



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

“Determinación de la frecuencia del gen *oipA* de *Helicobacter pylori*
en biopsias gástricas de individuos de Paraguay y México con
enfermedad gastroduodenal”

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

FABIAN SERRANO GARCÍA

COMITÉ ASESOR:

DIRECTOR DE TESIS: Dra. MARGARITA CAMORLINGA PONCE

ASESOR DE TESIS: Q.F.B. JOSÉ OSCAR GONZÁLEZ MORENO



MÉXICO, D.F.

MAYO 2009



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.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bacteriología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Coordinación de Investigación Médica, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional, Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social.

JURADO

PRESIDENTE Q.F.B. FRANCISCO JAVIER PARADA GARCÍA

VOCAL DRA. MARGARITA CAMORLINGA PONCE

SECRETARIO Q.F.B. JOSÉ OSCAR GONZÁLEZ MORENO

SUPLENTE M. en C. RAQUEL RETANA UGALDE

SUPLENTE DR. MARCO ANTONIO RODRÍGUEZ MEDINA

DEDICATORIAS:

A mis padres Teresa García, Francisco Serrano; a mis hermanos Abraham y Ricardo:

Por brindarme la fuerza y apoyo incondicional en los momentos difíciles, compartir mis alegrías, por enseñarme a ser honesto con mis amigos y profesores, porque como familia me inspiraron para continuar a pesar de las malas rachas en la vida. Me inculcaron el valor de la responsabilidad, tener sueños y conseguirlos; porque nuestro hogar esta lleno de cariño y confianza, un millón de gracias aunque jamás podré agradecer con palabras todo lo que me enseñaron, enseñan y enseñarán pues gracias a ustedes he conseguido otro logro en mi vida.

A Yadira Lizethe y la familia López Ramírez:

Cariño, gracias por estar en este momento tan importante en mi vida. Por tu amor, confianza, abrazos y abrirme las puertas de tu casa; a tus papas Jorgelina y Agustín, hermanos Katy y Kayro que me han apoyado en todo momento y hacerme saber que en cualquier instante podré contar con cada uno de ustedes.

A los Q.F.B. José Oscar González Moreno, Q.F.B. Teresa Benítez Escamilla, Q.F.B. Lourdes Santana Castillo, Q.F.B. Cirenía Sandoval, Q.F.B. Francisco Javier Parada García, M. en C. Raquel Retana Ugalde y Dr. Marco Antonio Rodríguez Medina:

Gracias por haberme impartido conocimientos tan importantes dentro de la carrera, por su apoyo, paciencia, confianza, pero lo más gratificante su amistad. Jamás olvidaré cada uno de sus regaños; los cuales me han formado como un profesionista capaz de realizar lo que se proponga; gracias nuevamente pues mas allá de verlos como los profesores que tuve en esta faceta de mi vida los considero mis amigos y padres académicos.

A la Dra. Margarita Camorlinga y la Dra. Norma:

Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio mostrando una sonrisa sincera, su confianza, por haberme permitido ser parte de ustedes, por guiarme con sus enseñanzas y experiencias a lo largo de este trabajo; pues su apoyo me inyectó demasiados ánimos para confiar en mi mismo.

A mis amigas Ana Patricia Diego, Claudia Saldívar, Guadalupe Méndez, Mayra Somohano, Rosa Ma. Alcántara y amigos Edson Becerra, Víctor Avelino, Mauricio Montoya:

Las travesuras que realizamos en este tiempo que convivimos, las tareas que nos compartimos, cada momento difícil de la carrera en el que nos apoyamos, gracias por ser parte importante en mi desarrollo como persona, estudiante y amigo en verdad jamás podré terminar de agradecerles el que me apoyarán.

Pero sobre todas las cosas gracias a Dios que me brindó una excelente familia, por dejar en mi camino personas maravillosas y hermosas como mis amigos, profesores y a una persona que me ama; pero lo más importante el permitirme seguir en este mundo para lograr cosechar más y más triunfos; así como dejarme levantar de las caídas más dolorosas que he tenido.

RESUMEN	A3
INTRODUCCIÓN	A3
MARCO TEÓRICO	A4
<i>Microbiología</i>	<i>A4</i>
<i>Epidemiología.....</i>	<i>A4</i>
<i>Patogenia</i>	<i>A4</i>
<i>Enfermedades asociadas a la infección con H. pylori y sintomatología...</i>	<i>A4</i>
<i>Factores de virulencia.....</i>	<i>A4</i>
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	A5
OBJETIVOS.....	A6
HIPÓTESIS	A7
DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	A8
<i>Diagrama de flujo.....</i>	<i>A8</i>
MATERIAL.....	A9
METODOLOGÍA	A9
<i>Análisis estadístico</i>	<i>A9</i>
RESULTADOS	A10
<i>Figuras de PCR.....</i>	<i>A10</i>
DISCUSIÓN	A11
CONCLUSIONES	A12
ANEXOS.....	A13
REFERENCIAS	A14

RESUMEN

Helicobacter pylori es una de las bacterias patógenas más comunes en los seres humanos, la cual coloniza la mucosa gástrica. La infección con *H. pylori* está asociada con el desarrollo de diferentes enfermedades gastroduodenales, la forma en que se transmite no es bien conocida aunque lo más probable es que lo haga de persona a persona; además la edad y el nivel socioeconómico parecen ser los factores más influyentes. En el presente estudio, se utilizó la cepa de *H. pylori* J99 como control positivo para detectar el gen *oipA* que codifica la proteína de membrana externa y estimula la secreción de interleucina 8; así mismo se compararon biopsias de pacientes con enfermedad gastroduodenal de Paraguay con cepas de *H. pylori* aisladas de biopsias de pacientes mexicanos. Los resultados demuestran que existe una diferencia estadística significativa debido al tipo de alimentación que existe en Paraguay pues su comida no es tan condimentada como lo es en los alimentos en México.

INTRODUCCIÓN

Hasta finales del siglo XX los científicos consideraron al estómago como un ambiente hostil para el crecimiento bacteriano. Por primera vez en 1975, la gastritis se asoció con la presencia en la mucosa gástrica, de una bacteria Gram negativa. En 1983 B.J. Marshall y J.R. Warren cultivaron de la mucosa gástrica humana un microorganismo Gram negativo, microaerófilico, de forma espirada y estudiaron su asociación con la inflamación del aparato gastrointestinal. El microorganismo cultivado fue primero incluido en el género *Campylobacter*, con el nombre de *Campylobacter pylori*, pero más tarde se definió como un nuevo género, llamado *Helicobacter*, donde se encuentran al menos otras 11 especies que han sido aisladas de la mucosa gástrica e intestinal de otros mamíferos.

La infección por *Helicobacter pylori* es la principal causa de gastritis crónica, úlcera péptica, y adenocarcinoma gástrico, también se asocia a linfomas gástricos tipo MALT, y actualmente se cree que puede estar asociado con algunos padecimientos no gastroduodenales como el púrpura trombocitopénico.

H. pylori, es un bacilo espirulado Gram-negativo, móvil, cuyo cultivo requiere de condiciones microaerófilas, su temperatura óptima es 37 °C y pH fisiológico.

La patogenicidad de *H. pylori* está dada por varios factores de virulencia que favorecen su penetración a la mucosa gástrica como es su forma espiralada, la presencia de flagelos, la actividad de la enzima ureasa; además de los productos de los genes *vacA* (*vacuolating toxin A*), *cagA* (*cytotoxin-associated gene A*) e *iceA* (*induced by contact with epithelium*). El gen *cagA* forma parte de la isla de patogenicidad (*cagPAI*); estructura genética que contiene 30 genes relacionados con la virulencia y patogenicidad de las cepas de *H. pylori*. El otro factor es la citotoxina vacuolizante, *vacA*, responsable de la formación *in vitro* de vacuolas en las células epiteliales.

Dentro de los principales genes asociados a virulencia esta el gen *oipA* que codifica una proteína proinflamatoria de membrana externa; favorece la adherencia, su mayor actividad es la inducción de inflamación local, estimulando la secreción de citocinas inflamatorias, básicamente la interleucina 8 (IL-8).

La IL-8 ha sido descrita como un factor quimiotáctico para neutrófilos y se produce en células epiteliales, fue caracterizada bioquímicamente por Yoshimura. Debido a que IL-8 comparte similaridad de secuencias aminoácidas y de función con un grupo de citocinas, éstas han sido agrupadas en una superfamilia de citocinas pro-inflamatorias denominadas quimiocinas.

Estas quimiocinas han sido divididas en dos subfamilias: la C-C, que se caracteriza porque estas moléculas tienen dos residuos de cisteína continuos en su estructura y son quimiotácticos principalmente para monocitos, y la C-X-C otra subfamilia, que tiene actividad quimiotáctica para neutrófilos y se caracteriza por tener dos residuos no continuos de cisteína, a excepción de dos de sus miembros, las quimiocinas IP-10 (Induced Protein), y la PF-4 (Factor Plaquetario 4), que teniendo estructura C-X-C son quimiotácticos para monocitos y no para neutrófilos o monocitos y es llamada linfotactina.

Para el diagnóstico existen métodos invasivos y no invasivos. Los primeros dependen de la obtención de una biopsia por endoscopia y los segundos no requieren de este procedimiento. Dentro de los métodos de diagnóstico en biopsia, esta la técnica de la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), para *H. pylori* tiene una sensibilidad y especificidad de 95 % y su principal ventaja es que se puede detectar al microorganismo sin importar la viabilidad de la bacteria en las muestras sino la presencia del DNA bacteriano. La especificidad de esta técnica viene dada por el uso de oligonucleótidos sintéticos, específicos para determinado gen y que facilitan la amplificación de una secuencia nucleotídica, que a su vez es específica para el *H. pylori*; es por esta razón que en los últimos años se ha diseñado una variedad de pruebas diagnósticas para esta bacteria por medio de PCR basándose en:

- Oligonucleótidos para identificar el gen de la ureasa A (*ureA*).
- Oligonucleótidos para identificar los genes que codifican el 16s ARN ribosomal (*16s rRNA*).
- Oligonucleótidos para identificar el gen de la fosfoglucoamin mutasa (*glmM*).

En este estudio se utilizaron biopsias gástricas de individuos con enfermedad gastroduodenal (gastritis no atrófica, lesiones pre-neoplásicas, úlcera duodenal y cáncer gástrico) de pacientes de Paraguay y México. Así mismo de cada muestra se llevó a cabo la extracción de DNA por el método de GES, posteriormente se realizó la genotipificación del gen 16s y del gen *oipA*, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mostrando que las biopsias de pacientes con úlcera duodenal y cáncer gástrico presentan con mayor frecuencia el gen *oipA* que las muestras de pacientes con gastritis no atrófica.

MARCO TEÓRICO

Helicobacter son bacterias con forma curva o espiral, descubiertas por Bizzozero en 1893 en el estómago de perros y gatos. En 1906, Kreintz y colaboradores, comunican el hallazgo de estos microorganismos en enfermos de cáncer gástrico y en 1940 Freedberg y Barron detectan la presencia de estas bacterias en el 40% de las muestras de gastrectomías ⁽¹⁾.

Sin embargo, fue hasta 1975 que se empezó a considerar seriamente una asociación entre bacterias espiriformes y patologías gástricas. En 1983 Warren y Marshall publicaron sus observaciones de biopsias de pacientes con problemas gastroduodenales teñidas con plata, en las que observaron la presencia de bacilos curvos; posteriormente, la aislaron y propusieron el nombre de *Campylobacter like organisms* (CLO). En 1985, Marshall se infecta personalmente con el microorganismo que denomina *Campylobacter pyloridis*, desarrollando un cuadro de gastritis. A partir de esta fecha, son numerosas las publicaciones que aparecieron en las que se comunican la presencia de la *Campylobacter pyloridis* en las biopsias gástricas ⁽²⁾.

Los estudios de secuenciación del ARN ribosómico de la bacteria pusieron de manifiesto que *Campylobacter pyloridis* era distinto de otras bacterias de este género por lo que se propuso un nuevo género y especie *Helicobacter pylori*. La diferencia morfológica más importante entre ambos géneros es que *Helicobacter* tiene flagelos envainados que terminan en una protuberancia.

En 1984, se publicó en la revista Lancet la asociación de *H. pylori* con la gastritis crónica y por primera vez se sugirió que la úlcera péptica pudiera ser de etiología infecciosa. En 1994 se efectuó una conferencia por los Institutos Nacionales de Salud de USA, donde *H. pylori* es declarado la principal causa de úlcera péptica y es en éste mismo año que la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) de la Organización Mundial de la Salud, declara que *H. pylori* es un cancerígeno tipo I de humanos ⁽³⁾.

Microbiología

En relación a sus características microbiológicas *H.pylori* presenta de 4 a 6 flagelos polares (figura 1). Puede definirse como un bacilo curvo Gram-negativo, oxidasa, catalasa y ureasa-positivo. Generalmente se presenta el crecimiento de colonias entre 5 y 7 días en medios sólidos, se requieren condiciones microaerofílicas (10% de CO₂) y medios artificiales ricos en nutrientes como: peptona, triptona, extracto de levadura, glucosa, sales como cloruro de sodio, bisulfito de sodio, suplementados además con sangre de caballo, polienriquecimiento, suero fetal bovino o combinaciones ⁽⁴⁾.

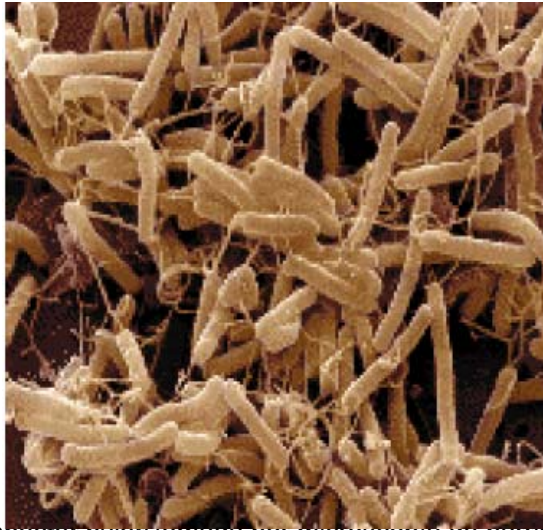


Figura 1.- Imagen de *Helicobacter pylori* tomada por microscopía de barrido (Tomada de Arturo Vizcaíno. *Helicobacter pylori* y enfermedad gastroduodenal. Bases para el Diagnóstico y Tratamiento. Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina, 2004. pp. 11-17)

Una característica importante de *H. pylori*, es la presencia de la enzima ureasa, esta enzima cataliza la hidrólisis de la urea en amonio y bióxido de carbono que protegen a la bacteria de los efectos letales del pH ácido del estómago.

El amonio es, sin embargo, tóxico para las células epiteliales, junto con otros productos de *H. pylori*, entre los que se incluyen a la proteasa, catalasa y fosfolipasa. Se ha sugerido que bajo estrés ambiental, *H. pylori* puede convertirse de su forma espiral a una cocoide; por lo que algunas investigaciones han sugerido que esta es una forma de resistencia del organismo ⁽⁵⁾.

La gran movilidad de estas bacterias es una propiedad clave para conseguir la colonización de la mucosa gástrica, obtenida gracias al grupo de flagelos que se presentan envainados, probablemente para protegerse de la acidez del entorno. Esta movilidad es un factor necesario para la virulencia de *H. pylori* ya que se ha comprobado que las cepas no móviles, no colonizan la mucosa gástrica. Esta bacteria coloniza el estómago del hombre y como característica especial es la colonización en forma de parches en la mucosa gástrica, permaneciendo en la mucosa por años o décadas. Las personas infectadas con este organismo tienen una inflamación crónica superficial difusa que involucra tanto al antro como al fondo gástrico; la asociación de *H. pylori* con diferentes patologías gástricas es altamente significativa ⁽⁶⁾.

Epidemiología

La infección con *H. pylori* se adquiere temprano en la vida. *H. pylori* infecta más del 50% de la población mundial, Las prevalencias son más altas en países en desarrollo que en países industrializados, lo que se ha asociado con el nivel sociocultural y económico de la población. En la adquisición de la bacteria influyen las condiciones de vida en la niñez más que las condiciones en la vida adulta ⁽⁸⁾.

Es posible que los individuos de países desarrollados vivieran una niñez en ambientes con condiciones higiénicas como las que hoy prevalecen en muchos países en vías de desarrollo. Tal patrón epidemiológico hace suponer

que la vía de infección es común y muy efectiva. En tal sentido se han propuesto por lo menos tres opciones de transmisión: oro-oral, oro-gástrica y fecal-oral^(9,10).

Transmisión oro-oral. La base de tal propuesta ha sido el hallazgo de *H. pylori* en placa dental, en saliva o bien la identificación de DNA en saliva; también se apoya en las reacciones positivas de ureasa en muestras de saliva; pero otras bacterias de la biota oral podrían dar esta prueba positiva, por lo que tal prueba no es muy aceptada⁽¹¹⁾.

Transmisión oro-gástrica. Esta posibilidad se apoya en la ocurrencia de algunos brotes asociados con manejo y desinfección inadecuada de endoscopios. Tal posibilidad llevaría también a relacionarle con el vómito, lo que en cierta medida podría explicar las altas tasas de infección en niños, ya que estos vomitan más frecuentemente que los adultos, además de que frecuentemente se llevan objetos a la boca^(12,13).

Transmisión fecal-oral. Esta vía explica más fácilmente la marcada diferencia en la prevalencia de *H. pylori* en países en desarrollo comparada con países desarrollados, cuyo patrón guarda un cierto paralelismo con las tasas de enfermedades diarreicas en esos mismos países. A pesar de que hay informes esporádicos sobre el aislamiento de la bacteria a partir de heces, e incluso se ha descrito el método para tal aislamiento, esos hallazgos no son sistemáticos, lo que representa un escollo para la verificación de esta hipótesis⁽¹⁴⁾.

Por otra parte, los métodos de PCR han permitido su identificación en heces; no obstante, estas técnicas han enfrentado limitaciones debido a metabolitos como polisacáridos ácidos que han llevado a resultados erráticos. Sin embargo, la identificación del genoma de esta bacteria en agua potable, tanto en países en desarrollo como en países industrializados, apoya la transmisión fecal de este agente⁽¹⁵⁾.

Patogenia

H. pylori se adapta fuertemente al nicho ecológico de la mucosa gástrica, debido a sus características que le permiten entrar al moco, desplazarse y adherirse a las células epiteliales, evadir la respuesta inmune y como resultado, la colonización y transmisión persistentes. La supervivencia del bacilo en la mucosa gástrica se lleva a cabo por una serie de mecanismos que incluyen: *adhesinas*, que le impiden ser arrastrado por el peristaltismo, la actividad ciliar o el recambio epitelial; enzimas bacterianas, como la *ureasa*, que transforma la urea en amonio, produciendo un microambiente alcalino que lo protege de la acidez gástrica, *lipasa* y *proteasa* que propician la desintegración del moco gástrico y la pérdida de la hidrofobicidad de la mucosa disminuyendo la capacidad de las células mucosas para secretar moco, *catalasa* y *superóxido dismutasa* como línea de defensa ante polimorfonucleares activados⁽³⁾.

H. pylori causa una inflamación crónica de la mucosa gástrica. La respuesta inflamatoria inicial consiste en el reclutamiento de neutrófilos, seguidos por linfocitos T y B, células plasmáticas y macrófagos. También participan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad que inducen la apoptosis de las células epiteliales. Los genes de *H. pylori* inducen la formación de IL-8 y otras quimiocinas que atraen a los neutrófilos, también está involucrado el factor de necrosis tumoral α (TNF α), la interleucina 1 β (IL-1 β) y el Interferón gamma (IFN- γ) incrementan la liberación de gastrina y de este modo inducen la producción de la secreción ácida, además el TNF α produce una disminución del número de células antrales. La infección aguda de *H. pylori* causa hipoclorhidria transitoria y se diagnostica raramente, ya que es asintomática^(5,7).

El curso clínico posterior es altamente variable y depende de factores bacterianos, ambientales y del huésped. Los pacientes con una secreción ácida elevada son más propensos de tener gastritis antral preferentemente, que los predispone a las úlceras duodenales. Los pacientes con una secreción ácida disminuida, generalmente desarrollan gastritis en el cuerpo del estómago, que los predispone a la úlcera gástrica y puede iniciar una secuencia de eventos que, en casos raros, conducen al carcinoma gástrico (figura 2). La infección de *H. pylori* induce la formación del tejido linfoide mucosa-asociado (MALT) en la mucosa gástrica. La relación causal entre esta infección y la úlcera gástrica o duodenal ha sido demostrada por la cura de la úlcera con la erradicación del bacilo⁽⁷⁾.



Desarrollo de gastritis	Histología gástrica	Histología duodenal	Secreción de ácido	Condición clínica
 Pangastritis	<ul style="list-style-type: none"> • Inflamación crónica • Atrofia • Metaplasia intestinal 	<ul style="list-style-type: none"> • Normal 	<ul style="list-style-type: none"> • Reducida 	<ul style="list-style-type: none"> • Úlcera gástrica • Cáncer gástrico
 Predominante antral	<ul style="list-style-type: none"> • Inflamación crónica • Actividad polimórfica 	<ul style="list-style-type: none"> • Metaplasia gástrica • Inflamación crónica activa 	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento 	<ul style="list-style-type: none"> • Úlcera duodenal

Figura 2.- La secreción ácida y el patrón de gastritis asociados desempeñan un papel importante en el resultado de la enfermedad en la infección por *H. pylori*. La figura muestra la correlación entre el patrón de colonización de *H. pylori*, inflamación, secreción de ácido, la histología gástrica y duodenal, y el resultado clínico. (Tomada de Johannes G. Kusters Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection Clinical Microbiology Reviews, Julio 2006, p. 449–490).

Enfermedades asociadas a la infección con *H. pylori* y sintomatología

Inmediatamente después de infectarse con *H. pylori*, la mayoría de las personas desarrolla gastritis, una inflamación del revestimiento del estómago. Sin embargo, la mayoría de las personas nunca tienen síntomas o problemas relacionados con la infección. Cuando los síntomas están presentes, pueden incluir ⁽¹²⁾:

- Dolor persistente, que puede:
 - ✚ Ocurrir dos o tres horas después de las comidas.
 - ✚ Aparecer y desaparecer por varios días o semanas.
 - ✚ Ocurrir por la noche cuando el estómago está vacío.
 - ✚ Aliviarse con las comidas.
- Pérdida de peso
- Pérdida del apetito
- Gases
- Eructos
- Náuseas
- Vómitos

Todos los infectados desarrollan gastritis crónica, que en la gran mayoría de los casos es asintomática. Únicamente entre el 10 al 20% desarrollarán una entidad clínica que incluye úlcera péptica (15%), cáncer gástrico (1-2%), linfoma MALT gástrico (menos del 1%).

La aparición de estas entidades clínicas dependen de la interacción entre las características genéticas del huésped, del medio ambiente y del genotipo de *H. pylori* infectante. Actualmente, no se conoce porque algunos individuos infectados desarrollan enfermedad y otros permanecen asintomáticos. En la mayoría de los casos, los procesos ulcerosos tienen sintomatología clínica con períodos de epigastralgia, ardor, dispepsia, entre otros, pero, en otras circunstancias, la enfermedad inicia con su complicación más frecuente, la hemorragia digestiva ⁽⁸⁾.

El desarrollo de úlceras en la presencia de *H. pylori* está influenciada por una variedad de factores del hospedero, la bacteria y el medio ambiente.

Úlcera duodenal

- Es más frecuente que la úlcera gástrica.
- Es mucho más frecuente en el varón que en la mujer.
- Se observa entre los 35 y los 55 años.
- Factor nervioso: personas inestables, depresivas, competitivas, ansiosas, irritables.
- Deben tenerse en cuenta los trastornos endócrinos: Síndrome de Zollinger-Ellison.

Úlcera gástrica

- Es menos frecuente que la úlcera duodenal.
- Es más frecuente en el sexo masculino.
- Aparece entre los 35 y los 64 años.

Síntomas: dolor epigástrico que tiene periodicidad y horario, es llamado dolor a cuatro tiempos, aparece después de las comidas, suele ceder espontáneamente antes de una nueva ingestión de alimentos; pirosis; vómitos pituitosos o alimentarios.^(4,7)

Cáncer gástrico

El cáncer gástrico es una de las enfermedades más severas que se han asociado a la infección con *H. pylori*. Actualmente esta entre los 10 cánceres más importantes a nivel mundial. Ocupa el segundo lugar por muertes por cáncer. México es un país con una tasa media de cáncer gástrico (16.5 x 100 000 habitantes) y Paraguay es un país con una tasa baja de cáncer gástrico (6 x 100 000) habitantes.

El cáncer gástrico temprano prácticamente es asintomático, en los estados avanzados, predominan la pérdida de peso y el dolor abdominal, también existen la disfagia, saciedad temprana, vómitos persistentes y anemia por los eventuales sangrados⁽²⁾.

Factores de virulencia

En la mayoría de los casos *H. pylori* tiene la capacidad de adaptarse al huésped que coloniza, generando un equilibrio dinámico con el mismo, de modo tal de asegurar su persistencia sin producir patología. En este equilibrio (coadaptación evolutiva) juegan un rol importante los factores de virulencia de la bacteria y el sistema inmunitario del huésped. Las patologías severas se desarrollan en individuos donde este equilibrio no puede ser preservado en el tiempo. Entre los factores de virulencia más importantes de este bacilo, se encuentran⁽¹³⁾:

Factores de adherencia.

La colonización de la mucosa lleva implícito como paso previo la capacidad de la bacteria para adherirse al epitelio gástrico, lo cual es esencial para la inducción de gastritis. Esta adherencia ocurre mediante la interacción entre las adhesinas bacterianas y los receptores del hospedero que están representados por algunas proteínas de la matriz extracelular. De tal manera que las lesiones inducidas por la adherencia son de tipo adhesión-esfacelación y ultraestructuralmente son similares a las producidas por *E. coli* enteropatógena (EPEC) ⁽⁶⁾.

Estas lesiones se caracterizan por la pérdida de las microvellosidades del epitelio gástrico en el sitio de adhesión, lo que conduce a la formación de una estructura similar a un pedestal de unos 5 nm de diámetro, con uniones estrechas entre la bacteria y la superficie celular, *H. pylori* infecta sólo mucosa de tipo gástrico, debido a esa estrecha relación con la excreción de urea y posiblemente a la expresión de receptores en ese epitelio. En las lesiones duodenales, la colonización inicial se realiza en focos de metaplasia gástrica y no en el epitelio intestinal, lo cual denota un alto grado de adaptación al nicho gástrico ^(3,4).

Similarmente, las lesiones extra-gástricas en las que se ha evidenciado la bacteria, siempre están asociadas con metaplasia gástrica, como es el caso del esófago de Barrett o en divertículos intestinales. Además, estudios *in vitro* demuestran que la adherencia es necesaria para la inducción y liberación de citocinas proinflamatorias ⁽⁹⁾; por lo tanto, la adherencia no debe ser considerada como un evento aislado si no más bien como parte de un proceso complejo que involucra quimiotaxis. Los múltiples flagelos y la morfología espiral de *H. pylori* enfatizan la importancia del movimiento dirigido, el cual está determinado por la detección de quimiotaxinas específicas del hospedero ⁽¹⁵⁾.

Ureasa

El jugo gástrico normal posee un pH < 4, el cual le confiere un carácter bactericida y por tanto capaz de eliminar a muchas de las bacterias que llegan al estómago con la ingesta de agua y alimentos, por ello se hace referencia al estómago como la "barrera ácida". Por lo tanto, la colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori*, implica la capacidad de esta bacteria para sobrevivir en ese ambiente ácido ⁽¹⁷⁾.

La clave para la adaptación al pH gástrico reside en la producción de ureasa ⁽¹³⁾. Esta enzima (urea amidohidrolasa) cataliza la hidrólisis de urea para proporcionar amonio y carbamato, el cual se descompone para producir otra molécula de amonio y ácido carbónico, con lo cual neutraliza el microambiente de las glándulas gástricas colonizadas. El efecto neto de esas reacciones es un aumento del pH. También explica el hecho de la asociación de la bacteria con los espacios intercelulares del epitelio gástrico, por los cuales se excreta urea (Fig. 3).

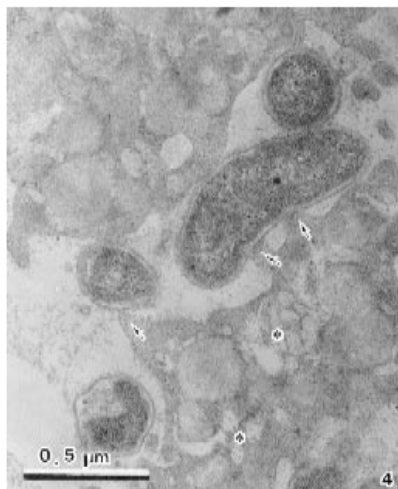


Figura 3.- Micrografía electrónica de transmisión de un corte ultrafino de una biopsia de antro gástrico de un paciente con gastritis crónica. Se aprecian 4 bacterias, 3 de ellas localizadas en un espacio intercelular distendido. Entre la bacteria cortada longitudinalmente y la célula epitelial aparecen dos estructuras en pedestal (flechas). Los asteriscos indican zonas vacuolizadas de la célula epitelial, lo que indica el efecto toxigénico de la bacteria *in vivo*. (Tomada de Francisco Rivas-Traverso, Francisco Hernández. *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. Revista Biomédica 2000; 11:187-205)

Por otra parte, el hidróxido de amonio generado durante la hidrólisis de urea contribuye significativamente al daño histológico asociado con esta infección; aunque debe enfatizarse que directamente el amonio no es tóxico, si no que el daño infringido es el resultado del ión hidróxido generado por el equilibrio del amonio con el agua. Éste desdobra el moco gástrico, haciéndolo más fluido, con lo cual la bacteria puede desplazarse más fácilmente, para ganar los espacios intercelulares ⁽¹⁰⁾.

La actividad de la urea también puede ser responsable indirectamente del daño tisular mediante su interacción con el sistema inmune, estimulando el estallido respiratorio de neutrófilos. Ello se ha demostrado experimentalmente con células intactas de *H. pylori*, las cuales son capaces de cebar e inclusive causar una activación directa del estallido respiratorio de leucocitos neutrófilos polimorfonucleares (PMN), monocitos y además, ejerce acción sobre otras células inflamatorias mediante liberación de citocinas proinflamatorias e intermediarios del oxígeno reactivo que participan en el proceso inflamatorio ⁽¹⁵⁾.

La infección por *H. pylori* en la mucosa gástrica esta caracterizada por una respuesta inflamatoria con infiltración de neutrófilos, linfocitos, monocitos y células plasmáticas. La migración inicial y activación de células inflamatorias en la mucosa gástrica dependerá de la producción de varias citocinas proinflamatorias, especialmente interleucina 8 (IL-8), una potente proteína quimotáctica de neutrófilos, producida por células epiteliales gástricas ⁽²¹⁾. Entre los factores de virulencia mas conocidos se encuentran:

- LA ISLA DE PATOGENICIDAD *cag* (*cag-PAI*): segmento genómico de 40 Kb con un conjunto de 30 genes que codifican un sistema de secreción tipo IV, por el cual se inyecta a las células del huésped la proteína CagA. Produce alteraciones morfológicas humanas *in vitro* y estimula la producción de citocinas inflamatorias locales.
- LOS GENES *babA* y *sabA*: codifican adhesinas, facilitan la adherencia a células del epitelio gástrico y la colonización. En algunos casos, también influyen en el estímulo de la secreción de citocinas proinflamatorias locales.
- EL GEN *oipA* o HopH: tiene un peso de 34 kDa y es otro miembro de la familia Hop, codifica la llamada proteína proinflamatoria de membrana externa exponiendo a una variación fenotípica (Guanina o Citosina). También actúa favoreciendo la adherencia, aunque su mayor actividad es la inducción de inflamación local, estimulando la secreción de citocinas inflamatorias, básicamente la interleucina 8 (IL-8). Al parecer tanto *oipA* y *CagA* activan en conjunto el factor regulador de Interferon 1 (IRF-1)⁽²⁰⁾.

OipA originalmente se ha identificado como una proteína proinflamatoria, dado que las mutantes isogénicas de OipA reducen la inducción de IL-8 de las células epiteliales gástricas como MKN45, AGS y KATO- III. El mecanismo para inducir IL-8 por OipA ha sido estudiado, se observó que *oipA* participa en la inducción del factor regulador de interferón (IRF)-1 y activa el elemento de respuesta estimulada por interferón (ISRE) como elemento promotor de IL-8⁽²¹⁾.

Estudios recientes muestran que OipA esta involucrado en la activación de muchos factores de transcripción incluyendo al factor nuclear (NF)- κ B, el factor activador de proteína (AP)-1, ISRE y proteína de unión al elemento de respuesta al adenosin monofosfato cíclico (CRE). Una visión general de lo anterior se muestra en la figura 4.

Existe evidencia de que OipA puede servir también como una adhesina. Un reporte inicial la involucro con adhesión a la línea de células epiteliales gástricas AGS y KATO III. Sin embargo la afinidad de OipA con las células epiteliales gástricas no es tan fuerte como se ha demostrado con otras adhesinas como HopZ⁽¹⁷⁾.

Estudios sobre la relación entre la infección por *H. pylori* y la IL-8 se han enfocado sobretodo en la isla de patogenicidad *cag* (PAI). La presencia de una *cag-PAI*, *oipA*, genotipo *vacAs1* o *babA* funcional se relacionan con el riesgo de úlcera duodenal y con un aumento en la producción de IL-8; varios de los genes de *cag-PAI* participan en la inducción de IL-8 y consecuentemente en la respuesta inflamatoria. Sin embargo, también existen datos que sugieren que *cag-PAI* no es el único factor capaz de promover la secreción de IL-8 en *H. pylori*⁽¹⁹⁾.

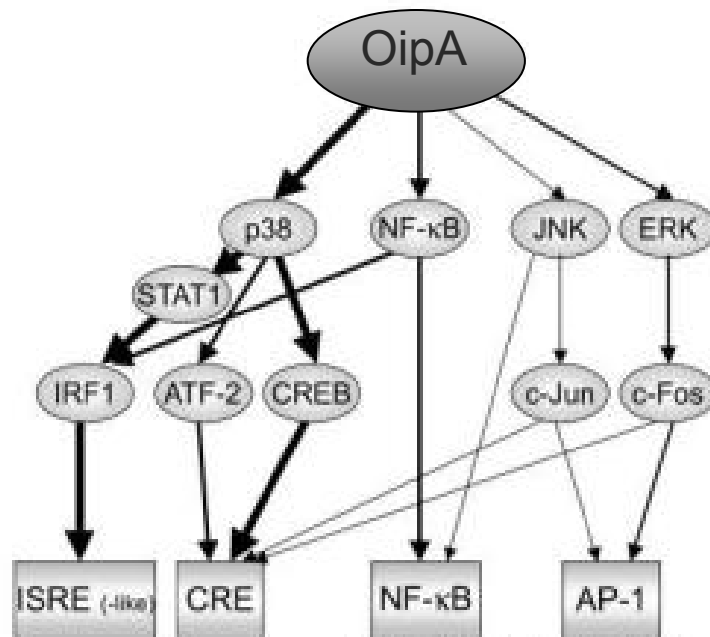


Figura 4.- Modelo hipotético para transducción de señales de OipA en células epiteliales del hospedero infectado con *H. pylori*. Las líneas gruesas representan la vía principal independiente de los genes blanco y de *H. pylori*. AP-1: proteína activadora 1; CRE: elemento de respuesta al adenosin monofosfato cíclico (AMPC); CRE: proteína de unión; quinasa ERK; IRF: factor regulador de interferón; ISRE: elemento de respuesta estimulada por interferón; JNK: quinasa Jun- N-terminal; NF: factor nuclear κ B; STAT: transductores de señal y activadores de transcripción. (Tomada de Yamaoka, Yoshio. *Helicobacter pylori*. Molecular Genetics and Cellular Biology. Ed. Caister Academic Press, Texas, 2008, pp.55)

Otro estudio recientemente informó que en una cepa de *H. pylori* inducida *in vivo* desarrolló cáncer gástrico en mongoles gerbos. Dado que la cepa es fácilmente transformable, se utilizó esta para aislarla como un prototipo para definir el papel de los factores de virulencia (*cagA* y *oipA*) de *H. pylori* inducida para la inflamación y el cáncer gástrico ⁽¹⁹⁾.

Además, un análisis de regresión lineal múltiple mostró que *oipA* funcional está significativamente asociado a una alta concentración de *H. pylori*, una severa infiltración de neutrófilos y una alta producción de IL-8 en mucosa gástrica ($P < 0.001$). En contraste la condición funcional de *oipA* fue independiente de la atrofia y metaplasia intestinal ⁽²¹⁾.

Hay muchos factores de virulencia de *H. pylori* que podrían influir en el riesgo de un paciente de desarrollar diferentes enfermedades gastroduodenales relacionadas con esta bacteria. Yamaoka y colaboradores en 2006, observaron que aislados de *H. pylori cagPAI* positivos frecuentemente también tenían el gen *oipA* "on", a pesar de que el gen está ubicado fuera de la isla de patogenicidad ⁽²⁰⁾. Se requieren otros estudios para comprobar el significado de este hallazgo.

Algunas cepas de *H. pylori cagPAI*-negativas producen IL-8 a partir de líneas celulares como MKN45, AGS, y KATO III, usualmente con niveles bajos,

igualmente en biopsias de pacientes se han detectados niveles bajos de la citocina. Sin embargo en algunos casos *cagPAI*-negativos los niveles de IL-8 son superiores a los de *cagPAI*-positivos. En conjunto, estas observaciones sugieren la presencia de un factor de virulencia diferente a *cag-PAI* que participa en la inducción de IL-8⁽¹⁸⁾.

- EL GEN *vacA*: codifica la citotoxina vacuolizante, que causa alteraciones celulares *in vitro*. También participa en la internalización celular de la bacteria, impidiendo la formación de fagosomas. Por último, actúa a nivel inmunitario, bloqueando la presentación antigénica y suprimiendo la activación de las células T.

En cuanto al sistema inmunitario es de tipo celular, por lo que juegan un rol importante los mediadores químicos de inmunidad, secretados tanto por macrófagos o células epiteliales gástricas. Entre los cuales se presentan:

1. Mediadores proinflamatorios: son básicamente las IL- 1- β , IL- 8 y TNF- α , entre otros.
2. Mediadores antiinflamatorios: son entre otros la IL-10, el receptor antagonista de interleucina 1 (IL-1).

Estos mediadores pueden ser secretados en mayor o menor grado; y esto dependerá de:

1. El estímulo de los factores de virulencia sobre las células inmunitarias.
2. Los polimorfismos genéticos hereditarios propios de cada individuo para estos genes.

La búsqueda de los factores causantes de ulceración se ha intensificado en los últimos años, señalándose entre ellos a la ureasa bacteriana, adhesinas y la producción de una toxina vacuolizante.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En las enfermedades gastroduodenales como úlcera duodenal y cáncer gástrico participan factores del hospedero, de virulencia de la bacteria y ambientales. Diversos factores de virulencia de *H. pylori*, como la isla de patogenicidad (*cagPAI*) y *vacA s1m1* han sido relacionados a enfermedad severa, La presencia de *H. pylori* en el epitelio gástrico ocasiona un proceso inflamatorio que todavía no esta totalmente entendido, se sabe que el gen *oipA* participa en la inducción de IL-8, una citocina altamente quimioattractante y su presencia podría estar relacionada con enfermedades gastroduodenales severas como úlcera duodenal y cáncer gástrico.

OBJETIVOS

- ✚ Determinar la frecuencia del gen *oipA* en biopsias gástricas de individuos con enfermedad gastroduodenal (gastritis no atrófica, lesiones pre-neoplásicas, úlcera duodenal y cáncer gástrico) de pacientes de Paraguay.
- ✚ Comparar la frecuencia del gen *oipA* de *H. pylori* entre individuos de México (cepas) y pacientes de Paraguay (biopsias).

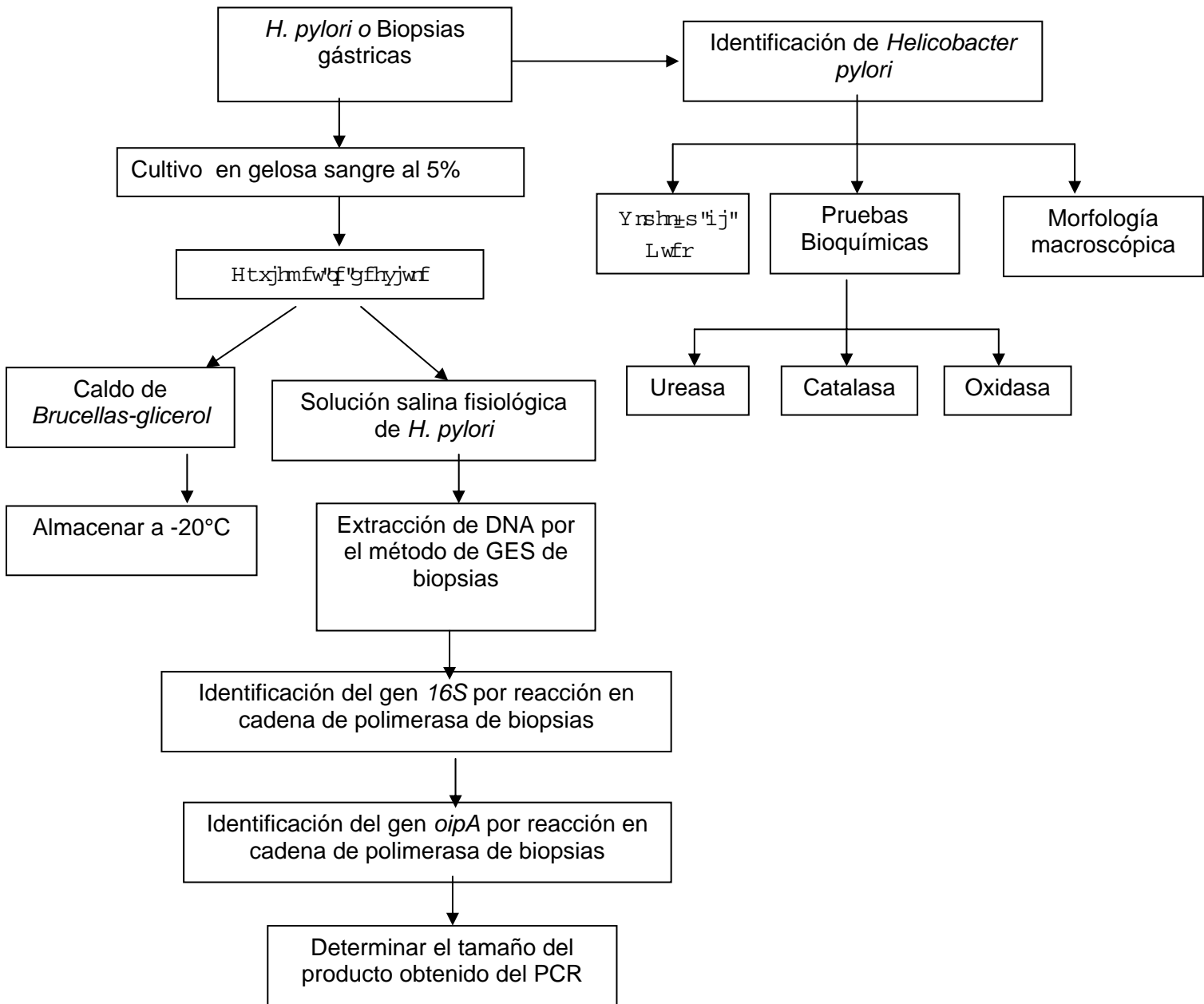
HIPÓTESIS

La mayor frecuencia del gen *oipA* será en las biopsias de pacientes con úlcera duodenal y cáncer gástrico. Por lo que al comparar la frecuencia del gen *oipA* entre individuos de México (cepas) y pacientes de Paraguay (biopsias) se espera que exista una diferencia estadística significativa debido al tipo de alimentación que existe en ambos países, además de que México se considera de mediana incidencia de cáncer gástrico y Paraguay con baja incidencia.

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

- ✚ Tipo de estudio: Transversal, Observacional, Retrolectivo y Comparativo.
- ✚ Población de estudio: 116 biopsias de pacientes con enfermedad gastroduodenal de Paraguay.
- ✚ Criterios de inclusión.
 1. Pacientes con indicación médica de endoscopia por sintomatología de enfermedad gastroduodenal.
 2. Que no hayan recibido tratamiento antimicrobiano o de inhibidores de la bomba de protones un mes previo al estudio.
 3. Que no tengan enfermedades como diabetes o autoinmunes como cáncer diferente al del estudio.
- ✚ Variables.
 1. Dependiente: *oipA*.
 2. Independiente: Biopsias gástricas de Paraguay y gen obtenido de las cepas de México.

Diagrama de Flujo



MATERIAL

1) Biológico:

- a) 116 Biopsias gástricas de pacientes con enfermedad gastroduodenal.
- b) Gen obtenido de cepas de individuos de México.

2) Laboratorio:

- a) Tubo Eppendorf de 1.5 mL, tubos Eppendorf de 400 μ L, micropipeta de 100-1000 μ L, micropipeta de 20-200 μ L, micropipeta de 0.5-10 μ L, puntas para micropipetas, matraz Erlenmeyer de 50 mL, homogenizador con pistilo, vaso de precipitados de 600 mL, probeta de 30 mL, pipeta de 10 mL, pipeta de 5 mL.
- b) Reactivos: GES (Tiocianato de guanidina 59.1g, 20 mL de solución stock de EDTA 0.5 M pH 8, 5 mL de N-Lauroyl-Sarcosine al 10%, aforado a 100 mL de agua desionizada), TE (0.2 mL solución stock de Tris 1 M pH 8, 98.8 mL de solución stock de EDTA 1 M pH 8), TAE 1X(40 mM de Tris, 20 mM de ácido acético, 1 mM EDTA), etanol al 70%, solución salina, acetato de amonio, cloroformo, isopropanol, agarosa, bromuro de etidio, marcador de peso molecular (1 Kb plus), agua desionizada.
- c) Equipo: Termociclador Eppendorf, aparato SYNGENE (procesador de imágenes para geles) con luz ultravioleta, microcentrífuga MPW-55, equipo de electroforesis (fuente de alimentación, cubeta y puente), vortex (Fisher Vortex Genie), incubadora Graft, pHmetro (CG 840 B).

METODOLOGÍA

1. Extracción de DNA de las biopsias por el método de GES.

- ❖ Cosechar y resuspender en 1 mL de solución salina una placa de cultivo.
- ❖ Centrifugar la suspensión a máxima velocidad por 5 min.
- ❖ Desechar el sobrenadante y resuspender el paquete celular en 100µL de TE.
- ❖ Adicionar 400µL de GES, mezclar suavemente a temperatura ambiente y colocar en hielo.
- ❖ Adicionar 200µL de solución de acetato de amonio, previamente enfriado, mezclar y dejar en hielo durante 5 min.
- ❖ Adicionar 680µL de cloroformo, mezclar y centrifugar a máxima velocidad por 5 min.
- ❖ Remover la fase acuosa y adicionar 320µL de isopropanol, mezclar y dejar precipitar durante 5min.
- ❖ Centrifugar a máxima velocidad por 1 min.
- ❖ Lavar el paquete celular con 800µL de etanol al 70% y centrifugar por 1 min a máxima velocidad.
- ❖ Dejar secar por 10 min en incubación a 43°C.
- ❖ Disolver con 100µL de TE.
- ❖ Verificar la pureza del DNA por medio de electroforesis. Mezclar 5µL de la muestra con 1µL de buffer de muestra. La electroforesis se corre en geles de agarosa al 1% a 100v el tiempo que sea necesario para observar las bandas.
- ❖ Almacenar a -20°C.

2. Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) utilizando iniciadores de RNA 16s específicos para identificar *H. pylori*.

3. PCR para determinar la presencia del gen *oipA* en las muestras positivas a RNA 16s.

- a) Se coloca 1 μ L de muestra de DNA en un tubo Eppendorf especial para PCR y se adiciona 24 μ L de mezcla de reacción de PCR que consiste en:

Concentración final	24 μ L
Buffer de PCR 10x con cloruro de magnesio 50 mM 1x	2.5 μ L
Cloruro de magnesio 50 mM 1.5 mM	0.75 μ L
Mezcla de dNTPs 10 mM 0.2 mM c/u	0.5 μ L
Mezcla de primers 25 μ M c/u 0.5 μ M	0.5 μ L
Taq DNA polimerasa 5U/ μ L 2.5 unidades	0.25 μ L
Agua desionizada estéril	19 μ L

- b) Se colocan los tubos en el termociclador Eppendorf con las siguientes condiciones: a 94°C por 5 minutos, 52°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y por último a 72°C por 10 minutos para una extensión final durante 32 ciclos. Se utiliza como control positivo la cepa J99 y como control negativo agua desionizada estéril. Para la amplificación de los controles positivos y negativos se utiliza el marcador de peso molecular de 1 Kilobase Plus para la secuencia completa del gen.

Tabla 1. Primers utilizados para la genotipificación de *oipA*.

Gen	Primer	Secuencia del primer 5' - 3'	Tamaño y ubicación del producto
<i>oipA</i>	SO 102	CAAGCGTTAACAGATAGGC	870 pb ⁽¹⁶⁾
	SO 103	GCTTCACGAGAAAACGCCTT	
16S	Estándar	GGAGTACGGTCGCAAGATTTAA	130 pb ⁽²⁴⁾
		CTAGCGGATTCTCTCAATGTCAA	

4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100V teñido con bromuro de etidio.
5. Visualizar con luz ultravioleta en el aparato SYNGENE (procesador de imágenes para geles).

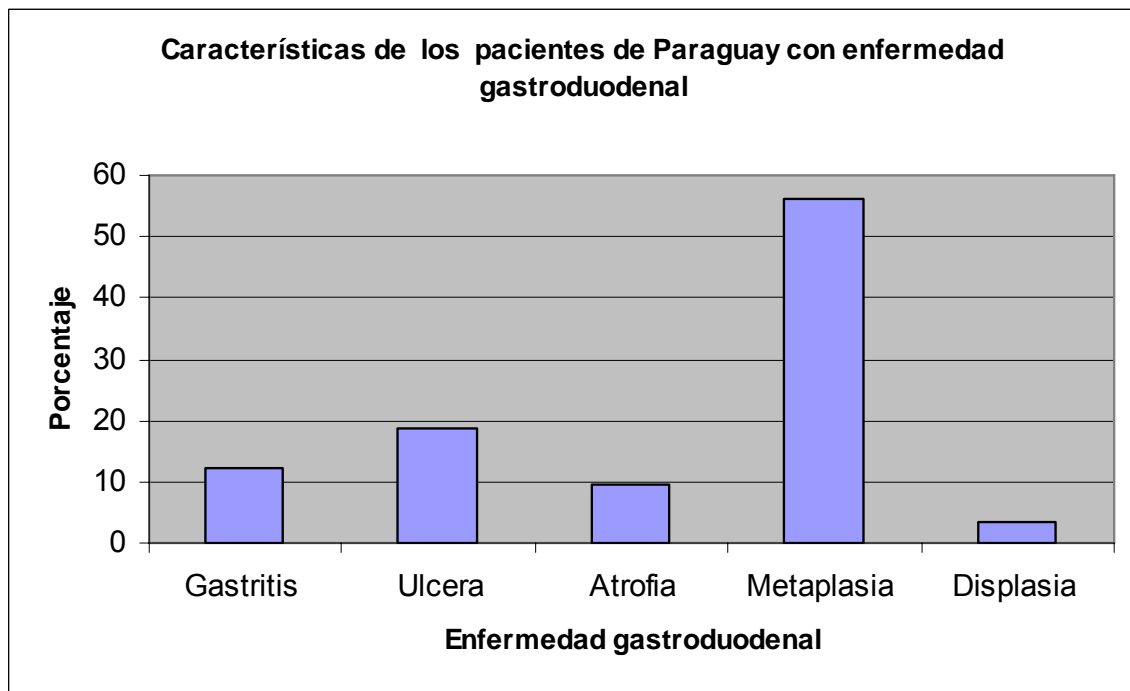
Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron estudiando medidas descriptivas, frecuencias, porcentajes, valores, promedio, desviación estándar (\pm DE) y como prueba de comparación se empleó la prueba exacta de Fisher cuando fue necesario. Para todos los análisis estadísticos se consideró una diferencia significativa cuando el valor de p era menor de 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Tabla 1. Características de los pacientes de Paraguay con enfermedad gastroduodenal.

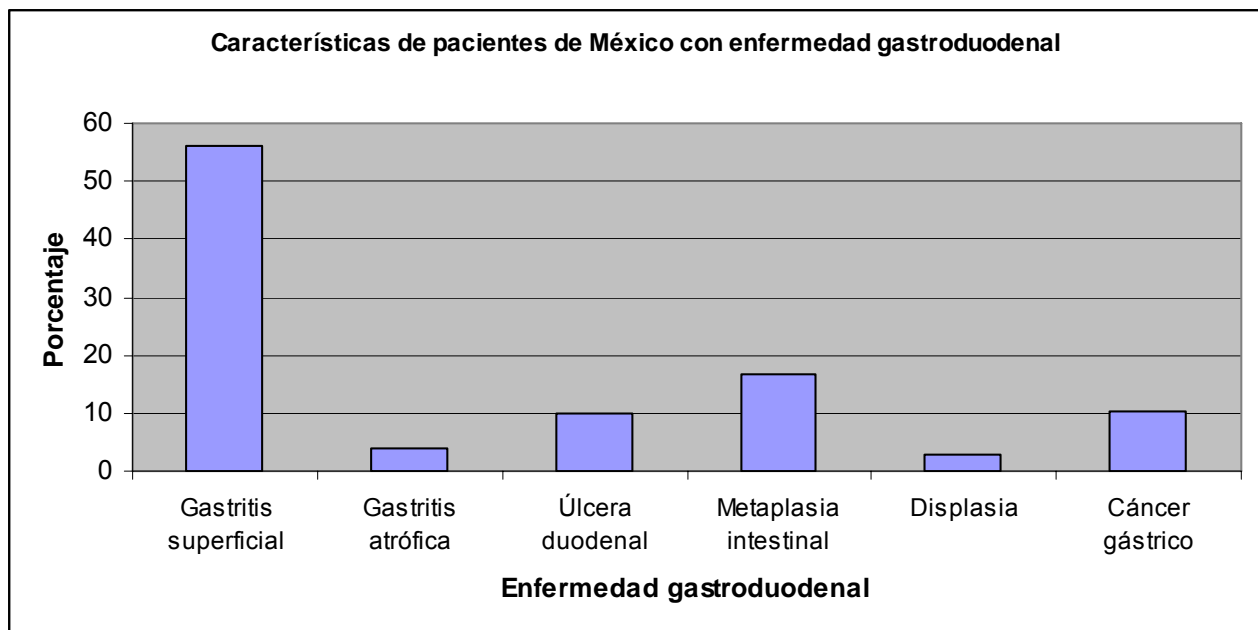
Padecimiento	Número de pacientes	Promedio de edad (rango)	Desviación estándar (+ DE)	Sexo (M/F)
Gastritis no atrófica	14	53.7 (24-69)	14.04	12/2
Úlcera duodenal	22	52.4 (23-68)	12.9	17/5
Atrofia	11	44.3 (30-61)	10.7	7/4
Metaplasia intestinal	65	46.6 (15-73)	13.1	36/29
Displasia	4	47.5 (40-51)	5.2	3/1



Gráfica 1. Características de los pacientes de Paraguay con enfermedad gastroduodenal.

Tabla 2. Características de pacientes de México con enfermedad gastroduodenal.

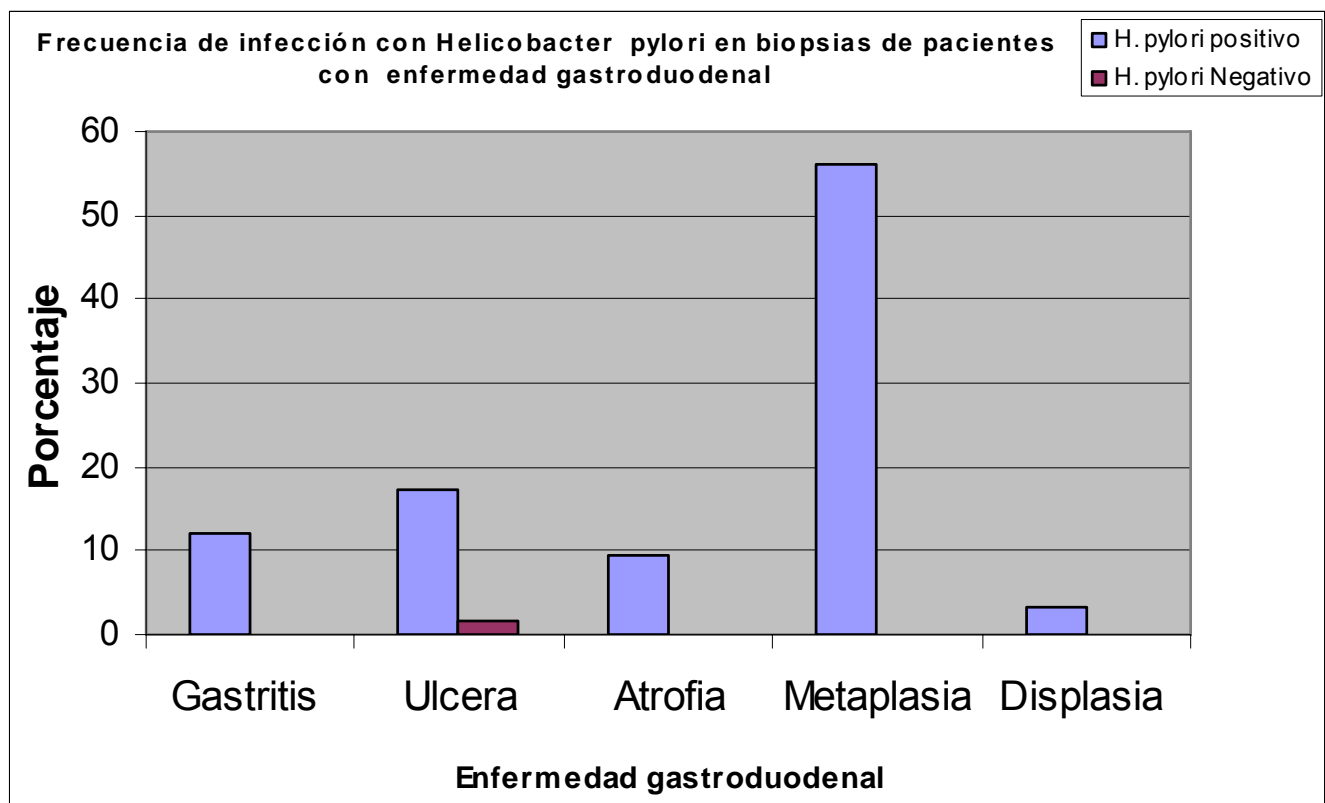
Padecimiento	Número de pacientes	Promedio de edad (rango)	Desviación estándar (+ DE)	Sexo (M/F)
Gastritis superficial	350	48.1 (30-92)	14.6	144/206
Gastritis atrófica	25	50.3 (30-75)	16.2	13/12
Úlcera duodenal	62	50.7 (25-80)	14.5	32/30
Metaplasia intestinal	103	56.6 (30-81)	17.9	36/67
Displasia	18	62.8 (39-88)	18.1	9/9
Cáncer gástrico	65	60.4 (28-86)	16.9	39/26



Gráfica 2. Características de pacientes de México con enfermedad gastroduodenal.

Tabla 3. Frecuencia de infección con *Helicobacter pylori* en biopsias de pacientes con enfermedad gastroduodenal.

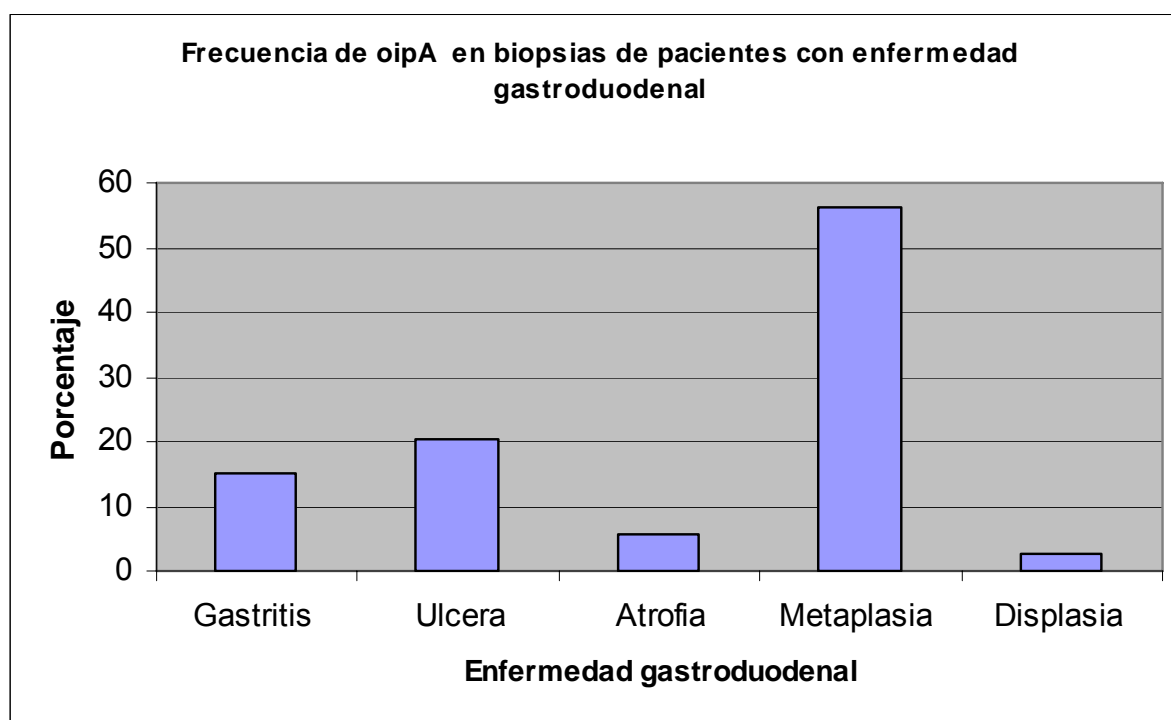
Padeamiento	<i>H. pylori</i> Positivo			<i>H. pylori</i> Negativo		
	Promedio de edad (años)	Desviación estándar (\pm DE)	Sexo Masc/Fem	Promedio de edad (años)	Desviación estándar (\pm DE)	Sexo Masc/Fem
Gastritis	53.7	14.04	12/2	-	-	-
Úlcera	50.8	12.6	15/5	68	0	2/0
Atrofia	44.3	10.7	7/4	-	-	-
Metaplasia	46.6	13.1	36/29	-	-	-
Displasia	47.5	5.2	3/1	-	-	-



Gráfica 3. Frecuencia de infección con *Helicobacter pylori* en biopsias de pacientes con enfermedad gastroduodenal.

Tabla 4. Frecuencia del gen *oipA* de *H. pylori* en biopsias de pacientes con enfermedad gastroduodenal.

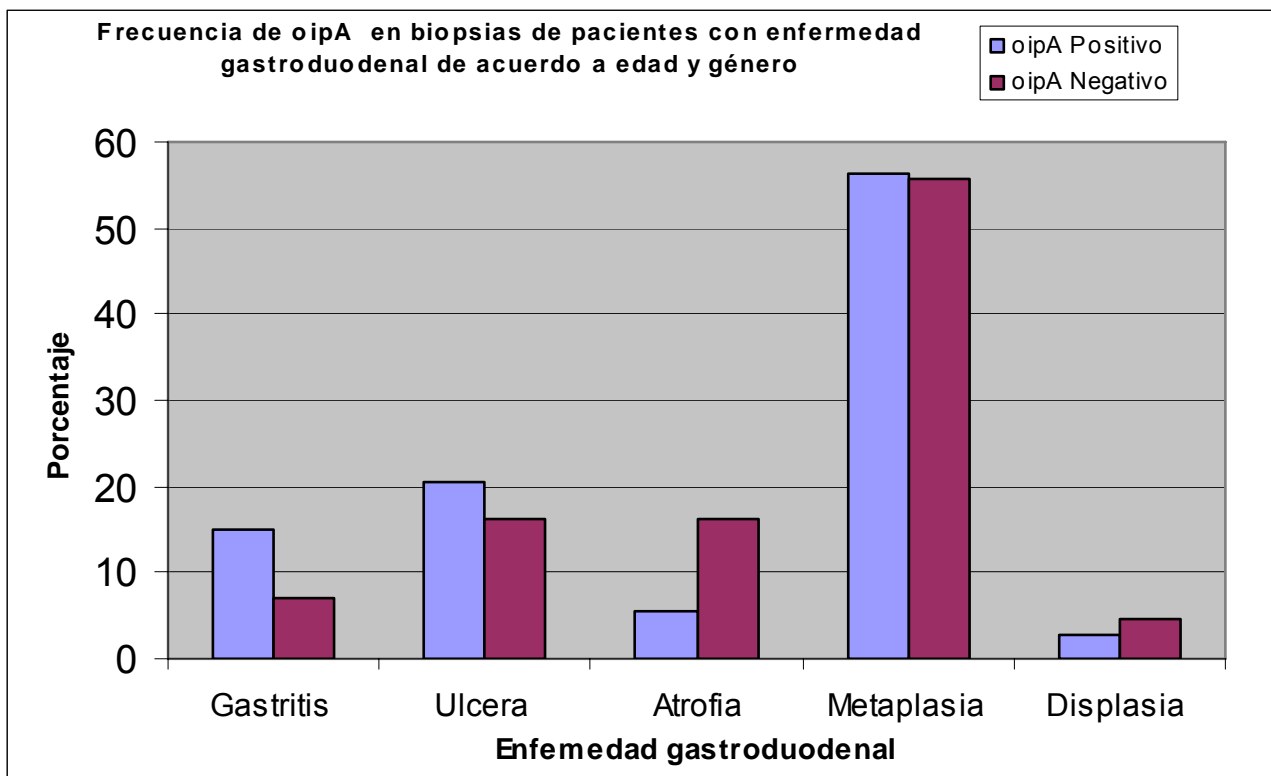
Padecimiento	Frecuencia	Promedio de edad (años)	Desviación estándar (\pm DE)	Sexo Masc/Fem
Gastritis	11	53.8	15.8	9/2
Úlcera	15	52.7	9.7	12/3
Atrofia	4	48.5	12.7	2/2
Metaplasia	41	47.7	13.9	22/19
Displasia	2	45.5	7.8	2/0



Gráfica 4. Frecuencia del gen *oipA* de *H. pylori* en biopsias de pacientes con enfermedad gastroduodenal.

Tabla 5. Frecuencia del gen *oipA* en biopsias de pacientes con enfermedad gastroduodenal de acuerdo a edad y género.

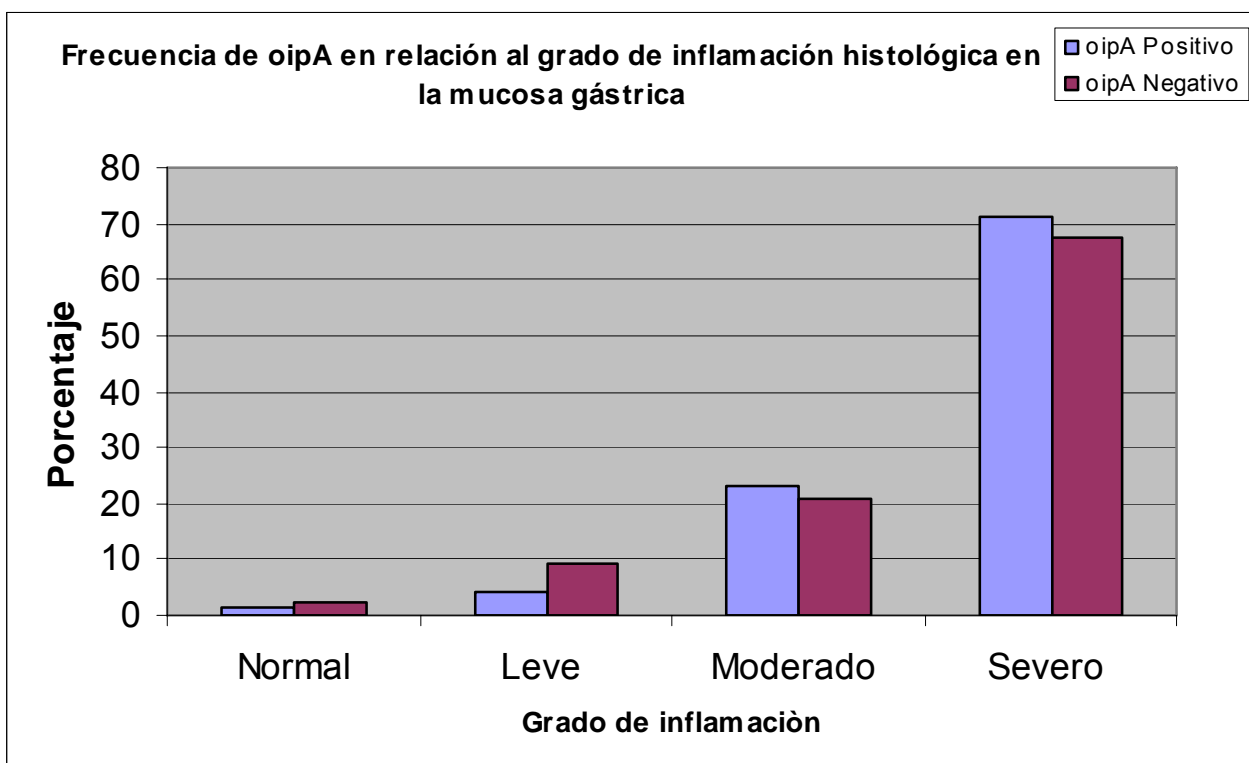
Padecimiento	<i>oipA</i> Positivo			<i>oipA</i> Negativo		
	Promedio de edad (años)	Sexo Masc/Fem	Desviación estándar (+ DE)	Promedio de edad (años)	Sexo Masc/Fem	Desviación estándar (+ DE)
Gastritis	53.8	9/2	15.8	54.3	3/0	2.4
Úlcera	52.7	12/3	9.7	51.7	5/2	19.3
Atrofia	48.5	2/2	12.7	41.9	5/2	9.6
Metaplasia	47.2	22/19	13.9	44.7	14/10	11.3
Displasia	45.5	2/0	7.8	49.5	1/1	2.1



Gráfica 5. Frecuencia del gen *oipA* en biopsias de pacientes con enfermedad gastroduodenal de acuerdo a edad y género.

Tabla 6. Frecuencia de *oipA* en relación al grado de inflamación de la mucosa gástrica

Grado de inflamación	<i>oipA</i> Positivo		<i>oipA</i> Negativo	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Normal	1	1.3	1	2.3
Leve	3	4.1	4	9.3
Moderado	17	23.3	9	20.9
Severo	52	71.3	29	67.5



Gráfica 6. Frecuencia de *oipA* en relación al grado de inflamación de la mucosa gástrica.

Tabla 7.- Frecuencia del gen *oipA* de *Helicobacter pylori* en biopsias de pacientes de Paraguay con enfermedad gastroduodenal

	Gastritis n=14	Úlcera duodenal n= (22)	Lesiones pre- neoplásicas n= (80)
<i>oipA</i>	11* (78.57%)	15* (68.18%)	47* (58.75%)

* = **p >0.05** (gastritis vs UD y lesiones pre-neoplásicas)

Tabla 8. Frecuencia del gen *oipA* de *H. pylori* en cepas aisladas de pacientes de México.

	Gastritis n= (135)	Úlcera duodenal n= (42)	Lesiones pre- neoplásicas n= (32)	Cáncer gástrico n= (38)
<i>oipA</i>	52 [†] (39.2%)	36 [‡] (85%)	26 [‡] (81.3%)	32 [‡] (85%)

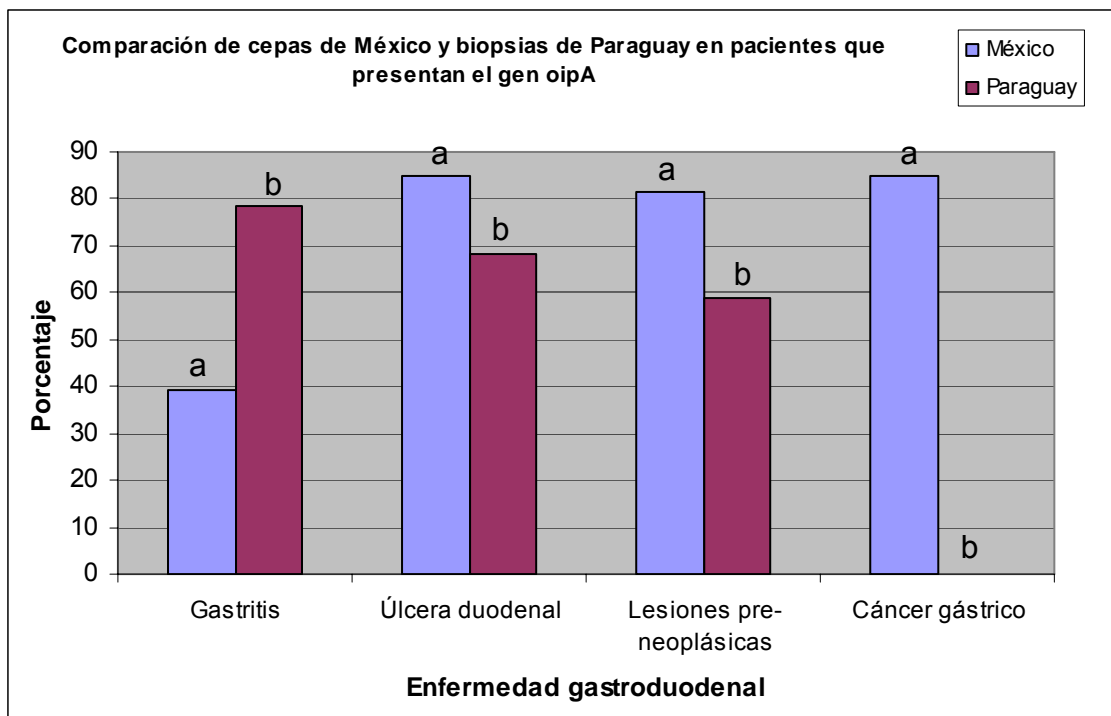
[†] **p=0.04**

[‡] **p<0.001**(gastritis vs UD y lesiones pre-

neoplásicas)

Tabla 9. Comparación de cepas de México y biopsias de Paraguay en pacientes que presentan el gen *oipA*.

Padecimiento	México	Paraguay
Gastritis	52/135 (39.2%)	11/14 (78.57%)
Úlcera duodenal	36/42 (85%)	15/22 (68.18%)
Lesiones pre- neoplásicas	26/32 (81.3%)	47/80 (58.75%)
Cáncer gástrico	32/38 (85%)	-



Gráfica 9. Comparación de cepas de México y biopsias de Paraguay en pacientes que presentan el gen *oipA*. Letras diferentes sobre las barras ($a \neq b$) indican diferencia estadística significativa.

Figuras de PCR

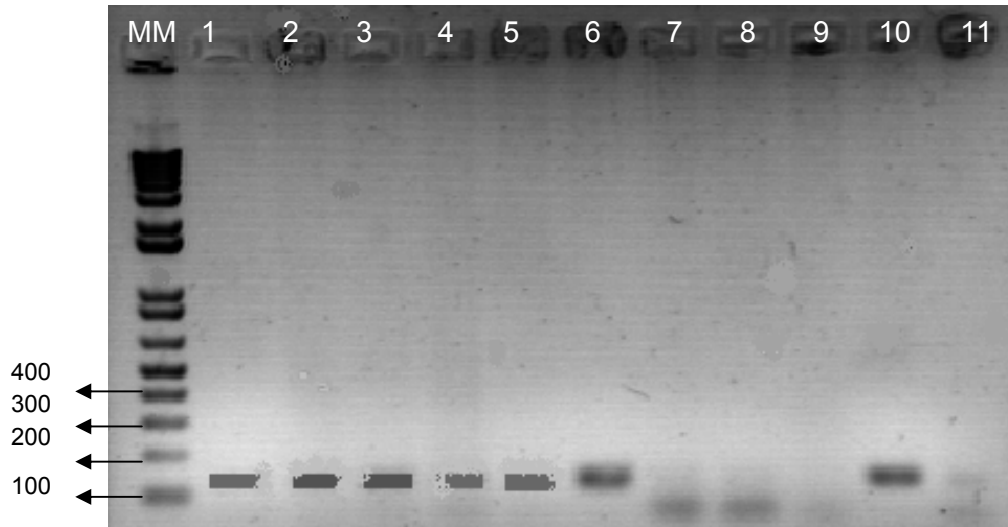


Figura 1. PCR de *H. pylori* para observar la presencia del gen 16S. Líneas 1-6 biopsias positivas (excepto líneas 7, 8, 9) para el gen 16S con un producto de 140 pb aproximadamente utilizando un marcador de peso molecular (MM) de 1 Kb Plus DNA; línea 10 control positivo (cepa J99); línea 11 (agua) control negativo.

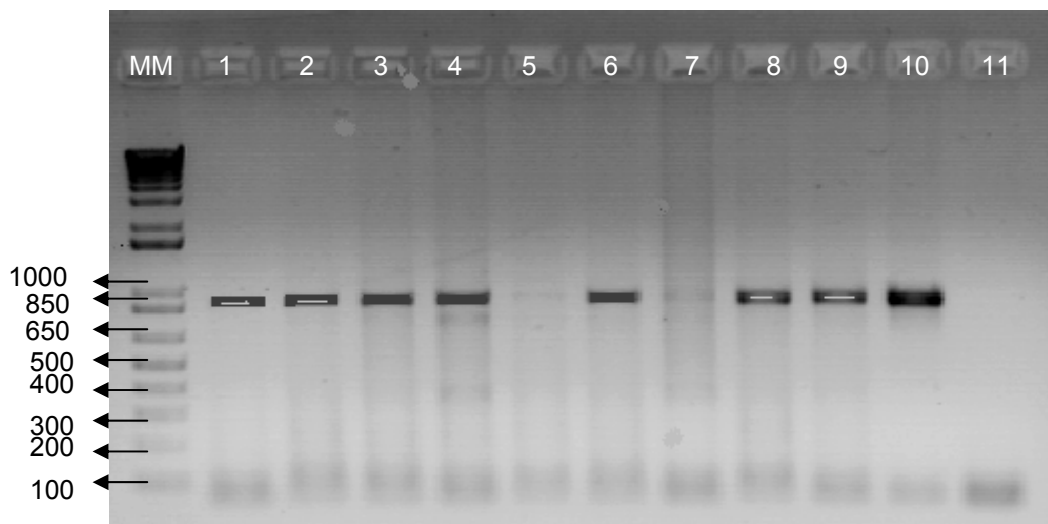


Figura 2. PCR de *H. pylori* para observar la presencia del gen *oipA*. Líneas 1-9 biopsias positivas (excepto líneas 5 y 7) para el gen *oipA* con un producto de 870 pb aproximadamente utilizando un marcador de peso molecular (MM) de 1 Kb Plus DNA; línea 10 control positivo (cepa J99); línea 11 (agua) control negativo.

DISCUSIÓN

Helicobacter pylori es considerada la bacteria causante de enfermedades gastroduodenales como gastritis, úlcera gástrica, atrofia e inclusive cáncer gástrico, por lo cual es muy importante conocer a fondo su genoma. Sabemos que se ha descrito el genoma completo de dos cepas (J99 y 26695) y sabemos que se han encontrado diferentes factores de virulencia y su presencia se ha asociado a enfermedades gastroduodenales severas como úlcera duodenal y cáncer gástrico, entre los más estudiados se encuentran los genes *cagA* y *vacA*. Sin embargo se sabe de hay otros genes de virulencia en *H. pylori*, por lo que se ha continuado con el estudio de estos factores y su posible relación con la enfermedad.

En el presente trabajo se identificó el gen *oipA*, miembro de la familia Hop, el cual codifica una proteína proinflamatoria de membrana externa, exponiendo a una variación fenotípica (Guanina o Citosina). También actúa favoreciendo la adherencia, aunque su mayor actividad es la inducción de inflamación local, estimulando la secreción de citocinas inflamatorias, básicamente la interleucina 8 (IL-8).

En este trabajo se utilizaron 116 biopsias de pacientes con enfermedad gastroduodenal de Paraguay de las cuales el 63% presentan el gen *oipA*. Se sabe que la presencia de *H. pylori*, casi invariablemente induce un proceso inflamatorio crónico que hasta ahora no esta totalmente entendido, pero que puede llevar a cambios importantes en la mucosa gástrica que pueden ir de gastritis no atrófica → gastritis atrófica → metaplasia → displasia → cáncer gástrico o ulcera duodenal o gástrica.

Paraguay es un país con baja incidencia de cáncer gástrico por lo que es interesante estudiar *oipA* un gen de *H. pylori* que se asocia a la respuesta inflamatoria y que se ha identificado que su frecuencia es mayor en cepas de pacientes con lesiones precancerosas y cáncer gástrico. En las biopsias de Paraguay, país con baja incidencia de cáncer gástrico se encontró una frecuencia de 63% del gen *oipA*, en cepas de México (59%) con mediana incidencia de cáncer gástrico y en cepas de *H. pylori* de pacientes de Colombia se reporta una frecuencia de 74% del gen *oipA*, este último país tiene alta incidencia de este padecimiento. La frecuencia observada tanto en Paraguay como en México de este gen es similar y la frecuencia es mayor en lo publicado para Colombia.

Entre las causas que se asocian al cáncer gástrico se incluyen además de la presencia de *H. pylori* virulentas, factores de riesgo genéticos esto se ha observado en familiares de pacientes con cáncer gástrico (incidencia 2-3 veces mayor, grupo sanguíneo A), alimentación: pescados secos y salados, alimentos muy condimentados, carnes rojas, entre otros, ingestión de alcohol, de bebidas calientes, de nitrato de sodio, tabaco masticado y anemia perniciosa (20 veces más frecuente que en sujetos normales).

Las biopsias de individuos de Paraguay presentaron un 62.93% de frecuencia total de *oipA*, este porcentaje nos dice que un poco mas de la mitad de las bacterias aisladas de estos individuos tienen presente al gen, sin embargo con lo realizado en este estudio no podemos saber si el gen esta encendido o apagado. Desglosando este porcentaje entre cada una de las enfermedades procedentes encontramos que la mayor frecuencia del gen se ubica en los pacientes con gastritis, esto es contrario a lo esperado ya que este grupo se considera el grupo con el padecimiento menos severo de todos los individuos estudiados. Además comparando los resultados del grupo de gastritis con ulcera y lesiones pre-neoplásicas encontramos que no fueron estadísticamente significativas las diferencias observadas.

En las cepas de *H. pylori* aisladas de biopsias de pacientes mexicanos encontramos diferencias significativas entre las cepas de pacientes con gastritis, comparando con las de ulcera duodenal y lesiones pre-neoplásicas. Es difícil explicar estas diferencias ya que no existen trabajos anteriores que reporten la presencia de este gen tanto en cepas de Paraguay como México, este sería el primer reporte en el que se incluyan resultados de ambos países. Lo que podemos decir es que el gen *oipA*, gen relacionado con cáncer en cepas de Japón y Colombia, muestra diferencias en frecuencia entre muestras de pacientes de Paraguay y México. Para conocer su participación en inflamación y enfermedad serían necesarios otros estudios como secuenciarlo para confirmar si esta encendido o apagado y su relación con enfermedad en un mayor numero de muestras.

CONCLUSIONES

- El gen *oipA* de *H. pylori* se encuentra presente en biopsias de individuos de Paraguay en una frecuencia de 63%.
- El gen *oipA* se observó más frecuentemente en biopsias de individuos con metaplasia intestinal.
- El gen *oipA* se observó más frecuentemente en biopsias de individuos con inflamación severa.
- El gen *oipA* se observó con mayor frecuencia en biopsias de pacientes Paraguayos con gastritis y en los pacientes Mexicanos se observó mayor frecuencia de este gen en las cepas de úlcera, lesiones pre-neoplásicas y cáncer gástrico.

ANEXOS

Adenocarcinoma: "Adeno" es un prefijo que significa "glándula". El adenocarcinoma es un tumor canceroso que aparece en las células glandulares que revisten algunos órganos internos.

Adhesina: Componente de la superficie celular o apéndice de bacterias que facilitan adhesión a otras células o a superficies inanimadas. La mayoría de las fimbrias de bacterias gram negativas funcionan como adhesinas, pero en muchos casos son subunidades menores de proteínas en la punta de las fimbrias que son las adhesinas reales. En las bacterias gram positivas, una proteína o una capa superficial de polisacárido sirve como adhesina específica.

Apoptosis: Tipo de muerte celular en la que una serie de procesos moleculares en la célula conducen a su muerte. Este es el proceso normal mediante el cual el cuerpo se deshace de células innecesarias o anormales. El proceso de apoptosis puede estar impedido en las células cancerosas. También se llama muerte celular programada.

Atrofia: Disminución en el desarrollo, volumen y actividad de los músculos y tejidos de un órgano.

Citocina: Sustancia elaborada por las células del sistema inmunitario. Algunas citocinas pueden estimular la respuesta inmunitaria y otras pueden suprimirla. Las citocinas también se pueden producir en el laboratorio por medio de la tecnología del ADN recombinante y usarse para tratar distintas enfermedades, incluso el cáncer.

Citotoxina: Sustancia que tiene efectos tóxicos sobre ciertas células. Un anticuerpo puede actuar como una citotoxina.

Disfagia: Dificultad para tragar.

Dispepsia: Trastorno gástrico que dificulta la digestión.

Displasia: Anomalía en el desarrollo de un órgano.

Epigastralgia: Dolor en epigastrio, siendo ésta la región situada en la parte anterior, superior y central del abdomen.

Epigastrio: Región del abdomen o vientre, que se extiende desde la punta del esternón hasta cerca del ombligo, y queda limitada en ambos lados por las costillas falsas. (Sobre el vientre).

Esfacelación: Mortificarse o gangrenarse un tejido.

Factor de necrosis tumoral (TNF): Es una sustancia química del grupo de las citocinas que es liberada por células del sistema inmune.

Factor Plaquetario 4 (PF-4): Proteína de las plaquetas que neutraliza la actividad antitrombótica de la heparina.

Fagosoma: Vesícula citoplasmática limitada por una membrana, formada por la invaginación de material fagocitado. Se fusiona con los lisosomas para formar los fagolisosomas dentro de los cuales las enzimas hidrolíticas del lisosoma digieren el material fagocitado.

Gastrectomía: Cirugía para extirpar total o parcialmente el estómago.

Gastrina: Hormona que liberan células especiales del revestimiento del estómago después de comer. La gastrina hace que el estómago libere un ácido que ayuda a digerir los alimentos

Gastritis atrófica: Es la inflamación crónica del estómago acompañado por una atrofia de la mucosa gástrica y destrucción de las glándulas pépticas.

Hipoclorhidria: Reducción del ácido clorhídrico libre o combinado en el jugo gástrico.

Interferon gamma (IFN- γ): Modificador de la respuesta biológica (sustancia que puede mejorar la respuesta natural del cuerpo a las infecciones y otras enfermedades). El interferón impide la multiplicación de las células cancerosas y puede retardar el crecimiento de un tumor.

Interleucina-1 β (IL-1 β): Pertenece a un grupo de proteínas relacionadas que elaboran los leucocitos (glóbulos blancos) y otras células del cuerpo. Principalmente los macrófagos, un tipo de glóbulos blancos, elaboran la interleucina-1 y esta ayuda a otro tipo de glóbulos blancos, los linfocitos, a combatir infecciones. También ayuda a que los leucocitos pasen a través de las paredes de los vasos sanguíneos y lleguen a los sitios de la infección; además, causa fiebre porque afecta zonas del cerebro que controlan la temperatura del cuerpo. Hay dos formas de interleucina-1, alfa y beta, que actúan de la misma manera.

Interleucina-8 (IL-8): Citocina producida por diversos tipos de células implicadas en la inflamación, que atrae y activa los neutrófilos. Su síntesis se realiza en fibroblastos, célula endotelial, monocito y macrófagos. Es un potente factor quimiotáctico de neutrófilos, regula la producción de proteínas de adhesión y la formación de lípidos bioactivos; amplifica la respuesta inflamatoria local.

Interleucina-10: Es una citocina con propiedades antiinflamatorias capaz de inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias por los linfocitos T y los macrófagos.

Isogénico: Relativo a un individuo o tipo de célula que tiene el mismo genotipo que otro.

Linfoma MALT (Tejido Linfoide Asociado a Mucosas): Es un linfoma tipo B extranodal del tejido linfoide asociado con la mucosa. Se define también como Infoma de células B de la zona marginal extranodal tipo MALT.

Metaplasia: Cambio en la forma que toman algunas células que, por lo general, no es normal en las células del tejido al que pertenecen.

Oligonucleótido: Secuencia lineal de nucleótidos unidos por enlaces fosfo-diéster, habitualmente no mayor de 50 nucleótidos.

Polimorfonuclear: Leucocito que tiene un núcleo con varias lobulaciones o segmentos, unidos por un fino filamento. Puede ser neutrófilo, basófilo o eosinófilo.

Peristaltismo: Movimiento ondulatorio de los músculos del intestino u otros órganos tubulares que se caracteriza por la contracción y relajación alternadas de los músculos que impulsan hacia adelante lo que contienen

Púrpura trombocitopénico: Es una causa frecuente de trombocitopenia y complicaciones hemorrágicas en adultos y niños. Se le ha definido como una trombocitopenia aislada, mediada por autoanticuerpos, no asociada a otras condiciones o factores que puedan causar trombocitopenia.

Quimiocina: Grupo de citocinas pro-inflamatorias, de bajo peso molecular (8-10 kDa) que tienen la capacidad de atraer y activar los leucocitos. Pueden dividirse en al menos tres ramas estructurales: C (QUIMIOCINAS, C), CC (QUIMIOCINAS, CC), y CXC (QUIMIOCINAS, CXC).

Quimiotaxinas: Sustancias químicas que atraen o repelen a células u organismos. El concepto especialmente denota aquellos factores liberados como resultados del daño tisular, invasión o actividad inmunológica, que atraen leucocitos, macrófagos, u otras células al sitio de infección o insulto

Quimiotaxis: Tendencia de las células a moverse en dirección determinada por la influencia de estímulos químicos. Sinónimo: quimiotropismo.

Trombocitopenia: Afección en la cual hay un número menor que el normal de plaquetas en la sangre. Puede llevar a sufrir de moretones con facilidad y a demasiado sangrado de las heridas, o al sangrado de las membranas mucosas y otros tejidos.

Úlcera péptica: Una úlcera presente en el estómago se llama úlcera gástrica y en el duodeno úlcera duodenal y ambas se conocen con el nombre de úlceras pépticas.

REFERENCIAS

1. Cullen DJ, Collin BJ, Christiansen BJ *et al.* When is bacterial *Helicobacter pylori* infection acquired? *Gut* 1997; 34:1861-2.
2. Axon, ATR. Transmission of *Helicobacter pylori*. *Yale J Biol Med* 1997; 70:1-6.
3. Krajden S, Fuksa M, Anderson J, *et al.* Examination of human stomach, saliva, and dental plaque for *Campylobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1397-8.
4. Ferguson D, Patel NR, Mayberry WR, *et al.* Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. *J Clin Pathol* 1993; 31:2802-4.
5. Nguyen AM, Engstrand L, Genta RM, *et al.* Detection of *H pylori* in dental plaque by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31:783-7.
6. Li CF, Ha TZ, Ferguson DA, *et al.* A newly developed PCR assay of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy, saliva and faeces. Evidence of high prevalence of *Helicobacter pylori* in saliva support oral transmission. *Digest Dis Sci* 1996; 41:2142-9.
7. Notarnicola N, Russo F, Cavallini A, *et al.* PCR identification of *Helicobacter pylori* DNA faeces from patient with gastroduodenal pathology. *Med Sci Res* 1996; 24:785-7.
8. Nilsson HO, Aleljung P, Nilsson I, *et al.* Immunomagnetic bead enrichment and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in humans stools. *J Microbiol Meth* 1996; 27:73-9.
9. Grubel P, Huang L, Masubuchi N, *et al.* Detection of *Helicobacter pylori* DNA in houseflies (*Musca domestica*) on three continents. *Lancet* 1998; 352:788-9.
10. Sharma SA, Tumuru MKR, Blaser M. Characterization of gastric epithelial cell IL-8 induction by *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1994; 89:A244.
11. Crowe SE, Alvarez L, Dytoc M, *et al.* Expression of interleukin 8 and CD54 by human gastric epithelium after *Helicobacter pylori* infection *in vitro*. *Gastroenterology* 1995; 108:656-74.
12. Koneman EW, Allen SD, Janda WM. Diagnóstico microbiológico. 5ª ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1999: 317-331.

13. Torres J, Leal Y, Pérez G, *et al.* A Community-Based Seroepidemiologic Study of *Helicobacter pylori* Infection in Mexico. *J Infect Dis* 1998, 178: 1089-1094.
14. Cerezo S, Gutiérrez GR. Diagnóstico microbiológico, serológico, genotipificación de *Helicobacter pylori* aislado de biopsias de niños y adultos. Detección molecular de la isla de patogenicidad *cag* de *Helicobacter pylori*. *Rev Latin Microbiol* 2006; 48 (2): 99-104.
15. Karp G. *Biología Celular y Molecular*, editores. 1ª ed. México: MacGraw-Hill Interamericana; 1996. p.p 717- 46.
16. Quiroga AJ, Cittelly D, Bravo M. Frecuencia de los genotipos *babA2*, *oipA* y *cagE* de *Helicobacter pylori* en pacientes colombianos con enfermedades gastroduodenales. *Biomédica* vol.25 no.3, Laboratorio de Inmunología, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, D. C., Colombia. Sept. 2005.
17. Johannes G. Kusters Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. Vol. 19 No. 3, *Clin Microbiol Rev* 2006, pp. 449–90.
18. Shao S, Wang H. Research progress on *Helicobacter pylori* outer membrane protein. *World J Gastroenterol* 2005; 11(20):3011-13.
19. Franco AT, Johnston J. Regulation of Gastric Carcinogenesis by *Helicobacter pylori* Virulence Factors. *Cancer Res* 2008; pp. 379-387.
20. Yamaoka Y, Kwon DH, and Graham D. A Mr 34,000 proinflammatory outer membrane protein (*oipA*) of *Helicobacter pylori* 2000, *PNAS*, Vol. 97 7533–38.
21. Yamaoka Y. *Helicobacter pylori*. *Molecular Genetics and Cellular Biology*. Ed. Caister Academic Press, Texas, 2008. pp 53-57.
22. Vizcaíno A. *Helicobacter pylori* y enfermedad gastroduodenal. Bases para el Diagnóstico y Tratamiento. *Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina*, 2004. pp. 11-17
23. Piñol F. Cáncer Gástrico: Factores de Riesgo. *Rev. Cubana de Oncol.* 1998; 14(3):171-79.
24. Boonjakuakul Jenni K., Canfield Don R., Solnick Jay V. Comparison of *Helicobacter pylori* Virulence Gene Expression In Vitro and in the Rhesus Macaque. *Infection and immunity*, American Society for Microbiology, Vol. 73, No. 8, 2005, p. 4895–4904.