



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

"PREVALENCIA DE *Helicobacter pylori* cagA⁺ EN
PACIENTES QUE PRESENTAN GASTRITIS, ÚLCERA
PÉPTICA Y PROCESOS GÁSTRICOS MALIGNOS"

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:
INGRID JUDITH MORENO LEAL

ASESOR: M. en C. ANDREA A. BECERRIL OSNAYA

ASESOR: M. en C. ANA LAURA VAZQUEZ MARTÍNEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Páginas
I) Índice	I
II) Índice de figuras	III
III) Índice de gráficas	IV
IV) Índice de tablas	V
V) Abreviaturas	VI
VI) Resumen	VIII
1.- Introducción	1
1.1 Reseña Histórica	1
1.1.1 Clasificación del género	2
1.2 Morfología de <i>Helicobacter pylori</i>	2
1.3 Métodos de diagnóstico	5
1.4 Genoma bacteriano	7
1.5 Isla de patogenicidad	9
1.6 Características bioquímicas	12
1.7 Patogénesis	13
1.7.1 Dinámica de la infección	13
1.7.2 Proceso de daño tisular	14
1.7.3 Factores de virulencia	14
1.8 Vías de transmisión	24
1.9 Epidemiología	25
1.10 Patologías	26
1.10.1 Gastritis	27
1.10.2 Úlcera péptica	28
1.10.3 Cáncer gástrico	29
1.11 Tratamiento	31
2.- Hipótesis	33
3.- Justificación	33

4.- Objetivo general	34
4.1 Ojetivos particulares	34
5.- Obtención de muestras biológicas	35
6.- Materiales y métodos	36
6.1 Reactivos	36
6.2 Soluciones	36
6.3 Cepas de referencia	36
6.4 Equipos	37
6.5 Esquema de trabajo	38
6.6 Aislamiento e identificación de <i>Helicobacter pylori</i>	39
6.6.1 Aislamiento a partir de biopsias gástricas	39
6.6.2 Conservación de muestras	39
6.7 Genotipificación del gen ureC y cagA	40
6.7.1 Extracción de DNA por el método Wizard Genomic	40
6.7.2 Reacción en cadena de la polimerasa PCR	42
6.7.3 Identificación de los productos de PCR	43
7.- Resultados	44
7.1 Aislamiento e identificación de <i>Helicobacter pylori</i>	44
7.2 Genotipificación de ureC por PCR	46
7.3 Genotipificación de cagA por PCR	47
8.- Discusión	50
9.- Conclusiones	55
10.- Referencias bibliográficas	56
11.- Anexo	64
11.1 Reactivos	64
11.2 Soluciones	65
11.3 Medios de cultivo utilizados	66
11.4 Identificación bioquímica de <i>Helicobacter pylori</i>	68

INDICE DE FIGURAS

	páginas
Figura 1. Morfología colonial de <i>Helicobacter pylori</i> en agar sangre	2
Figura 2. Morfología de espiral o sacacorchos de <i>Helicobacter pylori</i>	3
Figura 3. Tinción de gram de bacilos curvos de <i>Helicobacter pylori</i>	4
Figura 4. Morfología microscópica de <i>Helicobacter pylori</i> en medios artificiales	4
Figura 5. Genoma de <i>Helicobacter pylori</i>	8
Figura 6. Isla de patogenicidad	9
Figura 7. Isla de patogenicidad PAI-cag	10
Figura 8. Vías metabólicas de <i>Helicobacter pylori</i>	12
Figura 9. Factores de virulencia de <i>Helicobacter pylori</i>	18
Figura 10. Unión de adhesinas a antígenos de Lewis	19
Figura 11. Inducción de la respuesta inmune por <i>Helicobacter pylori</i>	20
Figura 12. CagA inyectándose a las células epiteliales	21
Figura 13. Colonización de células epiteliales	21
Figura 14. La proteína CagA	22
Figura 15. <i>Helicobacter pylori</i> y sus pares de flagelos	23
Figura 16. Esquema de la reacción de la urea	23
Figura 17. Cadena epidemiológica de la infección	24
Figura 18. Historia natural de la infección causada por <i>Helicobacter pylori</i>	26
Figura 19. Modo de infección de <i>Helicobacter pylori</i>	28
Figura 20. Identificación de los productos de PCR en agarosa al 2% del gen ureC	46
Figura 21. Identificación de los productos de PCR en agarosa al 2% del gen cagA	49

INDICE DE GRÁFICAS

	páginas
Gráfica 1. Número de biopsias trabajadas por diagnóstico	44
Gráfica 2. Pacientes con gastritis positivos para la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	45
Gráfica 3. Pacientes con úlcera péptica positivos para la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	45
Gráfica 4. Pacientes con linfoma positivos para la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	45
Gráfica 5. Pacientes con cáncer gástrico positivos para la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	45
Gráfica 6. Frecuencia de <i>Helicobacter pylori</i> en pacientes con diversas enfermedades gastroduodenales	46
Gráfica 7. Frecuencias de cepas de <i>Helicobacter pylori</i> <i>cagA</i> ⁺ en pacientes con diversas enfermedades gastroduodenales	47
Gráfica 8. Pacientes infectados con cepas de <i>Helicobacter pylori</i> que expresan el gen <i>cagA</i>	47
Gráfica 9. Pacientes infectados por cepas <i>Helicobacter pylori</i> <i>cagA</i> ⁺ con cultivos mixtos	48
Gráfica 10. Frecuencia de pacientes que presentan cultivos mixtos (<i>cagA</i> ⁺ y <i>cagA</i> ⁻)	49

INDICE DE TABLAS

	páginas
Tabla 1. Clasificación de los métodos de diagnóstico	6
Tabla 2. Tratamiento para la enfermedad causada por <i>Helicobacter pylori</i>	32
Tabla 3. Mezcla de la reacción para genotipificar ureC y cagA por PCR	42
Tabla 4. Número de biopsias totales trabajadas por cada enfermedad gastroduodenal	44
Tabla 5. Resultados de la frecuencia y % de enfermedades gastroduodenales en pacientes infectados por <i>Helicobacter pylori</i>	45
Tabla 6. Resultados de la prevalencia de <i>Helicobacter pylori</i> en pacientes con diversas enfermedades gastroduodenales	46
Tabla 7. Prevalencia del gen cagA en pacientes infectados por <i>Helicobcater pylori</i>	47
Tabla 8. Número de pacientes infectados por <i>Helicobacter pylori</i> cepas cagA ⁺ que presentan cultivo mixto	48

ABREVIATURAS.

AP1.- Factor activador de la proteína 1

C.- Citosina

°C.- Grados Centígrados

cag A.- Gen que codifica para la proteína cag A.

c-SCr.- cinasas

Cag A.- Proteína inmunogénica codificada por cag A.

Cag PAI.- Isla de patogenicidad cag.

CMN.- Centro Médico Nacional

CO₂.- Dióxido de carbono.

DNA. Acido desoxirribonucleico.

ENA-78.- Proteína 78 activadora de neutrofilos.

G.- Guanina.

GRO- α .- Oncogen relacionado con el crecimiento

gr.- Gramos.

HP-NADpendiente

hr.- Horas.

ICAM-1.- Molécula de adhesión intracelular

IFN- γ .- Interferón γ .

Ig A.- Inmunoglobulina A.

Ig H.- Inmunoglobulina H.

IL.- Interleucina.

iNos.- sintetasa inducible de Acido Nítrico

Kb.- Kilobases.

KDa.- Kilo Dalton.

L.- Litros.

Lyn .- cinasa de la familia Scr.

Lyso- PAF.- precursor del factor activador plaquetario

LPS.- Lipopolisacarido
Mb.- Megabases.
MCH.- Complejo de histocompatibilidad II.
mg.- Miligramos.
Min.- Minutos.
M.- Molar.
mM.- Milimolar.
NF – KB.- Factor nuclear Kappa-Beta.
Nm.- Nanometros
%.- Porciento.
PAI.- Isla de patogenicidad.
PAF.- factor activador plaquetario.
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.
ROS.- Especies de oxigeno reactivas.
Rpm.- Revoluciones por minuto.
SDS.- Dodecil-sulfato de sodio.
Seg.- Segundos.
SOD.- Superóxido Dimutasa.
TAE.- Tris-Acetato-EDTA.
TEMED.- N´N´N´N-Tetrametiletilendiamina.
TNF- α .- Factor de Necrosis Tumoral α .
Ure A.- Subunidad hexamérica A de la ureasa.
Ure B.- Subunidad hexamérica B de la ureasa.
V.- Voltios.
Vac A.- Citotoxina vacuolizante.

VCAM-1.- Molecule of adhesion molecular to endothelium 1

μg .- Micrograms.

μL .- Microliters.

μm .- Micrometers.

RESUMEN

Helicobacter pylori infecta de manera crónica la mucosa gástrica de casi la mitad de la población mundial. Todos los pacientes infectados presentan gastritis histológica. Aunque la infección es asintomática en aproximadamente el 85%. En el 15% de la población infectada, la infección se asocia con el desarrollo de úlcera péptica o cáncer gástrico, el cual es la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial. La infección a largo plazo empieza en la niñez y frecuentemente progresa a una gastritis crónica activa a una gastritis atrófica, la cual es el precursor histológico de un adenocarcinoma gástrico. Cerca del 60-82% de las cepas de *Helicobacter pylori* contienen una isla de patogenicidad de 37 Kb llamada cagPAI. Los pacientes infectados con tales cepas tienen mucho mayor probabilidad de desarrollar úlcera péptica o cáncer gástrico en relación a los pacientes infectados con cepas cagPAI negativas, el gen cagA ha sido considerado un marcador específico para esta isla de patogenicidad el cual se identifica por el método de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y además es un factor de virulencia importante para esta bacteria.

Se tomaron dos biopsias, una de antro y otra de cuerpo de los pacientes que presentaban diversas enfermedades gástricas (gastritis, úlcera péptica, linfoma y cáncer gástrico) para saber si estaban infectados con *Helicobacter pylori* y si eran cagA⁺ o cagA⁻. Se analizaron en total 241 biopsias pertenecientes a 121 pacientes de las cuales 79 pertenecían a pacientes con gastritis, 16 a pacientes con úlcera péptica, 8 a pacientes con linfoma y 18 eran de pacientes cáncer gástrico. Se realizó la tipificación por PCR del gen ureC para saber si los pacientes estaban infectados por esta bacteria, después a las muestras positivas para *Helicobacter pylori* se le realizó genotipificación de cagA por PCR de todas las cepas aisladas clonales y pool.

De 121 pacientes, 38/79 (48%) pacientes que presentaron gastritis, 5/16 (31%) de pacientes con úlcera péptica, 11/18 (60%) de pacientes con cáncer, 2/8 (25%) de pacientes con linfoma estaban infectados por *Helicobacter pylori*. De los pacientes infectados, 28/38 (74%) de los pacientes con gastritis, el 4/5 (80%) de los pacientes con úlcera péptica, mientras que para los pacientes con linfoma y cáncer gástricos el 100% son cepas de *Helicobacter pylori* cagA⁺. De todos los pacientes con cepas de *Helicobacter pylori* cagA⁺ se encontró que tienen infección múltiple debido a que el 20/28 (71%) de los pacientes con gastritis, 1/4 (25%) de pacientes con úlcera péptica, 5/11 (45%) de los pacientes con cáncer gástrico tienen cepas cagA⁺ y cagA⁻ y los pacientes con linfoma no presentaron infección múltiple.

En base a los resultados obtenidos se puede ver que la prevalencia de las cepas de *Helicobacter pylori* que expresan el factor de virulencia cagA que es un marcador de la isla de patogenicidad, la cual es más patógena que las que no la expresan, la cual es mayor en los pacientes con diagnósticos de linfoma y cáncer, esto debido al curso de la enfermedad por esta infección que inicia con una gastritis y puede progresar hasta cáncer, debido a que la mayoría de las infecciones de gastritis son causadas por esta bacteria y si a esto se le suma el factor de virulencia proteína CagA que las hace más patógenas es por eso que la enfermedad progresa hasta cáncer y se expresa en un 100% este tipo de cepas que son más virulentas. Además se pudo observar que en algunos pacientes se encuentran infecciones múltiples.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 RESEÑA HISTÓRICA

En 1875, científicos alemanes descubrieron bacterias espirales en el epitelio del estómago humano. Estas bacterias no podían ser cultivadas, y por consiguiente este descubrimiento se olvidó en aquel momento.⁷ En 1893, el investigador italiano **Giulio Bizzozero** describió una serie de bacterias espirales que vivían en el ambiente ácido del estómago de perros. Salomon (1896) reportó resultados similares a los de Bizzozero. El profesor **Walery Jaworski**, de la Universidad de Jagiellonian en Cracovia, investigó sedimentos de lavados gástricos obtenidos de humanos en 1899. Balfour (1906), describió la presencia de espiroquetas en perros y monos con úlceras gástricas. Krienitz (1906), reportó microorganismos similares en el estómago de pacientes con cáncer.⁴⁷ Doenges (1938), encontró espiroquetas en 104 de 242 estómagos de pacientes muertos. Freedburg y Barron (1938), encontraron espiroquetas en 13 de 37 gastrectomías, ninguno puede concluir si la bacteria coloniza el tejido y causa daño al epitelio ó solo actúa como saprofito oportunista. Además de unas bacterias alargadas, también encontró bacterias con una característica forma espiral, a las cuales llamó *Vibrio rugula*. Este investigador fue el primero en sugerir la participación de este microorganismo en enfermedades gástricas. Aunque este trabajo fue incluido en el *Manual de enfermedades gástricas*, no tuvo mucho impacto, debido a que estaba escrito en polaco.⁵⁷

Redescubrimiento y caracterización

Esta bacteria fue redescubierta en 1979 por el patólogo australiano **Robin Warren**, quien en investigaciones posteriores (a partir de 1981), junto a **Barry Marshall**, aisló este microorganismo de las mucosas de estómagos humanos y fue el primero que consiguió cultivarla.⁶⁷ En el trabajo original, Warren y Marshall afirmaron que muchas de las úlceras estomacales y gastritis estaban causadas por la colonización del estómago por esta bacteria, y no por estrés o comida **picante**, como se sostenía hasta entonces.⁶⁸

1.1.1 Clasificación del género

El microorganismo aislado por Warren y Marshall presento algunos aspectos morfológicos y fisiológicos similares a *Campylobacter*, por lo que fue clasificado como *Campylobacter pyloridis*.⁸¹ Estudios más detallados comprobaron las diferencias en la composición de ácidos grasos, en la secuencia de RNAr, en la producción de ureasa y en la ausencia de una quinona respiratoria. En 1989, se denomina a la bacteria ***Helicobacter pylori***.⁴⁶

1.2 MORFOLOGIA de *Helicobacter pylori*:

- a) Colonial: son colonias pequeñas, circulares, convexas, lisas, translúcidas, húmedas como gotas de rocío miden de 1-2 mm de diámetro.⁸⁷

Solo crece en agar sangre, en agar sangre adicionado con antibióticos y en medios suplementados con suero, hemina y almidón, bajo condiciones microaerofilicas (7-12% de CO₂) a 37° C y humedad elevada; es una bacteria de crecimiento lento (5-7 días).⁸

Después de más de 12 días de cultivo adoptan una forma cocoide.



Figura N.1 Morfología colonial de *Helicobacter pylori* en el medio agar sangre donde se aprecian colonias como gotas de rocío.

- b) Microscópica: es una bacterias Gram negativa y se pueden observar en forma de bacilos curvados o espirales de 2.5- 5 μm de largo y 0.5-1 μm de ancho, extremos redondeados, móvil con 4-6 flagelos polares. Es catalasa, oxidasa y ureasa positivas. (González Saldaña Napoleón, 1997)⁴⁴ Cuando se encuentran en la mucosa gástrica, aunque algo más rectos cuando se encuentran en medios de cultivo artificiales.

Después de más de 12 días de cultivo adoptan una forma cocoide. El cambio de la forma cocoide se presenta cuando *Helicobacter pylori* es cultivado bajo condiciones adversas como son: aerobiosis, pH alcalino, altas temperaturas, incubación prolongada y antibióticos. Al microscopio se observan bacilos curvos en forma de U o Gaviota.¹⁰⁸

La visión microscópica cuando se utilizan **colorantes cromogénicos** (por ejemplo, bromuro de etidio), muestra imágenes muy definidas

El bromuro de etidio es capaz de intercalarse entre las bases del ADN de la bacteria y emite fluorescencia que permite su observación en un microscopio de fluorescencia.



Figura N.2 Morfología de espiral o sacacorchos de *Helicobacter pylori* emitiendo fluorescencia debido a la utilización del colorante cromogénico bromuro de etidio.

Cuando se realiza una **tinción de Gram** a partir de una extensión de biopsia de antro gástrico se pueden observar los bacilos de morfología curvada y Gram negativos.

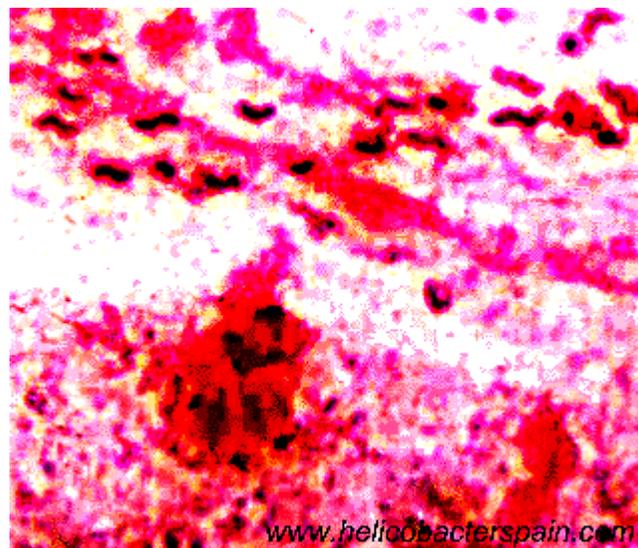


Figura N.3 Tinción de Gram de bacilos curvos característicos de *Helicobacter pylori*.

Cuando *Helicobacter pylori* crece en **medios artificiales** pierde su estructura completamente espirilar o de sacacorchos y adquiere una estructura algo más recta aunque sigue siendo curvado. Se observa de color rosa debido a su estructura de bacilo Gram negativo.



Figura N.4 Morfología microscópica de *Helicobacter pylori* en **medios artificiales**.

1.3 METODOS DE DIAGNOSTICO PARA LA DETECCION DE *Helicobacter pylori*

Inicialmente se consideraba como método estándar de oro de confirmación de la infección por *Helicobacter pylori* su identificación mediante pruebas histológicas y cultivo provenientes de una muestra de la mucosa gástrica obtenida por endoscopia. Posteriormente se desarrollaron pruebas alternativas con esta muestra comprendían **pruebas de ureasa rápida, reacción de la polimerasa en cadena (PCR) y tipificación molecular (PCR-RFLP)**, pero todas tienen el inconveniente de la **invasividad** y por tanto no son aplicables a portadores sanos; adicionalmente representan el resultado local de la muestra del estómago utilizada y no de todo el órgano, por tanto posible de mostrar falsos negativos.

Las proteínas bacterianas inducibles por estrés térmico tienen reacción cruzada con algunos antígenos de los tejidos humanos creando las bases de la autoinmunidad; estas macromoléculas están relacionadas también con los procesos inflamatorios producidos por el microorganismo.

Sobre esta base, *Evans* desarrolló en 1988 una prueba **ELISA**, basado en las proteínas de alto peso molecular asociadas a esta bacteria. Esta prueba tiene ventajas de costo en estudios epidemiológicos: su intervalo de sensibilidad oscila entre 63-97 %. Los métodos serológicos, sin embargo, a pesar de su comprobada eficacia en estudios de terreno presentan el inconveniente de que los anticuerpos una vez que se han producido pueden mantenerse elevados hasta 6 meses después de su erradicación, lo que limita la utilidad de la prueba en los controles de tratamiento.

Esta bacteria se encuentra también localizada en la boca. Las placas dentarías actúan como reservorio. Estudios de cuantificación están actualmente en curso.

El método considerado en la actualidad como el estándar de oro es la **prueba del aliento**, que utiliza urea marcada con ^{13}C ó ^{14}C . La prueba desarrollada por *Graham y Klein* en 1987 documenta la presencia de la infección momentánea y tiene una respuesta rápida a los efectos de tratamiento y a las reinfecciones que suelen producirse. Esta bacteria produce ureasa, una enzima ausente en el aparato digestivo alto. Por ello al suministrar urea marcada a un paciente y medir la excreción del isótopo por el aire espirado, 30 min después de su ingestión, puede diagnosticarse la infección por esta bacteria. A diferencia de otros métodos, un resultado positivo con la prueba del aliento es confirmatorio de contaminación. Una modificación de este método ha sido propuesta por el Laboratorio de Radioisótopos de la Universidad de Buenos Aires, en el cual se suministra conjuntamente una solución de urea marcada con ^{14}C y un coloide de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ que no se absorbe en el aparato digestivo. Este coloide permite la

visualización de la solución de urea dentro del aparato digestivo mediante la utilización de una cámara gamma, lo cual permite localizar exactamente el sitio donde se está produciendo el $^{14}\text{CO}_2$ como consecuencia de la hidrólisis de la urea de la bacteria. Esta combinación de la prueba del aliento con ^{14}C -Urea y la visualización del desplazamiento intragástrico de la solución de Urea- ^{14}C permitió elevar la sensibilidad del método al 98 % y la especificidad al 96 %.⁵¹

<p>Invasivos: se requiere endoscopia para la obtención de biopsias gástricas.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Histología • Cultivo • Prueba rápida de la ureasa • Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 	<p>No invasivos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Serología (ELISA) • Prueba del aliento de la ureasa • Detección de antígenos en heces • PCR de muestras biológicas no gástricas
---	--

Tabla 1.- Clasificación de los métodos de diagnóstico para *Helicobacter pylori*.

1.4 GENOMA BACTERIANO

El genoma de *Helicobacter pylori* tiene un tamaño entre 1.6 y 1.73 Mb, con un promedio de 1.67 Mb. La composición media de guanina y citosina (G+C) es de 35.2 mol con un rango de 34.1 a 37.5 mol%. Aproximadamente el 40% de las cepas recuperadas contienen plásmidos con un tamaño de 1.5 a 23.3 Kb, pero

éstos no contienen factores de virulencia reconocidos. Los genes tienen, en el mapa genético, una localización variable, lo traduce una amplia reorganización de su genoma.²⁹ A este respecto, Alm y Trust², en dos cepas estudiadas, encontraron que los factores de restricción de (ADN/modificadores) de genes, tienen un menor contenido de G+C que el resto del genoma, por lo que piensan se podría asociar con regiones organizadas de diferente manera, e indicaría que la adquisición de esos genes es horizontal, desde otras especies bacterianas o bien transferidas por otras cepas de *Helicobacter pylori*. De ser así, implicaría mecanismos de conjugación o transformación bacteriana en forma natural. Entre los compuestos codificados por los genes de este bacilo, se pueden mencionar los relacionados con proteínas accesorias: flagelina, citotoxina vacuolizante, *Cag A* y la ureasa.

La diversidad genética entre cepas de varias poblaciones se ha explicado por los puntos de mutación, sustituciones amplias, inserciones, deleciones (que involucran a uno o más genes) y segmentos multigénicos (que incluye restricción/modificación de genes o al menos una isla de patogenicidad).

Entre 6 y 7% de los genes del *H. pylori* son específicos para cada cepa y casi la mitad de ellos se agrupan en una misma región hipervariable.¹² Es pertinente hacer mención que se ha reconsiderado recientemente la definición inicial de “**isla de patogenicidad**” (**PAI**), propuesta hace dos décadas: que menciona un segmento de ADN como responsable de los genes de virulencia, señalándose ahora, por el análisis detallado del locus *Cag A* de las cepas tipo I y II, que es debido a deleciones en la región larga del cromosoma.⁹⁴ Estos locus tienen características típicas de PAI: ADN diferente al resto del genoma, rango de G+C de 25 a 75% (La mayoría de las bacterias contienen entre 40 y 60%), esta composición de bases incide en la función de la bacteria, ya que su localización es adyacente a los genes tRNA. Este segmento ha sido denominado PAI *Cag* y tienen un tamaño de 37 a 40 Kb.⁹⁴

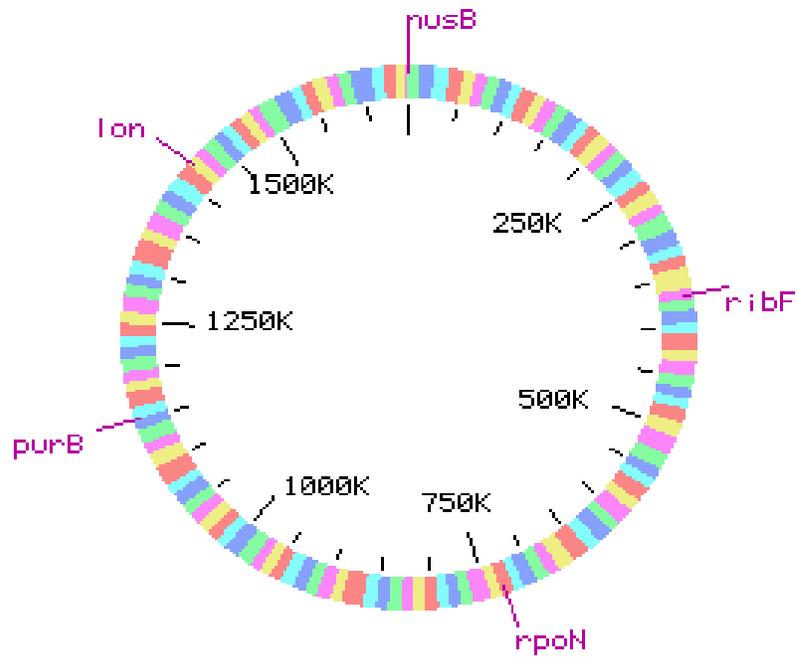


Figura N.5 Representación gráfica del genoma de *Helicobacter pylori* secuenciado. Se puede observar el tamaño del genoma.²

1.5 ISLA DE PATOGENICIDAD

Cerca del 60-82% de las cepas de *Helicobacter pylori* contienen una isla de patogenicidad de 37 Kb llamada PAI-cag. La PAI-cag es un fragmento de ADN

que codifica para 31 genes, esta isla esta flanqueada por dos secuencias repetidas cortas de 31 pares de bases, además su contenido de G+C (35%) difiere del resto del genoma (39%), lo cual sugiere que la PAI-cag se adquirió muy probablemente de un fago o plásmido de otro microorganismo por transferencia horizontal.¹⁰²

Aunque diversos estudios han revelado que el orden de los genes en la **PAI-cag** están esencialmente conservados entre las cepas de *esta bacteria*. En algunas cepas la PAI-cag puede encontrarse, como una unidad continua o dividida en dos porciones (la región cag I y la región cag II) por un elemento transponible IS605; en algunas otras cepas, las regiones cag I y cag II están separadas por un fragmento de DNA cromosomal flanqueado por dos secuencias de inserción IS605; en otras cepas hay eventos de recombinación entre copias de IS605, que eliminaron todo o parte de las regiones cag I y cag II, o ambas a la vez. De esta manera, los arreglos en el interior de la PAI-cag provocados por la inserción y recombinación de elementos IS605 han llevado a la generación de cepas de *Helicobacter Pylori* con diferentes grados de virulencia.^{3,4,39}

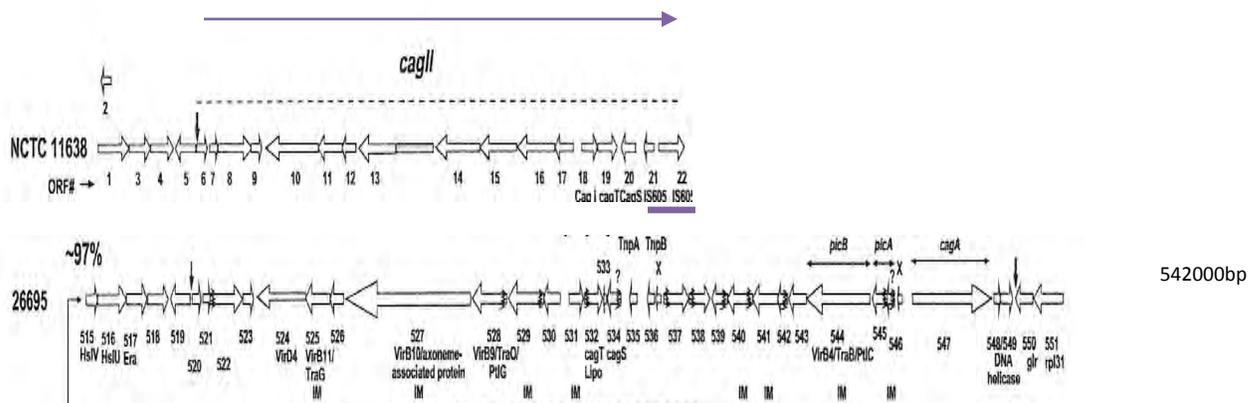


Figura N.6 Esquema de la isla de patogenicidad donde se muestran las secuencias de inserción IS605.¹⁰⁶

Actualmente las cepas de *Helicobacter pylori* han sido agrupadas en dos grandes familias denominadas tipo I y II en base a la presencia de la isla de patogenicidad PAI-cag completa (ininterrumpida o dividida en dos regiones) y activa, inducen la secreción de altos niveles de IL-8 en células del epitelio gástrico, y secretan una

citotoxina vacuolizante. Las cepas tipo I son positivas para todas las características. En contraste, las cepas tipo II tienen la isla de patogenicidad incompleta o carecen de ella no inducen la secreción de IL-8, además de que expresan una citotoxina vacuolizante inactiva y/o tienen un mecanismo de secreción defectuoso.

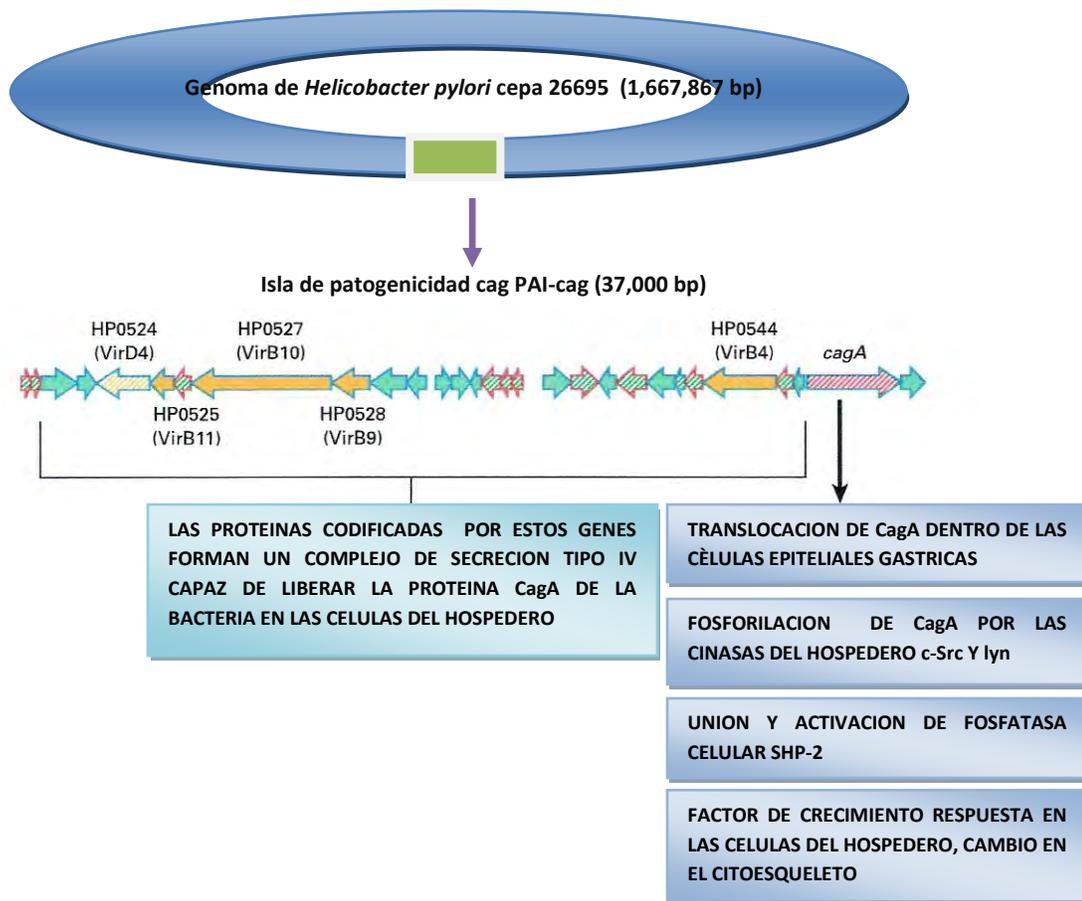


Figura N.7 Isla de patogenicidad PAI-cag.

La mayoría de las cepas de *Helicobacter pylori* que causan enfermedad son las que contienen la isla de patogenicidad cag, una región cromosomal con cerca de 37,000 bp y 29 genes, la localización esta indicada con flechas. La figura 7

muestra la organización de genes de la cepa 26695, donde la secuencia del genoma fue la primera en ser publicada. La isla esta dividida en dos partes en algunas cepas. La mayoría de los genes cag están probablemente involucrados en el montaje de la maquinaria secretora que transloca la proteína CagA dentro del citoplasma de las células epiteliales gástricas. Cinco genes (marcados en naranja **FIG 7**) son similares para los componentes del sistema de secreción tipo IV del patógeno de las plantas *Agrobacterium tumefaciens* (Vir proteins). Las proteínas codificadas por la isla de patogenicidad están involucradas en dos procesos, en la producción de interleucina 8 (IL-8) por las células epiteliales gástricas y la translocación de CagA de la bacteria en las células del hospedero. Todos los genes descritos por flechas solidas son esenciales para la inducción de IL-8; las flechas tachadas indican genes que no están involucrados en este proceso. De estas las flechas que tienen línea azul son genes que se requieren para la translocación de CagA; las que tienen líneas naranjas indican genes no esenciales para la translocación.¹⁰²

1.6 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

Su característica bioquímica más sobresaliente es la producción de ureasa y bióxido de carbono. Se realiza la prueba de la oxidasa y catalasa para su identificación.⁷⁰ Se ha logrado identificar bien la actividad enzimática de la vía pentosa fosfato. Posee actividad del ciclo de la urea. La via Entner-Doudoroff se tiene demostrada en esta bacteria. La enzima fumarato reductasa es un componente esencial para su metabolismo. Esta bacteria metaboliza aminoácidos por vía fermentativa, y se sabe que existen citocromos involucrados en la cadena respiratoria. El nivel elevado de CO₂ requerido para su crecimiento in vitro puede ser debido en parte a la actividad de la enzima Acetil coenzima A carboxilasa.¹⁰¹

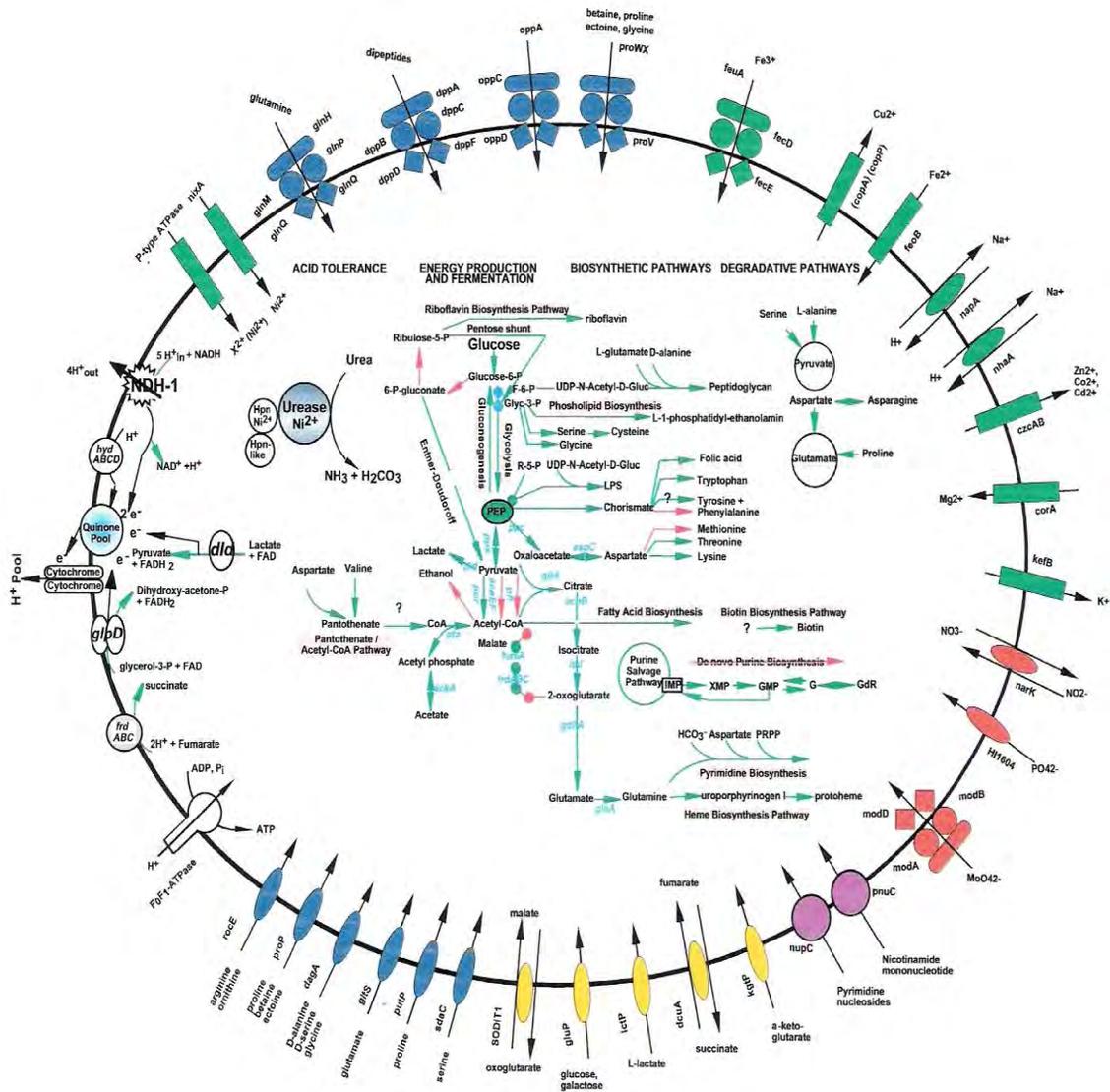


Figura N.8 Esquema de las vías metabólicas de *Helicobacter pylori* cepa 26695.¹⁰⁶

1.7 PATOGÉNESIS

A pesar de la gran incidencia de *Helicobacter pylori* no todas las personas infectadas por esta bacteria desarrollan la enfermedad. Al parecer el tipo de cepa bacteriana que coloniza la mucosa gástrica tiene una función determinante en el desarrollo de la enfermedad.^{9,70}

Se dispone de evidencias de que la colonización de esta bacteria induce inflamación gástrica.¹¹⁴ Se le relaciona comúnmente con gastritis crónica superficial que se caracteriza por infiltración de células mononucleares y neutrófilos en el epitelio.

A menudo suceden cambios degenerativos de la superficie epitelial incluyendo depleción de mucina, vacuolización citoplasmática y desorganización de las glándulas del mucus.

1.7.1 Dinámica de infección de *Helicobacter pylori* en el estómago humano.

Las superficies mucosas de vertebrados deben considerarse como estructuras en comunicación con el ambiente externo. Las bacterias que tienen contacto con ellas (tracto gastrointestinal) tienen tres impedimentos que limitan su número: peristalsis, competencia microbiana y efectores inmune-específicos.

Esta bacteria es un patógeno exógeno que a diferencia de la mayoría, persiste por décadas en el tracto gastrointestinal, induciendo inflamación gástrica crónica que termina en úlcera péptica o neoplasia gástrica en gran número de personas.¹¹

La colonización muestra un modelo de versatilidad bacteriana para persistir a pesar de los contratiempos físicos de la peristalsis. La adherencia bacteriana es una estrategia para resistir la peristalsis de la capa de la mucosa, a partir de allí migran a las células epiteliales.²⁹

La bacteria supera la barrera ácida estomacal y la respuesta inmune es esencialmente infectiva. Es muy móvil en la capa de la mucosa por encima del epitelio gástrico, en pequeña proporción atacan a las células epiteliales.

El 98% reside en el moco, mientras que el 2% se encuentran adheridas a células epiteliales (mantienen la infección). Elabora efectores proinflamatorios que son absorbidos por la mucosa, provocando la respuesta en el hospedador que conlleva un daño tisular con liberación de nutrientes. Las moléculas de la superficie de *Helicobacter pylori* como el LPS tienen baja actividad proinflamatoria, por lo tanto la respuesta celular queda suprimida, entonces esta regula la inflamación para evitar ser eliminado de su nicho.

1.7.2 Proceso de daño tisular.

Coloniza y persiste en un nicho único que es el lumen gástrico. Los determinantes patogénicos de la bacteria se dividen en dos grupos: factores de virulencia que contribuyen a efectos patogénicos de la bacteria y factores de mantenimiento que permiten a la bacteria colonizar y permanecer en el hospedador.^{11,22}

1.7.3 Factores de virulencia

Estos se clasifican según sus efectos patogénicos en el hospedador: inflamación gástrica, rotura de la barrera de la mucosa gástrica y alteración de la fisiología gástrica.

Inducción de la inflamación gástrica

En la gastritis superficial caracterizada por infiltración en la mucosa gástrica de leucocitos polimorfonucleares o células monocíticas. La inflamación es importante para la supervivencia de *Helicobacter pylori in vivo*.²²

Interleucina 8 (IL-8): es una quimiocina o pequeño péptido secretado por un número variable de células, actúa como un potente mediador inflamatorio que recluta y activa neutrófilos. *Helicobacter pylori* induce secreción de IL-8 de células de carcinoma gástrico *in vivo*.

Adherencia de neutrófilos: el gen napA muestra homología con el gen de la familia de las proteínas de bacterioferritina y codifica la proteína HP-NAP. Esta proteína es un polímero de 10 subunidades que incrementa la expresión de neutrófilos CD11b/CD18 y la adherencia de estos a las células endoteliales.³³

Factor activador plaquetario (PAF): un mediador fosfolipídico reconocido como potente agente ulcerogénico. Lyso-PAF es producido por células de la mucosa gástrica en condiciones basales y en respuesta a gastrina en personas saludables. PAF estimula la secreción de ácido gástrico a través de receptores específicos de células parietales. La bacteria metaboliza el precursor no ulcerogénico lyso-PAF a PAF. Por ello, a través de la síntesis del PAF, induce daños en la mucosa directa o indirectamente de la secreción de ácido.⁹⁷

Lipopolisacárido (LPS): el LPS rompe el moco gástrico interfiriendo con la interacción entre la mucina y su receptor. Sin embargo, el LPS esta bacteria tiene menor capacidad proinflamatoria.⁷⁶

Ureasa: es un potente estimulante de activación para fagocitos mononucleares y la producción de citoquinas inflamatorias. In vivo, su actividad es tóxica para células del epitelio gástrico. Funciona como colonizador (factores de mantenimiento), y factor de virulencia.^{11,25}

Ruptura de la barrera mucosa

Helicobacter pylori inhibe la respuesta secretora de las mucosas *in vitro*, indicando el efecto potencial del deterioro en este mecanismo principal de defensa en la mucosa gástrica.

Fosfolipasa: esta enzima destruye la capa rica en fosfolípidos con función protectora.⁸⁰

Mucinasas: esta bacteria posee un gen idéntico casi al de la mucinasa de *Vibrio cholerae*. La actividad de esta mucinasa *in vitro* contribuiría a la ruptura de la barrera mucosa gástrica.

Citotoxinas: estas inducen vacuolas ácidas en el citoplasma de células eucariota. El gen *vacA* (3.9Kb) codifica para una citotoxina vacuolizante. El gen *vacA* codifica para una proteína de 134KD, protoxina que contiene una secuencia *leader* de 33 aminoácidos y un fragmento carboxilo terminal del precursor de la proteasa de *IgA* de *Neisseria gonorrhoeae*, parece estar implicado en la traslocación de la proteasa a la membrana externa. Por analogía, el carboxilo terminal de la protoxina de *Helicobacter pylori* puede jugar un papel en la secreción de citotoxina. Mutantes de *vacA* no expresan la citotoxina y pierden la actividad vacuolizante.^{1,18}

Especies de oxígeno reactivas: esta bacteria induce la síntesis de "Reactive oxygen species" (ROS) en la mucosa gástrica *in vivo* e *in vitro*. (Davies GR, et al,

1994).²³ Hay asociación positiva entre ROS, la carga infectiva y el daño en mucosa gástrica. Muchas drogas antiulcerosas funcionan como secuestradores de ROS, ayudando a explicar cómo minimizan el daño inducido por *Helicobacter pylori*

Sintetasa inducible de oxido nítrico (iNOS): la bacteria induce iNOS y macrófagos *in vitro*. La alta producción de oxido nítrico por la inducción de esta sintasa, en asociación con la activación inmune, es responsable de daño tisular.¹⁴

Apoptosis: aparece esta bacteria para inducir la muerte celular programada de las células del epitelio gástrico y para estimular daño oxidativo de DNA en mucosa gástrica humana infectada. *Helicobacter pylori* inhibe la migración y proliferación de células del epitelio gástrico, por lo que el daño en la mucosa gástrica puede ser inducido directa o indirectamente.^{59,75}

Se han propuesto varios mecanismos de virulencia para *Helicobacter pylori* una enzima llamada **ureasa**, cuya función es proteger a la bacteria frente al pH ácido originado por los productos oxidativos del huésped. La ureasa tiene un peso molecular de 550 Kda, formada por dos subunidades denominadas UreA y UreB es una de las proteínas más abundantes secretadas por el organismo.^{71,45} La ureasa necesita como cofactor el níquel. Juntos hidrolizan la urea produciendo amonio, lo que permite a la bacteria rodearse de un medio alcalino protegiéndose de la secreción ácida gástrica.⁵⁶

Helicobacter pylori posee varios flagelos que le dan gran movilidad. Estos están compuestos por proteínas llamadas flagelinas cuyo peso molecular es de

aproximadamente 50,000 a 60,000 KDa. Las flagelinas están codificadas por los genes *flaA* y *flaB*.^{89,72}

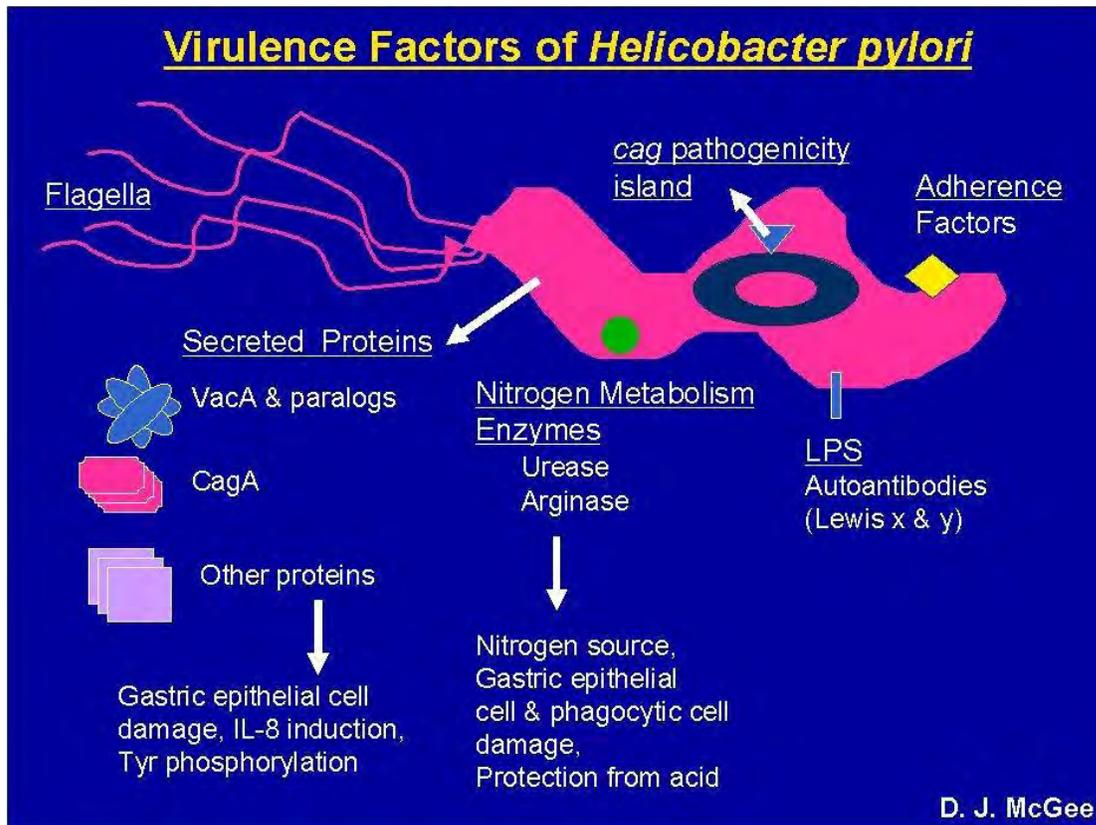


Figura N.9 Factores de virulencia de *Helicobacter pylori*.

Para la colonización de este microorganismo debe haber primero una adhesión a la mucosa gástrica, la cual se inicia a través de varias adhesinas. Las adhesinas son proteínas glicoconjugadas o lípidos bacterianos involucrados en el inicio de la colonización.^{28, 36} Una vez que *Helicobacter pylori* alcanza la capa epitelial, la bacteria se adhiere a través de varias adhesinas como son BabA, sabA, AlpA, AlpB, Hopo, HpA.^{20, 30}

La adherencia de la bacteria a los receptores de las células del huésped induce cambios celulares, los cuales incluyen una señal de transducción, permitiendo la infiltración de células inflamatorias como neutrófilos y monocitos. BabA es la adhesina que más ha sido estudiada. Esta adhesina facilita la unión del microorganismo a los antígenos de Lewis B. La **adhesina BabA** contiene dos

copias del gen *babA* denominadas *babA1* y *babA2*. La cepa que contiene el gen *bab2* codifica para una proteína funcional de la membrana externa, la cual se une al antígeno de Lewis B; y *bab1* tiene una pérdida de un segmento de 10 nucleótidos que contiene el codón de inicio para la traslación, lo cual induce a una delección.^{40, 55}

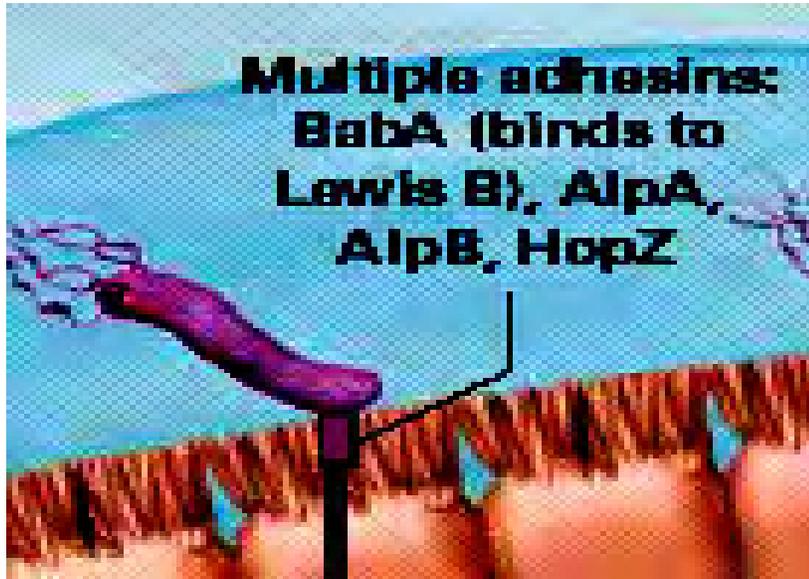


Figura N.10 Representación de la unión de múltiples adhesinas a los antígenos de Lewis B. Esquema¹⁰²

También existen enzimas como las **fosfolipasas** A2 y C, las cuales tienen un papel importante en la patogenia de esta bacteria, al degradar los componentes lipídicos de la mucosa que le proporciona integridad. Igualmente existen otras enzimas relacionadas con actividad proteolítica como la catalasa y la superoxidaso dismutasa que protegen a la bacteria de los metabolitos tóxicos, productos de procesos oxidativos de defensa de los macrófagos y neutrófilos.¹⁰⁹

Otro factor de virulencia es el **lipopolisacárido (LPS)** en su antígeno "O" los carbohidratos de Lewis "x", "y" o ambos. Los antígenos de Lewis son

glicoconjugados con diferente número de fucosa, los cuales pueden ser de 4 tipos Le^a, Le^b, Le^x, Le.^{65,74} Los antígenos de Lewis participan en la patogénesis ayudando al microorganismo a evadir la respuesta inmune durante la colonización en el estómago, favoreciendo a la bacteria su permanencia en el nicho gástrico, y por otro lado induce una respuesta autoinmune contra los antígenos de Lewis que expresa *Helicobacter pylori* que son compartidos por las células eucariotas contribuyendo a un daño directo o indirecto.^{13,3}

Otros dos factores de virulencia son: la **citotoxina vacuolizante VacA**, codificada por el gen *vacA* presente en todas las cepas de *H. pylori* y la **proteína CagA** por el gen *cagA* que se encuentra en la membrana externa. La proteína de la membrana externa, denominada proteína asociada a la citotoxina CagA, es codificada por el gen *cagA*. Es una proteína de la membrana externa, tiene un peso molecular entre 120-140 Kda y se considera altamente inmunogénica.

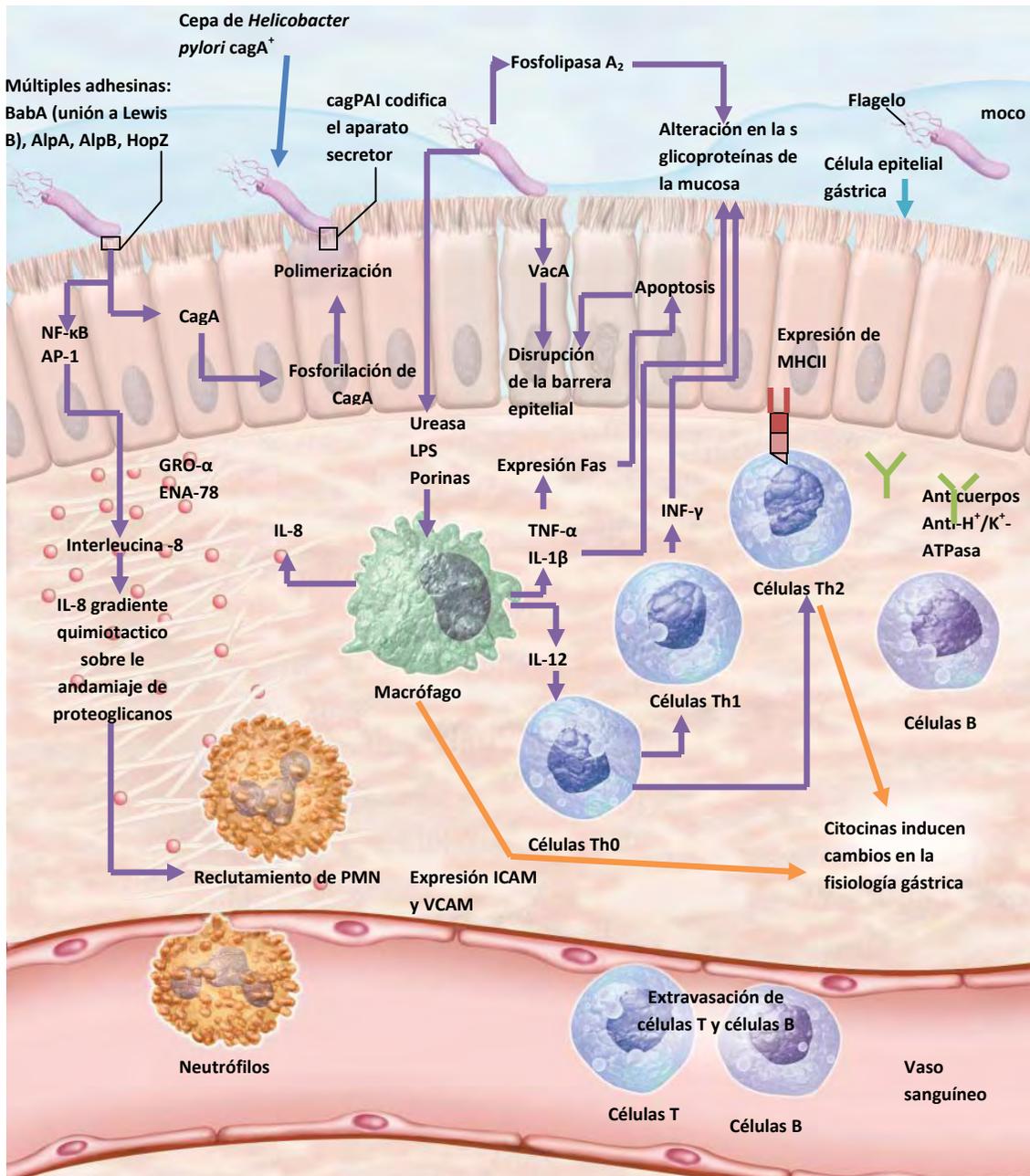


Figura N.11 Representación de la inducción de la respuesta inmune debida a la inyección de dos proteínas importantes como son cagA y vacA.

Las cepas de *Helicobacter pylori* cagA+ se adhieren a las células del epitelio gástrico, donde inducen la secreción de un mediador inflamatorio como la interleucina 8 (IL-8), a través de la activación del factor nuclear kappa beta (NF-κB).^{34, 95}

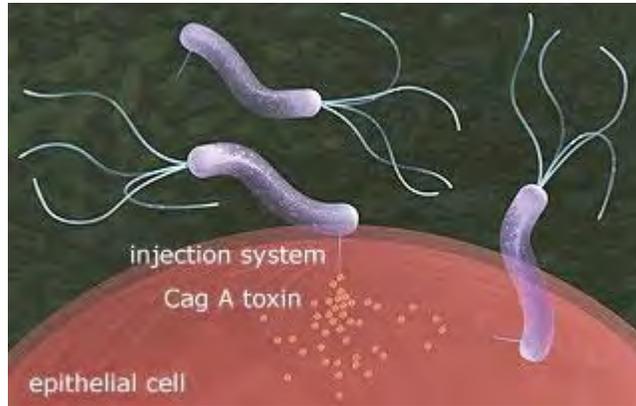


Figura N.12 Figura que muestra la inyección de la proteína CagA dentro de las células epiteliales.¹¹⁷

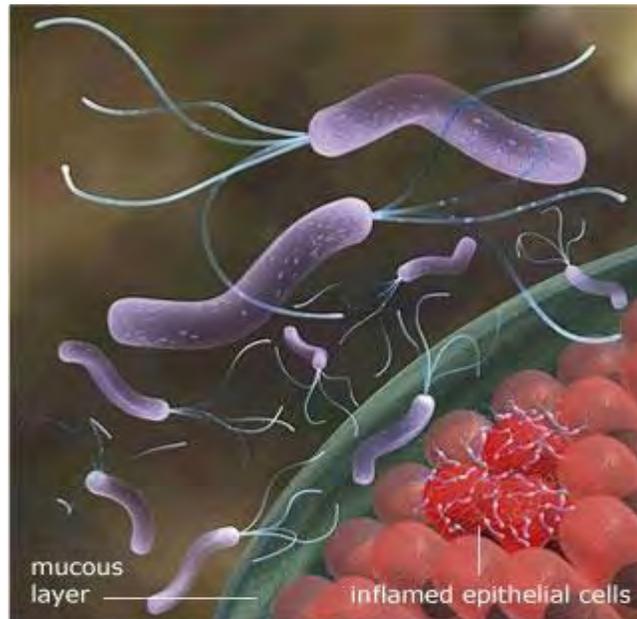
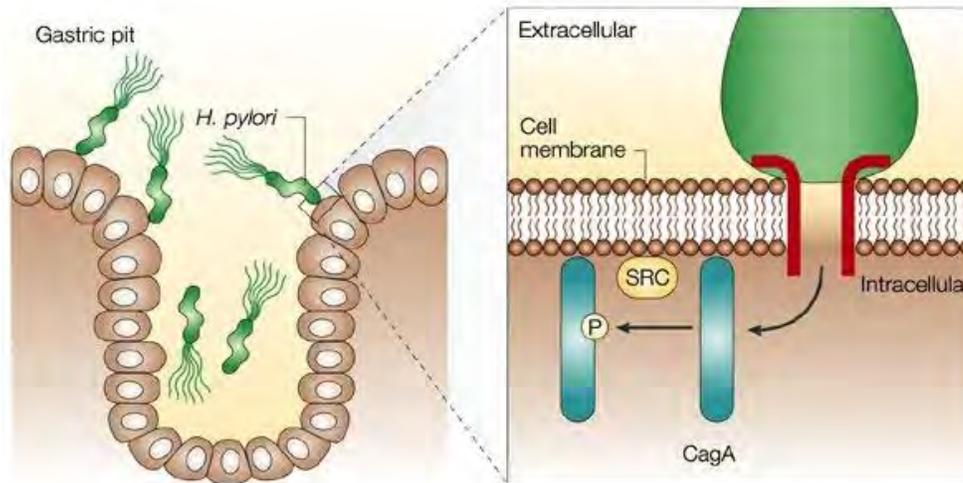


Figura N.13 En esta figura se muestra como después de que la bacteria coloniza las células de la mucosa gástrica se produce la inflamación de las células epiteliales debido a la inyección de la proteína CagA a estas.¹¹⁷



Nature Reviews | Cancer

Figura N.14

La figura muestra como Cag A después de entrar la célula es traslocada y posteriormente fosforilada para poder interactuar en la traducción de la señal intracelular, causando irregularidades en las actividades de la célula y así producir acciones patológicas a estas.⁶⁹

También se ha observado que la **proteína CagA** activa la transcripción del factor AP-1 y la cascada de las cinasas ERK/MAP permitiendo la expresión de los proto-oncogenes c-fos y c-jun.^{110, 99}

Cover y col, propusieron que el gen *cagA* sea considerado como marcador de virulencia. En estudios seroepidemiológicos detectaron niveles elevados de anticuerpos IgG por la técnica de ELISA contra la **proteína CagA** en pacientes con úlcera duodenal en un 87.5%, con úlcera gástrica 76% y con dispepsia no ulcerosa 56.4%.²⁷ A los pacientes infectados con cepas que portan el gen *cagA* y expresan la proteína *cagA* se les ha asociado con el desarrollo de gastritis activa crónica, gastritis atrófica, úlcera péptica y un aumento en el riesgo a desarrollar adenocarcinoma o linfoma gástrico.^{52, 58}

La **citotoxina VacA** es un factor de virulencia importante en el desarrollo de las enfermedades gástricas. Esta citotoxina tiene un efecto citopático sobre cultivos celulares; además de ser responsable de formar vacuolas *in vivo* en células del

epitelio gástrico. También VacA se une a la célula por interacción con receptores específicos, y esta unión depende de la concentración de citotoxina así como de la saturación de los receptores en la superficie celular.⁹²

La infección reversible de *Helicobacter pylori* induce la expresión del péptido gastrina, estimulante de ácidos, y suprime la expresión de la hormona somatostatina la cual es inhibidora de ácidos.

Estos efectos no se deben a *Helicobacter pylori* en si, pero si al grado de inflamación gástrica presente. Dos factores importantes para la **colonización** son la motilidad debida a la presencia de 2 a 6 pares de **flagelos** polares y a la **ureasa**.

Actualmente sabemos que aunque la acidez gástrica es necesaria para la formación de úlceras, no es suficiente para explicar su ocurrencia. De hecho muchos pacientes con cantidades normales de ácido y otros con altos niveles de producción ácida, nunca desarrollan una úlcera.

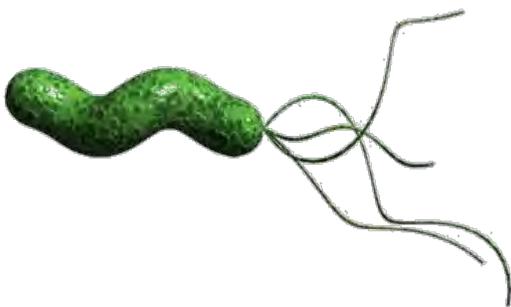


Figura N.15 En esta figura se muestran los pares de flagelos polares.¹¹¹



Figura N.16 Reacción en la que interviene la enzima ureasa.

1.8 VÍAS DE TRANSMISIÓN

Persona-persona:

- ✓ Oral- oral: La bacteria es removida de la mucosa gástrica, se puede encontrar en jugo gástrico y alcanzar la cavidad oral (posible reservorio), vía regurgitación.
- ✓ Oral-gástrica: se lleva acabo a través de endoscopios y sondas contaminadas, por el contacto directo de vomito o contenido gástrico en pacientes infectados. Es poco frecuente.
- ✓ Fecal- oral: la bacteria es removida de la mucosa gástrica y eliminada por el intestino de manera que puede sobrevivir en heces y ser eliminada al ambiente. Se ha logrado identificar DNA de *Helicobacter pylori* en aguas de ríos y lagos por lo que se sugiere que el agua puede actuar como reservorio ambiental.^{73, 93}

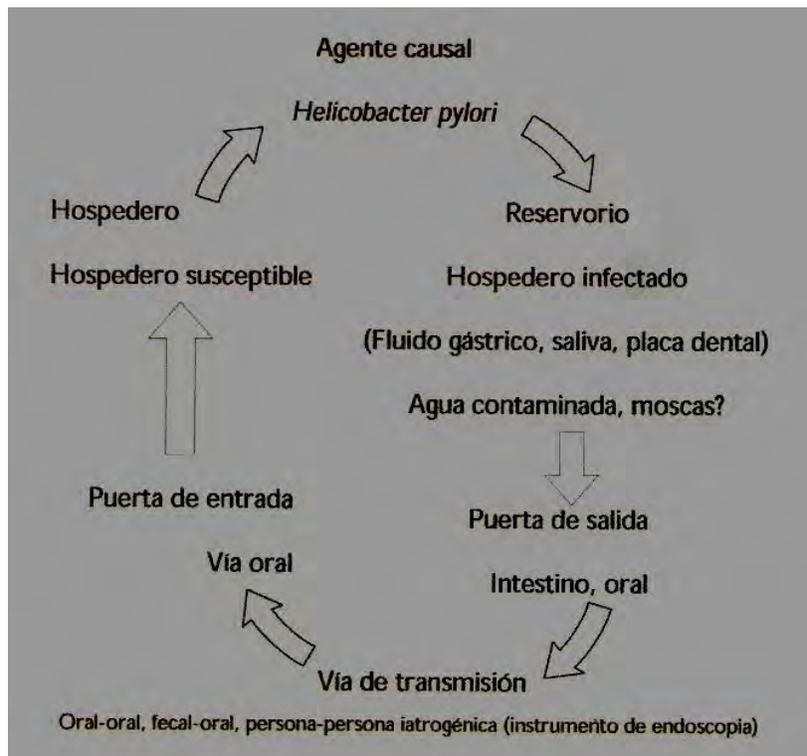


Figura N.17 Cadena epidemiológica de la infección de *Helicobacter pylori*^{49, 42}

1.9 EPIDEMIOLOGÍA

Los estudios epidemiológicos han demostrado que la infección por *Helicobacter pylori* ocurre en la población mundial.¹⁵ Sin embargo la incidencia de la infección entre países desarrollados y en vías de desarrollo es significativamente diferente. En Estados Unidos la incidencia anual de infección se presenta entre el 0.5% y el 1% para menores de 10 años y la infección aumenta hasta un 50% en adultos, con un promedio de edad de 60 años. En el grupo de afroamericanos, hispanos e indios nativos de este país, la infección por el microorganismo se observa desde edades tempranas y la transmisión intrafamiliar es alta.^{21, 35, 85}

Se estima que en los países en desarrollo la mayoría de las personas, el 80% aproximadamente se infectan con esta bacteria a una edad promedio de 10 años.¹⁰⁴ El factor de riesgo más importante es el de las carencias socioeconómicas. Se han investigado muchos factores, pero todos tienen como denominador común el bajo nivel económico. El hacinamiento, la vivienda insalubre, el agua contaminada, etc.

En países de Latinoamérica como Costa Rica y Brasil se reporta una incidencia anual de 45 enfermos de cáncer gástrico asociado a *Helicobacter pylori* por cada 100 000 habitantes.

En México se han observado regiones de mayor riesgo, como las zonas altas del estado de Chiapas donde existen grupos indígenas que presentan una alta incidencia de cáncer gástrico asociado al microorganismo.⁴⁸ En un estudio seroepidemiológico que se realizó en 1997 donde se trabajó con muestras representativas de la población de todos los estados de la República Mexicana cuya edad fluctuó entre 1-90 años arrojó como resultado que el 20% de los niños de 1 año de edad presentaban anticuerpos contra *Helicobacter pylori* y que la seropositividad aumentó hasta un 50% en los niños de 10 años de edad, lo que indicaba que la infección por el microorganismo en nuestro país se adquiere a

edades tempranas y alcanza un 80% en adultos jóvenes entre los 18 y 20 años de edad.¹⁰⁵

1.10 PATOLOGÍAS

El curso clínico de la infección por *Helicobacter pylori* es altamente variable y esta influenciado por dos cosas la primera el microorganismo y segundo los factores del hospedero. El patrón y distribución de la gastritis esta fuertemente relacionado con el riesgo de secuelas clínicas, llamado úlceras gástricas o duodenales, atrofia de las mucosas gástricas, carcinoma gástrico o linfoma gástrico. Pacientes con gastritis predominantemente antral, la forma más común de gastritis por *Helicobacter pylori*, están predispuestos a úlceras duodenales, mientras que los pacientes con gastritis predominantemente en el cuerpo y atrofia multifocal están más predispuestos a presentar úlcera gástrica, atrofia gástrica, metaplasias intestinal y en último caso carcinoma gástrico.

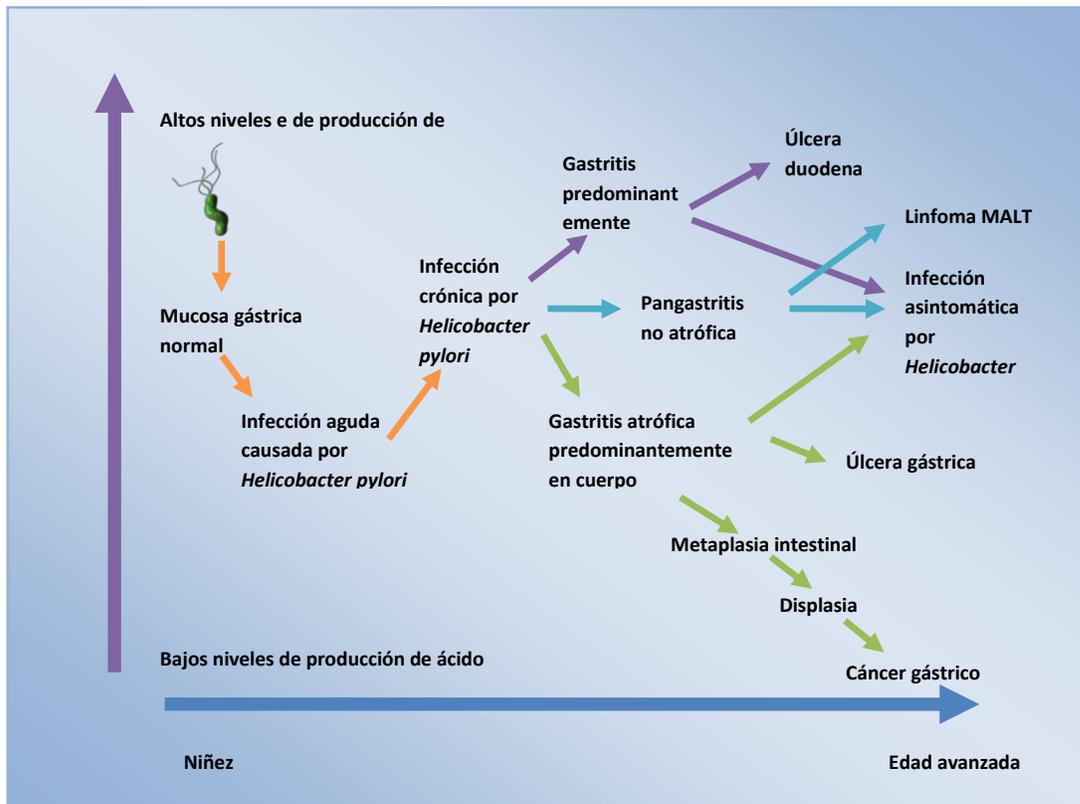


Figura N.18 Historia natural de la infección causada por *Helicobacter pylori*.

1.10.1 Gastritis asociada a la infección por *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori es la causa más común de gastritis crónica inespecífica no erosiva. En la mayoría de los pacientes, la infección es asintomática. Generalmente se encuentran afectados el antro y el fondos del estomago y se observa un infiltrado inflamatorio formado por células mononucleares (liberan IL-2, TNF- α y radicales libres de oxígeno)y/o leucocitos polimorfonucleares. Este microorganismo en el antro gástrico reconoce los antígenos fucosilados conocidos como H y Lewis b, una vez allí origina inflamación crónica debida a la liberación de distintas toxinas. Si no se trata específicamente, la infección puede hacerse crónica y en algunos pacientes los cambios de las glándulas de la mucosa gástrica se hacen permanentes.

La gastritis crónica inducida por *Helicobacter pylori* puede progresar a gastritis atrófica crónica, que es precursora del cáncer.

1.10.2 Úlcera péptica asociada a infección por *Helicobacter pylori*

La úlcera péptica es una llaga en el revestimiento del estomago y el duodeno. *Helicobacter pylori* se encuentra en el 85 al 100 % de los pacientes con úlceras duodenal, así como en el 70-90% de los que presentan úlceras gástricas. Esta bacteria debilita el revestimiento mucoso que protege el estomago y el duodeno, lo cual permite que el ácido afecte la superficie sensible que se halla por debajo de dicho revestimiento. Por efecto tanto del ácido como de las bacterias, esa superficie delicada se irrita y se forma un llaga o úlcera.⁷⁷ El habitat natural de esta bacteria es la mucosa gástrica donde quiera que esta se encuentre. La predilección que tiene esta bacteria por las uniones intercelulares puede favorecer la difusión de iones hidrogeno al interior de la mucosa, también tiene toxinas capaces de ocasionar la inflamación de la mucosa. Aproximadamente el 50% de las cepas de *Helicobacter pylori* produce la citotoxina de vacuolización VacA y la infección con estas cepas puede ser asociada a la presencia de ulcera péptica. Otro factor de virulencia determinante de esta bacteria es el producto del gen cagA. Este gen esta presente en aproximadamente el 60% de los aislados y es el primer gen en ser identificado que no esta presente en todas las cepas. Este gen es mas frecuentemente encontrado en personas con úlcera péptica que en personas con gastritis causadas ambas por esta bacteria.²¹

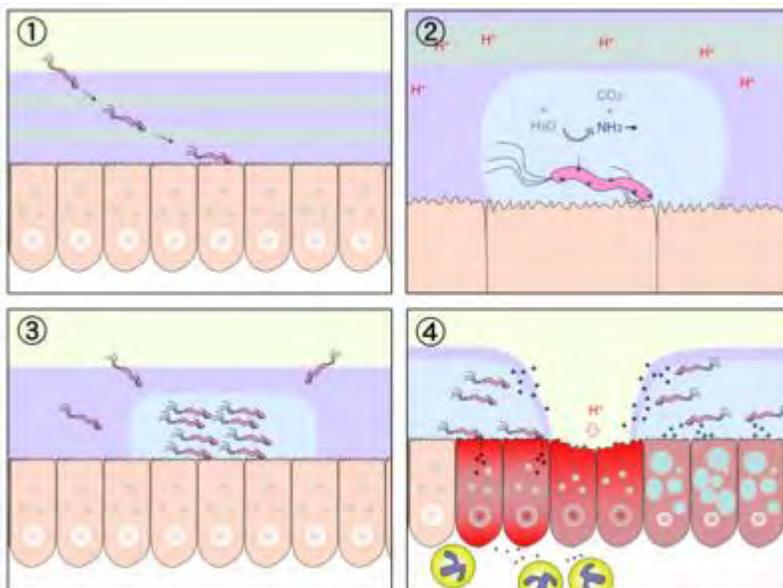


Figura N.19 Modo de infección de *H. pylori*¹¹² :

1. *H. pylori* penetra la capa mucosa del estómago y se adhiere a la superficie de la capa mucosa epitelial gástrica.
2. Produce amoníaco a partir de la urea, para neutralizar el ácido gástrico.
3. Migración y proliferación de *Helicobacter pylori* al foco de infección.
4. Se desarrolla la ulceración gástrica con destrucción de la mucosa, inflamación y muerte de las células mucosas.

1.10.3 Cáncer gástrico asociado a infección por *Helicobacter pylori*.

En 1994 *Helicobacter pylori* fue declarado como carcinógeno de tipo I por la Agencia Internacional para la Investigación del cáncer.⁸⁴

El adenocarcinoma gástrico se clasifica en 2 tipos: uno intestinal y otro difuso. El primero predomina en poblaciones de alto riesgo y es más común en personas de edad avanzada. Es precedido por varios cambios histológicos, tales como gastritis activa, atrofia intestinal, metaplasia y displasia. En la segunda las lesiones precancerosas no han sido bien definidas y se presentan en poblaciones de menor riesgo, compuestas generalmente por grupos de gente joven.⁸⁹

La hipótesis que relaciona a esta bacteria con el desarrollo de cáncer gástrico de tipo intestinal, se basa en un daño progresivo inducido por la presencia de la bacteria, que lleva a lesiones que evolucionan de gastritis superficial, gastritis crónica, gastritis atrófica y en esta última etapa, hay una infiltración inflamatoria importante con agregados foliculares linfoides que destruyen la mucosa a tal grado, que ocurre pérdida de la función y se induce una metaplasia intestinal, displasia y eventualmente cáncer.¹⁶

Actualmente se estudian dos mecanismos relacionados con esta supuesta capacidad de *Helicobacter pylori* de producir **cáncer**. El primero involucra la posibilidad de generar **radicales libres** asociada a una infección de *Helicobacter pylori*, la cual produciría un aumento en la tasa de **mutación** de la célula **huésped**. El segundo mecanismo ha sido llamado **ruta perigenética**¹⁰⁷ e involucra la transformación del **fenotipo** de la célula huésped por medio de alteraciones en **proteínas celulares** tales como las **proteínas de adhesión**. Se ha propuesto la posibilidad de que *Helicobacter pylori* induzca **inflamación** y

niveles localmente altos de **TNF-alfa** o **interleucina 6**. De acuerdo con el mecanismo perigenético propuesto, las **moléculas** señalizadoras de **inflamación**, tales como TNF-alfa, podrían alterar la capacidad de adhesión de las células epiteliales del estómago y conducir a la dispersión y migración de estas células epiteliales mutadas, sin necesidad de alteraciones adicionales en *genes supresores de tumores* (como, por ejemplo, los genes que codifican para proteínas de **adhesión celular**).

La metaplasia intestinal puede ser considerada como una estrategia defensiva, ya que esta bacteria solo coloniza el epitelio gástrico.⁹⁰ Entre los factores asociados con protección contra el cáncer gástrico se menciona el ácido ascórbico, el cual es secretado contra un gradiente desde la mucosa hacia el jugo gástrico. El papel protector parece radicar en su habilidad para inactivar las formas reactivas de oxígeno, que dañan el ADN, así como de alterar el mecanismo responsable de la formación de compuestos nitrosos.⁵⁰ Las formas reactivas de oxígeno dañan el ADN causando rupturas en las bandas del ácido nucleico, translocaciones y deleciones.²⁶ Esta bacteria no tiende a disminuir la secreción del ácido ascórbico si no de la gastritis crónica causada por la infección resulta en una hipoclorhidria que conduce a un sobrecrecimiento bacteriano.

1.11 TRATAMIENTO

Existe un gran número de fármacos que se pueden utilizar en pacientes con infección por *Helicobacter pylori*. Sin embargo la multiplicidad de fármacos, la dosis y la duración del tratamiento así como las pautas para erradicarlo es muy diversa, por lo que la decisión de escoger uno u otro fármaco para el tratamiento es difícil. Los tratamientos que se utilizan en la actualidad se basan en combinaciones dobles, triples o cuádruples.⁶⁴ El tratamiento para la erradicación de *Helicobacter pylori* fue desarrollado por Borody en 1989, donde se incluyen medicamentos como Bismuto, Metronidazol y Tetraciclinas.

Para el tratamiento contra la infección por *Helicobacter Pylori* se han utilizado 3 tipos de terapias:

- **Terapia dual:** 1 antibiótico, se usa un inhibidor de la bomba de protones, pero puede causar resistencia por las bajas dosis de antibiótico.
- **Terapia triple:** 2 antibióticos, es la terapia mas recomendada puede erradicar en un 95% a *Helicobacter pylori*.
- **Terapia cuádruple:** 2 antibióticos en dosis elevadas

RÉGIMEN MEDICAMENTOSO	DOSIS TERAPEUTICA	EFICACIA	DURACIÓN DEL TRATAMIENTO
TERAPIA DUAL			
Claritromicina	500mg 3x/día	74%	14 días
Omeprazol	40 mg diarios		
Claritromicina	500 mg 3 x/día	82%	14 días
Ranitidina	400 mg 2x/día		
TERAPIA TRIPLE.			
Tetraciclina	500 mg 4x/ día	90%	14 días
Metronidazol	250 mg 4x/día		
Bismuto	2 tabletas 4x/ día		
Amoxicilina	1g 2x/día		

Clorimetrocina	500mg 2x/día	90%	14 días
Omeprazol	20 mg 2x/día		
Ranitidina	40 mg 2x/ día	90%	14 días.
Claritromicina	500 mg 2x/ día		
Amoxicilina	1 g 2x / día		

Tabla N.2 Tratamiento para la enfermedad causada por *Helicobacter pylori*.

2. HIPOTESIS: *Helicobacter pylori* tiene en su genoma segmentos de genes de virulencia llamados islas de patogenicidad. Un factor de virulencia que es expresado por la cagPAI es la proteína CagA⁺. En estudios previos se ha demostrado que cerca del 60-82% de las cepas de *Helicobacter pylori* contienen una isla de patogenicidad cagPAI, si los pacientes infectados con tales cepas tienen mucha mayor probabilidad de desarrollar úlcera péptica o cáncer gástrico, entonces se espera que exista mayor prevalencia en pacientes con úlcera péptica, linfoma, cáncer gástrico, con respecto a los pacientes con diagnóstico clínico de gastritis superficial.

3. JUSTIFICACION: El 15% de la población infectada, la infección se asocia con el desarrollo de úlcera péptica o cáncer, el cual es la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial.

Aproximadamente el 90% de las úlceras y el 60% de los adenocarcinomas gástricos han sido atribuidos a la infección con *Helicobacter pylori*.

La infección a largo plazo empieza en la niñez, frecuentemente progresa de una gastritis atrófica, la cual es el precursor histológico de un adenocarcinoma gástrico

Cerca del 60-80% de las cepas de *Helicobacter pylori* contienen una isla de patogenicidad llamada cagPAI. Los pacientes infectados con tales cepas tienen mucha mayor probabilidad de desarrollar úlcera péptica o cáncer gástrico en relación a los pacientes infectados con cepas cagPAI⁻.

4. OBJETIVO: Determinar la prevalencia de cepas de *Helicobacter pylori* cagA⁺ en pacientes con gastritis, úlcera péptica, linfoma y cáncer gástrico por el método de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para confirmar la relación existente entre las enfermedades antes mencionadas (gastritis, úlcera péptica, linfoma y cáncer gástrico) y las cepas de *Helicobacter pylori* cagA⁺.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES:

- Aislar e identificar la bacteria *Helicobacter pylori* en biopsias de antro y de cuerpo de personas con diversas enfermedades gastroduodenales.
- Identificar si las cepas de *Helicobacter pylori* son cag A⁺ por medio del método PCR.
- Determinar la prevalencia de cepas cagA⁺ en las biopsias de pacientes con diversas enfermedades gastroduodenales.

5. OBTENCION DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Los pacientes incluidos en este estudio son de tres hospitales diferentes Hospital Gabriel Mancera, Hospital de Especialidades y Hospital de Oncología estos últimos de CMN Siglo XXI de la Ciudad de México. De cada paciente se tomaron 4 muestras de antro y 4 muestras de cuerpo. Cada muestra fue clasificada de acuerdo al diagnóstico endoscópico en los grupos de gastritis crónica, úlcera péptica, linfoma y cáncer gástrico.

El número de biopsias analizadas corresponde a una población de **121 adultos** incluyendo hombres y mujeres.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 REACTIVOS

- Reactivo de Ureasa (Ver anexo)
- Reactivo de Peróxido de Hidrógeno al 30% (Ver anexo)
- Placas de Oxidasa impregnado de Diclorhidrato de Tetrametil-p-fenilendiamina (Becton-Dickinson).
- Sistema de Velobiosis Gas Pack (Becton-Dickinson).
- Reactivo de GES.
- Bromuro de Etidio (Ver anexo).
- Buffer de PCR 10x (Invitrogen Life Technologies).
- Desoxinucleótidos Trifosfatos (dNTP'S) (Ver anexo).
- Iniciadores o Primer UREC y cagA3' (Ver tabla).
- Taq. Polimerasa (Invitrogen Life Technologies).

6.2 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 Sangre 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 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 de 6x para PCR (Ver anexo).

6.3 CEPAS DE REFERENCIA.

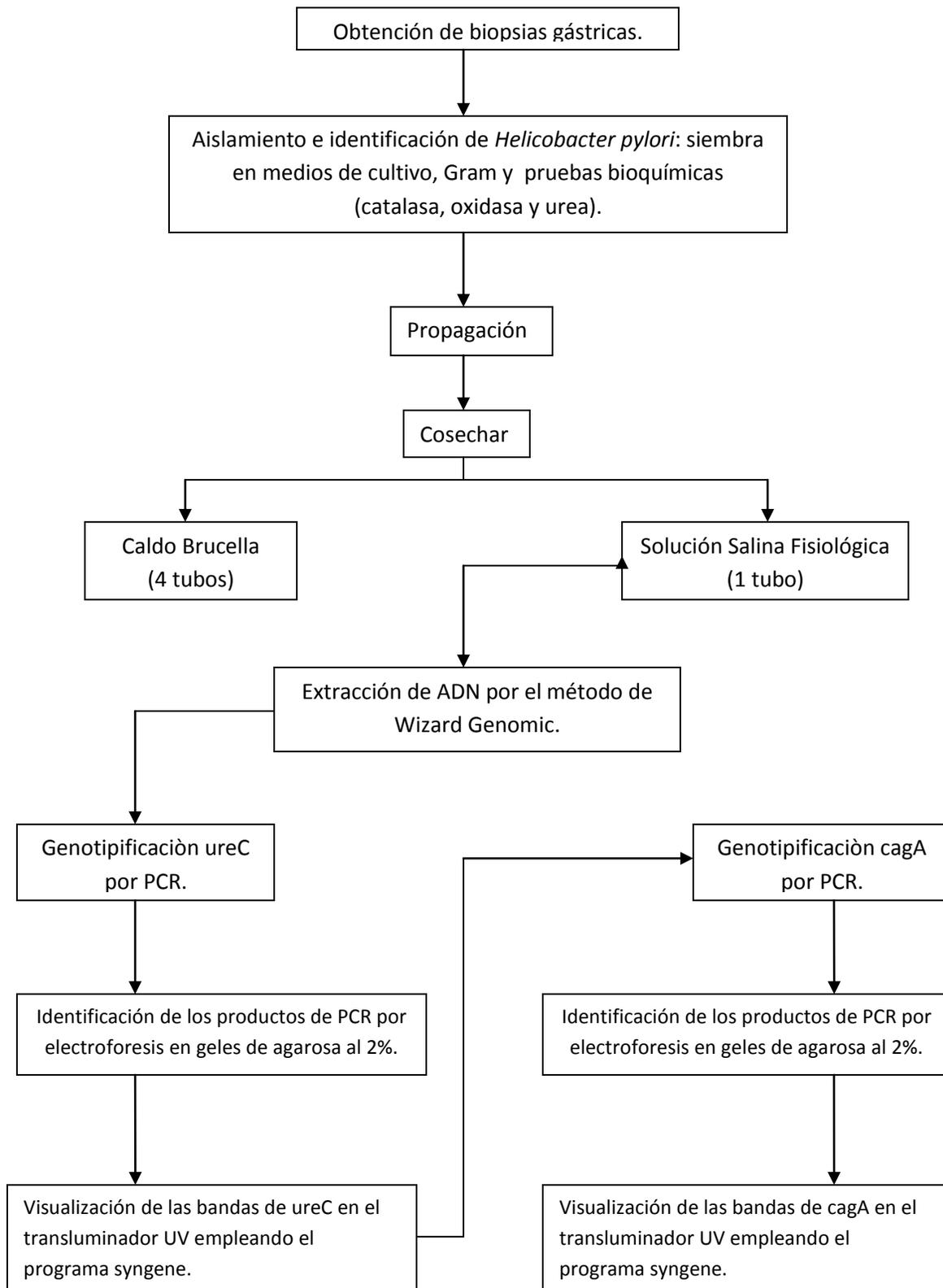
Cepa J99 Control positivo para cag A+ y Urec+

Cepa 8822 Control positivo para cag A+y Urec+

6.4 EQUIPOS.

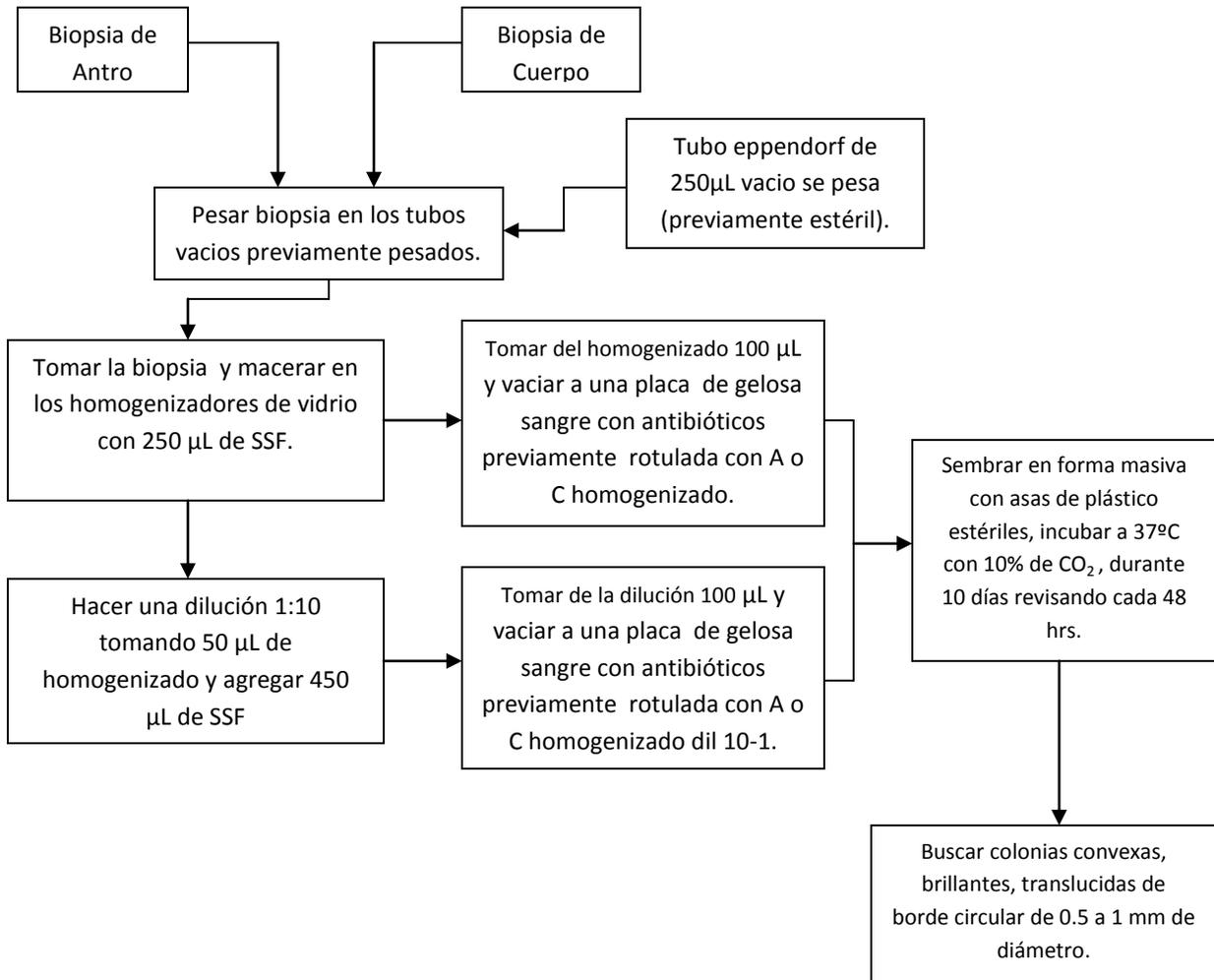
- Campana de flujo Laminar (Nuair).
- Microscopio (Olympus Bx 40).
- Incubadora de CO₂ (Nuair).
- Balanza Analítica (Mettler Toledo).
- Microcentrífuga (Biofuge Heraeus, Accesolab).
- Termociclador (Gene Amp, PCR System 9700).
- Procesador de imágenes (Bioquim, Synges).
- Potenciómetro (Beckman).

6.5 ESQUEMA DE TRABAJO.

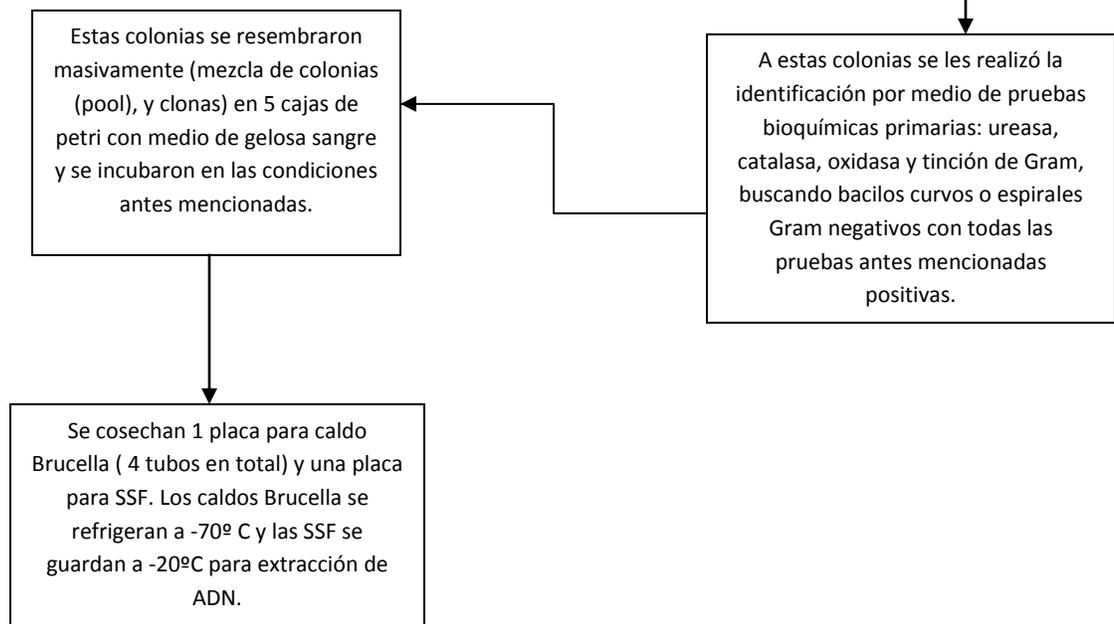


6.6 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Helicobacter pylori*.

6.6.1 AISLAMIENTO A PARTIR DE BIOPSIAS GÁSTRICAS.



6.6.2 CONSERVACION DE MUESTRAS DE *Helicobacter pylori*.



6.7 GENOTIPIFICACIÓN DEL GEN UREC.

6.7.1 EXTRACCIÓN DEL DNA POR EL METODO DE WIZARD GENOMIC.

Método

1. Tubo de 1.5 mL, suspensión de bacterias en solución Salina.
2. Centrifugar a 13,000-16,000 x g por 2 min. para empastelar las células. Remover el sobrenadante.
3. Adicionar 600µL de solución de Lisis Nuclear y mezclar suavemente con la pipeta hasta resuspender las células.
4. Incubar a 80°C por 5 mín para lisar las células después enfriar a T.A.
5. Agregar 1.2µL de RNAasa (10 mg/mL) al lisado de células y mezclar unas 25 veces invirtiendo el tubo.
6. Incubar a 37°C por 15-60 min. Enfriar la temperatura a T.A.
7. Adicionar 200µL de solución de precipitación de proteínas al lisado tratado con RNAasa, agitar vigorosamente en vortex a velocidad máxima por 20 seg. para mezclar la sol. De precipitación de proteínas con el lisado celular.
8. Incubar las muestras con hielo por 5 mín.
9. Centrifugar por 3 mín a 13,000-16,000 x g
10. Transferir el sobrenadante que contiene el DNA que se va a limpiar a un tubo de 1.5 ml que ha sido adicionado con 600µL de isopropanol.
11. Mezclar suavemente por inversión hasta que se observan las bandas de DNA.
12. Dejar precipitar toda la noche (-20°C) ó a TA.

13. Centrifugar por 10 min a 13,000-16,000 x g.
14. Decantar el sobrenadante y secar el tubo con papel absorbente, para agregar 600 μ L de etanol al 70% e invertir el tubo varias veces para lavar el DNA.
15. Centrifugar 10 min a 13,000-16,000 x g, con cuidado aspirar todo el etanol.
16. Agregar 50-100 μ L de tris EDTA (TE) al tubo para rehidratar el DNA incubando 1 HR a 65°C. Mezclar periódicamente la solución alternativamente se puede rehidratar dejando el tubo toda la noche a TA o a 4°C.
17. Guardar a 2-8°C

6.7.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

En la genotipificación de *ureC* y *cagA* se emplearon las siguientes condiciones descritas en la tabla 2.

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

Tabla N.3 Mezcla de reacción para genotipificar *ureC* y *cagA* por PCR.

Genotipificación de *ureC*

Se utilizó una pareja de iniciadores para amplificar el gen *ureC*: 5'-AAG CTT TTA GGG GTGTTA GGG GTT T-3' y 5' -AAG CTT ACT TTC TAACAC TAA CGC -3', amplifica para 294 pb. La reacción se realizó en un termociclador (Gene Amp, PCR System 9700).El programa de amplificación para PCR-*ureC* fue el siguiente: Desnaturalización inicial 94° C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1minuto, acoplamiento a 60°C por 1 minuto y extensión a72°C por 1 minuto, y una extensión final a 72°C por 4minutos. El genotipo se determinó por electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa al 2%.

Genotipificación de *cagA*

Para detectar la presencia del gen *CagA*, se emplearon la siguiente pareja de iniciadores *CagAR*: 5'CTTCCCTTAATTGCGAGATTCC3' y *CagAF*: 5'TTGACCAACAACCACAAACCG AAG3' que amplifica para 128 pb. La reacción se realizó en un termociclador (Gene Amp, PCR System 9700).El programa de amplificación para PCR-*cagA* fue el siguiente: Desnaturalización inicial 94° C por 4 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, acoplamiento a 50°C por 45 segundos y extensión a72°C por 45 segundos, y una extensión final a 72°C por 5 minutos. El genotipo se determinó por electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa al 2%.

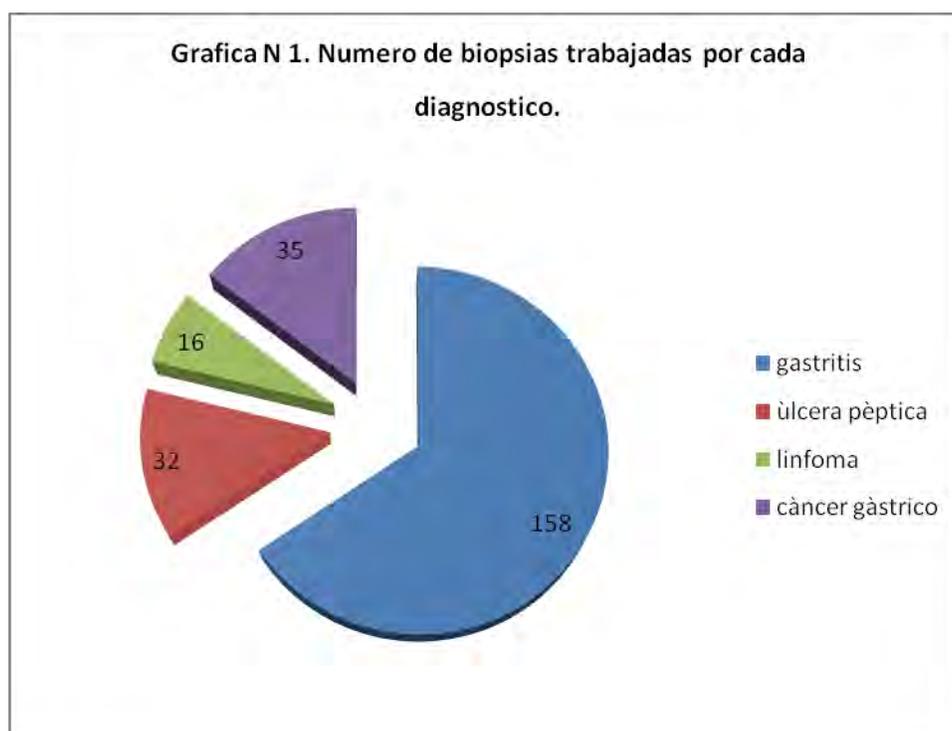
6.7.3 IDENTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR POR ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA AL 2%.

Se preparo agarosa al 2% en solución amortiguadora TAE concentración 1x. se lleno la cámara electroforética con la solución amortiguadora TAE 1x. Se mezclo 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 80-85V. se tiño el gel con Bromuro de Etidio al 0.06% durante 10 min y se enjuago bien con agar corriente. Se analizaron y observaron en el transluminador UV empleando el programa Syngene.

7. RESULTADOS

7.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Helicobacter pylori*.

En el estudio se procesaron 241* BIOPSIAS (121 biopsias de antro y 120 biopsias de cuerpo) de pacientes infectados (dos biopsias por paciente). Se tomó un barrido de colonias (pool) y clonas (colonia por colonia) por biopsia para la extracción de DNA y genotipificación de ureC y cagA por PCR. El cuadro clínico fue determinado durante la endoscopia y por diagnóstico histológico en cortes por cada biopsia.



Diagnóstico	gastritis	úlcer a péptica	linfoma	cáncer gástrico
Biopsias totales	158	32	16	35

Tabla N.4 Número de biopsias totales trabajadas en este estudio para cada enfermedad gastroduodenal.

*nota: de un paciente solo se obtuvo una biopsia correspondiente al antro.

Enfermedad gastroduodenal	Número de pacientes totales	N. de pacientes infectados por <i>Helicobacter pylori</i>	(%)
Gastritis	79	38	68
Úlcera péptica	16	5	9
Linfoma	8	2	3
Cáncer gástrico	18	11	20
TOTAL DE PACIENTES	121	56	100

Tabla N.5 Resultados de la frecuencia y porcentaje de enfermedades gastroduodenales en los pacientes infectados con *Helicobacter pylori*.

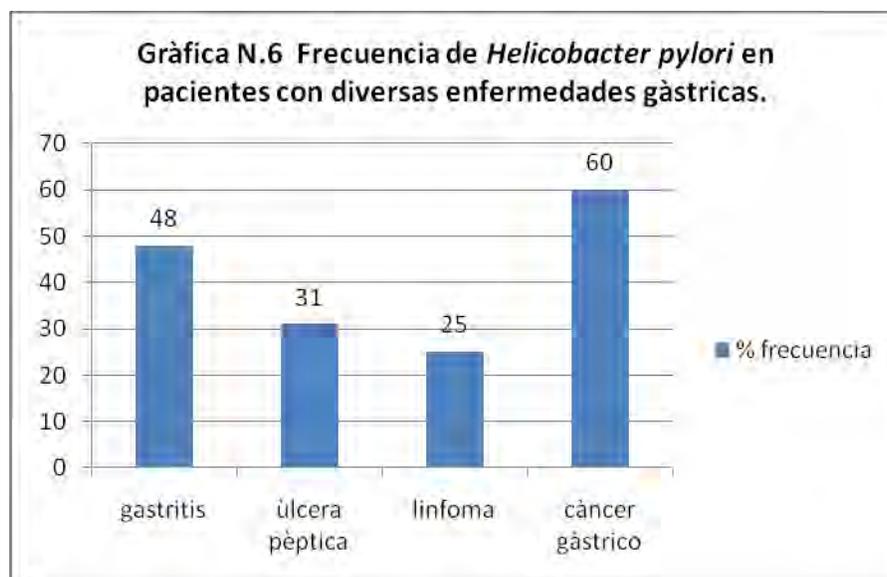


7.2 Genotipificación de ureC por PCR.

Para corroborar que todas las cepas aisladas eran *Helicobacter pylori* se le realizó la genotipificación de ureC.

Diagnóstico	gastritis	úlceras pépticas	linfoma	cáncer gástrico
Número de pacientes totales	74	16	8	18
Pacientes con Biopsias positivas para <i>Helicobacter pylori</i> .	38	5	2	11
% prevalencia	48	31	25	60

Tabla N.6 Resultado de la prevalencia de *Helicobacter pylori* en pacientes con enfermedades gastroduodenales.



Mediante la identificación por electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa al 2% se determinó el genotipo ureC, empleando un marcador molecular de 1Kb y un control positivo.

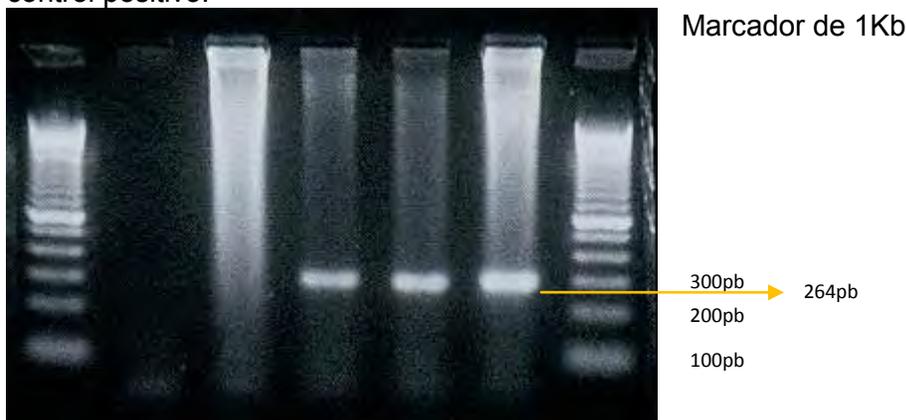


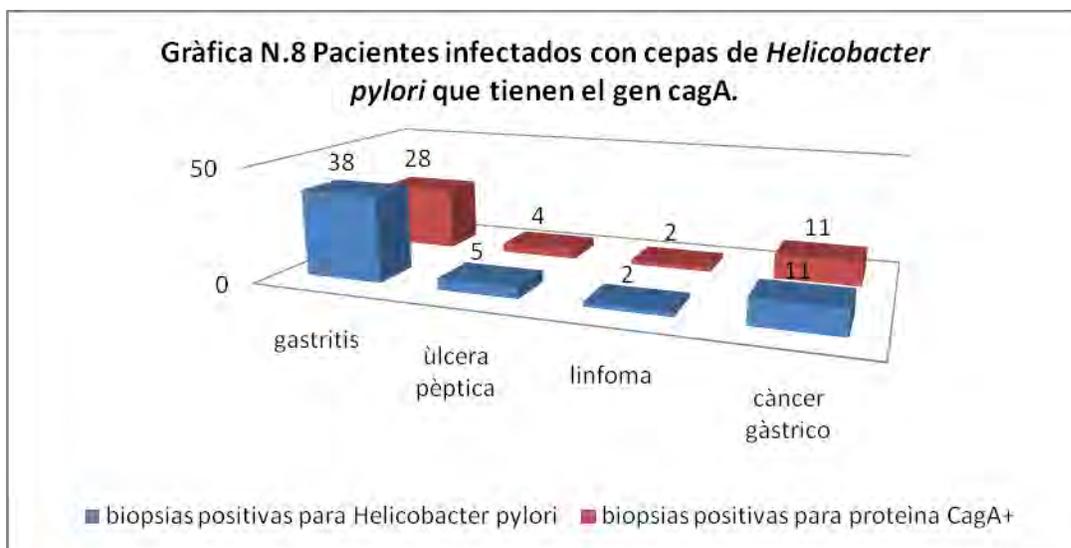
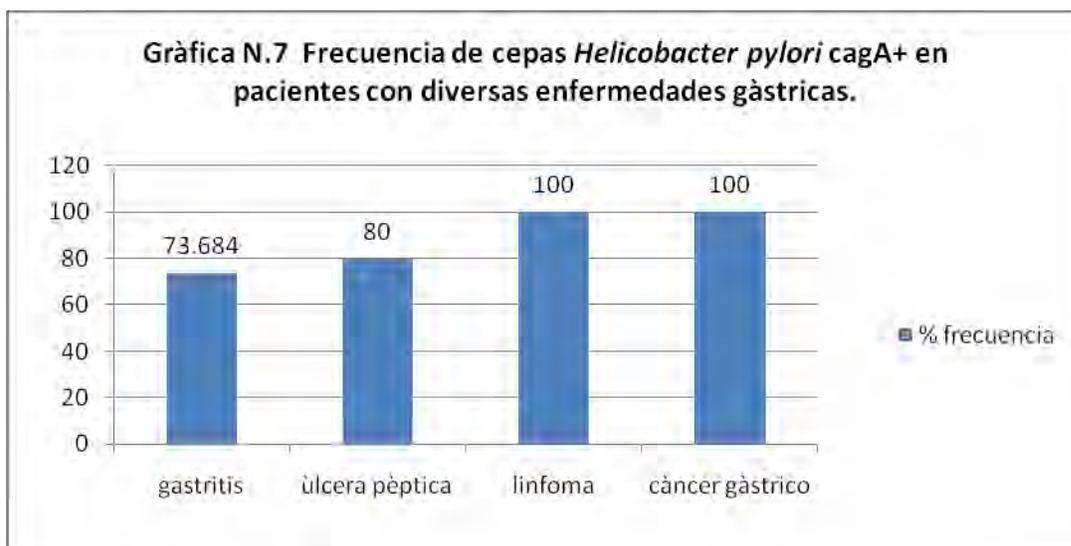
Figura 20. PCR-ureC en biopsias gástricas. Líneas 2 y 6 controles negativo y positivo, respectivamente. Línea 3 ureC negativo y líneas 4 y 5 ureC positivo (294 pb). Líneas 1 y 7 marcador molecular de 1 Kb.

7.3 Genotipificación de cagA por PCR.

Para cada cepa positiva para ureC se le realizó la genotipificación de la región completa de cagA. En el grupo de gastritis se obtuvo 74% (28/38). Para el grupo de úlcera péptica el 80%(4/5), del grupo de linfoma 100% (2/2) y para el grupo de cáncer gástrico 100% (11/11).

Diagnóstico	gastritis	úlcerapéptica	linfoma	cáncer gástrico
Pacientes con Biopsias positivas para <i>Helicobacter pylori</i>	38	5	2	11
Pacientes con Biopsias positivas para el gen cagA+	28	4	2	11
%	73.684	80	100	100

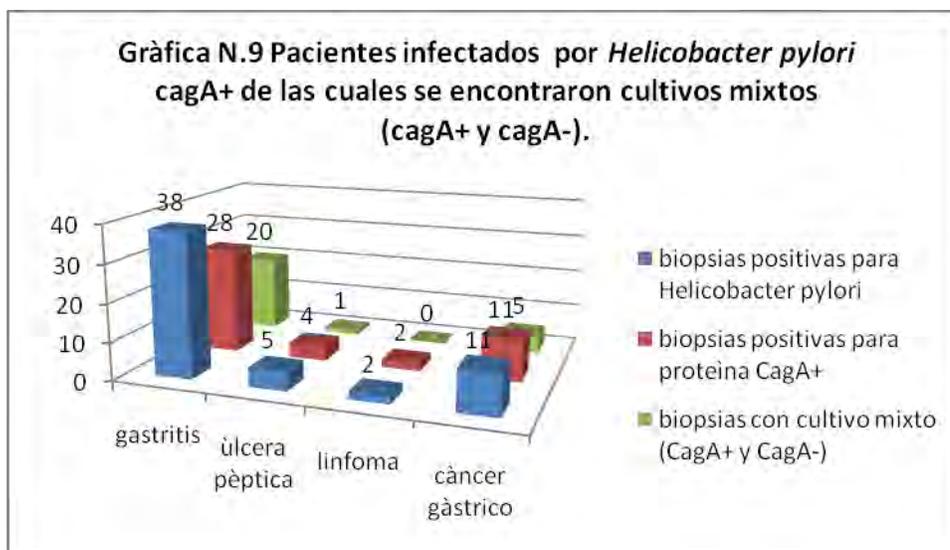
Tabla N.7 Prevalencia del gen cagA en pacientes infectados con *Helicobacter pylori* con diversos diagnósticos gastroduodenales.

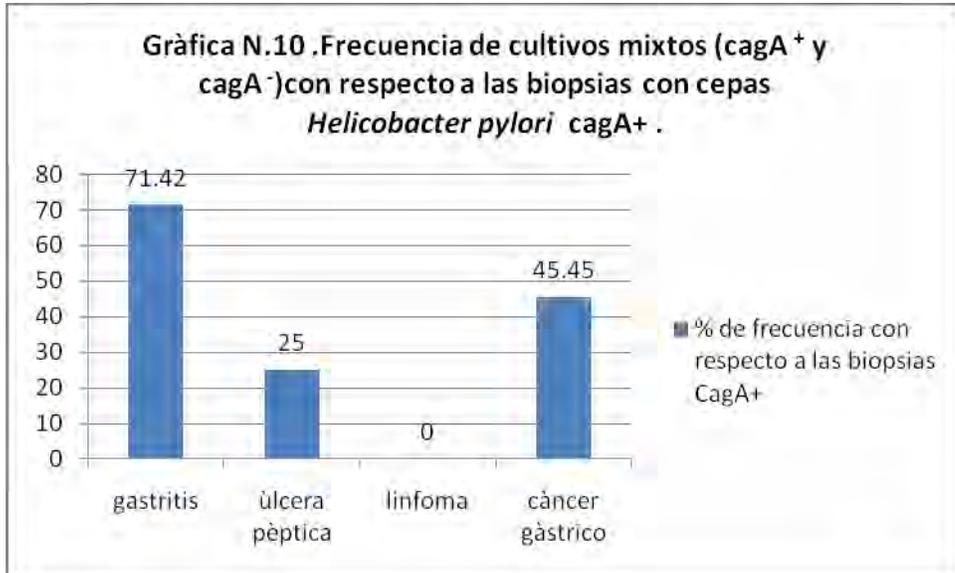


También se encontró cultivos mixtos en las biopsias de los pacientes que están infectados con *Helicobacter pylori* cagA+ ó sea que hay cepas que no presentan dicha proteína y que ambas están colonizando el antro o el cuerpo en el estomago del paciente.

Diagnóstico	gastritis	úlceras pépticas	Linfoma	cáncer gástrico
Pacientes con Biopsias positivas para <i>Helicobacter pylori</i>	38	5	2	11
Pacientes con Biopsias positivas para proteína CagA+	28	4	2	11
Pacientes con Biopsias con cultivo mixto (CagA+ y CagA-)	20	1	0	5
% con respecto a las biopsias CagA+	71.42	25	0	45.45

Tabla N.8 Número de pacientes con biopsias cagA+ donde se encontró cultivo mixto.





Mediante la identificación por electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa al 2% se determinó el genotipo cagA empleando un marcador molecular de 1Kb y un control positivo.

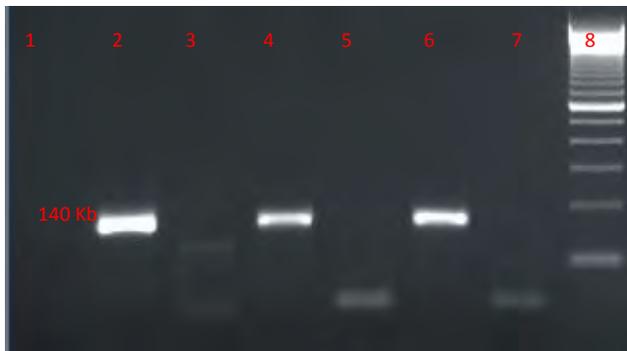


Figura N. 21. Amplificación del gen *cagA* de *H. pylori*. Los pozos corresponden a 8: marcador de peso molecular 1 Kb, 2: control positivo, 1: control negativo, 3,5 y 7 paciente negativo, 4 y 6: pacientes positivos.

8.DISCUSIÓN

La proteína CagA de *Helicobacter pylori* es un antígeno inmunodominante caracterizada por su elevada antigenicidad a pesar de representar un bajo peso entre las proteínas celulares. Las cepas de *Helicobacter pylori* pueden ser divididas en dos grupos basados en la presencia o ausencia del gen cagA. En este estudio se encontró una relación entre la presencia de gen cagA con el desarrollo de diferentes enfermedades gástricas como son gastritis, úlcera péptica, linfoma y cáncer gástrico. La presencia de este gen es reconocido como un importante marcador de las especies, que les confiere un riesgo incrementado para el desarrollo de las enfermedades antes mencionadas.

En este trabajo, la determinación de pacientes positivos a la infección se determinó mediante el aislamiento de *Helicobacter pylori* por cultivo de biopsias gástricas.

Después para poder confirmar que si fuesen *Helicobacter pylori* y no basarse en un falso positivo se realizó PCR para el gen ureC ya que éste es un método con mayor sensibilidad que el cultivo de estas. A todos los pacientes que dieron positivos en la prueba de cultivo también dieron positivos para la PCR UreC ya que es un gen exclusivo de esta bacteria, obteniéndose una incidencia mayor en pacientes con diagnóstico de cáncer gástrico 60%(11/18), en forma decreciente se obtuvo una proporción de 48% (38/79) en pacientes con cuadros clínicos de gastritis, una incidencia del 31% (5/16) en pacientes con úlcera péptica y finalmente 25% (2/8) en pacientes con linfoma (Ver tabla 5).

Entre un 60 a un 70% de las especies de *Helicobacter pylori* contienen el gen denominado cagA(gen asociado a la citotoxina), que codifica para una proteína de 128 KDa denominada CagA. Este gen representa una parte de una gran entidad genómica denominada isla de patogenicidad. En este trabajo todas las biopsias que dieron positivas para *Helicobacter pylori* se les realizó una PCR para saber si eran cagA positivas y se encontró que de los 38 pacientes con gastritis 28 de ellos dieron positivas para el gen cagA las cuales representan 74%, de los 5 pacientes con úlcera gástrica 4 dieron positivas para el gen cagA (80%), en las

biopsias de pacientes con linfoma se obtuvo un 100% de positividad para este gen al igual que en pacientes con cáncer gástrico (Ver tabla 6). Entonces como se puede ver estos datos nos muestran una predominancia en la expresión del gen *cagA* según el tipo de enfermedad. En este caso se observó que hay predominancia en las personas con gastritis y úlcera péptica, pero este estudio reveló que las personas con diagnóstico de linfoma y cáncer gástrico tienen cepas de *Helicobacter pylori* que expresan en su totalidad el gen *cagA* . Entonces si a mayor tiempo de exposición de cepas *cagA* positivas de esta bacteria aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades gástricas más severas iniciando por una gastritis leve, es por eso que se observó en todas biopsias de cáncer que son positivas para *Helicobacter pylori* todas son *cagA* positivas al igual que las biopsias de linfoma.

Se encontró que los pacientes con las enfermedades antes mencionadas presentan infección mixta lo que sugiere la presencia de infección múltiple debido a que tienen cepas de *Helicobacter pylori* *cagA* positivas y *cagA* negativas (Ver tabla 7). Para los casos de gastritis el 70% presenta una infección múltiple, el 25% en personas con úlcera péptica , en cáncer gástrico el 45% mientras que en pacientes con linfoma no se encontró infección múltiple porque todas las cepas de *Helicobacter pylori* son en su totalidad *cagA* positivas. Este resultado se debe a que el estómago normal carece de tejido linfoide organizado, siendo la infección crónica por la bacteria *Helicobacter Pylori* la responsable de la aparición de tejido MALT en la mucosa gástrica.⁴¹

Existe una estrecha relación entre la infección por *Helicobacter Pylori* y el desarrollo de linfoma MALT gástrico, demostrado por diferentes estudios. En estudios epidemiológicos se ha observado una significativa prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* en pacientes afectados con el linfoma MALT, con una tasa de infección cercana al 100%.¹⁰⁰

La infección por esta bacteria se asocia con el 90% de los pacientes con linfoma gástrico MALT de bajo grado, este padecimiento representa alrededor del 10% del total de linfomas y un 3% del total de neoplasias gástricas.⁸³

Se ha demostrado que el desarrollo del linfoma gástrico MALT depende de la activación de los linfocitos T por *Helicobacter pylori*, lo que provoca la secreción de diversas quimiocinas (IL-2, IL-8), que a su vez estimulan a los linfocitos B localizados en la corona externa de los folículos linfoides, estos inducen una transformación maligna en células centricitoides marginales que infiltran y destruyen el epitelio mucoso, formando las lesiones características de este tipo de linfomas.⁵⁴

El proceso comienza con una colonización e inflamación aguda de la mucosa gástrica por esta bacteria con destrucción de foveolas gástricas. Se aloja en ellas creando una nube de amonio gracias a que posee una enzima, la ureasa, para defenderse del medio ácido. Allí actúa extracelularmente sobre las vacuolas de mucina, provocando en muchos casos una erosión de la mucosa.⁸⁶

La inflamación aguda evoluciona a una inflamación crónica, con aumento de linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos.¹¹⁶ La respuesta del hospedero para la infección es la inducción de daño al epitelio gástrico y por consiguiente daño por la patogenicidad de la bacteria. Durante la fase temprana de la infección, la unión de *Helicobacter pylori* a las células del epitelio gástrico, en particular a través de BabA y por cepas que contengan las isla de patogenicidad cag, resultan la producción de IL-8 y otras quimiocinas, de tal modo las células epiteliales mandan una señal para activar el péptido (ENA-78) el cual es activador de los neutrófilos y el oncogén α relacionado con el crecimiento (GRO- α). El Factor Nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) y la respuesta temprana de el factor activador de la transcripción de la proteína 1 (AP1) son los mensajes intracelulares relacionados en este proceso. Las quimiocinas secretadas por las células epiteliales y los proteoglicanos, generan un gradiente con polimorfonucleares y estos son reclutados. La fase crónica de gastritis por *Helicobacter pylori* se asocia una respuesta de linfocitos con respuesta innata inicial. El reclutamiento linfocítico es facilitado por la expresión mediada por quimiocinas de señalización vascular como son la molécula de adhesión molecular al endotelio 1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) que son requeridas para la extravasación linfocítica. Los macrófagos que participan en la producción de IL-8 la cual es una citocina proinflamatoria

involucrada en la activación de el reclutamiento celular, en particular de las células T (Th0,Th1 y TH2), que responden con una respuesta parcial para *Helicobacter pylori*. Los linfocitos Th1 liberan Interferón gamma (INF- γ) que induce la expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad II, (MHC) y moléculas accesorias B7-1 y B7-2 por las células epiteliales, formando un componente para la presentación de antígeno. La citotoxina VacA y las regulan la apoptosis inducida por el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)iniciando la desorganización de la barrera epitelial, facilitando la translocación de los antígenos bacteriales e iniciando aun más la activación de los macrófagos. Las citocinas producidas por los macrófagos pueden alterar la secreción de moco contribuyendo al rompimiento de la lamina gástrica que ya ha sido iniciado por *Helicobacter pylori*. Las citocinas producidas en la mucosa gástrica inducen cambios en la secreción de acido y homeostasis. TNF- γ , IL-1 β e IF- γ aumentan la relación de gastrina, estimulando parenteral y enterocromafin a las células y su secreción de ácido. TNF- α también induce una disminución en el número de células antrales, iniciando una disminución en la producción de somatostatina y cambiando indirectamente la producción de ácido.¹⁰²

Inicialmente puede existir una gastritis antral difusa y los linfocitos emigran al territorio gástrico, hasta los capilares de la lámina propia.⁸⁶ En el curso de la gastritis crónica pueden aparecer folículos linfoides y agregados linfáticos en la base de la mucosa gástrica, lo que constituye el llamado tejido MALT. Este es el substrato anatómico necesario para que se desarrolle un linfoma MALT.

La proliferación tumoral de los linfocitos B es secundaria a una activación específica de linfocitos T reactivos. Estos linfocitos T son activados específicamente por *Helicobacter pylori* y las citocinas del huésped como fue explicado en el párrafo anterior.

En la actualidad no se conoce con exactitud el papel que desempeña *Helicobacter pylori* en la carcinogénesis; sin embargo, se ha propuesto que puede actuar a través de diversos mecanismos tales como incrementando la proliferación de las células gástricas en pacientes con úlcera duodenal y gastritis infectados con

Helicobacter pylori en comparación con los no infectados⁶¹, excretando lipasas y proteasas que degradan la mucina gástrica haciéndola menos viscosa y por consiguiente con insuficientes propiedades protectoras de la mucosa⁹⁶ y finalmente elevando la concentración intragástrica de amonio, que al reaccionar con reactivos intermediarios de oxígeno (ROIs) y nitritos, ocasionan daños oxidativos al DNA del hospedero. De tal forma que *Helicobacter pylori* podría actuar indirectamente como un agente mutagénico haciendo posible que alteraciones del DNA causadas por fragmentación o por sustancias carcinogénicas generen mutaciones estables.

En el trabajo se encontró una diferencia significativa en cuanto al porcentaje obtenido con los resultados para el diagnóstico inicial de *Helicobacter pylori* para las personas con diagnóstico de gastritis y úlcera péptica ya que para el primero el reportado es de 90% y el obtenido fue de 48% y para el segundo el rango es de 70-90% y el encontrado fue de 31%, esto se debe a que las biopsias de los pacientes fueron tomadas cuando las persona acudieron a un estudio de endoscopia y a partir de ahí se tomaba la decisión de tomarlas sin conocer su historia clínica y por lo consiguiente se desconoce si la enfermedad era inicial o si ya había sido diagnosticada con alguna de estas enfermedades y había recibido tratamiento para erradicar la bacteria, ya que los estudios con los que se está haciendo comparación son un grupo de personas clasificadas en base a su historia clínica y no tomadas al azar. Además existen otros factores independientes a *Helicobacter pylori* los cuales son causantes de estas enfermedades como son la dieta, consumo de alcohol, tabaquismo y factores genéticos.

Al comparar la prevalencia de cepas de *Helicobacter pylori* cagA⁺ reportados en trabajos anteriores con los resultados obtenidos en este trabajo se puede ver que existe una gran similitud ya que en pacientes con gastritis se obtuvo un 74 %

mientras que el reportado es de 76%⁹⁰, en pacientes con úlcera péptica se obtuvo un resultado de 80% comparado con el reportado que es de 87% para úlceras duodenales y 76% para úlceras gástricas²⁷, en pacientes con cáncer el reportado es de 95%¹⁰ y en personas con linfoma es de 98.5%³¹ mientras que el obtenido es de 100%.

En este estudio se puede ver la alta prevalencia de las cepas cagA⁺. Las bases para desarrollar este tipo de enfermedades no es por estar solamente infectado por *Helicobacter pylori* también intervienen varios factores de riesgo como el nivel socio-económico, las prácticas de higiene, hacinamiento, tabaquismo, consumo alto de sal en la dieta, el consumo de alcohol entre otros, así también, factores del huésped como la predisposición genética, el tipo de Complejo Mayor de Histocompatibilidad y el tipo de antígeno Lewis etc., influyen en la infección y determinan el desarrollo de la enfermedad .^{19, 21}

9. CONCLUSIONES

A partir del cultivo de biopsias de antro y de cuerpo se obtuvo un pool y clonas a las cuales se les realizó las pruebas bioquímicas primarias y las que dieron positivas se confirmaron que fueran *Helicobacter pylori* por medio del método de PCR y así se corroboró su presencia, ya que dieron positivas para el gen UreC debido a que todas las cepas de esta bacteria expresan este gen, después por el mismo método PCR se identificaron las cepas cagA positivas y se observó en que pacientes era mayor su prevalencia. Se encontró que en pacientes con úlcera gástrica y gastritis hay menor prevalencia de este tipo de cepas ya que hay otros factores que pueden causar este tipo de enfermedades como la dieta, consumo de alcohol, etc., también estos mismos pueden aumentar la severidad del problema a las personas que ya tienen alguna de estas enfermedades; además si no se da el tratamiento adecuado a los pacientes que poseen las cepas antes mencionadas, se puede llegar a desarrollar otras enfermedades como son linfoma y cáncer gástrico debido a que estas cepas tienen mayor virulencia debido a que contienen la isla de patogenicidad en específico el gen cagA, y es por eso que en estas personas se encontró mayor prevalencia de cepas cagA positivas.

En este trabajo se observó que los pacientes con las enfermedades antes mencionadas presentan infección mixta lo que sugiere la presencia de infección múltiple debido a que tienen cepas de *Helicobacter pylori* cagA positivas y cagA negativas.

9. CONCLUSIONES

A partir del cultivo de biopsias de antro y de cuerpo se obtuvo un pool y clonas a las cuales se les realizó las pruebas bioquímicas primarias y las que dieron positivas se confirmaron que fueran *Helicobacter pylori* por medio del método de PCR y así se corroboró su presencia, ya que dieron positivas para el gen UreC debido a que todas las cepas de esta bacteria expresan este gen, después por el mismo método PCR se identificaron las cepas cagA positivas y se observó en que pacientes era mayor su prevalencia. Se encontró que en pacientes con úlcera gástrica y gastritis hay menor prevalencia de este tipo de cepas ya que hay otros factores que pueden causar este tipo de enfermedades como la dieta, consumo de alcohol, etc., también estos mismos pueden aumentar la severidad del problema a las personas que ya tienen alguna de estas enfermedades; además si no se da el tratamiento adecuado a los pacientes que poseen las cepas antes mencionadas, se puede llegar a desarrollar otras enfermedades como son linfoma y cáncer gástrico debido a que estas cepas tienen mayor virulencia debido a que contienen la isla de patogenicidad en específico el gen cagA, y es por eso que en estas personas se encontró mayor prevalencia de cepas cagA positivas.

En este trabajo se observó que los pacientes con las enfermedades antes mencionadas presentan infección mixta lo que sugiere la presencia de infección múltiple debido a que tienen cepas de *Helicobacter pylori* cagA positivas y cagA negativas.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Akopyants NS, Kersulyte D, and Berg DE. **1995**. Cag II, anew multigene locus associated with virulence in *Helicobacter pylori*. Gut : 36:A1.
2. Alm RA, Trust TJ. **1999** Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. J Mol Med : 77(12): 834-846.
3. Aspinall GO, Monteiro MA. **1996**. Lipopolysaccharide of *Helicobacter pylori* strains P466 and MO19: structure of the O antigen and core oligosaccharide strains. Biochemistry ; 35: 2498-2504.
4. Appelmek BJ, Martino MC, Veenhoff F. **2000**. Phase variation in H type 1 and Lewis a epitopes of *Helicobacter pylori* lipopolisaccharide. Infec Immun ; 68: 5928-5932.
5. Bardham, P. K. **1997**. Epidemiological features of *Helicobacter pylori* in developing countries. Clin Infect Dis 25:973-978.
6. Blanco CA, Rivera P, Hernández F, Hevia F, GuillénF, Duran S. **1999**. Evaluación de una prueba de ureasa rápida para la detección de *Helicobacter pylori* y prevalencia de este agente en pacientes costarricenses. Rev. Latinoamer. Gastroenterol; 29:17-20.
7. Blaser M. J.**2005**. And engargered Species in the Stomach. Scientific American ;292 (2): 38-45.
8. Blaser M. J.**1988**. Bacteriology characteristics of *Campylobacter pylori* proceeding of the first Tokio International Symposium on Campylobacter pylori. Tokio Japon.
9. Blaser MJ. **1991**. *Helicobacter pylori*. Prince and pract inf dis. Update ;9:3-9.
10. Blaser MJ, Perez Perez G. I, Kleanthous H., Cover L. T. Peek R. M., Chyou P.H, Stemmerman G.N. and Nomura A. **1995**. Infection with *Helicobacter pylori* strains Possessing cagA is Associated with and Increased Risk of Developing Adenocarcionoma of the Stomach. Cancer Research, 55: 2111-2115.
11. Blaser MJ. **1996**. The bacteria behind ulcers. Scientific American; Feb: 92-97.
12. Blaser M, Berg D. **2001**. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. J Clin Invest ; 107(7): 767-773.
13. Bliss CM, Golenblock DT, Kates S, Linevsky JK. **1998**. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide binds to CD14 and stimulates release of interleukin-8, ephitelial neutrophil-activating peptide 78, and monocyte chemotactic protein 1 by human monocytes. Infect Immun; 66: 5357-5363.

14. Cava F, Cobas G. **2003**. Dos décadas de *Helicobacter pylori*. VacciMonitor Año 12, N.1 Enero-Marzo.
15. Cave DR, **1997**. Epidemiology and transmission of *Helicobacter pylori* infection How is *Helicobacter pylori* transmitted? Gastroenterology 113: S9-S14.
16. Correa P. **1992**. Human carcinogenesis a multistep and multifactorial process. Cancer Res; 52: 6735-40.
17. Correa, P., W. Haenszel, C Cuello, D Zavala, E. Fontham, G. Zamara, S. Tannenbaum, T. Collazos, and B. Ruiz. **1990**. Gastric precancerous process in a high risk population: cohort follow-up. Cancer Research 50:4737-4740.
18. Cover TL. **1998**. An intracellular target for *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. Trends in microbiology; 6(4): 127-129.
19. Cover T, Blaser M, **1995**. *Helicobacter pylori*: A bacteria cause of gastritis, peptic Ulcer disease and gastric Cancer; Asm New 61: 21-26.
20. Cover TL; Puryear W, Perez-Peres GI, Blaser MJ. **1991**. Effect of urease on HeLa cell vacuolating induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin. Infect Immun; 59: 1264-1270.
21. Cover TL, Glupczynski Y., Lage AP, Burette A, Murali K, R. Tummuru, Perez-Perez G I y Blaser MJ. **1995**. Serologic Detection of infection with *cagA*⁺ *Helicobacter pylori* strains; 33(6): 1496-1500.
22. Covacci A, Falkow S, Berg DE y Rappuoli R. **1997**. Did the inheritance of a pathogenicity island modify the virulence of *Helicobacter pylori*?. Trends in microbiology; 5(5): 205-208.
23. Davies GR. Et al. **1994**. Relationship between infective load of *Helicobacter pylori* and reactive oxygen metabolite production in antral mucosa. Scandinavian Journal of gastroenterology; 29: 419-424.
24. Dixon, M. F., R. M. Genta, J. H. Yardley, and P. Correa. **1996**. Classification and grading of gastritis. The update Sydney System. International Workshop on the histopathology of gastritis, Houston 1994. Am J Surg Pathol 20:1161-1181.
25. Dorrell N, Crabtree J, Wren B.W. **1998**. Host-Bacterial interactions and the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Trends in microbiology; 6(10): 379-383.
26. Drake IM, Warland D, Carswell N, et al. **1995**. Reactive oxygen species (ROS) activity and damage in *Helicobacter pylori* associated gastritis Effect of the eradication therapy Gut; 37: supp 1J: A155.
27. Dundon WG, De Bernard M, Montecucco C. **2001**. Virulence factors of *Helicobacter pylori*. Int J Med Microbiol: 290: 647-658.

28. Dunn B, Campbell G, Perez-Perez G. **1990**. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. J Biol Chem; 265: 9464-9468.
29. Dunn B, Cohen H, Blaser M J **1997**. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev; 10(4): 720-741.
30. Eaton KA; Morgan DR, Krakowka S. **1992**. Motility as a factor in the colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol; 37:123-127.
31. Eck M., Schmausser B., Haas R., Greiner A., Czub S., Muller-Hermelink H.K. **1997**. MALT- type lymphoma of the stomach is associated with *Helicobacter pylori* strain expressing the CagA protein. Journal Gastroenterology; 112(5): 1482-1486.
32. El-Omar, E. M., M. Carrington, W. H. Chow, K. E. McColl, J. H. Bream, H.A. Young, J. Herrera, J. F. Fraumeni, Jr., and C. S. Rabkin. **2000**. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. Nature 404:398-402.
33. Evans DJ. Jr, et al. **1995**. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil activating protein. Infection and Immunity; 63: 2213-2220.
34. Evans D, Quiroz D, Mendes E. **1998**. *Helicobacter pylori* CagA Status and s and m alleles of VacA in isolates from individuals with a variety of *Helicobacter pylori*: Associated Gastric disease. J Clin Microbiol; 36: 3435-3437.
35. Everhart JE, Kruszon-Moran D, Perez-Perez GI, Tralka TS. **2000**. Seroprevalence and Ethnic differences in *Helicobacter pylori* infection among adults in the United States J Infect Dis; 181: 1359-1363.
36. Fox JG, Correa P, Taylor NS, Thompson N, Fontham E. **1992**. High prevalence and persistence of cytotoxin-positive *Helicobacter pylori* strain in a population with high prevalence of atrophic gastritis. Am J Gastroenterol; 87: 1554-1560.
37. Fuchs, C. S., and R. J. Mayer. **1995**. Gastric carcinoma. NEJM 333:32-41.
38. Garder JD, Perdomo C. Sloan S, Hahne WF, Barth JA, Rodriguez –Stanley S, Robinson M. **2002**. Integrated acidity and rabeprazole pharmacology. Aliment Pharmacol Ther; 16(3): 455-464.
39. Ge Z, Taylor D. **1999**. Contributions of genome sequencing to understanding the biology of *Helicobacter pylori*. Annu Rev Microbiol; 53: 355-387.
40. Geis G, Surebaum S, Forsthoff B, Leying H. **1993**. Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol;38: 371-377.

41. Gisbert J.P., Boixeda D., Martin de Argila C. **1996**. Infección por *Helicobacter pylori* y cáncer gástrico. En infección por *Helicobacter pylori* ¿Dónde está el límite? Ed. Prouscience. Barcelona España: 179-197.
42. Gloria Premoli, Ana Julia Gonzales, Luis Alejandro Aguilera Galaviz. **2005**. Infección por *Helicobacter pylori* en niños. Su identificación en placa dental. Rev Mex de Ped; 72(2): 89-93.
43. González- Cuevas A, Juncosa T, Jene M, Varea V, Gene A, Muñoz C, Latorre C. **2001**. Infecciones por *Helicobacter pylori*. Detección de antígeno en muestras fecales. Enferm Infecc Microbiol Clin; 19: 49-52.
44. González Saldaña Napoleón. Infectología Clínica Pediátrica. Sexta edición. 1997. Editorial Trillas, México, D.F. P.p 569-572.
45. Goodwin C, Armstrong J, Peters M. Microbiology of *Campylobacter pylori*. **1989**. In Blasé M. Ed *Campylobacter pylori* in gastritis and peptic ulcer disease. New York. Medical Publishers: 25-49.
46. Gooding C. S., Armstrong J. A., et al. **1989**. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* a *Helicobacter pylori* comb.nov. and *Helicobacter mustelae* com.nov. respectively. Int. Journal Sist. Bacteriology; 39:397-405.
47. Graham S. K., Graham Y. D. **1998**. Contemporary Diagnosis and Management of *Helicobacter pylori* Associated Gastrointestinal Diseases. 1ra edición. Editorial Handbooks In Health Care Co. Newtown, Pennsylvania, USA.
48. Guarner J, Mohar A, Parsonet J. Halperin D. **1993**. The association of *Helicobacter pylori* with gastric Cancer and preneoplastic gastric lesions in Chiapas México. Cancer ; 71: 297-301.
49. Grubel P, Hoffman JS. **1997**. Vector Potential of Houseflies for *Helicobacter pylori*. J. Clin Microbiol; 36:783-787.
50. Hansson LE, Myren O, Bergstrom R, et al. **1994**. Nutrients and gastric cancer risk. A population bases control study in Sweden. Int J Cancer; 57: 638-44.
51. Hernandez T. M., **2001**. *Helicobacter pylori*. La bacteria que mas infecta al ser humano. Rev. Cubana Aliment nutr; 15(1): 42-54.
52. Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamasaki S. **2002**. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factors CagA is determined by variation in the tyrosine fosforilation sites. Proc Natl Acad Sci; 99: 14428-14433.
53. Higashi, H., R. Tsutsumi, S. Muto, T. Sugiyama, T. Azuma, M. Asaka, and M. Hatakeyama. **2002**. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intercellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. Science 295:683-686.
54. Husell T, Isaacson PG, Crabtree JE, Spencer J. **1993**. The response of cell from low-grade B-cell gastric Lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue of *Helicobacter pylori*. Cancer; 342: 571-574.

55. Josenhans C, Labigne A, Suyrebaum S. **1995**. Comparison Intrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: Both flagellin subunits, FlaA and FlaB are necessary for full motility in *Helicobacter* species. *J Bacteriol*; 177: 3010-3020.
56. Koneman EW, Allen SD, Schreckenberger PC; Winn WC, Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Lippincott William and Wilkins, Fifth Edition, 1997: 335-39.
57. Konturek JW. **2003**. Discovery by Jaworski of *Helicobacter pylori* and its pathogenetic role in peptic ulcer, gastritis and gastric cancer. *J. Physiol Pharmacol*; 54 suppl 3: 23-41.
58. Maeda S, Ogura K, Yoshida H, Funai F. **1998**. Major virulence factors, VacA and CagA are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. *Gut*; 42: 338-343.
59. Mannick EE, et al. **1993**. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. *Cancer Research*; 56: 3238-3243.
60. McGee DJ, Mobley HL. **1999**. Mechanisms of *Helicobacter pylori* infection: Bacterial factors. *Curr Top Microbiol Immunol*; 241: 155-180.
61. Moss SF, Calam J, Agarwal B, Wang S y Holt PR. **1996**. Induction of gastric Epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut*; 38: 498-501.
62. Muotiala A, Helander IM, Pyhala L, Kosunen TU y Moran AP. **1992**. Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infection and Immunity*; 60: 1714-1716.
63. Lage AP, Edmond G., Fauconnier A, Burete A., Butzler JP., Bollen A., Glupczynski Y. **1995**. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: Comparison with other invasive techniques and detection of cagA Gene in gastric biopsy specimens; 33(10): 2752-2756.
64. Lara LF, Cisneros GM, Gurney M., **2003**. One day quadruple therapy compared with 7 days triple therapy for *Helicobacter pylori* infection. *Arch J. Med* : 163: 2079-2084.
65. Mahdavi J, Sondèn B, Hurtig M, Olfat FO. *Helicobacter pylori* sabA adhesion in persistent infection and chronic inflammation. *Science* 2002; 297: 573-578.
66. Mannick EE, et al. **1993**. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. *Cancer Research*; 56: 3238-3243.
67. Marshall BJ. **1984**. Unidentified curved bacillus on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* (8336): 1273-1275.
68. Marshall BJ, Warren JR. **1984**. Unidentified curved bacilli in the stomach patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1(8390): 1311-1315.

69. Masanori Hatakeyama. **2004**. The interaction between *cagA* positive *Helicobacter pylori* and gastric epithelial cells. *Nature Reviews Cancer*; 4: 688-694.
70. Mazari-Hiriart M, Lopez-Vidal Y, Calva JJ. **2001**. *Helicobacter pylori* water system for human use in Mexico city. *Water Sci Technol* ;43: 93-98.
71. Mazari-Hiriart M, Lopez-Vidal Y, Castillo- Rojas G, Ponce de León S. **2001**. *Helicobacter pylori* and other enteric bacteria in freshwater environments in Mexico city. *Arch Med Res.*;32: 458-467.
72. McGee DJ, Mobley HL. **1999**. Mechanisms of *Helicobacter pylori* infection: Bacterial factors. *Curr Top Microbiol Immunol*; 241: 155-180.
73. Mègraud F. **1995**. Transmission of the *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. *Aliment, Pharmacol. Ther*; 9 (suppl 2):85-91.
74. Moran AP. **1992**. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide-mediated gastric and extragastric pathology. *J Physiol Pharmacol*; 50: 787-805.
75. Moss S F, Calam J, Agarwal B, Wang S y Holt PR. **1996**. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut*; 38: 498-501.
76. Muotiala A, Helander IM, Pyhala L, Kosunen TU, y Moran AP. **1992**. Low Biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. *Infection and Immunity*; 60: 1714-1716.
77. National Institute of Health, Office of the Director NIH Consensus Statement *Helicobacter pylori* in Peptic Ulcer Disease Vol12 N. 1 Bethesda, MD: National Institutes of Health; 1994.
78. Nomura, A., G. N. Stemmerman, P.-H. Chyou, I. Kato, G. I. Perez-Perez, and M. J. Blazer. **1991**. *Helicobacter pylori* infection and gastritis carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *New Engl J Med* 325:1132-1136.
79. Odenbreit, S., J. Püs, S. Sedlmaier, E. Gerland, W. Fischer, and R. Haas. **2000**. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 287:1497-1500.
80. Ottlecz A, Romeero J. J, Hazell S J, graham D. Y, y Lichtenberger L. M. **1993**. Phospholipase activity of *Helicobacter pylori* and its inhibition by bismuth salts *Digestive Diseases and Sciences*; 38: 2071-2080.
81. Pajares Garcia J. M., Correa P., *Infección por Helicobacter pylori en las lesiones gastroduodenales*. Editorial: Prous Science, S.A. Barcelona, España. 1998.
82. Parsonnet, J., G. D. Friedman, D. P. Vandersteen, Y. Chang, J. H. Vogelman, N. Orentreich, and R. K. Sibley. **1991**. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *New Engl J Med* 325:1127-1136.
83. Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gello AB, Warnke RA, Jellum E, Orentreich N, Vogelman JH, friedman GD. **1994**. *Helicobacter pylori* infection and gastric Lymphoma. *N Engl J Med*; 330: 1267-1271.

84. Parkin DM, Pisani P, Fearly J. **1993**. Estimates of worldwide incidence of eighteen major cancer in 1985. *Int J Cancer*; 54: 594-606.
85. Perez-Perez G, Dworkinbg B, Blaser M. **1988**. *Campylobacter pylori* antibodies in humans. *Ann Inter Med*; 109: 11-17.
86. Perkins A., Garcia-Spido. **1999**. Linfoma tipo MALT de localización gástrica
Infección por *Helicobacter pylori*.
www.helicobacterspain.com/clinica/linfoma-MALT-revision.htm
87. Queiroz Dulciene M. M., Gifone A. Rocha, et al. **1995**. *Helicobacter pylori*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*; 15(6): 424-429.
88. Replogle, M. L., S. L. Glaser, R. A. Hiatt, and J. Parsonnet. **1995**. Biologic sex as a risk factor for *Helicobacter pylori* infection in healthy young adults. *Am J Epidemiol* 142:856-863.
89. Rivas TF, Hernández F. **2000**. *Helicobacter pylori*: factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Rev Biomed*; 11: 187-205.
90. Rokkas T, Filipe MI, Salden GE. **1991**. Detection of an increased incidence of early cancer in patients with intestinal metaplasia type III who are closely followed up. *Gut* ; 32:1110-1113.
91. Rokkas T., Ladas S., Liatsos C., Petridou E., Papatheodorou G., Theocharis S., Karameris A. and Raptis S. **1999**. Relationship of *Helicobacter pylori* CagA status to gastric cell proliferation and apoptosis. *Digestive Diseases and Sciences*; 44(3): 487-493.
92. Rudi J, Kolb C, Maiwald M, Kick D. **1998**. Diversity of *Helicobacter pylori* vacA and cagA genes and relationships to VacA and protein expression cytotoxin production and associated diseases. *J Clin Microbiol*; 36: 944-948.
93. Shalamat M., Mai U., et al. **1993**. Use of autoradiography to assess viability of *Helicobacter pylori* in water. *Epidemiology Infect*; 111: 483-490.
94. Schmidt H, Hensel M. **2004**. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*; 17(1): 2004.
95. Segal ED, Falkow S, Thompkins LS, **1996**. *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangement and tyrosine phosphorylation of host cell protein. *Proc Natl Acad Sci*; 93:1259-1264.
96. Sidebotham RL, Batten JJ, Karmn QN, Spencer J, Baron JH. **1991**. Breakdown of gastric mucus in presence of *Helicobacter pylori* *J Clin Pathol*; 44:52-57.
97. Sobhani I. et al **1992**. *Helicobacter pylori* stimulates gastric acid secretion via platelet activating factor. *Journal of Physiology and Pharmacology*; 47: 177-185.
98. Solnick, J. V., and G. M. Young. Bacterial pathogenicity island and infectious diseases, p. 111-121. In M. Syvanen and C. I. Kado (ed.), *Horizontal Gene Transfer*, 2 ed. **2002**. Academic Press, San Diego.

99. Stein M, Rappuoli R, Covacci A. **2000**. Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation. Proc Natl AcadSci; 97: 1263-1268.
100. Stolte M., Eldts., Bayerdofther E., Fisher R. **1994**. *Helicobacter pylori* associated gastric Lymphoma. In Helicobacter, basis mechanisms to clinical uses. De hunt R:H Tytgat G.N. ed Kluwer Academic Publishers.Lancasters UK: 498-503.
101. Stuart L. Hazell., Mendz George L. **1997**. How H.p. works: an overview of the metabolism of *Helicobacter pylori* Helicobacter; 2: 1-11.
102. Suerbaum, S., and P. Michetti. **2002**. *Helicobacter pylori* infection. N Engl J Med 347:1175-1186.
103. Taylor, D. N., and M. J. Blaser. **1991**. The epidemiologic of *Helicobacter pylori* infection. Epidemiologic Reviews 13:42-59.
104. Torres J. Leal-Herrera Y, Perez-Perez G, Gomez A, Camorlinga-Ponce M, Cedillo-Rivera R, Tapia-Conyer R, Muñoz O. **1998**. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* Infection in México. J Infect Dis;178: 1089-1094.
105. Torres, J., L. Lopez, E. Lazcano, M. Camorlinga, L. Flores, and O. Muñoz **2005**. Trends in *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Mexico. In press.
106. Tomb Jean F., White O., Kerlavage A.R. **1997**. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature Vol. 389 Septiembre 25.
107. Tsuji S, Kawai N, Tsujii M, Kawano S, Hori M. **2003**. Review article: inflammation- related promotion of gastrointestinal carcinogenesis- a perigenetic pathway. Aliment Pharmacol Ther(18 Suppl 1): 82-9.
108. Vasile Soltesz, Barbro Z., et al **1992**. Optimal Survival of *Helicobacter pylori* under various transport conditions. Journal of Clinical Microbiology; 30(6): 1453-1456.
109. Wadstrom T, Hirno S, Boren T. **1996**. Biochemical aspect of *Helicobacter pylori* colonization of human gastric mucosa. Aliment Pharmacol Ther; 10: 17-27.
110. Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, Teleford JL. **1995**. Analysis of expression of cagA and vacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating toxin, Infect Immun; 63:94-98.
111. www.helicobacterspain.com
112. [//es.wikipedia.org](http://es.wikipedia.org)
113. www.zonamedica.com/gastroenterologia

114. Morris A., Nicholson G., **1987**. Ingestion the *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised gastric pH. American Journal of Gastroenterology: 82: 192-199.
115. Berkow R., Fletcher A. **1994**. El Manual Merk de Diagnóstico y Terapéutica. Editorial Hacountrt Brace. Novena edición Española; 5: 850-856.

11. Anexo

11.1 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 si es necesario. Filtrar al vacio utilizando poro de 0.22 μm .
- **Reactivo de Peróxido de Hidrogeno al 30%.** Mezclar 30 ml de peróxido de Hidrogeno concentrado (Sigma Diagnostic`s) con 70 ml de agua destilada.
- **Placas de Oxidasa impregnado con Diclorhidrato de Tetra-metil p-Fenilendiamina** (Becton-Dickinson).
- **Sistema de velobiosis Gas Pack.** (Becton Dickinson)
- **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 50mM** (Invitrogen Life Technologies)
- **Desoxinucleòtidos trifosfatos (dNTP`s).** Preparar una mezcla con 10 μL de cada desoxinucleòtido trifosfato 100 mM dATP, dCTP,dGTP y dTTP (Invitrogen Technologies) y añadir 60 μL de agua libre de nucleasas.
- **Iniciadores o primer**
- **Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologies).**

11.2 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 1 L de agua destilada y esterilizar.
- **Caldo brucella. Suspende 28 g de 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 minutos.
- **Placas de Agar Base Brucela adicionado con sangre de carnero al 5% con y sin antibióticos(Anexo10.3)**
- **Glycerol** (Boheringer 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.
- **Isopropanol** (Ommisolv)
- **Etanol al 70% (v/v)** mezclar 70 ml de Etanol (J.T Baker) con 30 ml de agua destilada.
- **Solución amortiguadora de corrimientos Tris-Acetato EDTA (TAE 50x) para electroforesis en geles de agarosa.** Disolver 242 g 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 1Kb** (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.

11.3 MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

Medio agar sangre de carnero al 5%

Suspender 40 g de polvo en 1000 mL de agua purificada. Mezcle bien.

Caliente Agitando Frecuentemente y hierva durante un minuto para disolver completamente el polvo.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

Para la preparación de agar sangre, enfrié la base a 45-50°C y agregue 5% de sangre desfibrinada estéril.

Formula de base agar sangre

Infusión de músculo cardiaco, a partir de sólidos.....	2.0 g
Caseínas digeridas por enzimas pancreáticas.....	13.0 g
Extracto de levadura.....	5.0 g
Cloruro de sodio.....	5.0 g
Agar.....	15.0 g

Medio Agar sangre de carnero al 5% con antibióticos

Suspender 40 g de polvo en 1000 mL de agua purificada. Mezcle bien.

Caliente Agitando Frecuentemente y hierva durante un minuto para disolver completamente el polvo.

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.

Para la preparación de agar sangre, enfríe la base a 45-50°C y agregue 5% de sangre desfibrinada estéril.

Antibióticos utilizados para agar sangre con antibiótico

ac. Nalidíxico.....10 mg

Trimetropin.....5 mg

Vancomicina.....3 mg

Anfotericina.....2 mg

Se prepara una alícuota madre de 10 mL de H₂O: pesando de cada antibiótico:

Ac. Nalidíxico.....0.1 g

Trimetropin.....0.05g

Vancomicina.....0.03 g

Anfotericina.....0.02 g

Adicionar la suspensión de antibióticos cuando ya se le ha adicionado la sangre de carnero a la base de agar sangre.

11.4 IDENTIFICACION BIOQUIMICA DE *Helicobacter pylori*

10.4.1 Tinción de Gram. En un portaobjetos limpio poner una gota de agua destilada o solución salina, tomar con el asa una colonia de *Helicobacter pylori* y homogenizarla con el agua, realizar una fijación pasándola sobre el mechero. Realizar la tinción de Gram cubriendo el frotis con unas gotas de colorante Cristal Violeta, dejar reposar 1 minuto y enjuagar con agua corriente. Adicionar unas gotas de solución mordente de Lugol, dejar reposar durante 1 minuto, y enjuagar con agua corriente. Decolorar con unas gotas de alcohol-acetona durante unos segundos y enjuagar rápidamente. Adicionar el colorante de contraste de Safranina dejando reposar por 1 minuto, enjuagar y secar perfectamente. Observar al microscopio a 10 x, 40x, y 100x para la búsqueda de *Helicobacter pylori* buscando bacilos curvos Gram negativos con aspecto de coma o espirales.

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

10.4.3 Prueba de catalasa. Picar una colonia de *Helicobacter pylori*, inocular en aproximadamente 1.5µL de peróxido de hidrógeno al 30%. Observar inmediatamente efervescencia.

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