beatriz, Hugo Pérez, Flavio Germán, Joaquín, Aidé, Israel y Mónica por su enorme amistad y calidez brindada

Al CCH plantel Naucalpan por haberme dado la oportunidad de formar parte de su bachillerato, por darme la facilidad de elegir y entrar a la licenciatura de mi preferencia. En recuerdo de mis mejores amigos de la generación 97-2000: Marisol (Licenciada en Derecho), Raúl (Químico Industrial), Brenda (Médico), Adriana (Médico), Sergio Coria (Administrador de E.), Jaime (Administrados de E.), Juan Manuel (Licenciado en M y Computación), Azucena (Médico) y Lizbeth (Psicóloga).

A la Dra. Margarita Camorlinga jefa del Laboratorio de la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del IMSS por haberme aceptado en su laboratorio y darme la oportunidad de realizar esta tesis. A mi asesor el Dr. Francisco Avilés J. por las asesorías brindadas durante la parte experimental. A mis compañeros y amigos de la sección de Bacteriología por los momentos gratos y amenos durante mi estancia en este laboratorio: Adriana, Carolina, Norma, Concepción (Conchis), Mónica, Gabriel, Araceli, Yatzareth, Erick y Hugo Lagunes.

A la profesora Ana Laura Vázquez por su gran ayuda y consejos brindados. A mis profesores sinodales Andrea Becerril, Víctor M. Zendejas, Susana E. y Jonathan por sus sugerencias.

A Verónica y Nayeli G. por su sincera amistad y por haber compartido muchos momentos inolvidables.

A Guadalupe y Ana 26 por hacer pasar mis ratos tan agradables y alegres.

A Jonathan y Jesús (chuy) mis mejores amigos.

PARA ALGUIEN TAN ESPECIAL....

Q.F.B GENERACION 27

Acevedo Nicolás Elizabeth
Acuña Lozano Edna Mitzin
Aguilar Cervantes Silvia E.
Aguirre Pineda Karen L.
Amaro Rodríguez Oscar Jimmy
Anguiano Méndez Diego
Avalos Torrecillas Cecilia
Balderas Zamora Magdalena
Barrientos Maldonado Uriel
Bartola Segundo Mayra Julieta
Bermeo Estrada María Guadalupe
Blas López Lucia
Cabrera Amaro Magnolia
Cabrera Hernández Julio César
Calderón Duarte Xóchitl
Cárdenas Ramírez Hugo Francisco
Cruz Rojas María del Carmen
Díaz López Raquel
Díaz Osnaya Gilberto
Domínguez Rojas Maritere
Donis Maturano Luis
Fascineto Arce Yaneth
Flores Medina Jorge
Flores Núñez Leticia
Gante Gante Araceli
García Alcántara Blanca Azucena
García Gálvez Yazmín
García García Eva
García López Carlos E.
García Olvera Marycruz
Gómez Gutiérrez Roxana
Gómez Pérez José Salvador
González Castañeda Rodrigo
González García Rigoberto
González Olmos Julieta Jacqueline
González Rulfo Juan
Gordillo Valseca Nayely
Hernández de Luna Ana María

Hernández Castro Miguel Angel
Hernández Escobar Juan Carlos
Hernández Rubio Elizabeth
Herrera Fragoso Aranny
Herrera Hernández Carolina
Herrera Salazar Alma
Islas Ocampo Nefris
Jácome Bordonave Alberto
Jaramillo Alejos Ricardo
Jiménez Islas Elizabeth
López Barajas Areli
López Montiel Luis Alfonso
Lorenzo Loreto Karla A.
Macías Cabrera Aureola
Magaña Cendejas Elsa
Martínez Rodríguez Gabriel
Méndez Bribiesca Alexia
Mendoza Téllez Miriam
Molina Pérez Francisco Israel
Molina Romero Catalina
Montes de Oca Salinas Yessica
Montuy Alvarez Carlos Eduardo
Morelos Yañez Edmundo
Moreno Parra Luz María
Moreno Zavala Fabiola
Mota Silva Lizbeth
Nieves Corona Rigoberto
Olea Martínez Angélica
Olvera Galindo Bernardo I.
Ortega González Martha
Ortiz Armendáriz Misael Simja
Pérez Sandra Selene
Paredes Juárez Jonathan Pablo
Peña Luna Sandra
Perea Cruz María Luisa
Pérez Velázquez Verónica
Pinto López David R.
Quintanar Balonia Maritza

Ramírez Cárdelas Jorge
Ramírez Malagón Raúl
Resendiz Capetillo Miguel Angel
Reyes Gonzáles Rocío
Reyes Reyes Jorge
Rivero Gómez Cecilia Artemisa
Robles Molina Silvana Mashenka
Rodríguez Domínguez Carolina
Rodríguez Flores Edna Marisol
Rodríguez Galindo Angel
Rodríguez Flores Luis Martín
Rodríguez Hernández Sandra Patricia
Rodríguez Pérez Iván
Rodríguez Villasana Siria
Romano Zuñiga Pablo R.
Rosales Gutiérrez Nadia
Saldivar Herrera Beatriz
Sánchez Aranda Manuela
Sánchez Pineda Edith Eloisa
Santamaría Basilio Humberto
Santander Borjes Oscar
Santiago Ramos Ernesto V.
Segundo Torres Santos de Jesús
Solís Cámara Laura
Soto Pérez Amilcar
Sotomayor Islas Emma
Suárez Reyes Luis Alberto
Tapia Barrios Anel
Vadillo Rosado Eduardo
Valdez Daniel Rigoberto
Valdueva Jiménez Nayelli F.
Vázquez Reyes Soledad
Vera Hernández Ricardo
Villegas Frías Angeles
Viquez Pérez Hugo L.
Wong Salas Roberto F.
Zamora Saldivar Esau.

INDICE

	páginas
I) Indice	i
II) Lista de Figuras	iv
III) Lista de Tablas	v
IV) Abreviaturas	vi
V) Resumen	ix
1.- Introducción	1
1.1.- <i>Helicobacter pylori</i>	1
1.1.1.- Características bioquímicas y morfológicas	1
1.1.2.- Medios de cultivo para su aislamiento	3
1.1.3.- Métodos de diagnóstico	3
1.1.3.1.- Pruebas invasivas	4
1.1.3.2.- Pruebas no invasivas	6
1.1.4.- Epidemiología	8
1.1.5.- Vías de transmisión	10
1.1.6.- Patogenia	11
1.1.6.1.- Factores de patogenicidad	11
1.1.6.2.- Factores de virulencia	12
1.1.7.- Patologías	15
1.1.7.1.- Gastritis asociada a infección por <i>H. pylori</i>	15
1.1.7.2.- Úlcera péptica asociada a infección por <i>H. pylori</i>	15
1.1.7.3.- Cáncer gástrico asociada a infección por <i>H. pylori</i>	17
1.1.8.- Respuesta inmune humoral y celular	19
1.2.- Citotóxina Vacuolizante VacA	22
1.2.1.- Antecedentes	22
1.2.2.- Estructura y diversidad del gen <i>vacA</i>	22
1.2.3.- Estructura y diversidad de la proteína VacA	24
1.2.4.- Efectos celulares <i>in vitro</i> inducidos por VacA	27
1.2.4.1.- Vacuolización celular	27
1.2.4.2.- Interferencia con la presentación antigénica	30

2.- Hipótesis	31
3.- Justificación	32
4.- Objetivo general	33
4.1.- Objetivos particulares	33
5.- Material y métodos	34
5.1- Reactivos	34
5.2.- Soluciones	35
5.3.- Cepas de referencia de <i>H. pylori</i>	36
5.4.- Equipos	37
5.5.- Esquemas de trabajo	38
5.6.- Obtención de muestras biológicas	39
5.7.- Aislamiento e Identificación de <i>H. pylori</i>	40
5.7.1.- Primoaislamiento a partir de biopsias gástricas	40
5.7.2.- Conservación de cepas de <i>H. pylori</i>	40
5.8.- Genotipificación de <i>vacA</i> por PCR	41
5.8.1.- Extracción de ADN por el método de Fenol-Cloroformo	41
5.8.2.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	42
5.8.3.- Identificación de los productos de PCR por electroforesis	43
5.9.- Tipificación de VacA por serología	44
5.9.1.- Detección de anticuerpos IgG anti-VacA por prueba de ELISA	44
5.10.- Detección de la toxina VacA por Western Blot	45
5.10.1.- Obtención de extractos acuosos de la toxina VacA	45
5.10.2.- Electroforesis en geles de Poliacrilamida Duodecil Sulfato de Sodio	45
5.10.3- Western Blot	46
6.- Resultados	47
6.1.- Aislamiento e identificación de <i>H. pylori</i>	47
6.2.- Genotipificación de <i>vacA</i> por PCR	47
6.3.- ELISA para VacA	51
6.3.1.- Controles negativos	51
6.3.2.- Pacientes con gastritis crónica	53
6.3.3.- Pacientes con úlcera duodenal	57

6.3.4.- Pacientes con lesiones precancerosas	58
6.3.5.- Pacientes con cáncer gástrico	60
6.3.6.- Respuesta de anticuerpos séricos contra VacA	61
6.3.7.- Detección de la banda de VacA por Western Blot	62
6.3.8.- Comparación de medias de absorbancias entre m1 y m2 de VacA por grupo de enfermedad gastroduodenal	64
6.3.9.- Comparación de medias de absorbancias para m1 de VacA entre grupos de enfermedad	68
6.3.10.- Comparación de medias de absorbancias para m2 de VacA entre grupos de enfermedad	69
6.4.- Relación entre la tipificación sérica de VacA con el genotipo de <i>vacA</i> aislado	70
6.4.1.- Relación entre la tipificación sérica de VacA con el genotipo aislado en pacientes seropositivos a un tipo de VacA	70
6.4.2.- Relación entre la tipificación sérica de VacA con el genotipo aislado en pacientes seropositivos a ambos tipos de VacA	71
6.5.- Análisis estadístico	72
6.5.3.- Prueba estadística por “ t de Students” para la comparación de medias de absorbancia entre m1 y m2	72
6.5.4.- Prueba estadística por χ^2 para determinar la relación entre el tipo de VacA con el genotipo aislado en pacientes seropositivos a un tipo de VacA	73
6.5.5.- Prueba exacta de Fisher (FET) para determinar la relación entre el tipo de VacA con el genotipo aislado en pacientes seropositivos a ambos tipos de VacA	74
7.- Discusión	75
8.- Conclusiones	82
9.- Referencias	84
10.- Anexo	94
10.1.- Reactivos	94
10.2.- Soluciones	95
10.3.- Pruebas de identificación de <i>H. pylori</i>	98

INDICE DE FIGURAS

	páginas
Figura 1. Tinción de Gram de bacilos curvos característicos de <i>H. pylori</i>	1
Figura 2. Morfología microscópica de <i>H. pylori</i>	1
Figura 3. Morfología colonial de <i>H. pylori</i> en agar sangre	3
Figura 4. Representación de las partes anatómicas del estómago	5
Figura 5. Representación geográfica mundial de la prevalencia por <i>H. pylori</i>	8
Figura 6. Representación geográfica mundial de la incidencia de cáncer gástrico.	9
Figura 7. Representación geográfica mundial de los genotipos de <i>vacA</i>	23
Figura 8. Representación esquemática de la toxina VacA	24
Figura 9. Representación esquemática de las familias de VacA	25
Figura 10. Representación oligomérica de la toxina VacA	26
Figura 11. Representación esquemática de la actividad de VacA en la célula epitelial gástrica	28
Figura 12. Identificación de los productos de PCR en agarosa al 2% de los alelos de <i>vacA</i>	50
Figura 13. Detección de la banda de VacA por Western Blot	63
Figura 14. Comparación de la respuesta de anticuerpos promedio entre m1 y m2 en sueros de pacientes con gastritis superficial crónica	64
Figura 15. Comparación de la respuesta de anticuerpos promedio entre m1 y m2 en sueros de pacientes con úlcera duodenal	65
Figura 16. Comparación de la respuesta de anticuerpos promedio entre m1 y m2 en sueros de pacientes con lesiones precancerosas	66
Figura 17. Comparación de la respuesta de anticuerpos promedio entre m1 y m2 en sueros de pacientes cáncer gástrico	67
Figura 18. Comparación de medias de la absorbancia promedio entre m1 de VacA entre los diferentes grupos de enfermedad gastroduodenal	68
Figura 19. Comparación de medias de la absorbancia promedio entre m2 De VacA entre los diferentes grupos de enfermedad gastroduodenal	69

INDICE DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1. Secuencia de los iniciadores utilizados en PCR para genotipificar <i>vacA</i>	34
Tabla 2. Mezcla de reacción para genotipificar <i>vacA</i> por PCR.	42
Tabla 3. Resultados de la frecuencia y porcentaje de enfermedades gastroduodenales	47
Tabla 4. Resultados de la frecuencia y porcentaje de alelos s1/s2 y m1/m2 de <i>vacA</i>	48
Tabla 5. Resultados de la frecuencia y porcentaje de genotipos (s1/m1, s1/m2, s2/m1 y s2/m2) de <i>vacA</i>	49
Tabla 6. Resultados de absorbancias en ELISA para determinar anticuerpos contra VacA usando sueros de individuos no infectados	51
Tabla 7. Resultados de la genotipificación de <i>vacA</i> por PCR y la respuesta de anticuerpos séricos contra VacA en pacientes con gastritis superficial	53
Tabla 8. Resultados de la genotipificación de <i>vacA</i> por PCR y la respuesta de anticuerpos séricos contra VacA en pacientes con úlcera duodenal	57
Tabla 9. Resultados de la genotipificación de <i>vacA</i> por PCR y la respuesta de anticuerpos séricos contra VacA en pacientes con lesiones precancerosas	59
Tabla 10. Resultados de la genotipificación de <i>vacA</i> por PCR y la respuesta de anticuerpos séricos contra VacA en pacientes con cáncer gástrico	60
Tabla 11. Resultados de la respuesta de anticuerpos séricos contra VacA en todos los pacientes infectados por <i>H. pylori</i> .	61
Tabla 12. Respuesta de anticuerpos contra VacA y detección de la banda de VacA por Western Blot	62
Tabla 13. Resultados de la relación entre la tipificación de VacA por serología con el genotipo aislado de <i>vacA</i> por PCR en pacientes seropositivos a un tipo de VacA.	70
Tabla 14. Resultados de la relación entre la tipificación de VacA por serología con el genotipo aislado de <i>vacA</i> por PCR en pacientes seropositivos a ambos tipos de VacA	71

ABREVIATURAS

abs.- absorbancia

AGS.- línea de células cancerígenas de estómago

APS.- Persulfato de Amonio

°C.- grados centígrados

cagA.- gen que codifica para la proteína CagA (gen asociado a la citotoxina)

CagA.- proteína inmunogénica codificada por *cagA*

cagPAI.- Isla de Patogenicidad *cag*

CG.- cáncer gástrico

CPA.- Células Presentadoras de Antígenos

dATP.- desoxiadenosintrifosfato

dCTP.- desoxicitocintrifosfato

Desv. std.- Desviación estándar

dGTP.- desoxiguanidintrifosfato

DNA.- Acido Desoxirribonucleico

dNTP's.- desoxinucleótidos trifosfatos

dTTP.- desoxitimidintrifosfato

ELISA.- Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a una Enzima

ENA-78.- Proteína 78 Activadora de Neutrófilos

g.- gramos

GC.- gastritis crónica

GPI-APs.- Proteínas Ancladas de Membrana Glicosilfosfatidilinositol

HeLa.- células cancerosas cervicales procedentes de una mujer llamada Helen Lane

hr.- horas

HX-XO.- Hipoxantina-xantinooxidasa

IFN- γ .- Interferón γ

IgA.- Inmunoglobulina A

IgG.- Inmunoglobulina G

IgM.- Inmunoglobulina M
IL.- Interleucina
katA.- gen que codifica para la enzima catalasa
Kb.- Kilobases
kDa.- kiloDalton
L.- Litros
LP.- lesiones precancerosas
m1.- región media de *vacA* tipo m1
m2.- región media de *vacA* tipo 2
M.- Molar
mA.- miliamperios
MCH.- Complejo Principal de Histocompatibilidad
MCP-1.- Proteína Quimiotáctica para los Macrófagos-1
mg.- miligramos
min.- minutos
mL.- mililitros
mm.- milímetros
mM.- milimolar
MPO.- Mieloperoxidasa
nm.- nanómetros
OMS.- Organización Mundial de la Salud
%.- por ciento
p/v.- peso sobre volumen
pb.- pares de bases
PBS.- Solución Buffer de Fosfatos
PCR.- Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH.- potencial de Hidrógeno
PMN.- Células Polimorfonucleares
RLO.- Radicales Libres de Oxígeno

RNA.- Acido Ribonucleico
rpm.- revoluciones por minuto
s1.- secuencia señal de *vacA* tipo 1
s2.- secuencia señal de *vacA* tipo 2
SDS.- Dodecil Sulfato de Sodio
seg.- segundos
SOD.- Superóxido Dismutasa
TAE.- Tris-Acetato-EDTA
TEMED.- N`N`N`N Tetrametiletilendiamina
TNF- α .- Factor de Necrosis Tumoral α
UD.- úlcera duodenal
ureA.- gen que codifica para la subunidad hexámerica A de la ureasa
UreA.- subunidad hexamérica A de la ureasa
ureB.- gen que codifica para la subunidad hexámerica B de la ureasa
UreB.- subunidad hexamérica B de la ureasa
v.- voltios
v/v.- volumen sobre volumen
VacA.- Citotóxina vacuolizante
vacA.- gen que codifica para la citotóxina vacuolizante
 μ g.- microgramos
 μ L.- microlitros
 μ m.- micrometros

RESUMEN

Introducción. La infección por *Helicobacter pylori* afecta a más de la mitad de la población mundial. Un factor de virulencia importante que induce vacuolización celular *in vitro* es la Citotoxina Vacuolizante (VacA) y el tipo m1 de la región media está asociado al desarrollo de cáncer gástrico. El fragmento p58 localizado en la región media de la toxina es más inmunogénica que el resto de la toxina y un método serológico para determinar el genotipo de *vacA* en base a la respuesta de anticuerpos anti-58 en población infectada ayudaría a identificar a los pacientes con mayor riesgo de desarrollar cuadros clínicos más severos.

Métodos. Se tomó una biopsia gástrica de antro y muestra de sangre venosa de 199 pacientes infectados con *H. pylori*. De estos pacientes, 118 presentaron gastritis crónica (GC), 25 úlcera duodenal (UD), 40 lesiones pre-cancerosas (LP) y 16 cáncer gástrico (CG) los cuales, fueron diagnosticados por histología. Se realizó la genotipificación de *vacA* por PCR de todas las cepas aisladas y la serología por ELISA usando como antígeno recombinante el fragmento p58 VacA tipo m1 y m2 para medir la respuesta de anticuerpos contra la toxina y determinar el genotipo de la región media de *vacA* comparándolo con el obtenido por PCR. Para el análisis serológico se incluyeron 27 muestras de suero tomadas de pacientes no infectados que fueron usados como controles negativos.

Resultados. De los 199 pacientes, 150 (75%) pacientes presentaron infección con cepas del tipo m1, 45 (23%) con el tipo m2 y solamente 4 (2%) presentó infección mixta evaluado por PCR. Sin embargo, por serología 34 (17%) pacientes presentaron anticuerpos contra ambos tipos y esto implica posiblemente infección mixta. De todos los pacientes infectados, 105 (53%) presentaron respuesta de anticuerpos positiva contra VacA. Mientras que 94 (47%) presentaron respuesta seronegativa contra la toxina sugiriendo, en algunos casos no existe expresión de VacA o no se generan los anticuerpos necesarios contra la toxina aún después de haberse aislado el genotipo en estos pacientes. Los niveles de anticuerpos inducidos contra el tipo m1 fue más alta con respecto al tipo m2 en todos los grupos: CG ($P<0.01$), UD ($P<0.02$), LP ($P<0.02$) y CG ($P<0.05$) sin encontrarse asociación entre la respuesta de anticuerpos con el cuadro clínico. Los resultados de la ELISA nos permitió identificar correctamente el genotipo de *vacA* en 63/71 ($P<0.001 \chi^2$) de los pacientes que reconocieron a un solo tipo de VacA y 26/34 ($P<0.01$ FET) de los pacientes que presentaron respuesta de anticuerpos positiva contra ambos tipos.

Conclusiones. En México, el genotipo predominante de la región media de *vacA* es m1 y la respuesta de anticuerpos contra el tipo m1 se presentó en mayor frecuencia. Los pacientes que presentaron anticuerpos contra ambos tipos sugieren la presencia de infecciones mixtas. El tipo m1 fue más inmunogénico al inducir una mayor respuesta de anticuerpos con respecto a m2 independientemente de la patología o cuadro clínico. El tipo de *vacA* de la cepa infectante se identificó correctamente en 89/105 ($P<0.001 \chi^2$) de los pacientes seropositivos a la toxina. Sin embargo, el 47% de los pacientes no indujeron una respuesta de anticuerpos detectable contra VacA siendo esto, una limitante para la aplicación esta técnica.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Helicobacter pylori*

1.1.1. Características bioquímicas y morfológicas

Helicobacter pylori es un bacilo Gram negativo, en forma curva, espiral o cocoide visto al microscopio óptico, mide de 2.5 a 3.5 μm de largo y de 0.5 a 1 μm de ancho. (Fig. 1). Posee de 1 a 6 flagelos unipolares envainados con movimientos en espiral o sacacorcho. (Fig. 2). Las formas cocoides se observan en cultivos viejos y se consideran no cultivables. En medios sólidos forma colonias circulares, brillantes, translúcidas y grises de 1 a 2 mm de diámetro.¹ (Fig. 3)



Fig. 1. Tinción de Gram de bacilos curvos característicos de *H. pylori* en cultivos frescos donde se observa la morfología típica de la bacteria teñida en rojo (Tomada de <http://www.helicobacterspain.com>)



Fig. 2. Morfología microscópica de *H. pylori* donde se observa a la bacteria con sus flagelos unipolares (Imagen tomada de <http://www.helicobacterspain.com>)



Fig. 3. Morfología colonial de *H. pylori* en agar sangre. Las colonias típicas de 3 a 5 días en el primoaislamiento (Imagen tomada de [http:// www.helicobacterspain.com](http://www.helicobacterspain.com))

En cuanto a pruebas bioquímicas de laboratorio es positivo a catalasa, oxidasa, ureasa, fosfatasa alcalina, arginina arilamidasa y DNAsa. Negativo a reducción de nitratos e hidrólisis de hipurato. No fermenta ni oxida carbohidratos, aunque puede metabolizar los aminoácidos por vías fermentativas.²

Es una bacteria microaerofílica no invasiva que vive en la superficie de las células epiteliales gástricas, protegido del ácido clorhídrico por la formación de un microambiente alcalino de amonio producto de la actividad de la ureasa.²⁹

H. pylori no se distribuye uniformemente por todas las áreas del estómago, pues se ha observado que coloniza frecuentemente la región del antro. Aunque también se ha aislado de la región del cuerpo gástrico, esófago y la parte alta del tracto intestinal (duodeno).²⁵

La estructura espiral o helicoidal de la bacteria le permite introducirse a través de la capa de moco gástrico durante la colonización, actuando de forma similar a un sacacorchos y favoreciendo por lo tanto el acercamiento a las células epiteliales gástricas.³²

1.1.2. Medios de cultivo para su aislamiento

El crecimiento de *H. pylori* es óptimo en medios de cultivo complejos suplementados con sangre entera y suero en condiciones microaerofílicas. Para la recuperación de *H. pylori* a partir de muestras de biopsias gástricas, resultan de gran utilidad los medios sólidos selectivos, como agar chocolate y agar para *Brucella* con sangre de carnero al 5% adicionado con antibióticos como vancomicina, ácido nalidíxico, anfotericina que inhiben bacterias provenientes del tracto gastrointestinal. Los agares selectivos, como el Skirrow con vancomicina, polimixina B y trimetoprim; y el de Thayer-Martin modificado, también favorecen su crecimiento.³

Para las condiciones de crecimiento se requieren incubadoras microaerofílicas (CO₂ al 10%, O₂ del 5 al 7% y N₂ al 85%) en una atmósfera húmeda y un rango de temperatura de entre 35-37°C durante un período de 3 a 6 días. En ocasiones el crecimiento puede tardar hasta 1 semana.³

1.1.3. Métodos de diagnóstico

La infección con *H. pylori* puede ser detectada por pruebas invasivas y no invasivas. Las pruebas invasivas se consideran “estándares de oro” y están basadas en diversos métodos de diagnóstico a partir de biopsias que suelen ser muy molestas para el paciente. Sin embargo, la prueba ideal para *H. pylori* debe ser no invasiva, precisa, de bajo costo y de fácil realización.

1.1.3.1. Pruebas invasivas

Cultivo de biopsias gástricas.- El cultivo de *H. pylori* a partir de biopsias gástricas permite diagnosticar la infección con una sensibilidad y especificidad variable, cuya ventaja nos permite realizar pruebas de sensibilidad a antibióticos y la obtención de cepas para su caracterización genética. Sin embargo, su alto costo, grado de dificultad e incomodidad del paciente para toma de muestra lo hacen poco accesible. Un estudio comparativo entre 3 pruebas invasivas realizado en 737 pacientes demostró que el cultivo de biopsias gástricas presenta un 86.3% de predicción negativa, es decir, existe un 13.7% de reportar falsos negativos debido a la toma de muestra en las regiones del estómago con poca densidad de *H. pylori*.³⁵ Sin embargo, este porcentaje es muy variable, pues existen diversos factores que pueden inhibir el crecimiento *in vitro* de la bacteria en un paciente positivo.

Histología de biopsias gástricas.- Esta prueba provee información sobre la presencia y severidad de la infección por *H. pylori*. La bacteria se puede observar con facilidad en las muestras histológicas teñidas con los colorantes Hematoxilina-eosina, Giemsa modificado y la tinción de plata de Warthin-Starry siendo esta la más sensible. La especificidad y sensibilidad del análisis histológico se aproximan al 100%. Sin embargo, la posibilidad de reportar falsos negativos depende del sitio anatómico del estómago donde se toma la biopsia, pues *H. pylori* no se encuentra distribuida uniformemente. En la porción del antro central (curvatura antral) y antro distal es donde se encuentra la mayor densidad de *H. pylori*, por lo tanto, son las regiones recomendadas para la toma de biopsias (Fig. 4). Mientras que en la región del cuerpo existe la menor colonización y existe hasta un 8.8% de reportar falsos negativos, según un estudio comparativo de 89 biopsias tomadas de distintos sitios anatómicos del estómago en pacientes con gastritis.²⁵

Estructuras del estómago

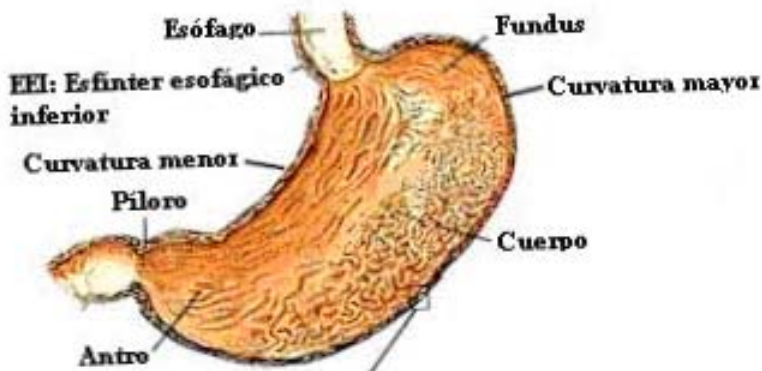


Fig. 4. Representación de las partes anatómicas del estómago. La zona del antro es la región recomendada para la toma de biopsias gástricas. (Imagen tomada de http://www.monografia.com/trabajos36/hemorragia_digestiva/hem7.gif)

Prueba del hilo.- Es un método rápido y sencillo que permite diagnosticar *H. pylori* por cultivo de secreciones gástricas a partir de la deglución de una cápsula que desenrolla un hilo y que permanece en el estómago durante 1 hora. Posteriormente el hilo es retirado para su cultivo. Un estudio realizado en 28 voluntarios mexicanos reportó que esta prueba, presenta una sensibilidad del 75% y una especificidad del 100%.²⁶

Prueba rápida de ureasa.- Es el método más rápido para detectar *H. pylori* en biopsias gástricas. La actividad de la ureasa se puede medir directamente en las muestras clínicas o después de que se haya aislado la bacteria. La gran cantidad de ureasa producida por *H. pylori* permite la detección de residuos alcalinos como el amoníaco en minutos. Es una prueba barata, fácil y con una especificidad cercana al 100%. Sin embargo, cuando se realiza directamente de tejido gástrico en un periodo de 1 a 3 horas, la sensibilidad aumenta del 75 al 90%.²⁷

1.1.3.2. Pruebas no invasivas

Prueba del aliento.- Esta prueba *in vivo* se basa en la presencia de ureasa de *H. pylori*, a través de la detección de $^{13}\text{CO}_2$ en aliento. El paciente ingiere urea radioactiva marcada con ^{13}C disuelta en agua, con posterior recolección de muestras de aliento que se analizan en busca de altas concentraciones de $^{13}\text{CO}_2$ marcado a los 30 minutos. Si hay infección, la ureasa producida por *H. pylori* hidroliza la urea para formar amoníaco y bicarbonato marcado que se exhala como CO_2 el cual, se detecta con un contador de centelleo o con un espectrómetro especial. Un estudio realizado en niños para evaluar los tiempos adecuados de recolección de muestras reveló que esta prueba tiene una sensibilidad del 100% y una especificidad de 97.5%. Sin embargo, es importante tomar la muestra en un tiempo no mayor de los 30 minutos pues, la sensibilidad y especificidad disminuyen²⁸. Además, ésta prueba ha sido muy empleada en estudios epidemiológicos sobre todo para el diagnóstico de la infección en niños.^{43, 44}

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).- Es una técnica 100% sensible y específica que permite la detección directa de *H. pylori* mediante la identificación específica de algunos genes como *cagA*, *ure* y *vacA*. En un estudio realizado en 88 pacientes con enfermedades gastroduodenales donde se diagnosticó la infección por *H. pylori* mediante observación histológica de biopsias gástricas y por determinación serológica de anticuerpos IgG anti-*H. pylori*, se detectó material genético en el 100% de las biopsias gástricas positivas. Así mismo, no se detectó ninguno producto de PCR en los pacientes no infectados. Además, se logró detectar ADN en el 85% de la saliva y en el 25% de las heces de los pacientes positivos.³⁶

Serología.- Esta prueba se basa en la detección de anticuerpos específicos de tipo IgG contra el antígeno total de *H. pylori* y algunos antígenos como CagA y ureasa a través de Ensayos Inmunoabsorbentes Ligados a Enzimas (ELISA). Aunque también pueden detectarse anticuerpos de tipo IgA e IgM, pero son de menor utilidad diagnóstica porque presentan poca sensibilidad.⁴⁵

La serología no distingue entre enfermedad actual o infección previa, porque una vez erradicada la infección, los títulos de anticuerpos séricos de tipo IgG disminuyen lentamente y pueden persistir durante meses disminuyendo su concentración. Sin embargo, esta característica es de gran utilidad y confiabilidad para documentar el tiempo de exposición a *H. pylori*, así como para la evaluación inicial de un paciente sintomático y monitoreo de la eficacia del tratamiento.⁴⁶

En un estudio realizado en 57 pacientes donde se determinó la concentración de anticuerpos IgG anti-*H. pylori* antes y después del tratamiento se encontró una disminución en la concentración de estos anticuerpos en un 26, 43 y 56% a los 3, 6 y 9 meses después de erradicada la bacteria. Sin embargo, en los pacientes que no recibieron tratamiento, la concentración de anticuerpos IgG anti-*H. pylori*, aumentó ligeramente.⁴⁶ Por otra parte, la serología por tratarse de una prueba rápida y específica resulta de gran utilidad para estudios epidemiológicos.⁴⁴

1.1.4. Epidemiología

Se estima que más de la mitad de la población mundial está infectada crónicamente con *H. pylori* sin presentar sintomatología, ni efectos adversos en muchos casos. La mayor parte de la población infectada se encuentra en los países en vías de desarrollo donde se estima existe una incidencia mayor del 80% en población adulta mayor de 20 años. Mientras, en los países desarrollados, la infección por *H. pylori*, se presenta en el 20% de la población mayor de 30 años y en el 50% de la población mayor de 60 años.⁵⁷ (Fig. 5)



Fig. 5. Representación geográfica mundial de la prevalencia por la infección con *H. pylori* en adultos asintomáticos. México se encuentra en el grupo de países con una prevalencia entre 65-74% (Tomada de Crew and Neugut. 2006)⁵⁷

Por otra parte, la incidencia del cáncer gástrico a nivel mundial es cercana al 0.1%. En el año 2000 se presentaron cerca de 880,000 nuevos casos de cáncer gástrico en todo el mundo donde, Japón y Corea presentaron los mayores índices, seguidos de los países del Este de Asia, Oeste de Europa y América del Sur, excepto Argentina y Chile. Mientras, la menor incidencia se encuentra en América del Norte, Europa del Este y Nueva Zelanda.⁵⁷ (Fig. 6)

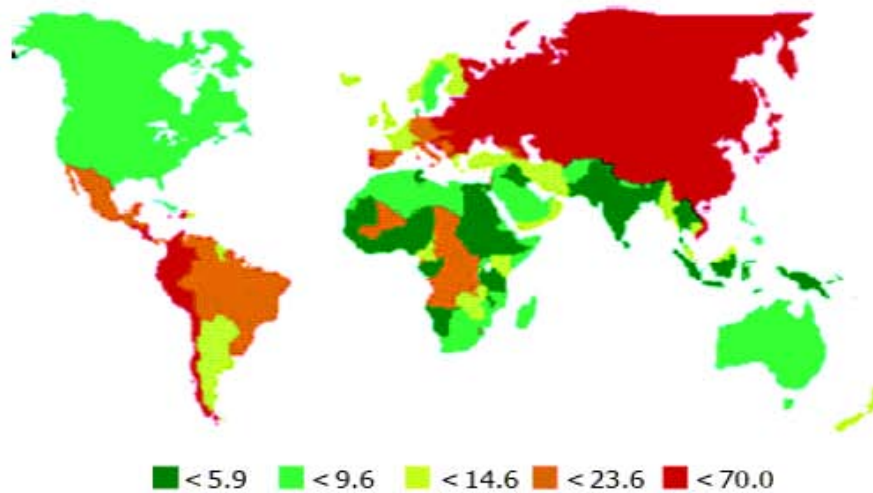


Fig. 6. Representación geográfica mundial de la incidencia de cáncer gástrico. México de encuentra en el grupo de países que presencia una incidencia menor a 23.6 por cada 100,000 habitantes. (Tomada de Crew and Neugut. 2006)⁵⁷

En México, se estima que entre 65 y 74% de la población está infectada con *H. pylori*.⁵⁷ Sin embargo, menos del 0.1% desarrolla algún tipo de lesión precancerosa gástrica en edad adulta. El número de personas diagnosticadas con cáncer gástrico hasta el año 2000 fue de 76,315 que representa más del 0.08% de la población donde, los estados de Yucatán, Chiapas, Morelos, Michoacán, Colima, Jalisco, Zacatecas, Chihuahua y Sonora, presentaron los mayores índices de mortalidad.⁶⁷

1.1.5. Vías de transmisión

Todavía se discute sobre los posibles mecanismos de transmisión de *H. pylori* hacia el humano. Sin embargo, se ha especulado acerca de los reservorios que pueden ser la causa directa del contagio. En los últimos años, con el desarrollo y aplicación de nuevas técnicas como la PCR se ha detectado material genético como ARN ribosomal de *H. pylori* en el agua de los pozos y alimentos crudos irrigados según un estudio realizado en Perú.¹³ Además se ha detectado en heces, saliva, placa dental y jugo gástrico en pacientes positivos, sugiriendo que la ruta de transmisión de *H. pylori* puede darse vía fecal-oral u oral-oral.³⁶ Sin embargo, la ruta de transmisión de *H. pylori* en humanos se desconoce pero están propuestos la vía fecal-oral, gástrica oral (vómitos) u oral-oral.

El hombre es el reservorio natural de la infección por *H. pylori* y es causa directa de contagio. En un censo realizado a 684 familias de los Andes colombianos se encontró que el contagio de *H. pylori* comienza desde los 2 años de edad y la frecuencia aumenta en familias numerosas donde la mayoría o casi todos están contagiados y las cuales, representan una fuente de infección hacia los niños. Por lo tanto, la transmisión de persona a persona es un factor importante. El censo también demostró directamente evidencias sobre múltiples factores de riesgo como causas principales de la transmisión de la infección de la bacteria como son la residencia en países en vías de desarrollo como Colombia, condiciones socioeconómicas y escolaridad baja, hacinamiento, costumbres, prácticas inadecuadas para la preparación de los alimentos¹² y posiblemente predisposición genética.

Un estudio realizado en 180 niños turcos demostró, que la infección comienza desde los 2 años de vida y el porcentaje de niños infectados aumenta con la edad, al grado de que a los 4 años el 39% presenta ya la infección.⁴³

Otro estudio realizado en 248 niños africanos, diagnosticó la infección por *H. pylori* en el 84% de los niños de 3 años de edad.⁴⁴

Los estudios donde se relaciona *H. pylori* con el desarrollo de adenocarcinoma gástrico se han realizado en modelos animales como gerbos, se ha propuesto que la infección induce metaplasia intestinal a nivel del piloro y cáncer gástrico como consecuencia de una inflamación crónica de varios años.⁴² Por lo tanto, se sugiere que la adquisición temprana de infección por *H. pylori* puede incrementar el riesgo para desarrollar cáncer gástrico en etapas más avanzadas de la vida y tardarán algunos años ya en la etapa adulta para que se presenten los síntomas.

1.1.6. Patogenia

Patogenicidad es la capacidad intrínseca de un microorganismo para producir enfermedad y virulencia es la medida o grado de patogenicidad. Cada microorganismo puede poseer o no un conjunto de factores que le den la capacidad de invadir al hospedero, sobrevivir y multiplicarse dentro de él. Así cada patógeno utiliza durante este proceso diferentes mecanismos y estrategias:

1.1.6.1. Factores de patogenicidad

1. **Motilidad.** Esta capacidad se la proporcionan los flagelos para el desplazamiento a través del mucus de las células epiteliales de la mucosa gástrica. Además le confieren una gran movilidad que le permite no ser eliminado tan fácilmente del hospedero.^{24, 32}

2. **Ureasa.** Esta enzima es codificada por los genes *ureA* y *ureB* presentes en todas las cepas de *H. pylori*. La ureasa está formada por dos subunidades hexámicas (UreA) y (UreB) rearrreglados en forma dodecamérica y con una masa molecular de 380 kDa aproximadamente. Su función es degradar la urea en amoníaco para después formar amonio producto de la reacción con el ácido clorhídrico y generar así un microambiente alcalino alrededor de la bacteria que le confiere protección ante la acidez gástrica.²⁹

Se ha demostrado que la ureasa contribuye a la toxicidad vía producción de amonio la cual, es toxico para las células. Además, la unión con los iones cloruros favorece la formación de cloruro de amonio indispensable para la vacuolización y daño celular por parte de la citotoxina vacuolizante (VacA).¹⁶

3. Superóxido dismutasa (SOD). Esta enzima está formada por dos estructuras homodiméricas cada una con una masa molecular de 24 kDa. Su función es constituir una línea de defensa ante la acción de los compuestos altamente reactivos y oxidativos como radicales libres de oxígeno producidos durante la actividad fagocitaria de las células polimorfonucleares.³¹

4. Catalasa. Tiene una masa molecular aproximada de 63 kDa, es producida por todas las cepas de *H. pylori*. Está codificada por el gen *katA* y su función es degradar en oxígeno y agua al peróxido de hidrógeno producido durante la actividad fagocítica de las células polimorfonucleadas.³⁰

5. Lipasas y proteasas. Ambas enzimas propician la desintegración del moco gástrico y la pérdida de la hidrofobicidad de la mucosa favoreciendo la colonización por *H. pylori*.¹

1.1.6.2. Factores de virulencia

Existen varios factores de virulencia que implican a *H. pylori* en la patogénesis de la gastritis superficial crónica y el desarrollo posterior de enfermedades gastroduodenales:

1.- Citotoxina vacuolizante (VacA). El gen *vacA* codifica para la síntesis de ésta toxina y se encuentra presente en todas las cepas de *H. pylori*. VacA induce vacuolización citoplasmática *in vitro* en varias líneas celulares epiteliales y en modelo animal en gerbos produce ulceración y daño celular al epitelio gástrico.^{7, 42}

La presencia de ciertos genotipos del gen *vacA* han sido asociados al desarrollo de enfermedad ulcerosa péptica y cáncer gástrico. El gen *vacA* y la citotoxina vacuolizante VacA se describen con más detalle en el apartado 1.2.

2. La isla de patogenicidad *cagPAI*. Se conoce como Isla de Patogenicidad a los segmentos de DNA presentes en bacterias patógenas, codifican para proteínas que pueden contribuir a la colonización y desarrollo de enfermedad. Estos fragmentos de DNA están presentes en bacterias Gram (-) los cuales, son adquiridos por transferencia horizontal. La Isla de Patogenicidad *cagPAI* es una región del cromosoma de *H. pylori* de 40 Kb, cuya región contiene más de 27 genes entre ellos *cagA* (gen asociado a la citotoxina) la cual, codifica para la proteína CagA y algunos otros que codifican para un sistema de secreción tipo IV.⁵²

3. CagA. Es un antígeno inmunodominante de 120 a 140 kDa presente en más del 90% de las cepas orientales (Japón, Corea y China). Además, es muy común en casi todos los grupos étnicos de los Estados Unidos (afroamericanos 71%, hispanos 74%, blancos 77% y vietnamitas 97%).⁵³

Esta proteína está codificada por el gen *cagA* (gen asociado a la citotoxina) localizado en una región del cromosoma que se conoce como Isla de Patogenicidad *cag PAI*.

La estructura del gen *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 el peso molecular de la proteína CagA debido a la presencia de diferentes secuencias repetidas de aminoácidos (Glicina, Prolina, Isoleucina, Tirosina y Alanina) conocidos como motivos EPIYAS presentes en la región variable.⁵⁴

La proteína CagA es inyectada en las células epiteliales mediante el sistema de secreción tipo IV y traslocada al citosol, donde es fosforilada por una cinasa del hospedero. La traslocación de CagA al interior de las células epiteliales induce señalización para la expresión de IL-8 la cual, es una citosina moduladora de la inducción y activación de neutrófilos en la mucosa gástrica infectada por *H. pylori*.⁷⁰

Otro efecto inducido por CagA es la polimerización de la actina mediante la interacción con una fosfatasa que guía la elongación de las células epiteliales ocasionando la formación de pedestales, rearrreglo de la actina y favoreciendo la unión de la bacteria con la célula hospedera.⁵⁴

Diversos estudios demuestran una diferencia en el proceso de enfermedad que se produce cuando se trata de una cepa *cagA* positiva y su asociación con *vacA*, pues ambos factores de virulencia incrementan el riesgo a desarrollar gastritis severa, úlcera gástrica o duodenal, metaplasia y cáncer gástrico en comparación con las cepas *cagA* negativas que no expresan la proteína.^{48, 49}

En estudios serológicos realizados en pacientes chinos positivos para *H. pylori* con diversas enfermedades gastroduodenales, se han determinado anticuerpos anti-CagA de tipo IgG en un 80 y 84% de los adultos con úlcera gástrica y duodenal respectivamente, así como en el 29% de los pacientes asintomáticos, presentando altos niveles séricos de anticuerpos anti-CagA en los pacientes con úlcera péptica lo que, sugiere que los anticuerpos anti-CagA pueden ser usados como marcadores de riesgo de estas enfermedades.^{50, 51}

4. Adhesinas. Estas estructuras lipoproteínicas son altamente específicas y le permiten a la bacteria adherirse a diversos tipos de receptores presentes en la superficie de las células epiteliales gástricas así como a la fibronectina y a la colágena sin verse afectados por el exceso de ácido.³³

Varios tipos de adhesinas han sido identificadas como las hemaglutininas las cuales, producen aglutinación de eritrocitos.³⁴ Y los antígenos de Lewis b y la adhesina BabA (antígeno de tipo sanguíneo ligado a adhesina) las cuales, son mediadores de la adherencia de la bacteria a antígenos de grupo sanguíneo humano en células gástricas epiteliales jugando un papel importante en la eficiencia del daño en el tejido y la respuesta inflamatoria que eventualmente guía a enfermedad ulcerosa.⁴⁷

1.1.7. Patologías

1.1.7.1. Gastritis asociada a infección por *H. pylori*

H. pylori es la causa principal del desarrollo de gastritis crónica activa, úlcera péptica y cáncer gástrico. La gastritis es una inflamación severa de la mucosa gástrica asociada en más del 90% de los casos a infección por *H. pylori* y el proceso crónico puede llevar a una gastritis superficial atrófica y no atrófica.⁵⁷

La gastritis crónica por *H. pylori* puede originar lesiones precancerosas. Se sabe que la gastritis crónica superficial puede evolucionar a gastritis superficial atrófica en la cual, pueden presentarse metaplasia intestinal y dicha condición representa un aumento en el riesgo para la aparición de cáncer gástrico, especialmente del tipo intestinal. Mientras, la gastritis crónica superficial no atrófica se ha relacionado con el desarrollo de cáncer gástrico de tipo difuso.⁵⁸

1.1.7.2. Úlcera péptica asociada a infección por *H. pylori*

La úlcera péptica se caracteriza por la pérdida de mucus de las regiones del tracto digestivo expuestas a la acción del ácido clorhídrico y de la pepsina, es una lesión localizada y en general única de la mucosa del estómago o del duodeno que se extiende hasta la *muscularis mucosae*. Se ha considerado que la úlcera resulta como consecuencia de un desbalance entre factores agresivos de la mucosa como la secreción de ácido, con los factores defensivos como la secreción de moco, la regeneración epitelial y la vascularización.⁵⁹

La relación entre úlcera péptica e infección por *H. pylori* se apoya en primer lugar, por estudios epidemiológicos que demuestran una alta prevalencia de la infección en enfermos ulcerosos con las cepas *cagA* positivas asociadas al tipo s1/m1 de *vacA* pues, tanto *vacA* y otros factores que codifican para la Isla de Patogenicidad de *cagPAI* contribuyen a un daño mayor en la mucosa gástrica.⁴⁸⁻⁵¹

Y en segundo lugar por estudios clínicos que evidencian la disminución de las recidivas y complicaciones después de erradicada la bacteria.^{46, 62}

Las diferentes combinaciones del gen *vacA* se han asociado de manera diferente con el desarrollo de los cuadros clínicos en la infección con *H. pylori* por ejemplo: las cepas con la región media de *vacA* tipo m1 se han asociado más con daño sobre epitelio gástrico *in vivo* en el estómago y se ha aislado con mayor frecuencia de pacientes con úlceras pépticas y adenocarcinoma gástrico con respecto a las cepas tipo m2.⁴⁸

Las cepas con los alelos s1/m1 de *vacA* (tipo I), asociado a la presencia de *cagA*, se consideran de alto potencial citotóxico y con alto riesgo para inducir úlcera péptica y atrofia de la mucosa gástrica elevando el riesgo para el desarrollo de adenocarcinoma gástrico. Por el contrario, otras formas alélicas de *vacA* diferentes como s2/m2 (Tipo II), y en ausencia de *cagA* se les considera de bajo potencial citotóxico, por lo tanto, la severidad de la infección por *H. pylori* está asociada al genotipo.^{48, 49}

Se han descrito prevalencias de la infección en 95% de los pacientes con úlcera duodenal y en 80% con úlcera gástrica.⁶⁰ Los sujetos infectados por *H. pylori* tiene un riesgo estimado de 10 a 20% de desarrollar enfermedad ulcerosa a lo largo de su vida siendo de 3 a 4 veces mayor con respecto a los que no tienen la infección. La gastritis inducida por *H. pylori* es el factor principal en el desarrollo de la úlcera gastroduodenal.⁶¹

1.1.7.3. Cáncer gástrico asociada a infección por *H. pylori*

En 1994 un grupo especializado de la OMS clasificó a *H. pylori* como un carcinógeno de Categoría I, pues está claramente relacionado con la inducción de cáncer gástrico fundamentalmente de tipo intestinal.⁵⁷

Un estudio realizado en 1526 pacientes japoneses con diferentes enfermedades gastroduodenales demostró lo siguiente: el cáncer gástrico de tipo difuso es más común en pacientes jóvenes. Mientras, el tipo intestinal es más frecuente en adultos siendo más común la gastritis atrófica.⁵⁸

Se han propuesto diversos mecanismos carcinogénicos relacionados con la infección por *H. pylori*, que actúan sobre la mucosa gástrica durante el largo periodo de exposición con ésta bacteria y se han implicado una serie de factores como son:

- 1.- Incremento en la proliferación de Polimorfonucleares (PMN) en el tejido epitelial infectado.^{63, 64}
- 2.- Incremento del metabolismo oxidativo de los PMN que generan Radicales Libres de Oxígeno (RLO).^{63, 64}
- 3.- Producción de nitritos, nitratos y nitrosaminas.^{63, 64}
- 4.- Disminución de antioxidantes en mucosa gástrica.⁶⁵

La colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori* está relacionada con el desarrollo de procesos inflamatorios caracterizados por la presencia de infiltrado celular leucocitario hacia el tejido epitelial infectado. Tales células como los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) sufren procesos de activación dando lugar al incremento del metabolismo oxidativo con el fin de combatir al agente bacteriano. Como consecuencia se induce el funcionamiento de diferentes sistemas enzimáticos como la mieloperoxidasa (MPO) o hipoxantina-xantinooxidasa (HX-XO), que inducen el incremento de radicales libres altamente reactivos derivados del oxígeno (RLO) como O_2^- , H_2O_2 y OH^- .⁶³

Sin embargo, la falta de selectividad de los RLO originan efectos no sólo contra los agentes extraños, sino también contra las células vecinas, originando no sólo lesiones estructurales, sino también lesiones cromosómicas que serían posibles responsables de mutaciones celulares e incluso transformaciones malignas. La sobreproducción de derivados nitrosos por PMN y macrófagos origina la desaminación de bases de ADN y favorecen la aparición de fenómenos neoplásicos, este fenómeno generalmente se presenta en procesos infecciosos crónicos. La presencia de polimorfonucleares incrementa el metabolismo oxidativo que junto con la activación enzimática de óxido nítrico, origina la producción de nitrosaminas y peroxinitritos que también favorecen la inducción de mutaciones cromosómicas al desaminar el DNA e incrementan la posibilidad de aparición de metaplasias, seguida de una displasia que más tarde puede evolucionar a un cáncer gástrico. Estos eventos se ven aumentados por la edad de inicio de la infección y el tiempo que ha persistido.^{63, 64}

La suplementación en la dieta con antioxidantes como el ácido ascórbico, α -tocoferol y β -caroteno puede interferir con el proceso precanceroso y puede ser una efectiva estrategia para la prevención de carcinoma gástrico.⁶⁵

1.1.8. Respuesta inmune humoral y celular

Se ha demostrado que la infección por *H. pylori* en la mucosa gástrica, induce la expresión de los genes que secretan quimiocinas en las células epiteliales gástricas tales como IL-8, la Proteína 78 Activadora de Neutrófilos (ENA-78) y la Proteína Quimiotáctica para los Macrófagos (MCP-1). Así como la secreción citocinas proinflamatorias como interleucinas (IL-1 y IL-6), Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α) que regulan positivamente la expresión de quimiocinas como la interleucina (IL-8) en células epiteliales y tienen propiedades de atracción de neutrófilos polimorfonucleares PMN que fagocitan la bacteria durante la respuesta inflamatoria, por lo tanto, IL-8 juega un papel importante en el inicio de la inflamación local y en la respuesta inmunitaria.^{68, 75} Además, el incremento en los niveles de secreción de esta quimiocina y la respuesta de IgM contra *H. pylori* son las primeras señales de una respuesta inflamatoria aguda.⁴¹

En el caso de la inflamación crónica de la mucosa gástrica se despierta una respuesta inmunitaria celular de tipo CD4+ y CD8+ donde, IL-8 siendo un potente quimioatrayente actúa como mediador inflamatorio reclutando y activando neutrófilos a los sitios de invasión por *H. pylori*, ocasionando infiltración de células plasmáticas, linfocitos T y B, neutrófilos, monocitos y eosinófilos hacia la mucosa gástrica infectada contribuyendo así al desarrollo de formas más severas de enfermedades gastroduodenales como linfomas y adenocarcinoma gástrico.^{63, 69} También, se despierta inicialmente una respuesta inmunitaria humoral de tipo IgA local específica contra *H. pylori* y posteriormente una respuesta de tipo IgG sistémica.⁴⁵ Aunque los anticuerpos séricos no necesariamente indican infección activa. Inicialmente, los pacientes infectados desarrollan una respuesta inmunitaria local aumentando los niveles de anticuerpos de tipo IgM con posterior aumento en la respuesta de IgA local específica contra *H. pylori* que impide la adherencia bacteriana en estómago y una respuesta de IgG sistémica de memoria que en las personas crónicamente infectadas persisten en títulos elevados.⁴⁵

Existen diversos tipos de cepas de *H. pylori* unas más virulentas que otras y se ha estudiado si existe asociación entre la colonización de estas cepas con el grado de inflamación. En un estudio inmunohistopatológico en pacientes con gastritis se encontró que los pacientes infectados con cepas de *H. pylori cagA+* tienen mayor capacidad en comparación con las *cagA-* para estimular la inflamación sugiriendo entonces, existe una mayor inducción de la secreción de IL-8 por las células del epitelio gástrico en estas cepas y dicha inducción depende de la integridad de la mayoría de los genes de la Isla de Patogenicidad (*cagPAI*) de *H. pylori*.⁷⁰

Se ha sugerido como mayor subgrupo de linfocitos involucrados en la respuesta inmunitaria adquirida contra la infección de *H. pylori* corresponde a los linfocitos T CD4+ fenotipos Th1 que participa en la respuesta vía celular y Th2 que está involucrada en la respuesta vía humoral. La infección por *H. pylori* es modulada por las células T las cuales, controlan el tipo de respuesta inmunitaria pues, la expresión de IL-12 y IL-10 durante la infección en el estómago, determinan la selección de células Th1 y Th2 respectivamente. Las células tipo Th1 producen citocinas que activan a los macrófagos y son responsables de la respuesta inmunitaria mediada por células citotóxicas. Mientras, las células tipo Th2 inhiben las funciones de los macrófagos y proveen una respuesta protectora independiente de fagocitos y una fuerte producción de anticuerpos de tipo IgA e IgG las cuales, son esencialmente activos en las mucosas. Aunque, *H. pylori* estimula ambas respuestas, se ha observado en la mucosa gástrica la proliferación de citocinas proinflamatorias sugiriendo entonces, existe una respuesta predominante de tipo Th1 (vía celular).⁷¹

La activación de la respuesta de tipo Th1 se debe a la interacción de *H. pylori* que induce maduración de células dendríticas y activación de IL-12 características de la respuesta celular.^{72, 73.}

Otro estudio demuestra el predominio y los altos niveles de IL-12 detectado por inmunohistoquímica en el estómago infectado de ratones la cual, favorece la expresión de interferón- γ (IFN- γ) en linfocitos T CD4+ que las diferencia a células Th1 propias de la inmunidad mediada por células. Además, la expresión de IFN- γ propia de la respuesta Th1, tiene una función importante en el inicio del daño a la mucosa observada durante la gastritis pues en un estudio *in vivo* en ratón se analizó el efecto exógeno de IFN- γ sobre la mucosa gástrica. Después de los siete días de administrado IFN- γ por vía intramuscular, los ratones mostraron inflamación en la mucosa gástrica y supresión en la secreción de somatostatina lo que sugiere que, la gastritis y los cambios observados en la mucosa gástrica durante la infección es mediada por la respuesta inmune de tipo Th1.⁷⁴ Se ha demostrado que biopsias de la mucosa gástrica normal, infectada y no infectada, mostraron ausencia o muy poca presencia de citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 características de la respuesta Th2 productora de anticuerpos, sugiriendo que los humanos tienen preferentemente una respuesta inmune celular en sus estómagos, lo cual no erradica la infección por *H. pylori*.⁷²

⁷⁴ Es predecible que una respuesta de tipo Th2 puede ser más efectiva porque así se generan los anticuerpos suficientes contra todas los fragmentos antigénicos bloqueando y neutralizando sus efectos. Sin embargo, aún se desconocen muchos factores que originan una mayor inclinación hacia la activación en la respuesta inmune de tipo Th1.

1.2. Citotoxina Vacuolizante VacA

1.2.1. Antecedentes

En 1988 se dieron los primeros reportes sobre la formación de vacuolas *in vitro* en cultivos celulares cuando eran añadidos caldos de *H. pylori*.⁴ En 1992 estos efectos de vacuolización fueron subsecuentemente demostrados al estudiarse que eran causados por la secreción de una toxina al que se le designó el nombre de VacA. La proteína fue precipitada, aislada y purificada a partir de caldos de cultivos con *H. pylori* empleando métodos cromatográficos para su posterior análisis bioquímico, serológico e inmunológico. Se demostró que la toxina VacA es un factor de virulencia importante. Sin embargo, se creía que sólo el 50-60% de las cepas expresaban la proteína, sugiriendo hasta ese entonces, la existencia de dos tipos de cepas de *H. pylori*, las toxigénicas y no toxigénicas.⁵ Más tarde se demostró la presencia de la toxina en extractos acuosos de todas las cepas de *H. pylori*.⁷

1.2.2. Estructura y diversidad del gen *vacA*

El gen *vacA* está presente en todas las cepas de *H. pylori*, este gen tiene la información necesaria para sintetizar una proteína con efectos citotóxicos variables.⁷ La caracterización de *vacA* a partir del alineamiento y comparación entre secuencias de nucleótidos en cepas de *H. pylori* toxigénicas y no toxigénicas ha demostrado diferencias en la secuencias del gen en uno u otro caso presentándose regiones conservadas y no conservadas a lo largo del gen.⁶

La variabilidad de nucleótidos en las regiones no conservadas determinan que *vacA* presente una similitud aproximada del 70%. Las regiones polimórficas de *vacA* se presentan en dos segmentos conocidos como la secuencia señal y la región media.^{5,6}

Estas variaciones, han originado la clasificación de cuatro tipos de alelos para la secuencia señal designados como s1a, s1b, s1c y s2 y dos tipos de alelos para la región media designados como m1 y m2 presentándose todas las posibles combinaciones y generando los genotipos s1/m1, s1/m2 y s2/m2.^{7, 55} Sin embargo, el genotipo s2/m1 no se habían identificado y no fue hasta 1999 cuando un estudio realizado en población sudafricana descubrió la primera cepa con esta combinación. Una posible explicación de estos alelos es que puede ser un genotipo que le confiere desventaja selectiva.³⁷

Esta diversidad de *vacA* está correlacionada con los distintos grados de actividad de la citotoxina y son marcadores diferentes en el potencial de virulencia.³⁸ Se ha demostrado que la diversidad de alelos de *vacA* se debe a recombinación *in vivo* de *H. pylori* cuando existe una infección múltiple.^{7, 37, 78}

La distribución geográfica de las cepas de *H. pylori* varía y en el caso particular de los genotipos de *vacA*, la variante s1a predomina en el Norte y Este de Europa, la variante s1b prevalece en el área Mediterránea y América del Sur. Mientras que la s1c prevalece en el Este de Asia.⁶⁶ (Fig. 7). En México predomina el genotipo s1b.⁷⁶

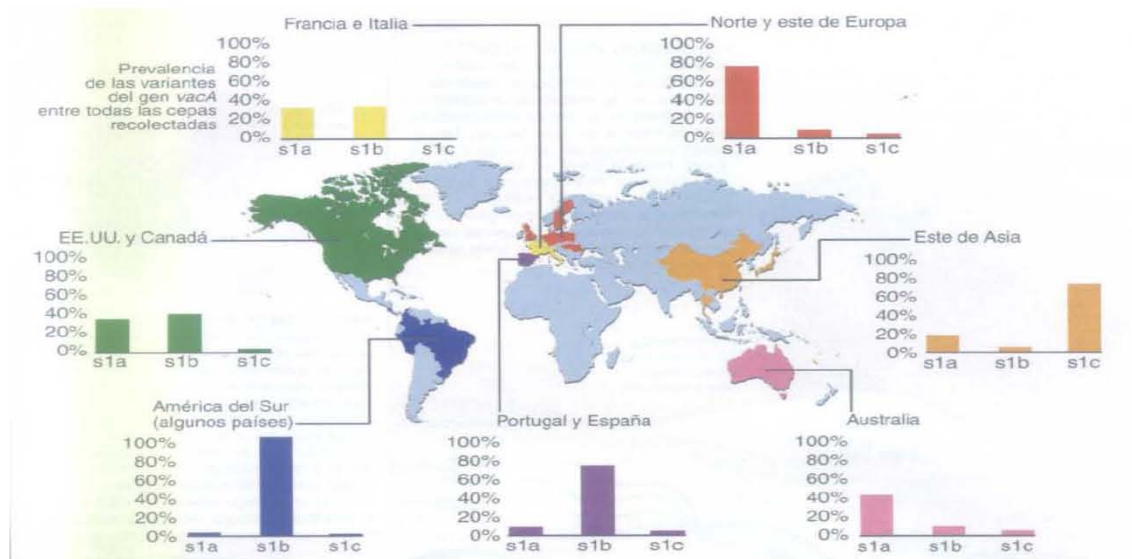


Fig. 7. Representación geográfica mundial de los genotipos de *vacA* s1a, s1b y s1c. (Tomada de Blaser, M. J. 2003)⁶⁶

1.2.3. Estructura y diversidad de la proteína VacA

La proteína VacA es una citotoxina secretada por *H. pylori*, pertenece a la familia de proteínas autotransportadoras debido a la homología que existe entre la secuencia carboxiloterminal de la toxina con las secuencias internas de numerosas proteínas autotransportadoras.⁴ Mediante un análisis secuencial por alineamiento y comparación entre aminoácidos de familias de VacA, han sido identificadas cinco regiones importantes nombradas a partir de la región aminoterminal: el péptido señal, el fragmento p37, la región sensible a proteasas, el fragmento p58 y el dominio carboxilo terminal p40 (autotransportador). (Fig. 8)

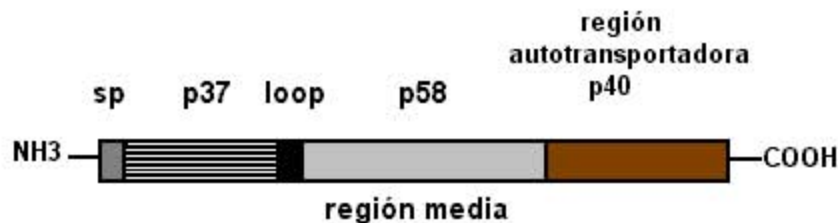


Fig. 8. Representación esquemática de la tóxina VacA. sp, péptido señal; p37 y p58 subunidades de 37 y 58 kDa respectivamente; loop, región flexible y sensible a proteasas; región autotransportadora. (Tomada de Atherton, J. C. 2006)¹¹

Estas variaciones secuenciales de aminoácidos generan por ejemplo en la secuencia señal, que la forma s2 presente doce aminoácidos que elimina la actividad vacuolizante con respecto a la forma s1.⁵⁵ (Fig. 9). Y originando que la toxina de ambos alelos presenten variabilidad en su conformación estructural confiriéndole diferentes propiedades antigénicas.⁵⁶ Las cuatro combinaciones alélicas que se presentan en el gen generan que la toxina presente un tamaño y peso variable.⁷

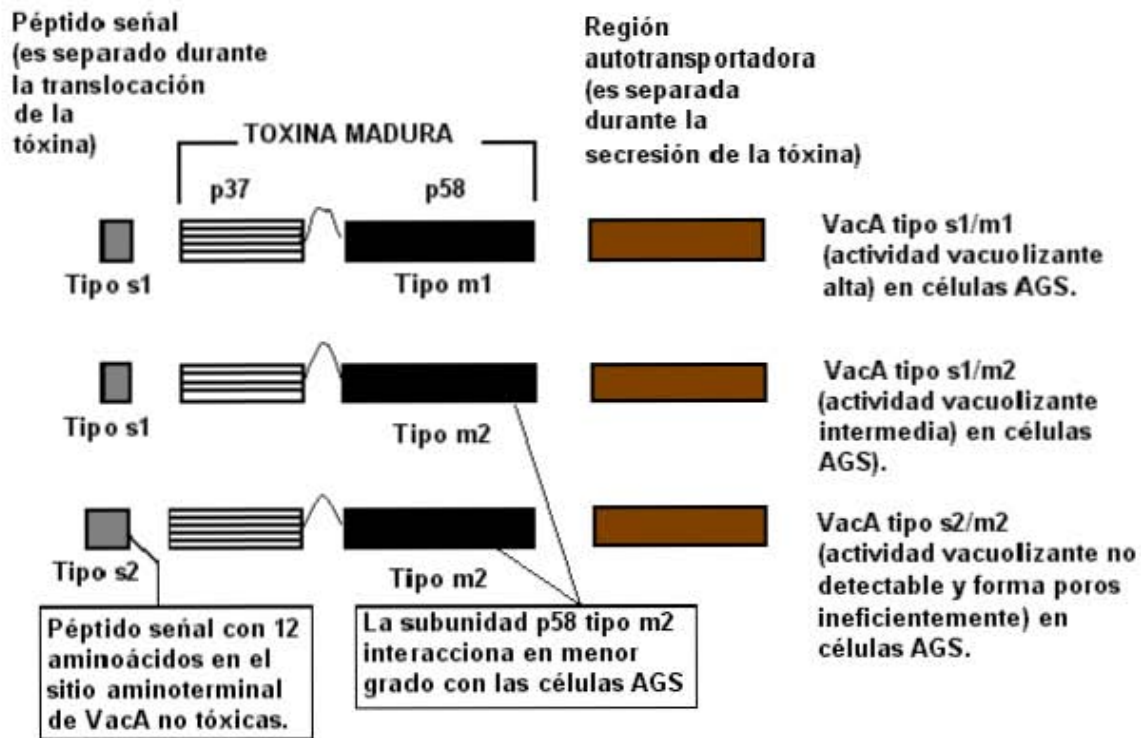


Fig. 9. Representación esquemática de las familias de VacA. Las principales variaciones en el gen *vacA* se presentan en la secuencia señal que codifica para el péptido señal y parte de p37 siendo del tipo s1 ó s2, y en la región media que codifica para la subunidad p58 (fragmento que interacciona con la célula) siendo del tipo m1 o m2. (Tomada de Atherton, J. C. 2006)¹¹

La toxina inmadura tiene un peso molecular de 137.7 kDa la cual, está formada por un fragmento autotransportador de 33 kDa y por una fracción monomérica activa de 95 kDa aproximadamente que representa a la toxina madura. La fracción de 95 kDa está constituida por una subunidad de 37 kDa llamada p37 y una de 58 kDa llamada p58.⁵ Cuando éstas estructuras monoméricas se unen a pH neutro forman un complejo oligomérico inactivo en forma de “flor” de 900 kDa que representan a la toxina nativa. Este complejo oligomérico es capaz de sufrir cambios conformacionales en su estructura bajo diferentes condiciones de pH pues, a pH neutro se observa una estructura conservada. Mientras, bajo condiciones ácidas o básicas el oligómero sufre una hidrólisis la cual, genera a los monómeros activos.⁸

La estructura tridimensional del complejo oligomérico de VacA observada por microscopía electrónica, revela estructuras en forma de “flor” con simetría hexamérica y heptamérica, donde cada brazo o “pétalo” representa un monómero de VacA.⁸ Por expresión del fragmento recombinante p58 en *E. coli*, se observa que este fragmento es similar a dos “bastones” curvados simétricamente en direcciones opuestas, donde cada bastón es la mitad de un dímero, la cual corresponde al brazo periférico de la toxina y al arreglarse en forma radial forma al oligómero. Mientras que p37 forma el anillo central.¹⁰ La estructura oligomérica está formada por un anillo central prominente con 6 a 9 brazos gruesos en forma de pétalos, acopladas en simetría radial y dispuestas en dirección contraria o a favor de las manecillas del reloj.^{8, 17} (Fig. 10). En 2002, Adrian y cols., utilizaron la tinción crio-negativa y observaron estructuras oligoméricas con múltiples orientaciones, donde el complejo oligomérico predominante se observa como un dodecámero, con un anillo central redondo producto de la superposición o acoplamiento cara a cara de dos hexámeros por el lado hidrofóbico, formando una estructura semejante a la “estrella de David”.^{9, 17}



Fig. 10. Representación oligomérica de la toxina VacA. Se representa el hexámero frontal donde, la fracción monomérica de 95 kDa está formada por la interacción del fragmento p58 y p37 formando el brazo periférico y el anillo central de la toxina respectivamente. (Tomada de Adrian, *et al.* 2002)⁹

El gen *vacA* codifica para la citotoxina VacA, una vez sintetizada, es transportada del citoplasma al periplasma bacteriano mediante el péptido señal. Posteriormente, el fragmento del extremo carboxi-terminal p40 se une a la membrana externa para formar un poro por donde la toxina será secretada al medio exterior. El enlace que une al resto de la proteína es procesada proteolíticamente para exportar al espacio extracelular a la toxina madura de 95 kDa. Estos monómeros sufren una hidrólisis proteolítica en el sitio sensible a proteasas generando dos subunidades, una de 37 y la otra de 58 kDa, nombradas como p37 y p58 respectivamente que corresponden a subunidades con función y estructura diferente.

1.2.4. Efectos celulares *in vitro* inducidos por VacA

1.2.4.1. Vacuolización celular

Bajo condiciones neutras extracelulares generadas por la formación de amonio producto de la hidrólisis de la urea por *H. pylori*, se incrementa la interacción del dominio p58 de VacA con el receptor de células epiteliales y proteínas ancladas glicosilfosfatidilinositol (GPI-APs) dentro de los dominios lipídicos de colesterol.¹⁸ Se piensa que el dominio amino-terminal p37 es primordial para la formación de canales selectivos aniónicos que alteran la permeabilidad celular en las monocapas epiteliales y provocan la salida de aniones como Cl^- .^{14, 20} La toxina insertada en la membrana es endocitada, acumulándose en compartimentos endosomales que presentan los marcadores de membrana GTPasa-rab7 y que sirve como mantenimiento de las vacuolas a través de la regulación del tráfico intracelular.¹⁹ Estos compartimentos endosomales presentan en su membrana la V-ATPasa. Aquí, el canal formado estimula a esta enzima y a la bomba de protones conduciendo al endosoma agua, protones, Cl^- , bases débiles de amonio y alterando el transporte de cationes Na^+ y K^+ provocando desequilibrio osmótico y vacuolización celular.^{14, 23}

La acumulación endosomal de iones acidotrópicos de amonio osmóticamente activos se combina con los Cl^- formando cloruro de amonio que genera presión osmótica e inflamación vesicular dentro del lumen de estos compartimentos.¹⁶ Por lo tanto, la capacidad de inducir vacuolización está localizado en p37. Mientras que en p58 está relacionado en la interacción con sus células blanco. (Fig. 11)

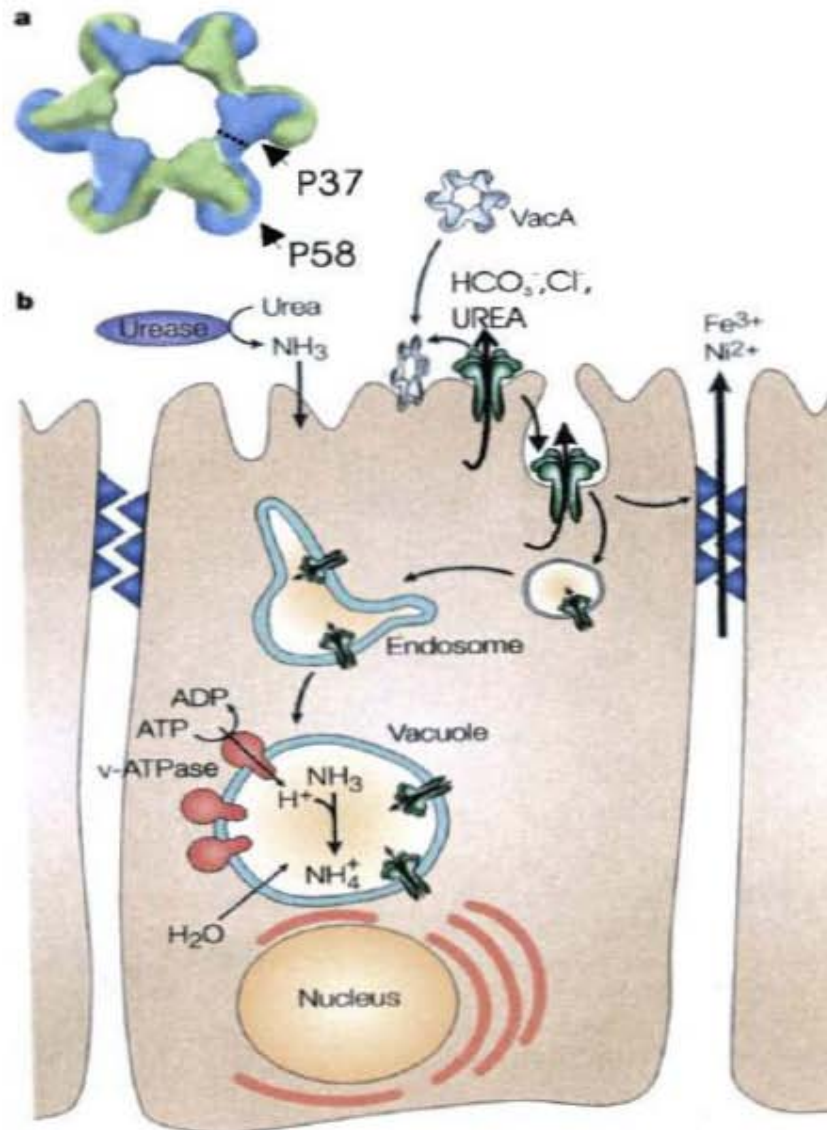


Fig. 11. Representación esquemática de la actividad de VacA en la célula epitelial gástrica (Tomada de Montecucco, *et al.* 2003)²¹

El grado de vacuolización de las distintas familias de VacA en células HeLa es variable pues, las cepas que poseen el genotipo s1/m1 codifican para la toxina que presenta mayor actividad vacuolizante, las cepas que poseen el genotipo s1/m2 codifican para la toxina de actividad vacuolizante intermedia, y los aislados clínicos cuyo genotipo es s2/m2 codifican a la toxina que presenta actividad vacuolizante no detectable.⁷

Por otro lado, se ha observado que los aislados clínicos que presentan el genotipo s1a para la secuencia señal y m1 para la región media, se asocian en mayor proporción con la inflamación gástrica y úlcera duodenal presentando mayor infiltrado de células polimorfonucleares con respecto a las s1b, s2 y m2.³⁸

La variación en las regiones no conservadas de *vacA* y la combinación de ambos alelos genera cuatro tipos de familias de VacA s1/m1, s1/m2, s2/m1 y s2/m2, con diferencias en la secuencia de aminoácidos que originan distintos grados de actividad vacuolizante *in vitro* en diferentes líneas celulares como células HeLa y AGS.^{7, 55}

1.2.4.2. Interferencia con la presentación antigénica

El procesamiento antigénico es un mecanismo inmune el cual, permite la generación de epítopes antigénicos específicos por parte de las Células Presentadoras de Antígenos (CPA) para ser procesados proteolíticamente dentro de endosomas ligeramente ácidos los cuales, originan pequeñas cadenas peptídicas que son expresadas en los receptores del Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase II (MCH II) para ser reconocidos por las células T CD4+ y CD8+ y activar así la respuesta inmunitaria. Sin embargo, Molinari, *et al.* 1998. mostró que VacA interfiere con el procesamiento antigénico en las Células Presentadoras de Antígenos (CPA) alterando la función endocítica celular y originando una defectuosa producción de epítopes antigénicos por parte de los linfocitos B.³⁹ Subsecuentemente, se inhibe la estimulación y proliferación clonal de los linfocitos T CD4+ y CD8+ por dos vías diferentes: se inhibe la movilización e influjo de calcio del medio extracelular hacia el interior de la célula T alterando los mecanismos de translocación nuclear e inhibiendo la activación de los genes productores de citocinas proinflamatorias.²² Y se activan mecanismos de señalización intracelular que originan inmovilización de la célula T mediante el desordenamiento en la polimerización y reacomodo de la actina.³⁹

La relevancia de este efecto *in vitro* representa una evidencia de que *H. pylori* suprime la respuesta inmunitaria, específicamente en las células TCD4+. Por lo tanto, la inhibición en el procesamiento de antígenos por parte de las CPA y la interferencia en la activación y estimulación de linfocitos T pueden ser parte de la estrategia de sobrevivencia de *H. pylori*, ayudando a la bacteria a prevenir una respuesta inmunitaria efectiva y contribuyendo así a una infección crónica en el estómago humano.

2. HIPOTESIS

Un factor de virulencia de *H. pylori* es la citotoxina vacuolizante. En estudios previos se ha demostrado, existe una asociación entre la infección con cepas de *H. pylori* tipo s1/m1 con el desarrollo de úlceras y cáncer gástrico. Por lo tanto, sí existe asociación entre el genotipo de *vacA* con el desarrollo de formas más severas en la enfermedad entonces, se espera exista una mayor respuesta de anticuerpos contra VacA tipo m1 en pacientes con úlcera duodenal, lesiones precancerosas y cáncer gástrico, con respecto a los pacientes con diagnóstico clínico de gastritis superficial.

La infección por *H. pylori* activa a la respuesta inmune humoral la cual, está determinada por la exposición antigénica de la bacteria cuando se presenta la infección. Por lo tanto, sí un paciente está infectado por algún genotipo de *vacA* entonces, la inducción en la respuesta de anticuerpos generada por la producción de la citotoxina vacuolizante será específica e indicativa del tipo de toxina presente en el paciente e igual al genotipo de *vacA* determinado por PCR.

3. JUSTIFICACION

H. pylori infecta a más de la mitad de la población mundial, siendo la causa principal del desarrollo de gastritis crónica, úlcera péptica y adenocarcinoma gástrico. Las cepas que poseen el genotipo m1 se han asociado más con daño sobre epitelio gástrico *in vitro* y se han aislado con mayor frecuencia de pacientes con úlceras pépticas y cáncer gástrico con respecto a las cepas tipo m2. Estos datos sugieren la utilidad de conocer el genotipo de la región media de *vacA* de la cepa infectante para identificar a los pacientes con mayor riesgo de desarrollar cuadros clínicos más severos. Actualmente, la determinación del genotipo de *vacA*, requiere del aislamiento de la bacteria a partir del cultivo de biopsias gástricas lo cual, representa un alto costo en la endoscopia, condiciones especiales y tiempo para el crecimiento de la cepa por lo que, un método serológico permitiría ver si la respuesta de anticuerpos de tipo IgG generada contra la región media de VacA que permanecen en títulos más elevados en suero durante la infección, nos permite determinar el genotipo de *vacA* de la cepa infectante en todos los pacientes y analizar un mayor número de muestras de manera rápida y económica evitándole al paciente trauma e incomodidad para la toma de una biopsia gástrica.

4. OBJETIVO GENERAL

- Determinar si la respuesta de anticuerpos de tipo IgG generada contra la citotoxina vacuolizante (VacA) de *H. pylori* en suero de pacientes mexicanos infectados nos permite determinar el genotipo de *vacA* de la cepa infectante por el método de ELISA comparándolo con el genotipo obtenido por PCR de la cepa aislada.

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Genotipificar la región media y secuencia señal del gen *vacA* de los aislados clínicos de *H. pylori* por medio de un método basado en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
2. Comparar si los niveles de anticuerpos IgG anti-VacA en el suero de pacientes infectados se asocian con los diferentes cuadros clínicos gastroduodenales.
3. Investigar si la respuesta de anticuerpos IgG anti-VacA es útil para determinar el genotipo de la región media de *vacA* de la cepa infectante.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1. REACTIVOS

- Reactivo de Ureasa. (Ver anexo)
- Reactivo de Peróxido de Hidrógeno al 30%. (Ver anexo)
- Placas de Oxidasa impregnado con Diclorhidrato de Tetrametil ρ -Fenilendiamina (Becton-Dickinson)
- Sistema de velobiosis Gas Pack. (Becton-Dickinson)
- Reactivo GES. (Ver anexo)
- Bromuro de Etidio. (Ver anexo)
- Buffer de PCR 10x (Invitrogen Life Technologies)
- Cloruro de Magnesio 50 mM (Invitrogen Life Technologies)
- desoxinucleótidos Trifosfatos (dNTP's). (Ver anexo)
- Iniciadores o Primer VAI-F/VAI-R y VAG-F/VAG-R (Invitrogen Life Technologies) para amplificar el gen *vacA* (Ver tabla 1).

Iniciadores	Región de <i>vacA</i> que amplifica	Secuencia (5' a 3')	Posición	Tamaño del producto (pb)
VAI-F	Secuencia señal	ATGGAAATACAA CAAACACAC	797	s1 = 259
VAI-R	Secuencia señal	CTGCTTGAATGCG CGCCAAAC	1055	s2 = 286
VAG-F	Región media	CAATCTGTCCAAT CAAGCGAG	2074	m1 = 570
VAG-R	Región media	CTAGCGTCAAAA TAATTCCAAGG	2643	m2 = 645

Tabla 1.- Secuencia de los iniciadores utilizados en PCR para la genotipación de *vacA*.

- Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies)
- Monolaurato Polioxietileno-Sorbitol (Tween 20). (Sigma)
- Anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG acoplada a Peroxidasas (Sigma)
- Sustrato peróxido (Sigma)
- Cromógeno Dihidroclorhidro o-Fenilendiamina OPD. Tabletas (Sigma)
- Suero hiperinmune policlonal de conejo anti-VacA (donados por el Dr. J. C. Atherton)
- Sustrato para detección de proteínas en Western Blot. (ECL Amersham Biociences)

5.2. SOLUCIONES

- Colorantes para la tinción de Gram (Sigma Diagnostic's) (Ver anexo)
- Solución Salina Fisiológica (SSF). (Ver anexo)
- Caldo Brucella. (Ver anexo)
- Placas de Agar Base Brucella adicionado con sangre de carnero al 5%
- Glicerol (Boehringer Mannheim Laboratory Reagent's)
- Agua Inyectable estéril (Secretaría de Salud)
- Solución de Acido Etilen-Diaminotetraacético (EDTA) 0.5 M pH 8.0. (Ver anexo)
- Acetato de Amonio 7.5 M. (Ver anexo)
- Cloroformo (J.T.Baker)
- Isopropanol (Ommisolv)
- Etanol al 70% (v/v). (Ver anexo)
- Solución amortiguadora de corrimiento Tris-Acetato-EDTA (TAE 50x) para electroforesis en geles de agarosa. (Ver anexo)
- Solución amortiguadora de corrimiento TAE 1x para electroforesis en geles de agarosa. (Ver anexo)
- Agarosa (Invitrogen Life Technologies).
- Marcador de peso molecular para ADN de 1 Kb (Invitrogen Life Technologies)
- Solución amortiguadora de carga 6x para PCR. (Ver anexo)
- Solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M pH 9.6. (Ver anexo)

- Solución amortiguadora de Fosfatos 10x (PBS). (Ver anexo)
- Solución amortiguadora de Fosfatos 1x (PBS). (Ver anexo)
- Solución amortiguadora diluyente para ELISA. (Ver anexo)
- Solución amortiguadora de lavado para ELISA. (Ver anexo)
- Solución de Acrilamida. (Ver anexo)
- Solución saturada de butanol en agua
- Tris pH 8.8 3 M. (Ver anexo)
- Tris pH 6.8 1 M. (Ver anexo)
- Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 10% (p/v). (Ver anexo)
- Persulfato de Amonio (APS) al 10% (p/v). (Ver anexo)
- N,N,N',N'- Tetrametiletilendiamina (TEMED) (Sigma)
- Solución amortiguadora de carga 4x SDS-PAGE para electroforesis en geles de poliacrilamida. (Ver anexo)
- Solución amortiguadora de corrimiento para electroforesis en geles de poliacrilamida 10x. (Ver anexo)
- Solución amortiguadora de corrimiento para electroforesis en geles de poliacrilamida 1x. (Ver anexo)
- Solución amortiguadora para la transferencia. (Ver anexo)
- Albúmina al 1% (p/v) en PBS 1x. (Ver anexo)
- Solución amortiguadora de lavado para Western Blot. (Ver anexo)
- Marcador de peso molecular para proteínas de 250 kDa (Bio-Rad)
- Azul de Coomasie. (Ver anexo)
- Solución decolorante. (Ver anexo)
- Solución reveladora de películas. (Ver anexo)
- Solución Fijadora de películas. (Ver anexo)

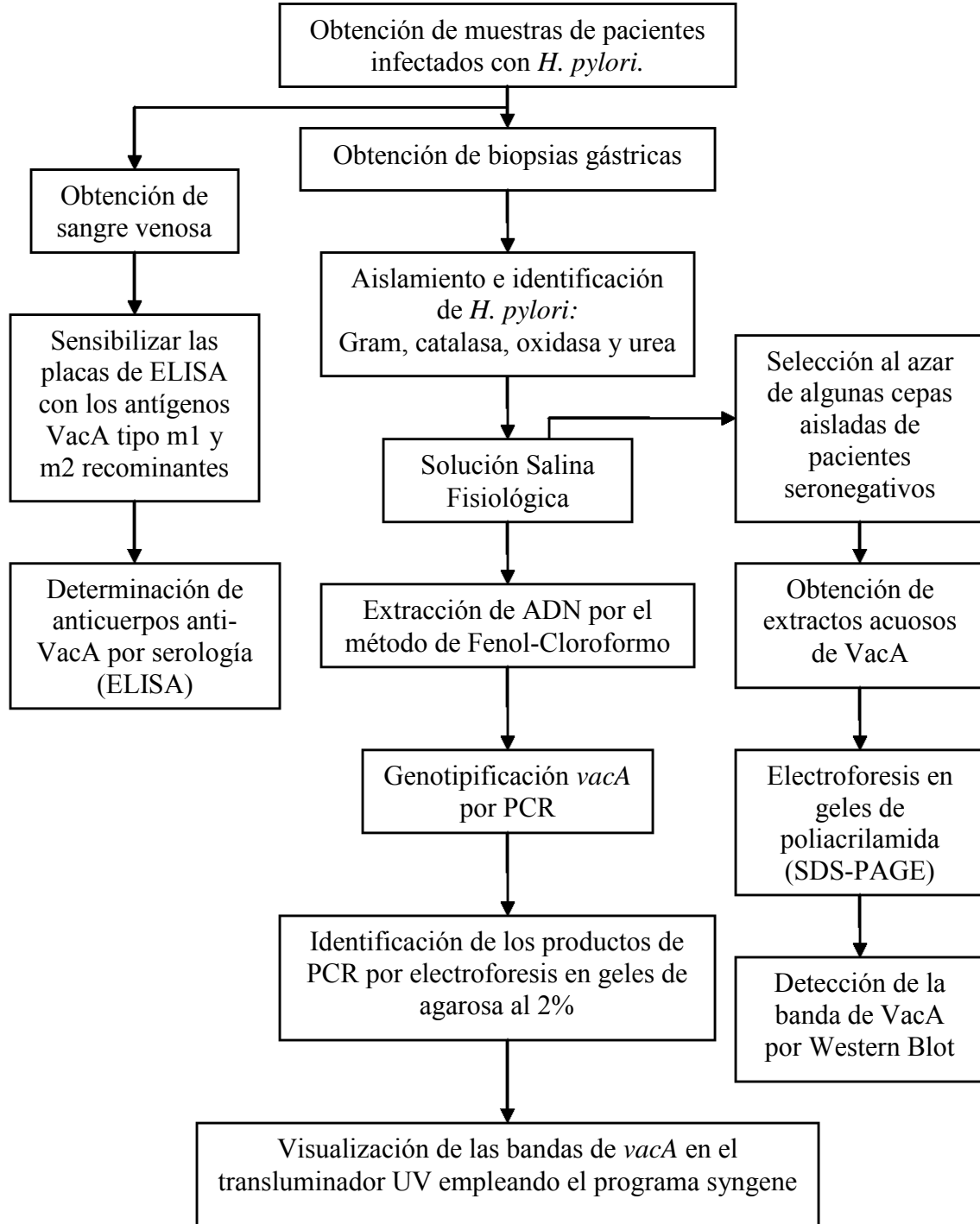
5.3. CEPAS DE REFERENCIA DE *H. pylori*

Cepa 60190 control positivo para el alelo s1/m1 del gen *vacA*
 Cepa 8822 control positivo para el alelo s2/m2 del gen *vacA*

5.4. EQUIPOS

- Campana de flujo laminar (Nuair)
- Microscopio (Olympus, Bx40)
- Incubadora de CO₂ (Nuair)
- Balanza analítica (Mettler Toledo)
- Microcentrifuga (Biofuge Heraeus, Accsolab)
- Termociclador (Gene Amp, PCR System 9700)
- Procesador de imágenes (Bioquím., syngens)
- Potenciómetro (Beckman)
- Lector de ELISA (Labsystem, Multiskan Ascent)
- Concentrador de soluciones (Eppendorf 5301)

5.5. ESQUEMA DE TRABAJO



5.6. OBTENCION DE MUESTRAS BIOLOGICAS

Los pacientes incluidos en este estudio forman parte de un proyecto multicéntrico y fueron reclutados en el Hospital General y Hospital de Oncología del CMN Siglo XXI en la ciudad de México. De cada paciente se tomaron biopsias gástricas de antro y cuerpo así, como una muestra de sangre periférica. Cada muestra fue clasificada de acuerdo al diagnóstico endoscópico e histopatológico en los grupos de gastritis crónica superficial, úlcera duodenal, lesiones precancerosas (displasia y metaplasia intestinal) y cáncer gástrico. El número de biopsias analizadas corresponde a una población de 199 adultos incluyendo hombres y mujeres.

Para la determinación de anticuerpos IgG anti-VacA se trabajaron el mismo número de muestras de sueros los cuales, fueron positivos a *H. pylori* por cultivo. Además, se incluyeron 27 muestras de sueros de individuos no infectados confirmados por cultivo, serología e histología, que fueron empleados como controles negativos para la determinación de anticuerpos IgG anti-VacA. El lugar de estudio fue en la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional (CMN) Siglo XXI.

5.7. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Helicobacter pylori*

5.7.1. PRIMO AISLAMIENTO A PARTIR DE BIOPSIAS GASTRICAS

Se descongelaron las biopsias gástricas del medio de conservación y con una asa estéril se sembraron por estría cruzada en placas de Gelosa Sangre. Posteriormente, se incubaron a 37°C con 10% de CO₂ durante 15 días revisando las cajas cada 48 hr. Se buscaron colonias convexas, brillantes, translúcidas de borde circular de 0.5 a 1 mm de diámetro y se realizó la identificación por medio de pruebas bioquímicas primarias: ureasa, catalasa, oxidasa, las cuales fueron positivas y la tinción de Gram para buscar bacilos curvos o espirales Gram negativos. Se resembraron masivamente por triplicado en Gelosa Sangre todas las colonias de *H. pylori* (pool) y se incubaron a 37°C con 10% de CO₂ durante 3 a 5 días revisando los cultivos cada 48 hr; la identificación se confirmó bioquímica y microscópicamente.

5.7.2. CONSERVACION DE CEPAS DE *H. pylori*

Se cosechó el pool con un hisopo estéril a partir de una caja de Petri y se resuspendió en 1 mL de Caldo Brucela adicionado con glicerol estéril al 15% en criotubos Eppendorff. Cada pool se marcó con el número de cepa y posteriormente se llevaron a congelación a -70°C para su conservación.

5.8. GENOTIPIFICACION DEL GEN *vacA* POR PCR

5.8.1. EXTRACCION DE ADN DE *H. pylori* POR EL METODO FENOL-CLOROFORMO

De un crecimiento de 48 hr, se cosechó *H. pylori* con un hisopo estéril a partir de 2 cajas de Petri y se realizó una suspensión homogénea en 1 mL de Solución Salina Fisiológica. Se centrifugaron los criotubos con la suspensión salina de *H. pylori* a 13,000 rpm durante 5 min, se decantó el sobrenadante, se resuspendió el paquete celular con 500 µL de solución GES y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. Se adicionaron a esta suspensión 250 µL de acetato de amonio 7.5 M frío, se invirtieron los criotubos varias veces y se incubaron en hielo durante 5 min. Posteriormente, se adicionaron 650 µL de cloroformo, se mezcló gentilmente y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min. Se removió la fase acuosa (capa superior) que contiene el ADN a otro tubo marcado. Se repitió la extracción con cloroformo 2 veces más. Después de la extracción, se transfirió la fase acuosa (capa superior) a otro tubo, se precipitó el ADN adicionando 450 µL de isopropanol frío. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 min, se decantó, se adicionaron 500 µL de etanol frío al 70% para lavar el ADN, se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 min y se decantó nuevamente. El lavado se repitió dos veces más con etanol al 70%. Se secaron muy bien los criotubos tubo al aire que contienen la pastilla y una vez secos, se resuspendió la pastilla en 100 µL de agua libre de nucleasas.

5.8.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En la genotipificación de la secuencia señal y la región media de *vacA* se emplearon las siguientes condiciones descritas en tabla 2.

Reactivos	Concentración final (25 MI de volumen final)
Solución amortiguadora para PCR (Sigma)	1x
Cloruro de Magnesio (Sigma)	1.5 mM
Mezcla de dNTP's (Sigma)	0.2 mM c/u
Mezcla de iniciadores (Sigma)	0.5 μ M
Taq-polimerasa	2.5 unidades
Muestra de ADN	1 μ L

Tabla 2.- Mezcla de reacción para genotipificar *vacA* por PCR.

La reacción se realizó en un termociclador (Gene Amp, PCR System 9700) bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 95°C por 1.5 min, amplificación en 35 ciclos de 3 pasos: desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento a 56 °C por 1 min y extensión a 72°C por 1.5 min, siguiendo una extensión final de 5 min a 72°C. El genotipo se determinó por electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa al 2%.

5.8.3. IDENTIFICACION DE LOS PRODUCTOS DE PCR POR ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA AL 2%

Se preparó agarosa al 2% en solución amortiguadora TAE concentración 1X. Se llenó la cámara electroforética con la solución amortiguadora TAE IX. Se mezcló perfectamente 5 μ L de producto de la reacción de PCR con 1 μ L de buffer 6x de carga concentrado y se adicionaron en los pocitos para someterlos a electroforesis aplicando una diferencia de potencial de 50 v. Se tiñió el gel con Bromuro de Etidio al 0.06% durante 10 min y se enjuagó muy bien con agua corriente. Se analizaron y observaron en el transluminador UV empleando el programa syngene, las bandas de *vacA* de 259 y 286 pb correspondientes a la secuencia señal s1 y s2, así como las bandas de 570 y 645 pb correspondientes a la región media m1 y m2 respectivamente.

5.9. TIPIFICACION DE VacA POR SEROLOGIA

5.9.1. DETECCION DE ANTICUERPOS IgG ANTI-VacA POR PRUEBA DE ELISA

A partir de la toxina recombinante VacA tipo m1 y m2, se prepararon soluciones de ambos antígenos a una concentración de 5 y 2.5 µg/mL respectivamente en amortiguador de carbonatos 0.1 M a pH 9.6 y se homogenizaron perfectamente. Se adicionaron 50 µL en cada pozo de la placa de ELISA y se incubó durante toda la noche a 4°C. Se retiró la solución, se adicionaron 200 µL de Albúmina al 0.25% en PBS-Tween 20 al 0.05% y se incubó a temperatura ambiente por 1 hr. Se enjuagó 3 veces con la solución amortiguadora de lavado y se eliminó la solución. Se adicionaron por triplicado 50 µL de los sueros problema a una dilución final de (1:100) en buffer diluyente y se incubó nuevamente la placa a 37°C por 1 hr. Se enjuagó 4 veces con buffer de lavado. Se agregaron 50 µL del anticuerpo secundario anti-IgG acoplada a peroxidasa a una dilución final (1:10,000) en buffer diluyente y se volvió a incubar a 37°C por 1 hr. Se enjuagó 4 veces más con solución amortiguadora de lavado. Se adicionaron 200 µL del sustrato peróxido más el cromógeno dihidroclorhidro o-fenilendiamina (OPD) en solución amortiguadora diluyente y se incubó a temperatura ambiente por 30 min en la oscuridad. Se realizó la lectura de absorbancias a 450 y 620 nm en el lector de ELISA.

5.10. DETECCIÓN DE VacA POR WESTERN BLOT

5.10.1. OBTENCION DE EXTRACTO ACUOSO DE LA TOXINA VacA

Se eligieron al azar algunas cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes que presentaron respuesta de anticuerpos negativa contra VacA. Las cepas se descongelaron, se sembraron por duplicado en placas de Gelosa Sangre utilizando una asa estéril y se incubaron a 37°C durante 48 horas. A partir de las 2 placas de cultivo se realizó una suspensión de cada cepa en 1 mL de agua destilada, se homogenizó con el vórtex por 30 seg, se dejó reposar por 30 min, se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min, se decantó y se obtuvo el sobrenadante. Se concentró la muestra a 100 µL para realizar la detección de la toxina por Inmnoelectrotransferencia.

5.10.2 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS-PAGE)

Se preparó el gel separador mezclando 4.5 mL de Acrilamida al 30% (p/v), 4.5 mL de TRIS 3M pH 8.8, 8.35 mL de agua destilada, 150 µL de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 10% (p/v), 133 µL de Persulfato de amonio (APS) al 10% (p/v) y 13 µL de N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED). Se sirvió la mezcla anterior dentro de la cámara electroforética, se cubrió con una solución saturada de butanol-agua y se dejó polimerizar la mezcla por 30 min aproximadamente. Una vez formado el gel, se drenó el butanol, se lavó con agua destilada y se secó con papel filtro. Posteriormente, se preparó el gel concentrador mezclando 1244 µL de Acrilamida al 30% (p/v), 1250 µL de TRIS 1 M pH 6.8, 6.72 mL de agua destilada, 100 µL de Dodecil Sulfato de Sodio al 10% (p/v), 100 µL de Persulfato de Amonio al 10% (p/v) y 10 µL de N, N, N', N'- Tetrametiletilendiamina. Se sirvió encima del gel separador.

Se mezclaron las muestras de los extractos acuosos de la toxina VacA llevándose a una concentración final de 1x en solución amortiguadora de carga SDS-PAGE 4x y se colocaron en baño María durante 5 min. Se llenó la cámara electroforética con solución amortiguadora de corrimiento SDS-PAGE 1x. Se colocaron 10 µL de cada muestra dentro de los pozos correspondientes. Se separaron las proteínas aplicando una corriente de 20 mA por 2 hr aproximadamente. Se tiñieron con Azul de Coomassie durante 15 min. y se desteñieron con la solución decolorante durante 10 min. Se compararon las bandas con un marcador de peso molecular para proteínas de 250 kDa y se usó un control positivo empleando la cepa de *Helicobacter pylori* 60190 que produce la toxina.

5.10.3. WESTERN BLOT

Se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa las proteínas separadas por electroforesis. Se preparó el sandwich para la inmunoelectrotransferencia usando una esponja, papel filtro y una membrana de nitrocelulosa sobre el lado del ánodo del gel. Se realizó la transferencia de las bandas a la membrana de nitrocelulosa usando la solución amortiguadora de transferencia aplicando una diferencia de potencial de 80 v durante 2 hr. Al finalizar este proceso, se bloqueó la membrana con albúmina al 1% en PBS por 30 min. Posteriormente se lavó con PBS-Tween 20 al 0.1 % (v/v) por 5 min. Se realizó la detección de las proteínas usando los sueros policlonales hiperinmunes anti-VacA a una dilución 1:10,000 en PBS y se incubó durante toda la noche a 4°C. Se lavó la membrana 10 veces con PBS-Tween 20 0.1% (v/v), se adicionó el anticuerpo secundario anti-IgG acoplada a peroxidasa a una dilución 1:10,000 en PBS y se incubó durante 2 hr a temperatura ambiente. Se lavó 10 veces la membrana con PBS- Tween 20 al 0.1 % (v/v). Se añadió el sustrato peróxido y se dejó reposar 1 min. Posteriormente, en un cuarto oscuro, se expuso en una película por 10 min. Se colocó la película a la solución reveladora, se agitó gentilmente hasta la aparición de las bandas y se enjuagó con agua. Se sumergió la película en solución fijadora, se agitó gentilmente por 1 min, se lavó y se secó al aire.

6. RESULTADOS

6.1 Aislamiento e identificación de *H. pylori*.

En el estudio se procesaron 199 biopsias gástricas de antro del mismo número de pacientes infectados las cuales, fueron positivas por cultivo. Se tomó un barrido de colonias por biopsia para la extracción de DNA y genotipificación de *vacA* por PCR. El cuadro clínico fue determinado durante la endoscopia y por diagnóstico histológico en cortes de cada biopsia. En el grupo de lesiones precancerosas se incluyeron los casos con metaplasia y displasia intestinal. (Ver Tabla 3)

Enfermedad gastroduodenal	No. de pacientes	(%)
Gastritis superficial	118	60
Úlcera duodenal	25	13
Lesiones precancerosas	40	20
Cáncer gástrico	16	8
TOTAL DE PACIENTES	199	100

Tabla 3. Resultados de la frecuencia y porcentaje de enfermedades gastroduodenales en los pacientes infectados con *H. pylori*.

6.2. Genotipificación de *vacA* por PCR

Para cada cepa aislada, se determinó el genotipo para la secuencia señal y región media de *vacA* (Ver Tabla 4). En el grupo con gastritis superficial, se obtuvieron para la región media 67% de cepas con el alelo m1, 30% con el alelo m2 y 3% con ambos alelos. Para el grupo de pacientes con úlcera duodenal se presentaron 84% de cepas con el alelo m1, 16% con el alelo m2 y ningún aislado presentó ambos genotipos. En el caso de los pacientes con lesiones precancerosas, 87% de las cepas presentaron el alelo m1, 12% el alelo m2 y ningún aislado presentó mezcla de ambos.

Finalmente en el grupo de pacientes con cáncer gástrico, 94% de los aislados presentaron el alelo m1, 6% el alelo m2 y ninguno presentó la mezcla de ambos. En el estudio se encontró que la variante alélica s1 se presentó con mayor frecuencia con respecto a la variante s2 en un porcentaje total de 84 y 16% respectivamente. De igual forma, el alelo m1 se presentó en mayor porcentaje con 75% con respecto al alelo m2 que mostró un porcentaje de 23%.

Alelos de <i>vacA</i> (s/m)	Gastritis superficial		Úlcera doudenal		Lesiones precancerosas		Cáncer gástrico		TOTAL	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
s1	93	(79)	23	(92)	36	(90)	15	(94)	167	(84)
s2	25	(21)	2	(8)	4	(10)	1	(6)	32	(16)
m1	79	(67)	21	(84)	35	(87)	15	(94)	150	(75)
m2	35	(30)	4	(16)	5	(12)	1	(6)	45	(23)
m1 y m2 (mixto)	4	(3)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	4	(2)
TOTAL DE PACIENTES	118		25		40		16		199	

Tabla 4. Resultados de la frecuencia y porcentaje de los alelos s1/s2 y m1/m2 del gen *vacA* en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con diferentes enfermedades gastrodoudenales.

De manera general, el genotipo prevalente en la población mexicana es s1/m1 con un porcentaje de 75%, seguido del genotipo s2/m2 y s1/m2 con un porcentaje de 16% y 7% respectivamente. Mientras, el genotipo s2/m1 no se encontró en ningún paciente infectado. (Ver Tabla 5)

Genotipo de <i>vacA</i>	Gastritis superficial		Úlcera doudenal		Lesiones precancerosas		Cáncer gástrico		Totales	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
s1/m1	79	(66)	21	(84)	35	(87)	15	(94)	150	(75)
s1/m2	11	(9)	2	(8)	1	(2)	0	(0)	14	(7)
s2/m1	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
s2/m2	24	(20)	2	(8)	4	(10)	1	(6)	31	(16)
Mixta (s1/m1 y s1/m2)	4	(3)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	4	(2)
TOTAL DE PACIENTES	118		25		40		16		199	

Tabla 5. Resultados de la frecuencia y porcentaje de los genotipos (s1/m1, s1/m2, s2/m1 y s2/m2) del gen *vacA* en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con diferentes enfermedades gastrodoudenales.

Mediante la identificación por electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa al 2% se determinó el genotipo de la secuencia señal y región media de *vacA* empleando un marcador molecular de 1 Kb y dos controles positivos de ambos alelos (Ver Fig. 12).

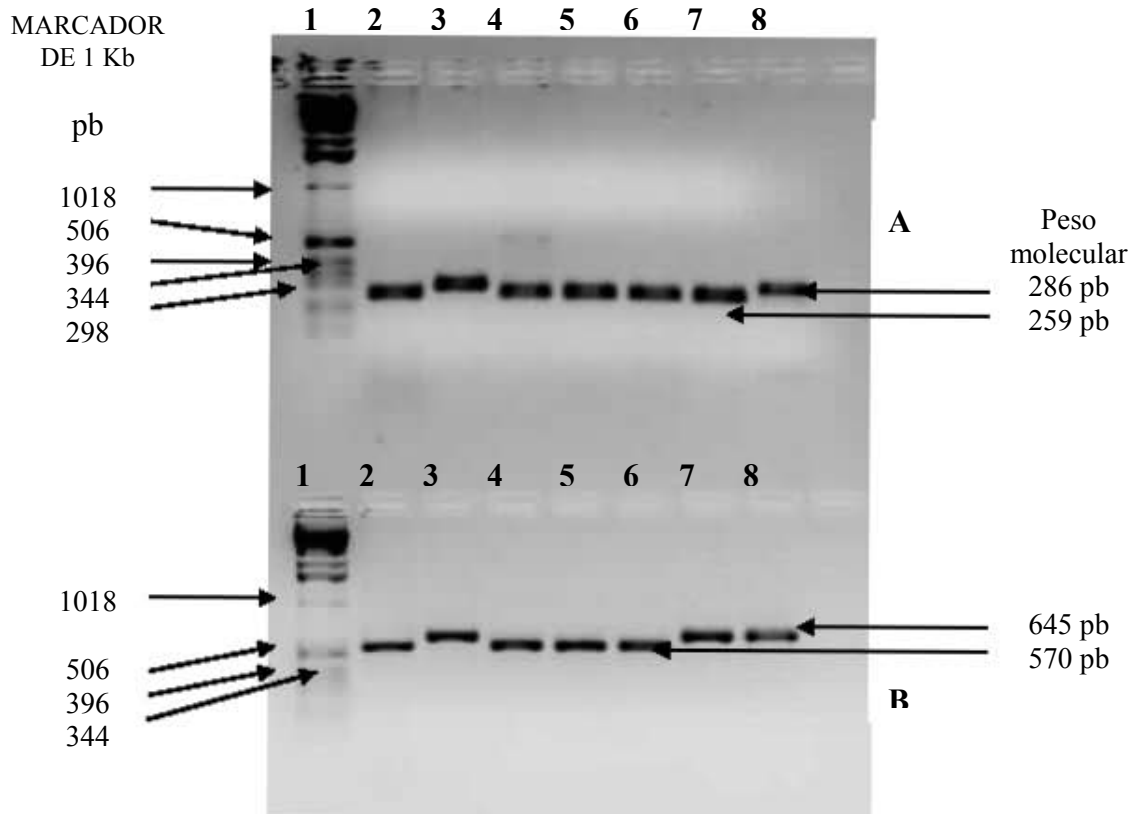


Fig. 12. Identificación de los productos de PCR en geles de agarosa al 2% del alelo “s” (11 A) y del alelo “m” (11 B) teñidos con Bromuro de Etidio donde se observan bandas de las muestras con un peso molecular de 259 y 286 pb para los alelos s1 y s2; y bandas de 570 y 645 pb para los alelos m1 y m2 respectivamente.

Columna 1 (marcador de peso molecular para DNA de 1 Kb), columna 2 (control positivo para los alelo s1 y m1, cepa 60190), columna 3 (control positivo para los alelos s2 y m2, cepa 8822), columna 4 (cepa 201-348, positivo para los alelos s1 y m1), columna 5 (cepa 201-349, positivo para los alelos s1 y m1), columna 6 (cepa 201-359, positivo para los alelos s1 y m1), columna 7 (cepa 201-353, positiva para los alelos s1 y m2), columna 8 (cepa 201-350, positiva para los alelos s2 y m2).

6.3. ELISA para VacA

6.3.1. Controles negativos.

Para la determinación de anticuerpos IgG contra VacA se emplearon como grupo control 27 muestras de sueros obtenidas de pacientes negativos a la infección, los cuales fueron examinados por histología, cultivo y prueba serológica para extracto total de *H. pylori* y CagA. A estos sueros control se les realizó la prueba de ELISA contra la toxina y en base a las absorbancias obtenidas contra m1 y m2 de VacA (ver tabla 6), se obtuvieron los valores de corte para considerar una respuesta de anticuerpos positiva o negativa contra VacA en las 199 muestras de sueros de los pacientes positivos a *H. pylori* confirmados por cultivo.

SUERO	ELISA VacA (p58)	
	Abs. (m1)	Abs. (m2)
1	0.125	0.164
2	0.132	0.159
3	0.118	0.147
4	0.124	0.146
5	0.127	0.156
6	0.102	0.116
7	0.121	0.139
8	0.172	0.165
9	0.156	0.168
10	0.143	0.170
11	0.138	0.157
12	0.150	0.164
13	0.127	0.162
14	0.120	0.131
15	0.155	0.176
16	0.114	0.132
17	0.113	0.112
18	0.110	0.128
19	0.100	0.099
20	0.114	0.132
21	0.109	0.117
22	0.101	0.107
23	0.101	0.109
24	0.104	0.090

25	0.12	0.111
26	0.098	0.094
27	0.096	0.107
Promedio	0.122	0.135
Desv. Std	0.020	0.026

Tabla 6. Resultados de absorbancia* en prueba de ELISA usando como antígenos los tipos m1 y m2 de VacA con sueros de individuos no infectados.

*La absorbancia obtenida para cada suero se calculó a partir de la diferencia de las absorbancias leídas a dos longitudes de onda (450 y 620 nm). El valor de la absorbancia promedio para el tipo m1 y m2 en los 27 individuos corresponde a 0.122 y 0.135 respectivamente.

Para considerar un valor de corte que indica respuesta positiva contra el fragmento p58 de VacA, se sumaron 2 desviaciones estándar a la absorbancia promedio de ambos tipos (m1 y m2) obteniendo valores de 0.162 y 0.187 respectivamente, por lo tanto, para medir la respuesta de anticuerpos séricos contra VacA, cualquier valor superior obtenido de la absorbancia de los sueros problema se considera una respuesta de anticuerpos positiva y viceversa.

La relación entre 0.162/0.187 es de 0.867, por lo tanto, para la tipificación de VacA por serología, cualquier valor superior obtenido de la relación de absorbancias entre m1/m2 indica predominio de anticuerpos contra el antígeno m1 con respecto a m2.

6.3.2. Pacientes con gastritis crónica

En la evaluación de anticuerpos contra el fragmento p58 de VacA se presentaron 37/118 pacientes con una respuesta de anticuerpos positiva al tipo m1, 3/118 con una respuesta positiva al tipo m2, 24/118 presentaron anticuerpos que reconocen a ambos tipos (m1 y m2). Mientras que 54/118 de los pacientes presentaron una respuesta de anticuerpos negativa. (Ver Tabla 7). El promedio de la absorbancia para el antígeno m1 fue de 0.200+0.112 y para el antígeno m2 fue de 0.161+0.109.

Los valores de absorbancias marcadas en color rojo indican una respuesta negativa contra el tipo m1 ó m2 de VacA y los cuadrantes marcados con verde indican la determinación del mismo genotipo de *vacA* por PCR y serología.

Biopsia	Genotipificación de <i>vacA</i> por PCR		ELISA Respuesta de anticuerpos contra p58 de VacA		Tipificación de VacA (p58) por serología	
	Secuencia Señal	Región Media	Abs. (m1)	Abs. (m2)	Abs. (m1/m2)	Genotipo
2	s1	m1m2	0.325	0.384	0.846	m2
5	s1	m1	0.215	0.264	0.814	m2
6	s2	m2	0.395	0.467	0.846	m2
9	s1	m1	0.308	0.341	0.903	m1
10	s1	m1	0.142	0.160	0.888	
11	s1	m1	0.192	0.228	0.842	m2
12	s1	m1	0.325	0.415	0.783	m2
13	s1	m1	0.578	0.452	1.279	m1
14	s1	m2	0.315	0.382	0.825	m2
15	s1	m1	0.139	0.110	1.259	
22	s2	m2	0.112	0.088	1.273	
23	s1	m1	0.390	0.076	5.105	m1
31	s1	m1	0.214	0.176	1.216	m1
32	s1	m1	0.454	0.215	2.112	m1
33	s1	m1	0.149	0.149	1.000	
36	s1	m1	0.124	0.181	0.685	
37	s1	m2	0.110	0.065	1.703	
44	s1	m1	0.204	0.270	0.756	m2
68	s1	m1	0.214	0.239	0.895	m1
69	s1	m1	0.167	0.198	0.843	m2
75	s2	m2	0.133	0.150	0.887	

76	s1	m1	0.238	0.165	1.442	m1
78	s1	m1	0.168	0.182	0.923	m1
79	s1	m1	0.296	0.126	2.349	m1
82	s1	m1	0.155	0.217	0.714	m2
85	s1	m1	0.415	0.231	1.797	m1
87	s1	m1	0.145	0.129	1.124	
100	s2	m2	0.141	0.211	0.668	m2
102	s1	m1	0.154	0.144	1.069	
103	s1	m1	0.219	0.184	1.190	m1
107	s1	m1	0.124	0.125	0.995	
117	s1	m2	0.173	0.266	0.650	m2
135	s2	m2	0.168	0.299	0.562	m2
136	s2	m2	0.125	0.122	1.025	
141	s2	m2	0.176	0.470	0.374	m2
146	s2	m2	0.165	0.112	1.470	m1
147	s2	m2	0.214	0.198	1.081	m1
156	s1	m1	0.292	0.098	2.966	m1
160	s2	m2	0.209	0.144	1.451	m1
167	s1	m1	0.345	0.213	1.621	m1
170	s1	m1	0.189	0.183	1.033	m1
171	s1	m1	0.245	0.154	1.591	m1
176	s1	m1	0.230	0.117	1.963	m1
179	s1	m1	0.193	0.141	1.369	m1
180	s2	m2	0.136	0.118	1.153	
187	s1	m1	0.120	0.137	0.876	
190	s1	m1	0.165	0.135	1.222	m1
203	s1	m1	0.208	0.114	1.827	m1
209	s1	m2	0.098	0.066	1.485	
213	s2	m2	0.122	0.084	1.448	
215	s1	m1	0.161	0.131	1.231	
217	s1	m1	0.249	0.144	1.729	m1
218	s1	m1	0.173	0.143	1.207	m1
221	s2	m2	0.140	0.147	0.952	
222	s1	m1	0.136	0.116	1.172	
224	s1	m1	0.128	0.125	1.024	
226	s1	m1	0.113	0.125	0.902	
231	s1	m1	0.502	0.439	1.144	m1
253	s1	m2	0.109	0.111	0.980	
255	s1	m1	0.149	0.148	1.003	
268	s1	m1	0.381	0.172	2.213	m1
274	s1	m1	0.124	0.111	1.125	
275	s1	m1	0.369	0.242	1.522	m1
276	s1	m1	0.117	0.089	1.317	
277	s2	m2	0.138	0.102	1.349	
279	s1	m1	0.121	0.052	2.304	

282	s1	m1	0.106	0.103	1.023	
287	s1	m1	0.219	0.092	2.385	m1
288	s1	m1	0.101	0.091	1.118	
289	s1	m2	0.111	0.115	0.962	
291	s1	m1	0.144	0.129	1.114	
293	s1	m1	0.100	0.094	1.059	
304	s1	m1	0.286	0.091	3.147	m1
311	s1	m1	0.125	0.097	1.291	
317	s1	m1	0.123	0.105	1.168	
345	s1	m2	0.169	0.607	0.278	m2
348	s1	m1	0.303	0.204	1.488	m1
349	s1	m1	0.407	0.139	2.936	m1
350	s2	m2	0.580	0.104	5.572	m1
360	s1	m2	0.464	0.163	2.851	m1
361	s2	m2	0.310	0.274	1.134	m1
364	s1	m1	0.090	0.117	0.773	
366	s1	m1	0.094	0.087	1.081	
367	s2	m2	0.100	0.102	0.982	
374	s1	m1m2	0.135	0.617	0.219	m2
375	s2	m2	0.083	0.103	0.809	
376	s2	m2	0.103	0.099	1.037	
378	s1	m1	0.170	0.084	2.038	m1
381	s1	m1	0.458	0.322	1.422	m1
384	s1	m1	0.090	0.073	1.243	
392	s2	m2	0.092	0.099	0.924	
430	s1	m1	0.212	0.133	1.588	m1
432	s1	m1	0.097	0.057	1.696	
441	s1	m1	0.030	0.118	0.256	
461	s1	m1	0.274	0.142	1.925	m1
474	s1	m1	0.195	0.071	2.755	m1
480	s1	m1	0.182	0.126	1.443	m1
504	s1	m1	0.185	0.086	2.160	m1
505	s2	m2	0.106	0.078	1.353	
506	s1	m2	0.214	0.140	1.526	m1
511	s2	m2	0.134	0.081	1.650	
512	s1	m1	0.181	0.110	1.642	m1
513	s1	m1	0.367	0.105	3.484	m1
514	s1	m2	0.078	0.017	4.500	
515	s2	m2	0.230	0.114	2.018	m1
516	s1	m1	0.221	0.099	2.235	m1
519	s1	m1/m2	0.240	0.113	2.130	m1
524	s1	m1	0.487	0.184	2.647	m1
526	s1	m1	0.207	0.094	2.199	m1
527	s1	m1	0.141	0.072	1.949	
533	s2	m2	0.094	0.119	0.792	

555	s1	m1	0.073	0.054	1.344	
566	s1	m1	0.110	0.101	1.092	
568	s2	m1/m2	0.162	0.106	1.533	
584	s1	m2	0.122	0.067	1.807	
604	s1	m1	0.124	0.074	1.683	
623	s1	m1	0.136	0.099	1.372	
628	s1	m1	0.092	0.076	1.210	
Promedio			0.200	0.161		
Desv. Std.			0.112	0.109		

Tabla 7. Resultados de la genotipificación de *vacA* por PCR y la respuesta de anticuerpos séricos generada contra VacA en pacientes con gastritis superficial.

6.3.3. Pacientes con úlcera duodenal

En los casos con úlcera duodenal, se obtuvieron por ELISA 11/25 pacientes que presentaron una respuesta de anticuerpos positiva al tipo m1, 1/25 con una respuesta positiva al tipo m2, 3/25 presentaron anticuerpos que reconocen a ambos tipos (m1 y m2). Mientras que 10/25 de los pacientes presentaron una respuesta de anticuerpos negativa. (Ver tabla 8). El promedio de la absorbancia para el antígeno m1 fue de 0.201 ± 0.118 y para el antígeno m2 fue de 0.135 ± 0.063 .

Biopsia	Genotipificación de <i>vacA</i> por PCR		ELISA Respuesta de anticuerpos contra p58 de VacA		Tipificación de VacA (p58) por serología	
	Secuencia Señal	Región Media	Abs. (m1)	Abs. (m2)	Abs. (m1/m2)	Genotipo
70	s2	m2	0.151	0.144	1.049	
204	s1	m1	0.246	0.123	1.996	m1
353	s1	m2	0.106	0.212	0.500	m2
380	s1	m1	0.334	0.277	1.205	m1
393	s2	m2	0.090	0.084	1.067	
395	s1	m1	0.267	0.136	1.956	m1
397	s1	m1	0.192	0.135	1.420	m1
404	s1	m1	0.179	0.150	1.193	m1
415	s1	m1	0.207	0.099	2.084	m1
419	s1	m1	0.086	0.081	1.064	
431	s1	m1	0.291	0.104	2.786	m1
434	s1	m1	0.211	0.152	1.387	m1
439	s1	m1	0.143	0.102	1.405	
444	s1	m1	0.198	0.141	1.405	m1
452	s1	m1	0.168	0.191	0.880	m1
465	s1	m1	0.561	0.113	4.953	m1
468	s1	m1	0.189	0.152	1.248	m1
469	s1	m1	0.410	0.112	3.677	m1
472	s1	m1	0.134	0.099	1.346	
558	s1	m1	0.105	0.109	0.966	
576	s1	m1	0.101	0.124	0.814	
496	s1	m1	0.373	0.331	1.126	m1
522	s1	m2	0.095	0.073	1.300	

576	s1	m1	0.086	0.063	1.365	
634	s1	m1	0.099	0.072	1.370	
		Promedio	0.201	0.135		
		Desv. Std.	0.118	0.063		

Tabla 8. Resultados de la genotipificación de *vacA* por PCR y la respuesta de anticuerpos séricos generada contra VacA en pacientes con úlcera duodenal.

6.3.4. Pacientes con lesiones pre-cancerosas

En el grupo de pacientes con lesiones precancerosas, 13/40 presentaron una respuesta de anticuerpos positiva al tipo m1, sólo 1/40 presentó una respuesta positiva al tipo m2, 5/40 presentaron anticuerpos que reconocen a ambos tipos (m1 y m2). Mientras que 21/40 de los pacientes fueron negativos a ambos antígenos (Ver tabla 9). El promedio de la absorbancia para el antígeno m1 fue de 0.199±0.096 y para el antígeno m2 fue de 0.150±0.084.

Biopsia	Genotipificación de <i>vacA</i> por PCR		ELISA Respuesta de anticuerpos contra p58 de VacA		Tipificación de VacA (p58) por serología	
	Secuencia Señal	Región Media	Abs. (m1)	Abs. (m2)	Abs. (m1/m2)	Genotipo
16	s1	m1	0.112	0.097	1.158	
21	s1	m1	0.127	0.101	1.259	
29	s1	m1	0.330	0.087	3.787	m1
35	s1	m1	0.154	0.501	0.307	m2
60	s1	m1	0.334	0.196	1.704	m1
88	s1	m1	0.159	0.119	1.336	
90	s1	m1	0.119	0.116	1.029	
93	s2	m2	0.281	0.308	0.911	m1
96	s1	m1	0.153	0.156	0.981	
110	s1	m1	0.117	0.128	0.918	
125	s1	m1	0.151	0.134	1.127	
144	s1	m1	0.158	0.148	1.063	
177	s1	m1	0.178	0.156	1.141	m1

185	s1	m1	0.136	0.130	1.046	
194	s1	m1	0.132	0.136	0.971	
196	s1	m1	0.200	0.150	1.333	m1
201	s1	m1	0.183	0.162	1.130	m1
220	s1	m1	0.157	0.154	1.021	
228	s1	m1	0.132	0.113	1.171	
235	s1	m1	0.291	0.169	1.725	m1
250	s1	m1	0.122	0.080	1.521	
264	s1	m1	0.191	0.102	1.879	m1
295	s2	m2	0.124	0.110	1.129	
303	s1	m1	0.177	0.094	1.879	m1
307	s1	m2	0.117	0.107	1.094	
321	s2	m2	0.112	0.102	1.096	
329	s1	m1	0.508	0.308	1.653	m1
330	s2	m2	0.100	0.105	0.952	
351	s1	m1	0.085	0.117	0.726	
359	s1	m1	0.105	0.094	1.115	
383	s1	m1	0.370	0.349	1.059	m1
398	s1	m1	0.343	0.205	1.672	m1
438	s1	m1	0.283	0.143	1.986	m1
448	s1	m1	0.120	0.097	1.234	
458	s1	m1	0.308	0.099	3.120	m1
463	s1	m1	0.163	0.136	1.203	m1
470	s1	m1	0.344	0.131	2.622	m1
503	s1	m1	0.289	0.128	2.258	m1
577	s1	m1	0.247	0.102	2.417	m1
645	s1	m1	0.149	0.100	1.498	
		Promedio	0.199	0.150		
		Desv. Std	0.096	0.084		

Tabla 9. Resultados de la genotipificación de *vacA* por PCR y la respuesta de anticuerpos séricos generada contra VacA en pacientes con lesiones precancerosas.

6.3.5. Pacientes con cáncer gástrico

En el grupo de pacientes con cáncer gástrico, 5/16 presentaron una respuesta de anticuerpos positiva al tipo m1, ningún paciente presentó respuesta positiva contra el tipo m2, 2/16 presentaron anticuerpos que reconocen a ambos tipos (m1 y m2). Mientras que 9/16 de los pacientes presentaron una respuesta de anticuerpos negativa para ambos antígenos. (Ver tabla 10). El promedio de la absorbancia para el antígeno m1 fue de 0.198+/-0.112 y para el antígeno m2 fue de 0.120+/-0.069.

Biopsia	Genotipificación de <i>vacA</i> por PCR		ELISA Respuesta de anticuerpos contra p58 de VacA		Tipificación de VacA (p58) por serología	
	Secuencia Señal	Región Media	Abs. (m1)	Abs. (m2)	Abs. (m1/m2)	Genotipo
188	s1	m1	0.388	0.148	2.630	m1
206	s1	m1	0.130	0.089	1.459	
331	s1	m1	0.117	0.084	1.394	
377	s1	m1	0.225	0.165	1.364	m1
401	s1	m1	0.330	0.074	4.439	m1
426	s1	m1	0.207	0.197	1.052	m1
535	s1	m1	0.391	0.110	3.552	m1
443	s1	m1	0.089	0.077	1.161	
456	s1	m1	0.368	0.340	1.080	m1
510	s1	m1	0.118	0.089	1.331	
521	s1	m1	0.130	0.090	1.450	
530	s1	m1	0.236	0.132	1.785	m1
542	s1	m1	0.141	0.081	1.744	
554	s2	m2	0.096	0.079	1.219	
636	s1	m1	0.106	0.081	1.318	
639	s1	m1	0.095	0.084	1.133	
Promedio			0.198	0.120		
Des. Std.			0.112	0.069		

Tabla 10. Resultados de la genotipificación de *vacA* por PCR y la respuesta de anticuerpos séricos generada contra VacA en pacientes cáncer gástrico.

6.3.6. Respuesta de anticuerpos séricos contra VacA

Se determinó la respuesta de anticuerpos séricos contra VacA (Ver tabla 11). En total, 53% de todos los pacientes presentaron respuesta de anticuerpos positiva contra VacA. Mientras, 47% presentaron una respuesta de anticuerpos negativa contra la toxina. Se obtuvo un mayor porcentaje en los pacientes que presentaron una respuesta de anticuerpos positiva contra un solo tipo de VacA (m1 ó m2) en 35% en comparación con el grupo que presentó respuesta positiva contra ambos antígenos 17%.

Respuesta Seropositiva			Respuesta seronegativa	Totales
Respuesta positiva al tipo m1	Respuesta positiva al tipo m2	Respuesta positiva a ambos tipos (m1 y m2)		
No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)	
66 (33)	5 (2)	34 (17)	94 (47)	199
105 (53)				

Tabla 11. Resultados de la respuesta de anticuerpos séricos contra VacA en todos los pacientes infectados por *H. pylori*.

6.3.7. Detección de la banda de VacA por Western Blot

Se investigó si la respuesta de anticuerpos seronegativa contra VacA presente en el 47% de todos los pacientes infectados puede deberse a la no expresión de la toxina. En este caso, se tomaron al azar 13 cepas aisladas de estos pacientes y se realizó el Western Blot para detectar a la banda de VacA en extractos acuosos de la bacteria (Ver tabla 12). De las 13 cepas analizadas, en 2 no se observó la presencia de la toxina.

Cepa	Respuesta de anticuerpos contra VacA (m1)	Respuesta de anticuerpos contra VacA (m2)	Detección de la banda de VacA
Control 60190	+	+	+
201-217	+	-	+
201-359	-	-	-
201-279	-	-	+
201-360	+	-	+
201-514	-	-	+
201-522	-	-	+
201-167	+	+	+
201-209	-	-	+
201-250	-	-	+
201-107	-	-	+
201-393	-	-	+
201-554	-	-	-
201-093	+	+	+

Tabla 12. Respuesta de anticuerpos contra VacA y detección de la banda de VacA por Western Blot.

Mediante la detección de la banda de VacA por Western Blot se determinó si algunas cepas de *H. pylori* producen y expresan a la toxina. Se utilizó un marcador molecular para proteínas de 250 kDa y el extracto acuoso de VacA de la cepa 60190 usado como control positivo de la banda (Ver Fig. 13)

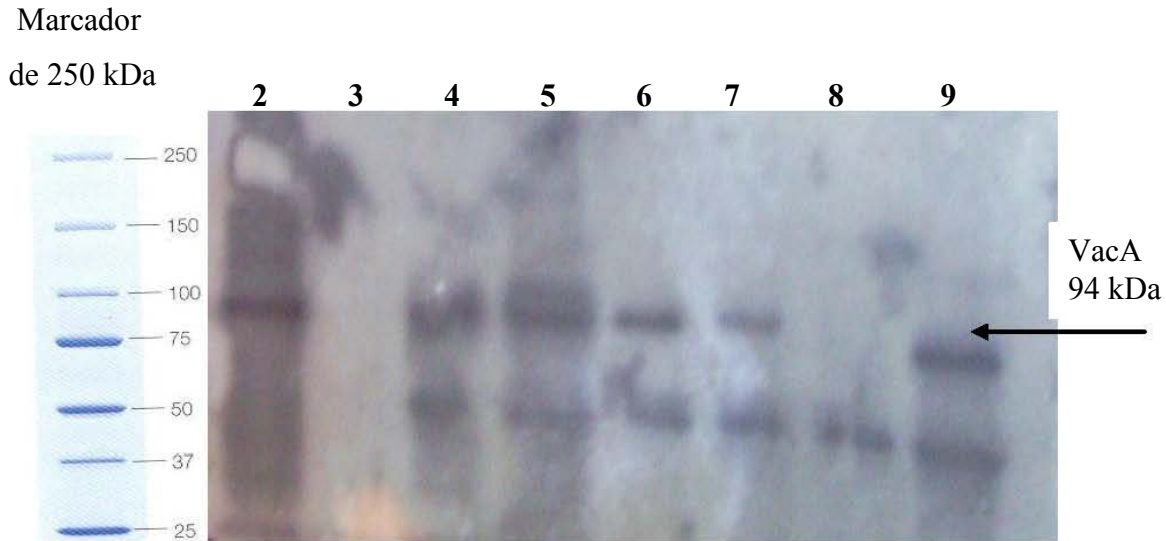


Fig. 13.- Detección de la banda de VacA por Western Blot donde se observan las bandas de las muestras con un peso molecular de aproximadamente 94 kDa. Columna 1 (marcador de peso molecular para proteínas de 250 kDa teñido con azul de Coomasie en geles de poliacrilamida), columna 2 (extracto acuoso de VacA de la cepa 60190, control positivo), columna 3 (extracto acuoso de VacA de la cepa 201-554, negativo para la toxina), columna 4 (extracto acuoso de VacA de la cepa 201-217, positivo para la toxina), columna 5 (extracto acuoso de VacA de la cepa 201-279, positivo para la toxina), columna 6 (extracto acuoso de VacA de la cepa 201-360, positivo para la toxina), columna 7 (extracto acuoso de VacA de la cepa 201-514, positivo para la toxina), columna 8 (extracto acuoso de VacA de la cepa 201-359, negativo para la toxina), columna 9 (extracto acuoso de VacA de la cepa 201-167, positivo para la toxina).

6.3.8. Comparación de medias de absorbancias entre m1 y m2 de VacA por grupo de enfermedad gastroduodenal.

Se investigó cómo es la respuesta de anticuerpos contra m1 y m2 en todos los pacientes infectados con *H. pylori*, el análisis se efectuó utilizando la prueba τ de student. La comparación de las medias de absorbancia entre m1 y m2 obtenidas de los 118 sueros de pacientes con diagnóstico clínico de gastritis superficial presentaron una diferencia significativa ($P < 0.01$) donde, la respuesta de anticuerpos contra m1 fue mayor con respecto a m2 en este grupo de pacientes. (Fig. 14).

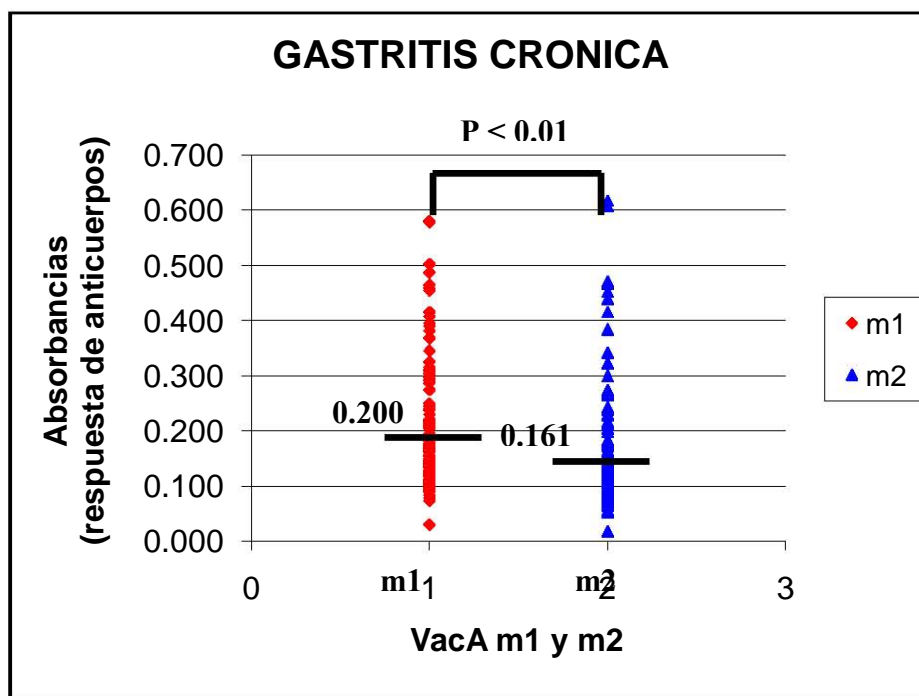


Fig. 14.- Comparación de la respuesta de anticuerpos promedio entre m1 y m2 en sueros de pacientes con gastritis superficial crónica.

La comparación de las medias de absorbancia entre m1 y m2 obtenidas de los 25 sueros de pacientes con diagnóstico clínico de úlcera duodenal presentaron una diferencia significativa ($P < 0.02$) donde, la respuesta de anticuerpos contra m1 fue mayor con respecto a m2 en este grupo de pacientes. (Fig. 15).

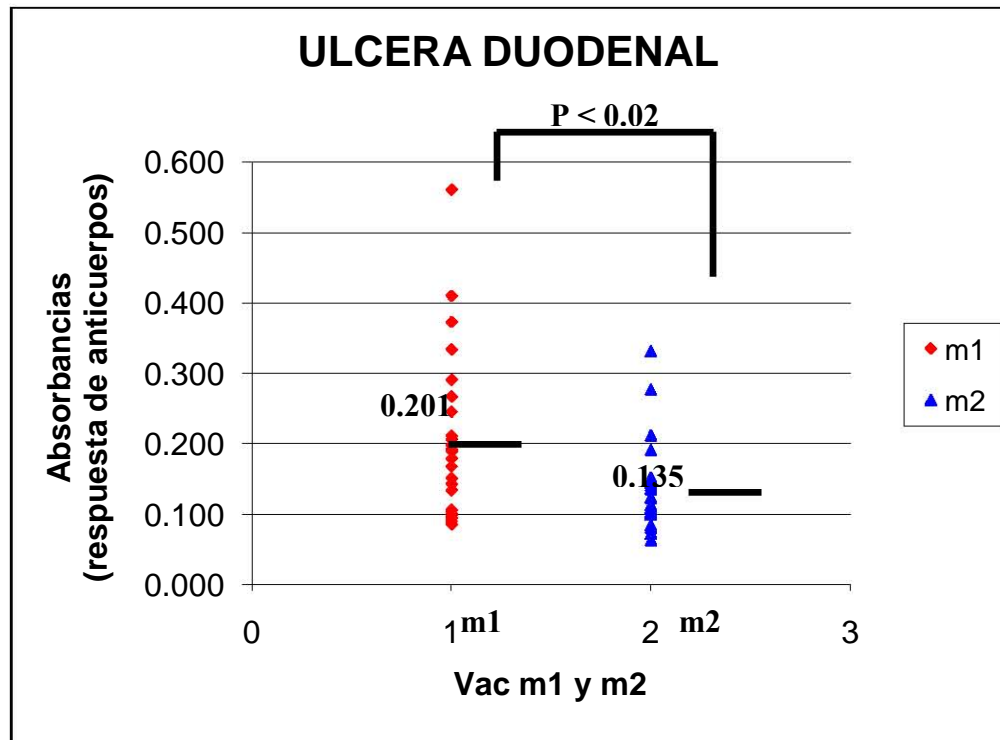


Fig. 15.- Comparación de la respuesta de anticuerpos promedio entre m1 y m2 en suero de pacientes con úlcera duodenal.

La comparación de las medias de absorbancia entre m1 y m2 obtenidas de los 40 sueros de pacientes con diagnóstico clínico de lesiones precancerosas presentaron una diferencia significativa ($P < 0.02$) donde, la respuesta de anticuerpos contra m1 fue mayor con respecto a m2 en este grupo de pacientes. (Fig. 16).

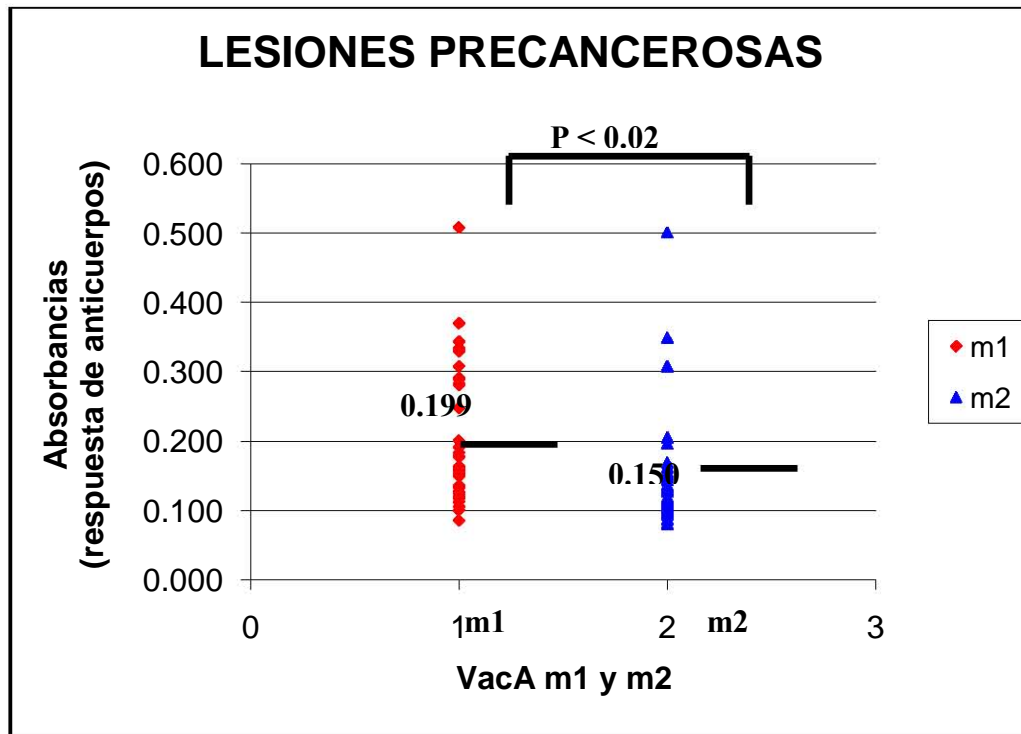


Fig. 16.- Comparación de la respuesta de anticuerpos promedio entre m1 y m2 en suero de pacientes con lesiones precancerosas.

La comparación de las medias de absorbancia entre m1 y m2 obtenidas de los 16 sueros de pacientes con diagnóstico clínico de cáncer gástrico presentaron una diferencia significativa ($P < 0.05$) donde, la respuesta de anticuerpos contra m1 fue mayor con respecto a m2 en este grupo de pacientes. (Fig. 17).

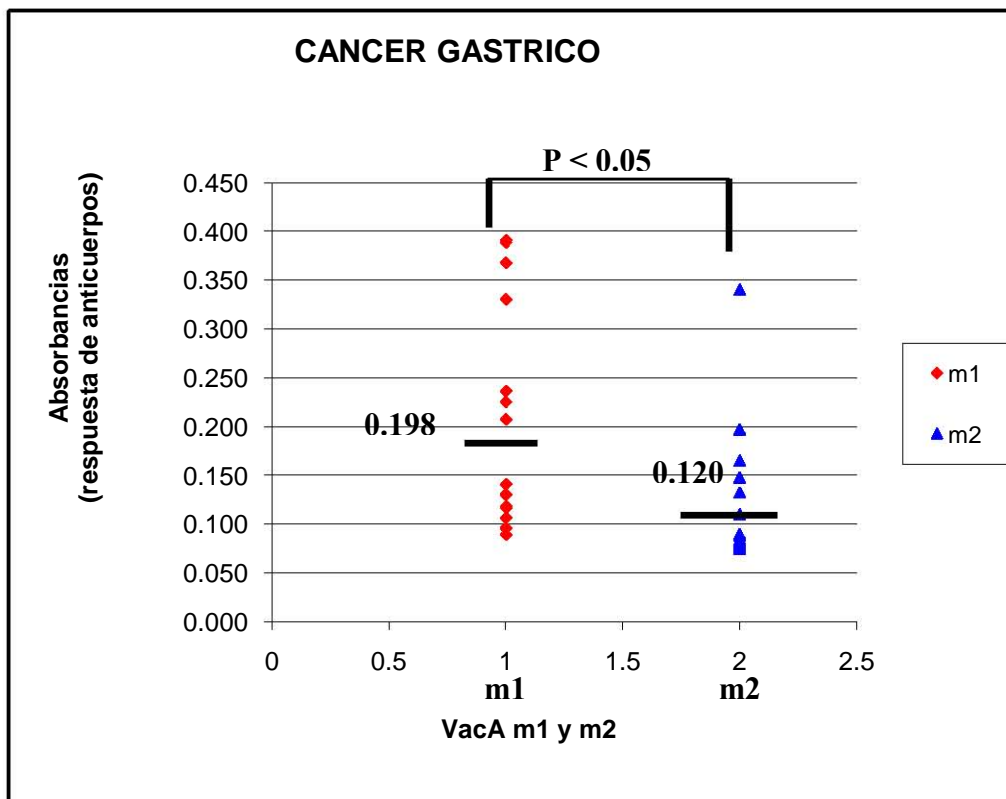


Fig. 17.- Comparación de la respuesta de anticuerpos promedio entre m1 y m2 en suero de pacientes con cáncer gástrico.

Analizando la respuesta de anticuerpos contra m1 y m2 en los 4 grupos de pacientes con diferentes enfermedades gastroduodenales, se presentó diferencia significativa. Por lo tanto, la toxina VacA tipo m1 fue más inmunogénica al presentar una mayor respuesta de anticuerpos con respecto al tipo m2 independientemente de la enfermedad y sí, hay respuesta positiva o negativa contra la toxina.

6.3.9. Comparación de medias de absorbancias para m1 de VacA entre grupos de enfermedad.

Se investigó si existe asociación entre la respuesta de anticuerpos contra m1 con el cuadro clínico. En este caso, la comparación de las medias de absorbancia para m1 obtenidos entre los 4 grupos de enfermedad no presentaron diferencia significativa. (Fig. 18)

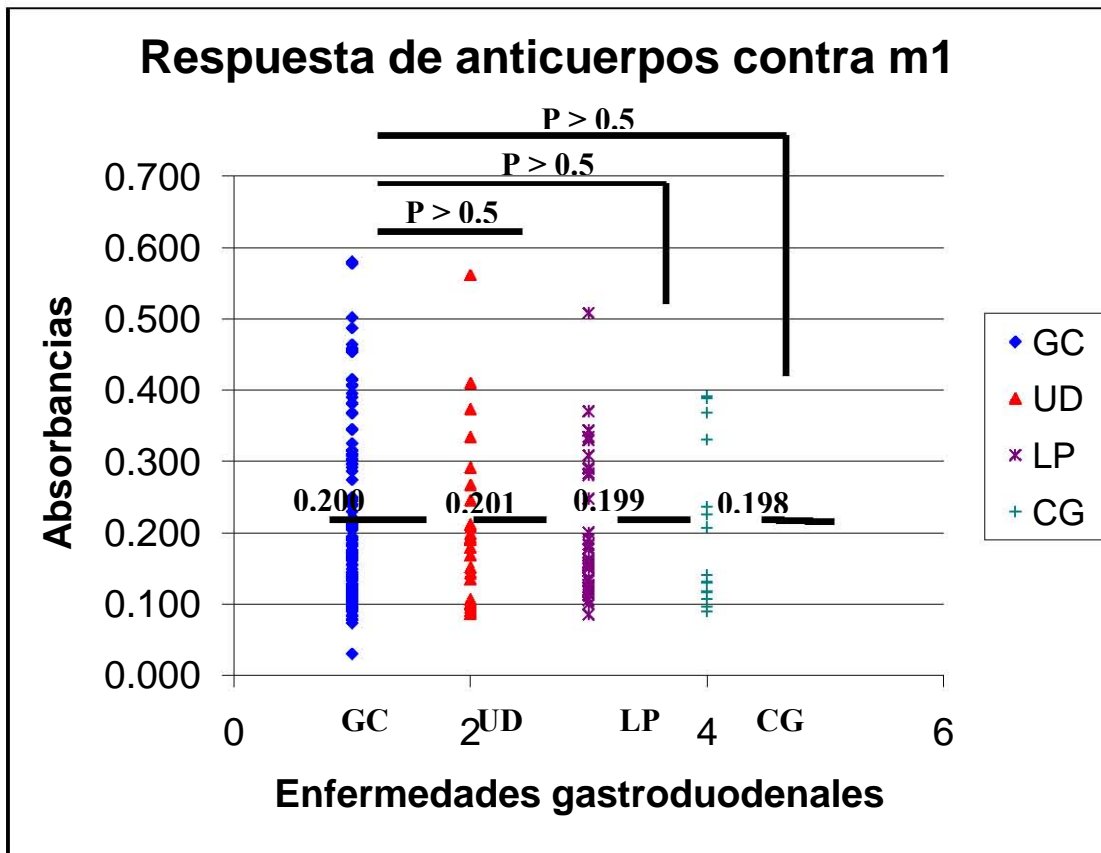


Fig. 18.- Comparación de la respuesta de anticuerpos sérica promedio para m1 entre los diferentes grupos de enfermedad gastroduodenal.

6.3.10. Comparación de medias de absorbancias para m2 de VacA entre grupos de enfermedad

Se investigó si existe asociación entre la respuesta de anticuerpos contra m2 con el tipo de enfermedad gastroduodenal. En este caso, la comparación de las medias de absorbancia para m2 obtenidos entre los 4 grupos de enfermedad no presentaron diferencia significativa. (Fig. 19)

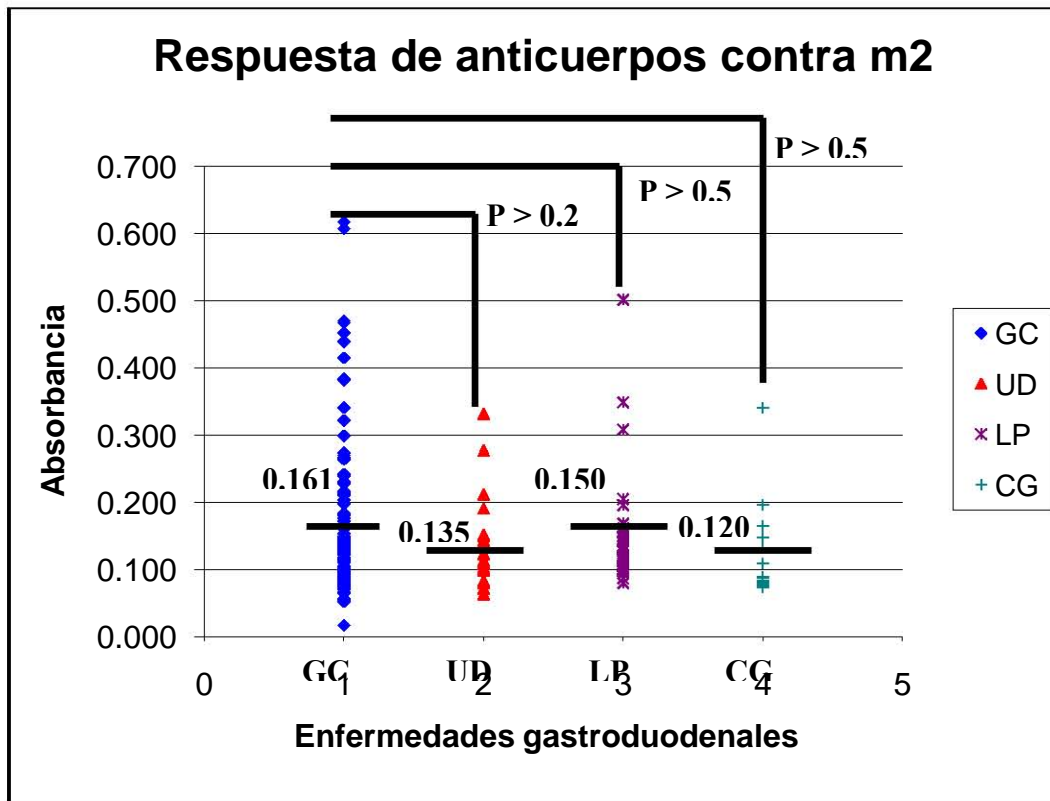


Fig. 19.- Comparación de la respuesta de anticuerpos sérica promedio para m2 entre los diferentes grupos de enfermedad gastroduodenal.

Analizando ambos casos, no hay asociación entre los niveles de anticuerpos contra m1 y m2 con el cuadro clínico pues, la respuesta de anticuerpos contra VacA en suero es igual en todos los pacientes.

6.4. Relación entre la tipificación sérica de VacA con el genotipo de *vacA* aislado

6.4.1. Relación entre la tipificación sérica de VacA con el genotipo aislado en pacientes seropositivos a un tipo de VacA

Se tipificó VacA por serología con base en la respuesta de anticuerpos generada contra la toxina de la cepa infectante y se comparó con el genotipo aislado de la región media de *vacA* obtenido por PCR. Los cuadrantes marcados en rojo indican el número de pacientes que presentaron el mismo genotipo de *vacA* tanto por PCR como por serología. (Ver tabla 13). En el estudio, la determinación correcta del genotipo de *vacA* en base a la relación obtenida entre la tipificación sérica de VacA y el genotipo aislado en pacientes seropositivos a un tipo de VacA fue de 63/71 ($P < 0.001$, prueba χ^2)

Pacientes seropositivos a un sólo tipo de VacA (p58)

(ELISA)

	m1	m2	TOTAL
Pacientes con los genotipos aislados de la región media de <i>vacA</i> (PCR)			
m1	60	2	62
m2	6	3	9
TOTAL	66	5	71

Tabla 13. Resultados de la relación entre la tipificación de VacA por serología con el genotipo aislado de *vacA* por PCR en pacientes seropositivos a un tipo de VacA.

6.4.2. Relación entre la tipificación sérica de VacA con el genotipo aislado en pacientes seropositivos a ambos tipos de VacA

La determinación correcta del genotipo de *vacA* en base a la relación obtenida entre la tipificación sérica de la toxina y el genotipo aislado en pacientes seropositivos a ambos tipos de VacA fue de 26/34 con diferencia significativa ($P < 0.01$, Prueba Exacta de Fisher) (Ver tabla 14). En este caso, aún cuando hay respuesta de anticuerpos positiva contra ambos antígenos de VacA, es posible determinar en la mayoría de los casos el genotipo de la cepa aislada a través de la serología.

Pacientes seropositivos a ambos tipos de VacA (p58)
(ELISA)

Pacientes con los genotipos aislados de la región media de *vacA* (PCR).

Genotipos	m1	m2	TOTAL
m1	19	5	24
m2	3	7	10
TOTAL	22	12	34

Tabla 14. Resultados de la relación entre la tipificación de VacA por serología con el genotipo aislado de *vacA* por PCR en pacientes seropositivos a ambos tipos de VacA.

6.5. ANALISIS ESTADISTICO

6.5.3. Prueba estadística por “ τ de Student” para la comparación de medias de absorbancias entre m1 y m2.

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de “ τ de Student” donde, se obtuvo una diferencia significativa entre la respuesta de anticuerpos contra m1 y m2 en los 4 grupos de enfermedad (Gastritis crónica, $\tau = 2.72$, $P < 0.01$; Úlcera duodenal, $\tau = 2.47$, $P < 0.02$; Lesiones precancerosas (metaplasia y displasia), $\tau = 2.40$, $P < 0.02$ y Cáncer gástrico, $\tau = 2.37$ $P < 0.05$).

En el caso, de la comparación de medias para m1 y m2 entre grupos de enfermedad para ver asociación entre la respuesta de anticuerpos contra VacA con el cuadro clínico, no se obtuvo diferencia significativa.

Cálculo para obtener el valor de τ :

$$t = (x_1 - x_2) / sp\sqrt{1/n_1 + 1/n_2}$$

$$\text{donde: } sp = \sqrt{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2 / (n_1 - 1) + (n_2 - 2)}$$

6.5.4. Prueba estadística por χ^2 para determinar la relación entre el tipo de VacA con el genotipo aislado en pacientes seropositivos a un tipo de VacA

Para la determinación correcta del genotipo de *vacA* en base a la relación obtenida entre la tipificación sérica de VacA por ELISA y el genotipo aislado obtenido por PCR en pacientes seropositivos a un tipo de VacA, se encontró una diferencia significativa.

($\chi^2 = 6.77$ y $P < 0.001$)

Pacientes seropositivos a un tipo de VacA
(ELISA)

Pacientes con los
genotipos aislados de
la región media de
vacA (PCR)

Genotipos	m1	m2	TOTAL
m1	A	B	C
m2	D	E	F
TOTAL	G	H	n

Cálculo para obtener χ^2 :

$$\chi^2 = \frac{n [(AE - BD) - n / 2]^2}{CFGH}$$

6.5.5. Prueba exacta de Fisher (FET) para determinar la relación entre el tipo de VacA con el genotipo aislado en pacientes seropositivos a ambos tipos de VacA

Para la determinación correcta del genotipo de *vacA* en base a la relación obtenida entre la tipificación sérica de VacA por ELISA con el genotipo obtenido por PCR aislado en pacientes seropositivos a ambos tipos de VacA, se encontró una diferencia significativa.

(P = 0.093, P < 0.01)

Pacientes seropositivos a ambos tipos de VacA

(ELISA)

Pacientes con los genotipos aislados de la región media de *vacA* (PCR)

Genotipos	m1	m2	TOTAL
m1	A	B	C
m2	D	E	F
TOTAL	G	H	n

$$FET = \frac{C! F! G! H!}{n! A! B! C! D!}$$

7. DISCUSION

En el trabajo, la determinación de pacientes positivos a la infección se determinó mediante el aislamiento de *H. pylori* por cultivo de biopsias gástricas. Sin embargo, la proporción de pacientes positivos con cuadros clínicos severos es muy alta pues, la proporción de aislamiento de *H. pylori* en pacientes que presentaron cáncer gástrico y lesiones precancerosas fue de 8 y 20% respectivamente de un total de 199 cepas aisladas (Ver tabla 3) y algunos estudios epidemiológicos reportan una incidencia en el desarrollo de cáncer gástrico cercana al 0.1 %.⁵⁷

Es importante mencionar que el total de pacientes analizados fue de 478, todos con enfermedades gastroduodenales. Sin embargo, en 58% no se logró el aislamiento de *H. pylori* pues, algunas biopsias habían sido procesadas con anterioridad o bien el transporte y el almacenamiento no fueron los adecuados para mantener viables a las cepas. Es importante mencionar que estas muestras fueron tomadas en el 2001 y aunque, fueron preservadas en caldo brucela más glicerol a -70°C, las biopsias fueron descongeladas varias veces. *H. pylori* es una bacteria altamente sensible a los cambios de ambiente y posiblemente el bajo número de bacterias presentes en las biopsias así, como el proceso de descongelamiento para su cultivo, pudo haber disminuido la cantidad de UFC hasta hacerlas casi irrecuperables.

En base al diagnóstico histológico para clasificar a los pacientes infectados en diferentes grupos de enfermedades gastroduodenales se observó algo en común, la principal enfermedad atribuida a *H. pylori* por el número de infectados es la gastritis y el desarrollo de enfermedades más severas de la infección disminuye por diversos factores tanto de la bacteria como del hospedero originando que, no todas las personas infectadas desarrollen enfermedad ulcerosa o cáncer gástrico.

Por otra parte, los resultados de la tipificación de *vacA* por PCR mostraron que todas las cepas aisladas presentaron este gen predominando para la secuencia señal la forma alélica s1 en 84% de los pacientes y para la región media, la forma alélica m1 se presentó en 75% (Ver tabla 4). Estos resultados son similares a reportes previos realizados en niños y adultos mexicanos.⁸¹ Diversos estudios han demostrado que las cepas que poseen las formas alélicas m1 y s1 de la región media y secuencia señal de *vacA* se han asociado más con daño sobre epitelio gástrico *in vitro* en el estómago y se han aislado con mayor frecuencia de pacientes con adenocarcinoma gástrico con respecto a las cepas que poseen las formas alélicas s2 y m2^{7, 38, 48-49}. En el caso de la región media de *vacA* que codifica para p58, la frecuencia y porcentaje de los alelos m1 y m2 aislados de úlcera doudenal corresponde a 84 y 16%, de lesiones precancerosas 87 y 12%. Mientras que de cáncer gástrico se aislaron en 94% y 6% respectivamente. Por lo tanto, VacA tipo m1 tiene mayor actividad y está más estrechamente asociada con el desarrollo de úlceras y lesiones precancerosas con respecto al tipo m2 (Ver tabla 4).

La combinación de alelos de la región media y secuencia señal de *vacA* generan cuatro familias de VacA: s1/m1, s1/m2, s2/m1 y s2/m2, cada una con diferencias en la secuencia de aminoácidos que originan distintos grados de actividad vacuolizante *in vitro* en diferentes líneas celulares como células HeLa y AGS.^{7, 55} El genotipo s1/m1 codifica para la toxina de mayor actividad vacuolizante presentando los alelos más relacionados a virulencia y enfermedad; s1/m2 codifica para la toxina que induce efecto vacuolizante intermedio y s2/m2 codifica para la toxina que no presenta actividad vacuolizante.⁷ La combinación alélica s2/m1 ha sido poco estudiada debido a que fue identificada la primera cepa en 1999.³⁷ En el estudio, no se logró aislar una cepa con este genotipo. Sin embargo, la combinación alélica s1/m1 que le confiere más virulencia predominó en 75% de las cepas aisladas, el genotipo s2/m2 en 16% de los pacientes y la combinación s1/m2 se presentó en 7% de los pacientes originando mayor predisposición al desarrollo de formas más severas de la infección en los pacientes con el genotipo s1/m1 (Ver tabla 5).

México, se encuentra en la región latinoamericana donde existe una mayor prevalencia del genotipo s1/m1 y donde se estima, la gastritis afecta entre 65% y 75% de la población adulta siendo en su mayoría asintomáticos.⁵⁷ En los resultados obtenidos, el genotipo s1/m1 atribuido a mayor virulencia se presentó en 66% de los pacientes con gastritis superficial con respecto al genotipo s2/m2 donde se presentó en 20% de los pacientes con esta enfermedad. Se observó que el genotipo s2/m2 no es agente directo de úlcera duodenal, lesiones precancerosas ni cáncer gástrico pues, la proporción de aislamientos en estas enfermedades es de 8, 10 y 6% respectivamente. Comparado con el genotipo s1/m1 donde, el porcentaje de aislamientos corresponde a 84, 87 y 94% de los pacientes con úlcera gástrica, lesiones precancerosas y cáncer gástrico respectivamente. (Ver tabla 5). Aunque, en el trabajo no se analizaron otros factores de virulencia que determinan el rumbo de la infección como la presencia de la Isla de patogenicidad *cagPAI*, adhesinas o bien los factores genéticos del huésped.

La infección con *H. pylori* se puede presentar inclusive por más de una cepa y se ha propuesto que la diversidad de alelos de *vacA* es originada a fenómenos de recombinación *in vivo* de *H. pylori* cuando existe una infección múltiple, esto puede generar cambios en el grado de toxicidad de VacA de las diferentes subclonas de las cepas colonizadoras.^{7,37,78}

Los resultados obtenidos con la prueba serológica usando VacA recombinante tipo m1 y m2 como antígeno sugieren que, la frecuencia de pacientes expuestos a más de un tipo de toxina de VacA es importante pues, existe una respuesta positiva de anticuerpos de tipo IgG generados contra la región media de ambos tipos de VacA (m1 y m2) en 17% de los pacientes (Ver tabla 11), sugiriendo que dichos individuos se han visto expuestos a diferentes cepas de forma individual o simultáneamente y si esto último es cierto, sólo pudo aislarse la cepa presente en mayor número durante la endoscopia. En los resultados obtenidos en la genotipificación por PCR solamente 2% de los pacientes con gastritis superficial presentaron infección mixta lo que sugiere la presencia de infección múltiple en estos casos. (Ver tabla 4).

Aunque no sabemos las causas que originaron la recuperación de una cepa en los pacientes que presentaron una respuesta de anticuerpos positiva contra ambos tipos de VacA sugerimos que, pudo haber existido un desplazamiento de la cepa que registra respuesta positiva menor causándole posiblemente su erradicación por mecanismos de defensa del huésped originando el predominio de un genotipo o, la cepa no aislada pudo haber colonizado un sitio anatómico del estómago fuera del antro, pues se ha demostrado que *H. pylori*, también puede colonizar cuerpo (distal y proximal).²⁵

Se ha demostrado que una proporción importante de personas están expuestas a más de una cepa de *H. pylori* durante su vida, y las múltiples cepas que causan infección hasta ahora conocidas pueden ser muy comunes siendo, en algunos países subdesarrollados un evento más frecuente de lo esperado.⁷⁷ Un estudio realizado en México en 20 adultos con enfermedades gastroduodenales encontró colonización múltiple con dos o más genotipos de *H. pylori* en el 85% de estos pacientes.⁷⁶

En la estructura de VacA, p58 es potencialmente más antigénica por ser más grande siendo, reconocida más fuertemente según, un estudio realizado a 32 pacientes Ingleses infectados para ver la intensidad de reconocimiento de anticuerpos contra ambos fragmentos de VacA usando Western Blot.⁷⁹ Además, mediante un análisis bioinformático se encontró, existe un mayor número de epítomos inmunogénicos en ésta subunidad en comparación con p37.⁸²

La respuesta de anticuerpos generada contra VacA en suero de pacientes infectados no fue positiva como se esperaba en todos los individuos infectados a pesar de la confirmación de la infección por cultivo pues, se observó que en 47% de los individuos no generaron respuesta de anticuerpos detectable contra VacA. (Ver Tabla 11). Una posible explicación a esto es; algunas cepas no pueden expresar la toxina debido a mutaciones puntuales que insertan un codon de paro en el marco de lectura. Una segunda posibilidad es que, a pesar de la expresión de VacA, algunos individuos no pueden producir una respuesta de anticuerpos contra VacA pues, estudios *in vitro* han demostrado que la toxina VacA interfiere con la respuesta inmunitaria al inhibir la proliferación y activación clonal de los linfocitos T específicamente en las células TCD4+,^{22, 40} y alterando el procesamiento de antígenos en las células presentadoras de antígenos (CPA) suprimiendo la producción de anticuerpos vía humoral.³⁹

Ambas posibilidades ayudan a explicar porque en 2 cepas donde se realizó la detección de la banda de VacA por Western Blot no se detecta a la toxina (Ver Fig. 13) y porque en algunos pacientes la respuesta de anticuerpos es muy débil contra VacA. (Ver tabla 12).

La frecuencia de pacientes seropositivos a un solo tipo de VacA que presentaron una respuesta de anticuerpos contra el tipo m1 fue mayor presentándose en 66 (33%) de los pacientes. Mientras que, la proporción de sueros de pacientes infectados que reconocieron al tipo m2 se presentó en 5 (2%) de los pacientes. Si consideramos además, los 17 (34%) pacientes con respuesta seropositiva a ambos tipos (m1 y m2) aumenta la proporción de pacientes que reconocen al tipo m1 con respecto a m2 (Ver tabla 11). Esto nos permite ver en base a la respuesta de anticuerpos que, existe una mayor frecuencia de pacientes infectados con el tipo m1.

Una respuesta positiva para ambos tipos de VacA nos indica infección mixta y una respuesta de anticuerpos mayor contra un tipo de VacA con respecto al otro, nos indica el genotipo predominante de la cepa que puede estar presente en mayor proporción. (Ver tablas 7, 8, 9 y 10)

Por otra parte, al realizar una comparación de las medias entre la respuesta de anticuerpos contra m1 y m2 en todos los pacientes por enfermedad gastroduodenal se encontró que, VacA tipo m1 despierta una mayor respuesta de anticuerpos con respecto al tipo m2 en todos los pacientes con diferencia significativa (GC: $P < 0.01$, UD: $P < 0.02$, LP: $P < 0.02$ y CG: $P < 0.05$) (Ver Fig. 14, 15, 16 y 17). Por lo tanto, m1 fue más inmunogénica con respecto a m2 independientemente de la enfermedad y si los pacientes presentan respuesta seropositiva o seronegativa. Esto puede deberse a que las cepas con el alelo m1 son más virulentas al presentar mayor actividad vacuolizante *in vitro* y posiblemente este tipo de toxina se exprese en mayor cantidad.

Se ha descrito la relación entre el genotipo aislado de *vacA* con la enfermedad gastroduodenal. Sin embargo, evaluando las implicaciones clínicas con la respuesta serológica contra VacA, no se pudo discernir si los pacientes se encuentran en un mayor riesgo de desarrollar cuadros clínicos más severos pues, en base a la comparación de medias de absorbancias para m1 y m2 entre grupos de enfermedad no se encontró asociación entre los niveles de anticuerpos con el cuadro clínico pues, la respuesta de anticuerpos promedio para m1 entre cada grupo de enfermedad es muy parecida, presentándose el mismo caso para m2 sin diferencia significativa ($P > 0.5$) en ambos casos. Por lo tanto, la respuesta de anticuerpos séricos contra VacA es igual en todos los pacientes. (Ver Fig. 18 y 19).

La respuesta de anticuerpos séricos generada contra VacA nos permitió determinar el genotipo de la región media de *vacA* de la cepa infectante al compararlo con el genotipo determinado por PCR, sobre todo en pacientes seropositivos a un tipo de VacA donde, el tipo de VacA tipificado por serología correspondió al mismo genotipo aislado en 63/71 de estos pacientes ($P < 0.001$) (Ver tabla 13). Mientras, en los pacientes seropositivos a ambos tipos de VacA fue de 26/34 ($P < 0.01$) (Ver tabla 14). La variación para la determinación correcta del genotipo pudo deberse posiblemente a constantes reinfecciones y colonizaciones múltiples que pueden desplazar en cantidad a otras cepas de *H. pylori* y generar variaciones en los niveles de anticuerpos contra diversos genotipos. Los pacientes que tienen respuesta de anticuerpos positiva contra ambos tipos de VacA presentan los epítomos antigénicos de ambos, estando en mayor cantidad los de la cepa predominante.

Sin embargo, en algunos casos, posiblemente existió un genotipo predominante que expresó en mayor cantidad los epítomos antigénicos de un tipo de VacA, generando en mayor número los anticuerpos específicos IgG de memoria y al ser desplazada en cantidad por otra cepa de *vacA*, los anticuerpos de la cepa que ya no predomina reconocen mejor sus epítomos correspondientes.

En los resultados de este trabajo, la respuesta de anticuerpos contra ambos tipos de VacA apoyan lo que dice Perez-Perez, *et al.* 1999. el cual, reporta una diferencia estadística en la respuesta de anticuerpos contra s1/m1 y s2/m2 con los genotipos infectantes. Además, reporta que el fragmento p58 localizado en la región media presenta pequeñas variaciones estructurales entre los diversos tipos de VacA que le confieren variabilidad antigénica y que pueden ser capaces de ser detectados en la respuesta serológica en pacientes colonizados por cepas de diferentes tipos.⁸⁰ Sin embargo, se pueden generar reacciones cruzadas cuando se utiliza en antígeno completo de m1 y m2 pues, aunque ambos tipos presentan diferencias secuenciales, las similitudes que puedan presentar genera que un solo tipo de anticuerpo contra p58 de VacA presente en suero pueda reconocer a ambos antígenos. Ghose, *et al.* 2007 en su ensayo serológico para identificar cepas de *vacA* m1 y m2 de *H. pylori* usó fragmentos antigénicos específicos de ciertas regiones variantes entre m1 y m2 para lograr una mayor especificidad en el reconocimiento del antígeno y diferenciar con mayor exactitud ambos genotipos. Sin embargo, los antígenos usados para detectar cepas infectantes m2 presentaron menor especificidad que el tipo m1.⁸³

8. CONCLUSIONES

8.1. CONCLUSION GENERAL

- El método serológico por ELISA para tipificar VacA y la comparación con el genotipo obtenido por PCR nos permitió determinar el mismo genotipo de *vacA* de la cepa infectante en 89/105 ($P < 0.001$ χ^2) únicamente en los pacientes mexicanos infectados que generaron respuesta de anticuerpos positiva contra la toxina.

8.2. CONCLUSIONES PARTICULARES

1. En la genotipificación de la región media y secuencia señal, la prevalencia en población mexicana del genotipo s1/m1 fue mayor con 75%, seguido de s2/m2 y s1/m2 con 16 y 7% respectivamente, corroborando lo que ya se sabía.
2. Los niveles de anticuerpos séricos IgG inducidos contra el tipo m1 y m2 de VacA no se asociaron con los cuadros clínicos pues, la respuesta de anticuerpos fue igual en todos los pacientes.
3. La tipificación de VacA por serología para determinar el genotipo infectante fue confiable en los casos en que el paciente presenta una respuesta de anticuerpos contra un solo tipo de VacA en 63/71 ($P < 0.001$ χ^2). Mientras, en los pacientes seropositivos para ambos tipos de VacA fue de 26/34. ($P < 0.01$ FET) siendo menor en este caso.

4. Los niveles de anticuerpos séricos IgG inducidos contra el tipo m1 de VacA fueron más altos en todos los grupos de pacientes por lo cual, el tipo m1 es más inmunogénico.
5. La respuesta serológica mixta generada contra ambos tipos de antígenos m1 y m2 se presentó en una frecuencia de 17% lo cual, puede ser indicativo de la presencia de infección mixta en la población.
6. La presencia de anticuerpos contra VacA no fue detectada en el 48% de estos pacientes a pesar de la confirmación de la infección por cultivo en todos los casos siendo, esto una limitante para la aplicación de ésta técnica de diagnóstico.

9. REFERENCIAS

1. Dunn, B. E., Cohen, H., and Blaser, M. J., 1997. *Helicobacter pylori*. Clinical Microbiology Reviews. **10**, 720-741.
2. Marais, A., Mendz, G. L., Hazell, S. L., and Mégraud, F., 1999. Metabolism and *Helicobacter pylori*: The Genome Era. Microbiology and Molecular Biology Reviews. **63**, 642-667.
3. Koneman, W. Elmer., Allen, D. Stephen., Janda, M. William. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas Color. Editorial Médica Panamericana. 5^{ta} edición. 1999. México. pp: 135, 329-334
4. Cover, T. L., and Blaser, M. J., 1992. Purification and characterization of the Vacuolating Toxin from *Helicobacter pylori*. The Journal of Biomedical Chemistry. **15**, 11570-10575.
5. Telford, J. L., Ghiara, P., Dell'Orco, M., Comanducci, M., Burroni, D., Bugnoli, M., Tecce, M. F., Cencini, S., Covacci, A., Xiang, Z., Papini, E., Montecucco, C., Parente, L., and Rappuoli, R., 1994. Gene Structure of the *Helicobacter pylori* Cytotoxin and Evidence of its Key Role In Gastric Disease. J. Exp. Med. **179**, 1653-1658.
6. Cover, T. L., Tummuru, M. K., Cao, P., Thompson, S. A., and Blaser, M. J., 1994. Divergence of Genetic Sequences for the Vacuolating Cytotoxin among *Helicobacter pylori* Strans. The Journal of Biological Chemistry. **14**. 10566-10573.
7. Atherton, J. C., Cao, P., Peek, R. M., Tummuru, M.K., Blaser, M. J., and Cover, T.L., 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. The Journal of Biological Chemistry. **270**, 17771-17777.
8. Lupetti, P., E. Heuser, J. E., Manetti, R., Massari, P., Lanzavecchia, S., Bellon, P. L., Dallai, R., Rappuoli, R., and Telford, J. L. 1996. Oligomeric and Subunit Structure of the *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin. Journal of Cell Biology. **133**. 801-807.

9. Adrian, M., Cover, T. L., Dubochet, J., and Heuser, J. E. 2002. Multiple Oligomeric States of the *Helicobacter pylori* Vacuolating Toxin Demonstrated by Cryo-electron Microscopy. *J. Mol. Biol.* **318**, 121-133
10. Reyrat, J. M., Lanzavecchia, S., Lupetti, P., Pagliaccia, C., Pelicic, V., Cherrel, M., Olivieri, C., Norais, N., Ji, X., Cabiaux, V., Papini, e., Rappuoli, R., and Telford, J. L. 1999. 3D Imaging of the 58 kDa Cell Binding Subunit of the *Helicobacter pylori* Cytotoxin. *J. Mol. Bio* **290**, 459-470
11. Atherton, J. C. 2006. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **1**. 63-96
12. Goodman, K. J., Corea, P., Tenganá-Aux, H. J., Ramírez, H., DeLany, J. P., Guerrero-Pepinosa, O., Lopez-Quñones, M., and Collazos-Parra, T. 1996. *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes: A population-based study of transmission pathways. *American Journal of Epidemiology.* **144**. 290-299
13. Hulten, K., Han, S. W., Enroth, H., Klein, P. D., Opekun, A. R., Gilman, R. H., Evans, D. G., Graham, D. Y., and El-Zaatari, F. A. 1996. *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterology.* **110**. 1031-1035.
14. Tombola, F., Carlesso, C., Szabó, I., de Bernard, M., Reyrat, J. M., Telford, J. L., Rappuoli, R., Montecucco, C., Papini, E., Zoratti, M. 1999. *Helicobacter pylori* vacuolating toxin forms anion-selective channels in planar lipid bilayer: possible implications for the mechanism of cellular vacuolation. *Biophysical Journal.* **76**. 1401-1419.
15. Ricci, V., Sommi, P., Fiocca, R., Necchi, V., Romano, M., and Solcia, E. 2002. Extracellular pH Modulates *Helicobacter pylori*- Induced Vacuolation and VacA Toxin Internalization in Human Gastric Epithelial Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **292**. 167-174
16. Morbatio, L., Tombola, F., Campello, S., Del Giudice, G., Rappuoli, R., Zoratti, M., and Papini, E. 2001. Vacuolation induced by VacA toxin of *Helicobacter pylori* requires the intracellular accumulation of membrane permeant bases, Cl⁻ and water. *Federation of European Biochemical Societies.* **508**. 479-483.

17. El-Bez, C., Adrian, M., Dubochet, J., and Cover, T. L. 2005. High resolution structural analysis of *Helicobacter pylori* VacA toxin oligomers by cryo-negative staining electron microscopy. *Journal of Structural Biology*. **151**. 215-228.
18. Kuo, Ch. H., and Wang, W. Ch. 2003. Binding and Internalization of *Helicobacter pylori* VacA via cellular lipid rafts in epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **303**. 640-644.
19. Papini, E., Bernad, M., Milia., E., Bugnoli, M., Zerial, M., Rappuoli, R., and Montecucco, C. 1994. Cellular vacuoles induced by *Helicobacter pylori* originate from late endosomal compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. Mediacal Sciences*. **91**. 9720-9724.
20. Czajkowsky, D. M., Iwamoto, H., Cover, T. L., and Shao, Zhifeng. 1999. The vacuolating toxin from *Helicobacter pylori* forms hexameric pores in lipid bilayers at low pH. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **96**. 2001-2006
21. Montecucco, C. and De Bernard, M. 2003. Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Microbes and infection*. **5**. 715-721.
22. Gebert, B., Fischer, W., Weiss, E., Hoffmann, R., and Haas, R. 2003. *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin Inhibits T Lymphocyte Activation. *Science*. **301**. 1099-110.
23. Cover, T. L., Reddy, L. Y., and Blaser, M. J. 1993. Effects of ATPase inhibitors on the response of HeLa cells to *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Infection and immunity*. **61**. 1427-1431.
24. Eaton, K. A., Morgan, D. R., and Srakowka. S. 1992. Motility as a factor in the colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol*. **37**. 123-127.
25. Genta, R. M., and Graham, D. Y. 1994. Comparison of biopsy sites for the histopathologic diagnosis of *Helicobacter pylori*: a topographic study of *Helicobacter pylori* density and distribution. *Gastrointestinal Endoscopy*. **40**. 342-345.

26. Torres, J., Camorlinga, M., Perez-Perez, G., Gonzalez, G., and Muñoz, O. 2001. Validation of the string test for the recovery of *Helicobacter pylori* from gastric secretions and correlation of its results with urea breath test results, serology, and gastric pH levels. *Journal of Clinical Microbiology*. **39**. 1650-1651.
27. Laine, L., Chun, D., Stein, C., El- Beblawi, I., Sharma, V., and Chandrasoma, P. 1996. The influence of size or number of biopsies on rapid urease test results: a prospective evaluation. *Gastrointestinal Endoscopy*. **43**. 49-53.
28. Rowland, M., Lambert, I., Gormally, S., Daly, L. E., Thomas, J. E., Hetherington, C., Durnin, M., and Drumm, B., 1997. Carbon 13-labeled urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. *The Journal of Pediatrics*. **131**. 815-820
29. Dunn, B. E., Campbell, G. P., Perez-Perez, G. I., and Blaser, M, J. 1990. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *The Journal of Biological Chemistry*. **265**. 9464-9469.
30. Odenbreit, S., Wieland, B., and Haas, R. 1996. Cloning and genetic characterization of *Helicobacter pylori* catalase and construction of a catalase-deficient mutant strain. *Journal of Bacteriology*. **178**. 6960-6967.
31. Spiegelhalder, C., Gerstenecker, B., Kersten, A., Schiltz, E., and Kist, M. 1993. Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. *Infection and Immunity*. **61**. 5315-5325.
32. Worku, M. L., Sidebotham, R. L., Walker, M. M., Keshavarz, T., and Karim, Q. J., 1999. The relationship between *Helicobacter pylori* motility, morphology and phase of growth, implications for gastric colonization and pathology. *Microbiology*. **145**. 2803-2811.
33. Ascencio, F., Fransson, L. A., and Wadstrom, T. 1993. Affinity of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* for the N-sulphated glycosaminoglycan heparan sulphate. *J. Med. Microbiol*. **38**. 240-244
34. Ringner, M., Aleljung, P., and Wadstrom, T. 1993. Adherence of haemagglutinating *Helicobacter pylori* to five cell lines. *Int. Journal Med. Microbiolog. Virol. Parasitol. Infec. Dis*. **280**. 107-112.

35. Grove, D. I., Koutsouridis, G., and Cummins, A. G. 1998. Comparison of culture, histopathology and urease testing for the diagnosis of *Helicobacter pylori* gastritis and susceptibility amoxicillin, clarithromycin, metronidazole and tetracycline. *Pathology*. **30**. 183-187.
36. Li, C., Ha, T., Ferguson, D. A., Chi, D. S., Zhao, R., Patel, N. R., Krishnaswamy, G., and Thomas, E. 1996. A newly developed PCR assay of *H. pylori* in gastric biopsy, saliva, and faces. Evidence of high prevalence of *H. pylori* in saliva support oral transmission. *Digestive Diseases and Sciences*. **41**. 2142-2149.
37. Letley, D. P., Lastovica, A., Louw, J. A., Hawkey, C. J., and Atherton, J. C. 1999. 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. *Journal of Clinical Microbiology*. **37**. 1203-1205.
38. Atherton, J. C., Peek, R. M., Tham, K. T., Cover, T. L., and Blaser, M. J. 1997. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. **112**. 92-99.
39. Molinari, M., Salio, M., Galli, C., Norais, N., Rappuoli, R., Lanzavecchia, A., and Montecucco, C. 1998. Selective inhibition of dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *J. Exp. Med.* **187**. 135-140.
40. Boncristiano, M., Paccani, S. R., Barone, S., Olivieri, C., Patrussi, L., Ilver, D., Amedei, A., D'Elia, M. M., Telford, J. L., and Baldari, C. T. 2003. The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J. Exp. Med.* **198**. 1887-1897
41. Sharma, S. A., Tummuru, K. R., Millar, G. G., and Blaser, M. J. 1995. Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation in vitro. *Infection and Immunity*. **63**. 1681-1687.
42. Watanabe, T., Tada, M., Nagai, H., Sasaki, S., and Nakao, M. 1998. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in Mongolian gerbils. *Gastroenterology*, **115**. 642-648.

43. Rothenbacher, D., Inceoglu, J., Bode, G., and Brenner, H. 1999. Acquisition of *Helicobacter pylori* infection in a high-risk population occurs within the first 2 year of life. *Journal of Pediatrics*. **136**. 744-748
44. Thomas, J. E., Dale, A., Harding, M., Coward, W, A., Cole, T. J., and Weaver, L. T. 1999. *Helicobacter pylori* colonization in early life. *Pediatric Research*. **45**. 218-223.
45. Kosunen, T. U., Seppala. K., Sarna, S., and Sipponen, P. 1992. Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. *The Lancet*. **339**. 893-895
46. Cutler, A., Schubert, A., and Schubert, T. 1993. Role of *Helicobacter pylori* serology in evaluating treatment success. *Digestive Diseases and Sciences*. **38**. 2262-2266.
47. Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., Frick, I., Kersulyte, D., Incecik, E. T., Berg, D. E., Covacci, A., Engstrand, L., and Boren T. 1998. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*. **279**. 373-377.
48. Miehlike, S., Yu, J., Schuppler, M., Frings, C., Kirsch, C., Negraszus, N., Morgner, A., Stolte, M., Ehninger, G., and Bayerdorffer, E. 2001. *Helicobacter pylori vacA, ice A, and cagA* status and pattern of gastritis in patients with malignant and benign gastroduodenal disease. *The American Journal of Gastroenterology*. **96**. 1008-1013
49. Rudi, J., Kolb, C., Maiwald, M., Kuck, D., Sieg, A., Galle, P. R., and Stremmel W. 1998. Diversity of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genes and relationship to VacA and CagA protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. *Journal of clinical microbiology*. **36**. 944-948.
50. Ching, C. K., Wong, B. C., Kwok, E., Ong, L., Covacci, A., and Lam, S. K. 1996. Prevalence of CagA-bearing *Helicobacter pylori* strains detected by the anti-CagA assay in patients with peptic ulcer disease and in controls. *American Journal of Gastroenterology*. **91**. 949-953

51. Cover, T. L., Glupczynski, Y., Lage, A. P., Burette, A., Tummuru, M. K., Perez-Perez, G., and Blaser, M. J. 1995. Serologic detection of infection with *cagA*+ *Helicobacter pylori* strains. **33**. 1496-1500.
52. Akopyans, S., Natalia, S. W., Clifton. 1998. Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. Mol. Microbiology. **28**. 37-53
53. Yamaoka, H., Malaty, H. M., Osato, M. S., and Graham, D, Y. 2000. Conservation of *Helicobacter pylori* genotypes in different ethnic groups in Houston, Texas. The Journal of Infectious Diseases. **181**. 2083-2086.
54. Argent, R. H., Zhang, Y., and Atherton, J. C. Simple method for determination of the number of *Helicobacter pylori* CagA variable-region EPIYA tyrosine phosphorylation motifs by PCR. Journal of Clinical Microbiology. **43**. 791-795.
55. Letley, D. P., and Atherton, J. C. 2000. Natural Diversity in the N terminus of the mature vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* determines cytotoxin activity. Journal of Bacteriology. **182**. 3278-3280.
56. Vinion-Dubiel, A. D., McClain, M. S., Cao, Ping., Mernaugh, R. L., and Cover, T. L. 2001. Antigenic diversity among *Helicobacter pylori* vacuolating toxins. Infection and Immunity. **69**. 4329-4336.
57. Crew, K. d., and Neugut, A. I. 2006. Epidemiology of gastric cancer. World Journal of Gastroenterology. **12 (3)**. 354-362.
58. Uemura, N., Akamoto, S., Yamamoto, S., M atsumura, N., Yamaguchi, S., Yamakido, M., Taniyama, K., Ssaki, N., and Schlemper, R. J. 2001. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. The New England Journal of Medicine. **345**. 784-789.
59. National Institutes of Health Consensus Conference. 1994. NIH Consensus development panel of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. JAMA. **272**. 65-69.
60. Sipponen, P., Varis, K., Fräki, O., Korri, U. M., Seppälä, K., and Siurala, M. 1990. Cumulative 10 year risk of symptomatic duodenal and gastric ulcer in patients with or without chronic gastritis. A clinical follow-up study of 454 patients. Scand. J. Gastroenterol. **25**. 966-973.

61. Blum, A. L. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. 1996. Scand. J. Gastroenterol. Suppl 31. **214**. 24-27.
62. Satoh, K., Kimura, K., Takimoto, T., and Kihira, K. 1998. A follow-up study of atrophic gastritis and intestinal metaplasia after eradication of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. **3**. 236-240.
63. Matysiak-Budnik, T., and Mégraud, F. 2006. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *European Journal of Cancer*. **42**. 708-716.
64. Naito, Y., and Toshikazu, Y. 2002. Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. **33**. 323-336.
65. Correa, P., Fontham, T. H., Bravo, J. C., Bravo, L. E., Ruiz, B., Zaruma, G., Realpe, J. L., Malcom, G. T., Li, D., Jonson, W. D., and Mera, R. 2000. Chemoprevention of gastric dysplasia: Randomized trial of antioxidant supplements and anti-*Helicobacter pylori* therapy. *Journal of the National Cancer Institute*. **92**. 1881-1887.
66. Blaser, M. J. 2003. *Helicobacter pylori*. *Scientific American Latinoamericana*. **33**. 6-13.
67. Tovar-Guzmán, V., Girón-Hernández, C., Barquera, S., Rodríguez-Salgado, N., and López-Carrillo, L. 2001. Epidemiologic panorama of stomach cancer mortality in Mexico. *Archives of Medical Research*. **32**. 312-317.
68. Lindholm, C., Quiding – Jarbrink, M., Lonroth, H., Hamlet, A., Svennerholm, A. M., 1998. Local cytokine response in *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Infect. Immun.* **66**. 5964-5971.
69. Dixon, M. F. 1995. Histological responses to *Helicobacter pylori* infection: gastritis, atrophy and preneoplasia. *Baillieres Clin Gastroenterol*. **9**. 467-486.
70. Crabtree, J. E., Covacci, A., and Farmery, S. M. 1995. *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with CagA positive phenotype. *J. Clin. Pathol.* **48**. 41-45.

71. Bamford, K. B., Fan, X., Crowe, S. E., Leary, J. F., and Gourley, W. K. 1998. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology*. **114**. 482-492.
72. Guiney, D. G., Hasegawa, P., and Cole, S. P. 2003. *Helicobacter pylori* preferentially induces interleukin 12 (IL-12) rather than IL-6 or IL-10 in human dendritic cells. *Infect. Immun.* **71**. 4163- 4166
73. Kranzer, K., Eckhardt, A., Aigner, M., Knoll, G., and Deml, L. 2004. Induction of maturation and cytokine release of human dendritic cells by *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **72**. 4416-4423.
74. Smythies, L. E., Waites, K. B., Lindsey, J. R, Harris, P. R, Ghiara, P., and Smith, P. D. 2000. *Helicobacter pylori*-induced mucosal inflammation is Th1 mediated and exacerbated in IL-4, but not IFN- γ , gene-deficient mice. *J. Immunol.* **165**. 1022-1029.
75. Noach, L. A., Bosma, N. B., Cansen, J., Hoek, F.J. van Deventer, S. J., and Tytgat, G. N. 1994. Mucosal tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interleukin-8 production in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Scand.J. Gastroenterol.* **29**. 425-429.
76. Morales-Espinosa, R., Castillo-Rojas, G., Gonzáles-Valencia, G., Ponce de León, S., Cravioto, A., Atherton, J. and López-Vidal, Y. 1999. Colonization of mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strain with different *vacA* and *cagA* genotypes. *Journal of Clinical Microbiology.* **37**. 3001-3004.
77. Ghose, C., Perez-Perez, G. I., van Doorn, L. J., Dominguez-Bello, M. G., and Blaser, M. J. 2005. High frequency of gastric colonization with multiple *Helicobacter pylori* strains in Venezuelan subjects. *Journal of Clinical Microbiology.* **43**. 2635-2641.
78. Aviles-Jimenez, F., Letley, D. P., Gonzales-Valencia, G., Salama, N., Torres, J and Atherton, J. C. 2004. Evolution of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin in a human stomach. *Journal of Bacteriology.* **186**. 5182-5185.

79. Aviles-Jimenez, F., Letley, D. P., Robinson, K., Torres, J., El-Omar, E., and Atherton, J. C. Human IgG response to m1 and m2 types of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA), and development of a simple ELISA test.
80. Perez-Perez, G. I., Peek, R. M., Atherton, J. C., Blazer, M. J., and Cover, T. L. 1999. Detection of anti-VacA antibody responses in serum and gastric juice samples using type s1/m1 and s2/m2 *Helicobacter pylori* VacA antigens. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. **6**. 489-493.
81. Gonzales-Valencia, G., Atherton, J. C., Muñoz, O., Dehesa, M., de la Garza, M., and Torres, J. 2000. *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes in mexican adults and children. *The Journal of Infectious Diseases*. **182**. 1450-1454.
82. Xiu-Li., Shu-Qin, L., Chun-Jie, L., Hao-Xia, T., and Zhao-Shan, Z. 2004. Antigen epitope of *Helicobacter pylori* Vacuolating cytotoxin. *J. Gastroenterol.* **10**. 2340-2343.
83. Ghose, Ch., Perez-Perez, G, Torres, V. J., Crosatti, M., Nombra, A., Cover, T. L., Francois, F., and Blazer, M. J. 2007. Serological assays to identify human gastric colonization by VacA m1 or m2 *Helicobacter pylori* strains. *Clin. Vaccine Immunol.* **10**.
84. <http://www.helicobacterspain.com>
85. http://www.monografía.com/trabajos36/hemorragia_digestiva/hem7.gif

10. ANEXO

10.1. REACTIVOS

- **Reactivo de Ureasa.** Disolver 20 mg de KH_2PO_4 y 200 mg de Urea (Sigma Diagnostic's) en un volumen final de 10 mL con agua destilada. Adicionar 12 μL de rojo de fenol al 1%. Ajustar el pH a 6.8 sí es necesario. Filtrar al vacío utilizando poro de 0.22 μm .
- **Reactivo de Peróxido de Hidrógeno al 30%.** Mezclar 30 mL de Peróxido de Hidrógeno concentrado (Sigma Diagnostic's) con 70 mL de agua destilada.
- **Placas de Oxidasa impregnado con Diclorhidrato de Tetrametil p -Fenilendiamina** (Becton-Dickinson)
- **Sistema de velobiosis Gas Pack.** (Becton-Dickinson)
- **Reactivo GES.** Disolver 59.1g de Tiocianato de Guanidina en 20 mL de solución de EDTA 0.5 M pH 8.0 y calentar a 68°C con agitación constante. Adicionar 5 mL de N-lauril-Sarcosina al 10% y aforar a 100 mL con agua destilada.
- **Bromuro de Etidio.** Preparar una solución de Bromuro de Etidio (Sigma) al 0.06% en solución de agarosa al 2%.
- **Buffer de PCR 10x** (Invitrogen Life Technologies)
- **Cloruro de Magnesio 50 mM** (Invitrogen Life Technologies)
- **desoxinucleótidos Trifosfatos (dNTP's).** Preparar una mezcla con 10 μL de cada desoxinucleotido trifosfato 100 mM dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Invitrogen Technologies) y añadir 60 μL de agua libre de nucleasas.
- **Iniciadores o Primer VA1-F/VA1-R y VAG-F/VAG-R** (Invitrogen Life Technologies) Para amplificar el gen *vacA*

- **Taq polimerasa** (Invitrogen Life Technologies)
- **Monolaurato Polioxietileno-Sorbitol (Tween 20)**. (Sigma)
- **Anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG acoplada a Peroxidasa** (Sigma)
- **Sustrato peróxido**
- **Cromógeno Dihidroclorhidro o-Fenilendiamina OPD**. Tabletas (Sigma)
- **Sueros hiperinmunes policlonales de conejo anti-VacA** (donados por el Dr. J. C. Atherton)
- **Sustrato para detección de proteínas en Western Blot**. (ECL Amersham Biociences)

10.2. SOLUCIONES

- **Colorantes para la tinción de Gram** (Sigma Diagnostic's)
 - Solución de Cristal Violeta. Cristal violeta 2.3% (p/v). Oxalato de amonio 0.1%(p/v). Etanol 20% (v/v)
 - Solución de Yodo. Yodo 0.33% (p/v). Ioduro de potasio 0.66% (p/v).
 - Solución Decolorante. Isopropanol 75% (v/v). Acetona 25% (v/v)
 - Solución de Safranina. Safranina 6% (p/v). Etanol 20% (v/v)
- **Solución Salina Fisiológica (SSF)**. Disolver 9 g de Cloruro de Sodio (Sigma Diagnostic's) en 1L de agua destilada y esterilizar.
- **Caldo Brucella**. Resuspender 28 g del medio (Becton-Dickinson) en 1 L de agua destilada. Disolver y calentar para su disolución completa si es necesario. Esterilizar a 121°C por 15 min.
- **Placas de Agar Base Brucela adicionado con sangre de carnero al 5%**
- **Glicerol** (Boehringer Mannheim Laboratory Reagent's)
- **Agua Inyectable estéril** (Secretaria de Salud)
- **Solución de Acido Etilen-Diaminotetraacético (EDTA) 0.5 M pH 8.0**. Disolver 18.61 g de EDTA y 2 g de Hidróxido de Sodio en 80 mL de agua destilada. Ajustar el pH si es necesario y llevar a un volumen final de 100 mL con agua destilada.
- **Acetato de Amonio 7.5 M**. Disolver 60 g de Acetato de Amonio en 100 mL de agua destilada.

- **Cloroformo** (J.T.Baker)
- **Isopropanol** (Ommisolv)
- **Etanol al 70% (v/v)**. Mezclar 70 mL de Etanol (J.T.Baker) con 30 mL de agua destilada.
- **Solución amortiguadora de corrimiento Tris-Acetato-EDTA (TAE 50x) para electroforesis en geles de agarosa**. Disolver 242 g de Tris base en 57.1 mL de Acido Acético glacial y adicionar 100 mL de EDTA 0.5 M. Aforar a 1 L con agua destilada. Ajustar el pH a 8.0 si es necesario.
- **Solución amortiguadora de corrimiento TAE 1x para electroforesis en geles de agarosa**. Tomar una alícuota de 20 mL de TAE 50x y aforar a 1000 mL con agua destilada.
- **Agarosa** (Invitrogen Life Technologies).
- **Marcador de peso molecular para ADN de 1 Kb** (Invitrogen Life Technologies)
- **Solución amortiguadora de carga 6x para PCR**. Preparar una solución con 0.25% de Azul de Bromofenol, 0.25% de Xileno y 30% de Glicerol en agua.
- **Solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M pH 9.6**. Disolver 10.6 g de Na₂CO₃ en 0.5 L de agua destilada (solución stock A). Disolver 8.4 g de NaHCO₃ en 0.5 L de agua destilada (solución stock B). Añadir 160 mL de la solución A, 340 mL de la solución B y 500 mL de agua destilada. Ajustar el pH si es necesario.
- **Solución amortiguadora de Fosfatos 10x (PBS)**. Disolver 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 0.72 g de Na₂HPO₄ y 0.12 g de KH₂PO₄ en 100 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7.4 y aforar a 1 L.
- **Solución amortiguadora de Fosfatos 1x (PBS)**. Tomar una alícuota de 100 L del stock PBS 10x y aforar a 1 L con agua destilada.
- **Solución amortiguadora diluyente para ELISA**. Disolver 0.5 mL de Tween-20 y 2.5 g de albúmina en 100 mL de PBS 1x. Aforar a 1 L con PBS 1x y esterilizar por filtración al vacío.
- **Solución amortiguadora de lavado para ELISA**. Disolver 1 mL de Tween-20 en 1L de agua destilada. Filtrar al vacío utilizando un poro de 0.22 µm.

- **Solución de Acrilamida.** 30% (p/v) acrilamida (Sigma), 0.8% (p/v) N',N'- metil-bisacrilamida (Sigma)
- **Solución saturada de butanol en agua**
- **Tris pH 8.8 3 M.** Disolver 72.68 gr de Tris base (Sigma) en 200 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 8.8 si es necesario.
- **Tris pH 6.8 1 M.** Disolver 24.22 gr de Tris base (Sigma) en 200 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 6.8 si es necesario.
- **Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 10% (p/v).** Disolver 1 g de SDS (Boehringer-Mannheim) en 10 mL de agua destilada.
- **Persulfato de Amonio (APS) al 10% (p/v).** Disolver 1g de APS (Bio-Rad) en 10 mL de agua destilada y guardar a -20°C.
- **N,N,N',N'- Tetrametiletilendiamina (TEMED) (Sigma)**
- **Solución amortiguadora de carga 4x SDS-PAGE para electroforesis en geles de poliacrilamida.** Preparar una solución con 200 mM de Tris-Cl pH 6.8, 400 mM de Ditioneitol (DTT), 8% SDS, 0.4% de Azul de Bromofenol y 40% de Glicerol.
- **Solución amortiguadora de corrimiento para electroforesis en geles de poliacrilamida 10x.** Disolver 144 g de Glicina y 30 g de Tris en agua destilada y aforar a 1 L.
- **Solución amortiguadora de corrimiento para electroforesis en geles de poliacrilamida 1x.** Tomar una alícuota de 100 mL de buffer 10x, mezclar con 10 mL de SDS al 10% y aforar a 1 L.
- **Solución amortiguadora para Western Blot.** Disolver 2.4 g de Tris y 11.4 g de Glicina en 200 mL de Metanol. Aforar a 1 L con agua destilada.
- **Albúmina al 1% (p/v) en PBS 1x.** Disolver 1 g de albúmina (Beckton-Dickinson) en 100 mL de PBS 1x.
- **Solución amortiguadora de lavado para Western Blot.** Diluir 1 g de Tween 20 en 999 mL de PBS 1x.
- **Marcador de peso molecular para proteínas de 250 kDa (Bio-Rad)**

- **Azul de Coomasie.** Disolver 0.25 g de Azul de Coomasie Brillante en 90 mL de metanol:agua (1:1 v/v) y 10 mL de Acido Acético glacial. Filtrar al vacío utilizando poro de 0.22 µm.
- **Solución decolorante.** Preparar una solución con 50% (v/v) de metanol, 10% (v/v) de ácido acético y 40% (v/v) de agua.
- **Solución reveladora de películas.** Tomar una alícuota de 200 mL del concentrado y aforar a 1 L con agua destilada (Sigma).
- **Solución Fijadora de películas.** Tomar una alícuota de 200 mL del concentrado y aforar a 1 L con agua destilada (Sigma).

10.3. IDENTIFICACION BIOQUIMICA DE *Helicobacter pylori*

Tinción de Gram. En un portaobjetos limpio, colocar una pequeña gota de agua destilada o Solución Salina, seleccionar con un asa de 2 a 3 colonias de *H. pylori* y realizar un frotis fijando con calor. Realizar la tinción de Gram cubriendo el frotis con unas gotas de colorante de Cristal Violeta, dejar reposar 1 min y enjuagar con agua corriente. Adicionar unas gotas de solución mordente de Lugol, dejar reposar durante 1 min, y enjuagar con agua corriente. Decolorar con unas gotas de solución alcohol-acetona durante unos seg y enjuagar rápidamente. Adicionar el colorante de contraste Safranina dejando reposar por 1 min, enjuagar y secar perfectamente. Observar al microscopio a 10x, 40x y 100x para la búsqueda de *H. pylori* buscando bacilos curvos Gram (-) con aspecto de coma o espirales.

Prueba de Oxidasa. Tomar una colonia de *H. pylori* e impregnar sobre la placa de oxidasa que contiene el reactivo Diclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina, esperar unos segundos hasta observar inmediatamente la reacción positiva con un cambio de coloración a azul intenso.

Prueba de Catalasa. Picar una colonia de *H. pylori*, inocular en aproximadamente 15 μ L de peróxido de hidrógeno al 30%. Observar inmediatamente la reacción positiva mediante efervescencia.

Prueba de Ureasa. Adicionar una alícuota del reactivo de urea en un pequeño pozo, inocular una asada de la cepa a estudiar y homogenizar. Esperar unos min. hasta que la reacción se evidencie con un cambio de coloración del reactivo a rosa mexicano.

