



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

IDENTIFICACIÓN DE GENES DE  
*Helicobacter pylori* POR PCR Y  
MICROARREGLOS COMO  
MARCADORES DE GASTRITIS,  
ÚLCERA DUODENAL Y CÁNCER  
GÁSTRICO

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

CARMINA JIMÉNEZ RAMÍREZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Margarita de la Luz Camorlinga Ponce  
COMITÉ TUTOR: Dr. Gonzalo Castillo Rojas  
M en C Rosalva Rangel Corona

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2011



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.



**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de junio de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **JIMÉNEZ RAMÍREZ CARMINA** con número de cuenta **91604769** con la tesis titulada: **"IDENTIFICACIÓN DE GENES DE HELICOBACTER PYLORI POR PCR Y MICROARREGLOS COMO MARCADORES DE GASTRITIS, ÚLCERA DUODENAL Y CÁNCER GÁSTRICO"** realizada bajo la dirección de : **DRA. MARGARITA DE LA LUZ CAMORLINGA PONCE.**

Presidente:	DR.	<b>GONZÁLO CASTILLO ROJAS</b>
Vocal:	DR.	<b>DIEGO JULIO ARENAS ARANDA</b>
Secretario:	DRA.	<b>GERMÁN RUBÉN AGUILAR GUTIÉRREZ</b>
Suplente:	DR.	<b>BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO</b>
Suplente:	M. EM C.	<b>ROSALVA RANGEL CORONA</b>

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 09 de agosto de 2011

*M. del Coro Arizmendi*  
**DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

## AGRADECIMIENTOS

\* Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de continuar con mis estudios.

\* A CONACYT por los siguientes apoyos recibidos:

-CVU 294743

-CONACYT 069450

\* Al apoyo recibido de los proyectos 2008-785-001 (“Identificación, inflamación y cáncer; estudio para el desarrollo de pruebas diagnósticas y la identificación de biomarcadores de riesgo, pronóstico y prevención”) y 2010-785-036 (“Búsqueda de marcadores genéticos y fenotípicos de cepas de *H.pylori* de pacientes con gastritis, úlcera duodenal y cáncer gástrico”).

\* A los miembros del comité tutorial:

-Dra. Camorlinga Ponce Margarita De la Luz (UIMEIP, CMN Siglo XXI)

Por haberme permitido contar con su tutoría en esta segunda etapa de mi formación profesional así como por su atención, dedicación, paciencia y disposición que siempre mostró tanto a nivel profesional como a nivel personal. Es un privilegio conocerla.

-Dr. Castillo Rojas Gonzalo (Facultad de Medicina)

-M en C. Rangel Corona Rosalva (Facultad de Zaragoza)

Por haberme brindado su tiempo, su experiencia y sus valiosos puntos de vista que compartieron conmigo durante el desarrollo de esta investigación.

## AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

- A la Dra. Carolina Romo González por la ayuda, paciencia y consejos recibidos desde el principio del desarrollo de este proyecto y por darme una cátedra de sencillez y conocimientos con los que se maneja una persona por la vida.
- Al Dr. Javier Torres López, por su crítica constructiva y orientación que nos brinda a todos los alumnos de la Unidad a su cargo.
- Al Dr. Juan Burgueño Ferreira, por la asesoría brindada en el análisis estadístico de los datos.
- Al personal del Laboratorio de Bacteriología de la UIMEIP
  - Biol. Norma Pernas y TLC Carmina Fuentes por compartir su experiencia y resoluciones prácticas desde un cultivo hasta una técnica molecular.
  - QFB María del Cortés Márquina, QBP Flor Vázquez Jiménez y QBP Argelia Gómez, por haberme brindado su ayuda cuando fue necesario y por hacer más amenos los días y tardes de trabajo.
- M. en C. Norma Celia González Huerta, por su eterna amistad y mostrarme siempre las dificultades que hay en los caminos ya andados.

- A mis amigos: QFB María Esther Reyes Robles, QFB Ilda Olivares Prado, QBP Luz María Sosa Cisneros, QFB Berenice Medina Reyes, TLC Marvella Hernández Soto, TLC Fernando Martínez Ferrusca y QFB Juana Rocha Evangelista, porque siempre estuvieron allí para ayudarme y me demostraron que siempre puedo contar con ustedes. Gracias!!!
  
- A QFB Carolina Jiménez López, por alterar sus actividades profesionales y personales para apoyarme.
  
- A todos mis compañeros que me permitieron disponer siempre de su valioso tiempo y descanso, ustedes fueron una parte importante durante el inicio y término de mis estudios: M en C. Humberto Ayala Narváez, TLC Concepción Rosas Montañez, QFB Hilda Flores Valdovinos, QFB Laura Edith Alanis Brito, QFB Julio César González Cruz, TLC Francisco Castillo Morales, QFB Verónica Franco Aguilar y TLC Arturo Ivan Bernal Renaud.

## DEDICATORIAS

A mi papá Manuel

Un ángel que siempre me acompaña.

A mi mamá Guadalupe

Porque en cada proyecto personal y profesional que me propongo, nunca está atrás de mí, siempre está a mi lado.

A mis sobrinos

Manuel Esteban y Luis Fernando, esperando que siempre se superen y sean hombres de bien.

A mis hermanas Delia y Mayra

Ante cualquier situación, siempre cuento con ellas

# ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1.INTRODUCCIÓN .....	3
1.1 Características generales .....	3
1.2 Epidemiología .....	4
1.3 Enfermedades asociadas a <i>H. pylori</i> .....	5
1.4 Patogenia .....	10
1.5 Factores de virulencia .....	10
1.6 Genes propuestos como marcadores de enfermedad gastroduodenal .....	12
1.7 Isla de patogenicidad <i>cag</i> PAI .....	15
1.8 Características genómicas .....	19
2.JUSTIFICACIÓN .....	21
3. HIPÓTESIS .....	21
4. OBJETIVOS.....	22
4.1 Objetivo general .....	22
4.2 Objetivos específicos .....	22
5. MATERIAL Y MÉTODOS .....	23
5.1 Material biológico .....	23
5.2 Aislamiento e identificación de <i>H. pylori</i> .....	24
5.3 Extracción de DNA .....	24
5.4 Diferenciación de clones por el método de DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD-PCR) .....	25
5.5 Determinación de presencia o ausencia de 54 genes por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	27
5.6 Microarreglos.....	27
5.7 Análisis de resultados .....	36
6. RESULTADOS.....	37
6.1 Selección de clones para análisis por PCR y microarreglos .....	37

6.2 Frecuencia de genes determinada por PCR en enfermedad gastroduodenal.....	40
6.3 Comparación de genes de <i>H. pylori</i> encontrados en mayor y menor frecuencia en cada enfermedad gastroduodenal en comparación a los datos previamente publicados .....	46
6.3.1 Comparación de frecuencias encontradas en estudio previo por microarreglos con frecuencias encontradas en este estudio por PCR .....	48
6.3.2 Comparación de frecuencias encontradas en 13 genes en estudio previo por PCR con frecuencias encontradas en este estudio por PCR .....	50
6.4 Frecuencia de genes de <i>cag</i> PAI y genes asociados a enfermedad determinadas por microarreglos .....	54
6.5 Sensibilidad y especificidad de microarreglos .....	58
6.6 Frecuencia de genes e integridad de <i>cag</i> PAI.....	59
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	64
8. CONCLUSIONES .....	78
9. PERSPECTIVAS .....	79
10. BIBLIOGRAFÍA .....	80
11. ANEXOS .....	88
11.1 Anexo 1. Material y reactivos .....	88
11.2 Anexo 2. Preparación de reactivos .....	91
11.3 Anexo 3. Iniciadores de PCR .....	97
11.4 Anexo 4. Diseño de microarreglo de titulación .....	101
11.5 Anexo 5. Resultados de microarreglos con sondas de oligos y con sondas de productos de PCR .....	102
11.6 Anexo 6. Ejemplo de cálculo de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de microarreglos .....	106
11.7 Anexo 7. Abreviaturas .....	107

## LISTA DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS

Tabla 1. Genes de *H. pylori* asociados a enfermedad gastroduodenal propuestos por Romo-González *et al*; 2009.

Tabla 2. Genes de *cag* PAI

Tabla 3. Diseño del microarreglo

Tabla 4. Valores de k

Tabla 5. Características de los pacientes y cepas incluidas en este estudio

Tabla 6. Infección mixta obtenida en 47 pacientes determinada por RAPD-PCR

Tabla 7. Frecuencia de genes de *H. pylori* encontradas por PCR en cada enfermedad gastroduodenal.

Tabla 8. Genes de *H. pylori* presentes en menor frecuencia en enfermedad gastroduodenal.

Tabla 9. Genes de *H. pylori* presentes en mayor frecuencia en enfermedad gastroduodenal.

Tabla 10. Comparación de genes encontrados en menor y mayor frecuencia en enfermedad gastroduodenal con respecto a los datos publicados por Romo-González.

Tabla 11. Frecuencias encontradas por PCR en 13 genes reportadas por Romo-González y las obtenidas en este estudio.

Tabla 12. Frecuencias de genes asociados a enfermedad obtenidas por microarreglos con sondas de oligos y con sondas de productos de PCR en 15 muestras.

Tabla 13. Frecuencia de genes de *cag* PAI obtenidas por microarreglos con sondas de oligos y con sondas de productos de PCR en 15 muestras.

Tabla 14. Comparación de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los microarreglos validados en este estudio.

Tabla 15. Frecuencia de *cag* PAI ausente, completa e incompleta en 64 aislados, determinada por PCR.

Tabla 16. Frecuencia de genes de *cag* PAI determinada por PCR en 38 clonas de *H. pylori* que tuvieron la isla incompleta.

Figura 1. Evolución de la enfermedad por *H. pylori*

Figura 2. Estructura de *cag* PAI

Figura 3. Posición de los submicroarreglos

Figura 4. Imagen de microarreglo hibridado

Figura 5. Imágen de uno de los 16 submicroarreglos hibridado

Figura 6. Patrones RAPD obtenidos con el primer 1254

Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los DNA's utilizados en el ensayo de microarreglos

Gráfica 1. Frecuencia de genes encontrados en menor y mayor frecuencia en enfermedad gastroduodenal determinada por PCR

Gráfica 2. Comparación de frecuencias encontradas en genes con menor y mayor frecuencia en gastritis de acuerdo a Romo-González con respecto a nuestros resultados en muestras de gastritis

Gráfica 3. Comparación de frecuencias encontradas en genes con menor y mayor frecuencia en úlcera duodenal de acuerdo a Romo-González con respecto a nuestros resultados en muestras de úlcera duodenal

Gráfica 4. Comparación de frecuencias encontradas en genes con menor y mayor frecuencia en cáncer gástrico de acuerdo a Romo-González con respecto a nuestros resultados en muestras de cáncer gástrico

Gráfica 5. Frecuencias obtenidas por PCR en 13 genes por Romo-González y en el presente estudio en muestras de gastritis.

Gráfica 6. Frecuencias obtenidas por PCR en 13 genes por Romo-González y en el presente estudio en muestras de úlcera duodenal

Gráfica 7. Frecuencias obtenidas por PCR en 13 genes por Romo-González y en el presente estudio en muestras de cáncer gástrico

Gráfica 8. Comparación de frecuencias de genes asociados a enfermedad determinados por microarreglos con sondas de productos de PCR y de oligos en 15 muestras

Gráfica 9. Comparación de frecuencias de genes de *cag* PAI determinados por microarreglos con sondas de productos de PCR y de oligos en 15 muestras.

Gráfica 10. Frecuencia de la integridad de *cag* PAI en enfermedad gastroduodenal determinada por PCR

Gráfica 11. Frecuencia de genes de *cag* PAI determinada por PCR en 38 clonas de *H. pylori*

## RESUMEN

*Helicobacter pylori* es una bacteria que causa gastritis, úlcera duodenal y gástrica y se ha asociado a cáncer gástrico. El objetivo de este estudio fue determinar en un grupo de 60 pacientes que incluían pacientes con gastritis, úlcera duodenal y cáncer gástrico, la frecuencia de 54 genes en cada una de estas enfermedades, por medio de PCR, para poder identificar genes que pudieran considerarse como marcadores de enfermedad gastroduodenal en población mexicana y poder compararlos con genes previamente propuestos en otro estudio realizado en población mexicana; se evaluó también la integridad de la isla de patogenicidad *cag* PAI en estos pacientes. La colección de 54 genes incluía a los 27 genes que forman la isla de patogenicidad y 30 genes que se habían previamente propuesto como marcadores de enfermedad. Asimismo, se validó un microarreglo diseñado por la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMEIP), del Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI, IMSS, el cual contenía la colección de 54 genes impresos representados por sondas de productos de PCR y por sondas de oligos. Los genes encontrados en menor frecuencia en enfermedad gastroduodenal fueron: HP0713, HP1426, HP1381 y HP0425 en úlcera duodenal y en cáncer gástrico fue el gen JHP0951. Entre los genes encontrados con mayor frecuencia están: HP1404 para gastritis y para cáncer gástrico los genes JHP0674, NA/HP1405 y HP0967 (*vapD*). Los resultados obtenidos en este estudio no coinciden con los datos previamente publicados en población mexicana. Los microarreglos con sondas de oligos tuvieron mayor sensibilidad (75.2%) que los microarreglos con sondas de productos de PCR (63.9%). La isla de patogenicidad *cag* PAI estuvo ausente en el 19% del total de aislados evaluados, completa en un 22% e incompleta en el 59%. En conclusión, *H. pylori* muestra una gran variabilidad genética dentro de la población mexicana y existen limitaciones en el diseño del microarreglo propuesto por la UIMEIP para identificar genes de *H. pylori* como marcadores de enfermedad por lo que sería recomendable emplear más de una técnica molecular para lograr este objetivo.

## ABSTRACT

*Helicobacter pylori* is a bacterium that causes gastritis, gastric and duodenal ulcers and has been associated with gastric cancer. The aim of this study was to determine in a group of 60 patients that included patients with gastritis, duodenal ulcer and gastric cancer, the frequency of 54 genes in each of these diseases, by PCR to identify genes that could be considered gastroduodenal disease markers in Mexican population and to compare them with genes previously suggested in another study in Mexican population. The integrity of the pathogenicity island *cag* PAI in these patients was also evaluated. The collection of 54 genes included the 27 genes that form the pathogenicity island and 30 genes that were previously proposed as markers of disease. Also validated a microarray designed by the Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMEIP), Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI, IMSS, which contained the printed collection of 54 genes represented by probes and PCR products oligo probes. Genes found less frequently in gastroduodenal disease were: HP0713, HP1426, HP1381 and HP0425 in duodenal ulcer, and gastric cancer was the JHP0951 gene. Among the genes most frequently found were: HP1404 for gastritis and gastric cancer gene JHP0674, NA/HP1405 and HP0967 (*vapD*). The results of this study do not match previously published data in Mexican population. Microarrays with probes of oligos had greater sensitivity (75.2%) than microarrays with probes of PCR products (63.9%). *cag* PAI pathogenicity island was absent in 19% of the total isolates tested, 22% complete and incomplete in 59%. In conclusion, *H. pylori* shows a high genetic variability within the Mexican population. There are limitations in the microarray design proposed by the UIMEIP to identify genes of *H. pylori* as markers of disease; therefore it would be advisable to use more than one molecular technique to achieve this goal.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

En 1981 se observó por J. Robin Warren la presencia de bacilos en forma de espiral en la mucosa de biopsias gástricas, siempre acompañada de infiltrado de polimorfonucleares en la región antral del estómago. Posteriormente, se unió a sus investigaciones Barry J. Marshall y juntos lograron aislar una bacteria gram negativa, curva, microaerofílica y flagelada. Este bacilo fue observado inicialmente en 58 biopsias de 100 muestras revisadas. Más tarde, tuvieron éxito en el cultivo del organismo y describieron su similitud con las bacterias del género *Campylobacter*, inicialmente la llamaron *Campylobacter pyloridis* y su presencia fue asociada por primera vez a la gastritis activa crónica (Warren *et al*; 1983). En 1983, se publicó este hallazgo en la revista Lancet; por este descubrimiento en 2005, Warren y Marshall obtuvieron el premio Nobel de medicina.

Actualmente, esta bacteria es conocida como *Helicobacter pylori* y se considera el agente etiológico de la gastritis, úlcera duodenal y gástrica, linfoma gástrico y está estrechamente asociada a cáncer gástrico. En 1994 la OMS lo definió como un carcinógeno del tipo I (IARC, OMS 1994).

*H. pylori* crece en medios enriquecidos, como agar sangre y es de crecimiento lento, observándose que puede tardar hasta 10 días en crecer. Requiere CO<sub>2</sub> al 5% para su crecimiento, 5% O<sub>2</sub> y 86% N<sub>2</sub>; produce grandes cantidades de enzimas características de la especie como ureasa y oxidasa; sus colonias son pequeñas, húmedas, convexas y transparentes, observando al microscopio bacilos curvos gram negativos y en cultivos viejos se observan formas cocoides (Kuster *et al*; 1997); mide de 2 a 4 µm de largo y de 0.5 a 1 µm de ancho, tiene de 5 a 6 flagelos en uno de sus polos, que le permiten desplazarse a través de la capa mucosa del epitelio gástrico (Mobley *et al*; 2001).

Actualmente, se conocen varias especies de *Helicobacter* que infectan el estómago de otros mamíferos siendo *H. pylori* la única especie patógena para el hombre (Solnik *et al*; 2001).

## 1.2 EPIDEMIOLOGÍA

La infección con *H. pylori* se encuentra distribuida mundialmente, observándose diferencias significativas en su prevalencia entre los países. Se ha observado, que la prevalencia es mayor en países subdesarrollados que en los países desarrollados (Bardhan, 1997).

En forma general, se ha reportado una prevalencia del 5 al 10% en países desarrollados, mientras que en países subdesarrollados se reporta una prevalencia más alta que va de un 80 a 90% (Pérez-Pérez *et al*; 2004). En estudios realizados en Estados Unidos donde evaluaron la prevalencia de la infección de acuerdo al nivel socioeconómico en un grupo de niños, observaron que en una clase socioeconómica baja hay un 85% de prevalencia en comparación con la clase socioeconómica alta donde la prevalencia es de 11% (Malaty *et al*; 1994).

En un estudio realizado en México, en donde se analizó la seroprevalencia de *H. pylori* en 11, 605 sueros provenientes de toda la República Mexicana representativos de todas las edades (1 a 90 años), de hombres y mujeres, así como, de todos los niveles socioeconómicos, se observó que la prevalencia en la infección era del 66%, además que la infección se adquiere a una edad temprana de tal manera que a los 10 años el 50% de la población ya está infectada y a una edad adulta el 80% fueron seropositivos (Torres *et al*; 1998).

Se ha sugerido que la transmisión ocurre de persona a persona ya sea por vía iatrogénica, fecal-oral u oral-oral, siendo el agua una probable fuente de infección.

Además se han realizado estudios donde ha sido aislada la bacteria o identificado el DNA del bacilo en placa dental, saliva, jugo gástrico, materia fecal y vómito (Ferguson *et al*; 1993; Brown, 2000; Mobley *et al*; 2001; Allaker *et al*; 2002; Leung *et al*; 1999).

La mayoría de las personas infectadas permanecen asintomáticas, mientras que un 15% aproximadamente desarrollarán síntomas, pudiendo evolucionar de una gastritis crónica no atrófica a una enfermedad grave. Del 10 al 15% de los infectados desarrollarán úlcera péptica y del 1-3% desarrollarán cáncer gástrico (Kuipers *et al*; 1995). El 90 al 95% de las úlceras duodenales y 70 a 75% de las úlceras gástricas se asocian a la infección con *H. pylori*. El riesgo de desarrollar estas enfermedades en presencia de *H. pylori* depende de factores bacterianos, del huésped y ambientales (Blaser *et al*; 1995; Correa, 1998; Blaser, 1992; Guarner *et al*; 1993; IAR, 1994; Covacci *et al*; 1999).

### **1.3 ENFERMEDADES ASOCIADAS A LA INFECCIÓN CON *H. pylori***

#### **GASTRITIS**

Una vez colonizado el estómago, invariablemente se presenta inflamación de la mucosa gástrica que está caracterizada por una infiltración de células polimorfonucleares (PMN) y mononucleares (MN) dando inicio a la gastritis aguda. En esta etapa de la infección se presentan síntomas como dolor epigástrico, malestar general, náuseas y vómito, a menudo esta fase se asocia con hipoclorhidria durante varias semanas. Cuando la colonización persiste por mucho tiempo se afecta el nivel de secreción de ácido el cual tiene relación con la distribución de la inflamación en todo el órgano pudiendo afectar la región del antro, cuerpo o todo el estómago. En personas donde no se altera la secreción del ácido, la colonización se presenta preferentemente en el antro donde hay pocas células parietales secretoras de ácido, mientras que la porción del cuerpo gástrico permanece con muy poca colonización de la bacteria. La reducción de secreción ácida se debe a una pérdida glandular. Cuando la infección persiste se manifiesta la gastritis

crónica, caracterizada por la presencia de PMN sin evidencia de pérdida glandular ni alteraciones macroscópicas. Este tipo de gastritis se conoce como gastritis no atrófica y ocurre en la mayoría de los casos en personas asintomáticas infectadas con *H. pylori* (Kuster *et al*; 2006).

## **GASTRITIS ATRÓFICA**

La atrofia se define como la pérdida de tejido glandular como resultado de un daño continuo de la mucosa. El riesgo de gastritis atrófica depende de la distribución de la inflamación de la gastritis activa. La inflamación crónica producida por *H. pylori* puede conducir a la pérdida de la arquitectura normal de la mucosa gástrica, siendo de mayor riesgo encontrar inflamación crónica atrófica en zonas donde la producción de ácido es baja ya que la lesión progresará más rápido a una atrofia donde la pérdida de tejido glandular es considerable, esto tiene como consecuencia el desarrollo de aclorhidria o hipoclorhidria lo cual aumenta el riesgo de una neoplasia gástrica así como de desarrollar una úlcera gástrica (Kusters *et al*; 2006). La pérdida glandular aumenta el riesgo de cáncer gástrico de 5 a 90 veces dependiendo de la severidad de la atrofia que se presente (Moblely *et al*; 2001; Kuipers *et al*; 1995; Kuipers *et al*; 2006, Kuster *et al*; 2006).

## **ÚLCERA DUODENAL Y GÁSTRICA**

Una ulceración se considera como tal, cuando hay un daño en la mucosa en aproximadamente 0.5 cm de la capa; cuando es gástrica ésta se presenta en la curvatura mayor del estómago mientras que la úlcera duodenal se presenta en el bulbo duodenal la cual es un área muy expuesta al ácido gástrico (Llorens *et al*; 2000). La úlcera duodenal es 4 veces más común que la gástrica. Entre los 20 y 50 años de edad es más frecuente la úlcera duodenal que la gástrica, de estos casos, el 95% se encuentran asociadas a *H.*

*pylori* y en las úlceras gástricas el 85% (Kuster *et al*; 2006). Si la infección por *H.pylori* se adquiere a una edad temprana existe la posibilidad de desarrollar gastritis crónica atrófica en un 40% de los casos, como consecuencia hay disminución de la secreción de ácido gástrico lo que favorece la formación de úlceras gástricas. Cuando la infección se adquiere a edad más tardía la gastritis afectará la región antral donde la secreción ácida estará aumentada y por lo tanto la mucosa se verá afectada y se favorecerá la úlcera duodenal (Kuster *et al*; 2006; Mobley *et al*; 2001). Los síntomas asociados a la úlcera son: dolor y ardor gástrico que tienden a desaparecer después de ingerir alimentos o antiácidos, pérdida de apetito, náuseas, vómito y reflujo esofágico (Mobley *et al*; 2001; Kuster *et al*; 2006; Kuipers *et al*; 1995; Cullen *et al*; 1993).

## **METAPLASIA INTESTINAL**

Es un cambio irreversible en el cual un tipo celular diferenciado es sustituido por otro tipo celular diferenciado. En el caso del estómago la presencia de tejido similar al de la mucosa intestinal en la mucosa gástrica se conoce como metaplasia intestinal, es considerada como una condición precancerosa. Se ha reportado que la metaplasia intestinal se encuentra en pacientes con *H. pylori*, aunque al final de la enfermedad la atrofia gástrica y la metaplasia intestinal no es un ambiente habitable para la bacteria y se asocia con una reducción drástica o incluso con la desaparición de ésta (Kuster *et al*; 2006). La presencia de metaplasia intestinal en la curvatura menor del estómago se relaciona con un alto riesgo para desarrollar cáncer gástrico (Kuster *et al*; 2006; Zimaity *et al*; 2001; Zhang *et al*; 2005).

## **DISPLASIA**

Se caracteriza por cambios atípicos en la morfología del núcleo de las células gástricas observándose irregular, hipercromático y grande, hay un aumento de células indiferenciadas y disposición de glándulas. Generalmente se encuentra rodeada de un área de metaplasia intestinal (Mobley *et al*; 2001).

## **CÁNCER GÁSTRICO**

Es el crecimiento maligno de células anormales que tienen la capacidad de invadir y destruir otros tejidos. Puede ser de tipo intestinal o difuso. Correa P, propuso una serie de cambios histológicos por los cuales atraviesa la infección por *H. pylori* que van de gastritis no atrófica, para evolucionar a gastritis atrófica multifocal, luego se presenta metaplasia intestinal, displasia y finalmente, cáncer gástrico tipo intestinal (Kuster *et al*; 2006). Las etapas de esta cascada están influidas también por factores ambientales como la dieta y factores del huésped como polimorfismo en IL-1B, IL-10 y TNF $\alpha$  (Scott *et al*; 2006). En la figura 1 se representa el esquema de la evolución de la enfermedad desde la adquisición de *H. pylori* en la niñez hasta la manifestación de cáncer gástrico, 50 ó 60 años después del inicio del proceso inflamatorio. El cáncer difuso no presenta estos cambios histológicos y se manifiesta en individuos más jóvenes, de cerca de 40 años de edad (Mobley *et al*; 2001; Correa, 1998; Piñol-Jiménez *et al*; 1998; Wroblewski *et al*; 2010; Aravena, 2007; Polk *et al*; 2010).

En la figura 1 se muestra la historia natural de la infección por *H.pylori*.



#### 1.4 PATOGENIA

*H. pylori* es transmitido de persona a persona por vía fecal-oral u oral-oral (Allaker *et al*; 2002) y entra al estómago en donde la gran cantidad de ureasa que produce le ayuda a amortiguar el pH ácido del estómago mediante la producción de CO<sub>2</sub> y NH<sub>4</sub> formando una nube a su alrededor que logra aumentar el pH de 6 a 7. Con la ayuda de sus flagelos y su forma helicoidal, *H. pylori* atraviesa el medio acuoso y se implanta entre la capa de moco y la superficie epitelial gástrica donde el pH es neutro. Por medio de adhesinas como Oip (proinflammatory outer membrane protein), BabA (blood antigen binding) y SabA (sialic acid binding adhesin), se fija a las células gástricas. Una vez adherida la bacteria, mediante el sistema de secreción tipo IV transloca la proteína CagA (proteína asociada a la citotoxina), la cual es fosforilada (Asahi *et al*; 2000). Se inicia una serie de eventos como la producción de Interleucina 8 (IL8), una quimiocina altamente quimioattractante, manteniendo una inflamación crónica que se perpetúa y en algunos individuos ocasiona úlcera péptica o cáncer gástrico (Asahi *et al*; 2000; Correa *et al*; 1985; Kuster *et al*; 2006).

#### 1.5 FACTORES DE VIRULENCIA

*H. pylori* posee varios genes asociados con su virulencia, algunos participan en la adherencia y colonización de la bacteria, otros participan directamente en el daño al epitelio gástrico.

La ureasa, los flagelos y la forma helicoidal favorecen la colonización del bacilo a la mucosa gástrica. La ureasa es codificada por los genes de *ureA* a *ureG*, tiene como sustrato la urea y produce NH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, generando alrededor de la bacteria una nube amortiguadora de pH que le permite sobrevivir al ambiente ácido del estómago además de ser un factor muy importante en la colonización permitiéndole así atravesar la capa de moco que recubre el estómago. La ureasa es además un factor quimiotáctico para PMN (Scott *et al*; 2006).

El lipopolisacárido (LPS) que expresa en su pared celular *H. pylori*, contiene oligosacáridos fucosilados que antigénica y estructuralmente se parecen a los antígenos presentados por los grupos sanguíneos del hombre (antígeno Lewis), este efecto se conoce como mimetismo y es una herramienta de la bacteria para evadir la respuesta inmune del huésped logrando así la cronicidad de la infección (Kuipers *et al*; 2001).

Una vez que la bacteria entra a la mucosa gástrica y atraviesa la capa de moco es necesaria su adherencia la cual se da a través de otros factores de virulencia conocidos como adhesinas: SabA, Baba y OipA. BabA es la más estudiada siendo una proteína de membrana externa con características similares a los antígenos de Lewis, una vez adheridas a los receptores de las células generan señales que producen la infiltración de PMN, además de ayudar a la colonización de la mucosa gástrica (Ewards *et al*; 2000; Rivas-Traverso *et al*; 2000).

La citotoxina vacuolizante (VacA), es una proteína constitutiva y se ha observado que un 50% de cepas la producen *in vitro*, forma poros en las células epiteliales. Se han descrito variantes alélicas de este gen: para el péptido señal (variantes s1a, s1b y s1c del alelo s1 y el alelo s2) y en la porción media de la proteína (alelos m1 y m2). Las cepas que contienen los alelos s1m1 de *vacA*, se consideran de mayor potencial citotóxico y con mayor riesgo para inducir úlcera gastroduodenal en pacientes adultos. Las cepas que carecen del gen *vacA* y de *cag* PAI se consideran comensales más que patógenas (Atherton *et al*; 1995; Atherton *et al*; 1997; Aviles-Jiménez *et al*; 2004).

La proteína CagA es otro factor de virulencia de este bacilo, es producida por el 60% de las cepas, esta proteína es codificada por el gen *cagA* el cual se encuentra dentro de la isla de patogenicidad conocida como *cag* PAI y su presencia está asociada a úlcera duodenal y úlcera gástrica (Covacci *et al*; 1999); es altamente inmunogénica y una vez inyectada a las células epiteliales por el sistema de secreción tipo IV estimula la

producción de IL 8 y de factor de necrosis tumoral los cuales aumentarán el grado de inflamación de la mucosa gástrica (Kuipers *et al*; 1995) (Covacci *et al*; 1999; Censini *et al*; 1996). Cuando CagA es inyectada en la célula gástrica inmediatamente es fosforilada por una familia de cinasas en la región carboxilo terminal de residuos de tirosina conservados que forman parte de secuencias repetidas de 5 aminoácidos: glicina-prolina-isoleucina-tirosina-alanina (EPIYA). De acuerdo al número de repeticiones de estos motivos se pueden clasificar en A, B, C y D, observándose que EPIYA-C está más asociado a úlcera en cepas occidentales mientras que EPIYA-D se asocia a un nivel alto de inflamación y atrofia en cepas orientales (Hideaki *et al*; 2001; Lam *et al*; 2008).

#### **1.6 GENES PROPUESTOS COMO MARCADORES DE ENFERMEDAD GASTRODUODENAL**

Hay reportes de varios genes de *H. pylori* que se han asociado específicamente a alguna enfermedad y se les considera como marcadores de enfermedad. Algunos ejemplos son los genes JHP0562 y JHP0870 asociados a úlcera péptica en niños (Oleastro *et al*; 2006); JHP0940 asociado a cáncer gástrico (Occhialinni *et al*; 2008); JHP0947 asociado a úlcera duodenal y cáncer gástrico en pacientes brasileños (Santos *et al*; 2003); el gen JHP0917 y JHP0918 conocido también como *dupA* (promotor de úlcera duodenal) (Schimidt *et al*; 2009) y el gen JHP0950 asociado a linfoma (Fischbach *et al*; 2005). Es importante mencionar que algunos de estos genes no tienen la misma asociación a enfermedad en otros países e incluso en la misma región geográfica y en diferentes grupos étnicos poniendo de manifiesto la variabilidad genética que puede llegar a tener la bacteria (Santos *et al*; 2003; Occhialinni *et al*; 2008).

En el año 2000, Salama y colaboradores examinaron la diversidad genética de 15 cepas de *H. pylori*, por medio de microarreglos de DNA. Este microarreglo contenía 1,660 genes, las sondas impresas en el microarreglo fueron hechas a partir de productos de PCR, los

cuales incluían el 98% de marcos de lectura abiertos del genoma de las cepas secuenciadas J99 y 26695, con el objetivo de encontrar nuevos genes candidatos de virulencia. Se encontró que había 1,281 genes que formaban parte del *core* de la bacteria y otros 362 genes que eran específicos de cepa (6% del genoma) e incluían funciones de modificación-restricción, de transposasas, topoisomerasa, ATPasas; estos genes específicos de cepa, estaban agrupados en diferentes modelos de distribución a lo largo del cromosoma y eran resultado de diferentes mecanismos de pérdida y ganancia de genes. Se reportó, que estos genes se encuentran distribuidos en la isla de patogenicidad (*cag* PAI) y en 2 zonas de plasticidad más. Los autores de este reporte propusieron que estos genes eran probables factores de virulencia por tener la característica de que se adquirirían junto con la isla de patogenicidad *cag* PAI: HP0965, HP0483, HP0484, HP1177, HP1243 (*babA*), HP0260, HP0186, HP0767, HP0963 y HP1417 (Salama *et al*; 2000).

En un trabajo posterior realizado en 2009 (Romo González *et al*; 2009), por primera vez se propusieron genes marcadores de enfermedad en cepas de *H. pylori* de población mexicana los cuales fueron evaluados de acuerdo a la metodología propuesta por Salama *et al*; 2000; en este estudio se incluyeron 10 pacientes mexicanos con úlcera duodenal, 10 con gastritis y 9 con cáncer gástrico. Se analizaron por microarreglos, 1660 genes pertenecientes a las cepas de *H. pylori* 26695 y J99, con el objetivo de determinar la diversidad genética de *H. pylori* en las diferentes patologías gastroduodenales en población mexicana. Se encontró que había 30 genes asociados a enfermedad de los cuales, 13 se propusieron como posibles genes marcadores de enfermedad de *H. pylori*. Es importante mencionar que 3 de estos genes pertenecen a la isla de patogenicidad *cag* PAI. En la tabla 1 se describen los genes que se encontraron en mayor y menor frecuencia en enfermedad gastroduodenal en ese estudio.

Genes con mayor frecuencia en enfermedad				Genes con menor frecuencia en enfermedad			
Nomenclatura en J99	Nomenclatura en 26695	Proceso	Asociación a Enfermedad	Nomenclatura en J99	Nomenclatura en 26695	Proceso	Asociación a Enfermedad
JHP1399	HP1499	NA	Gastritis	NA	HP0053	NA	Gastritis
JHP0934	NA	-	Gastritis	JHP0651	HP0713	Proteína hipotética	Gastritis
NA	HP1381	NA	UD	NA	HP1404	Metabolismo DNA	Gastritis
NA	HP1405	NA	UD	JHP0630	NA	-	Gastritis
JHP0950	NA	-	UD	NA	HP0967	-	UD
JHP0951	NA	-	UD	JHP0021	HP0025	Membrana celular	UD
JHP0479	HP0530 ( <i>cag10</i> )	<i>cag</i> PAI	CG	JHP1365	HP1472	Metabolismo DNA	UD
JHP0442	HP0544 ( <i>cag23</i> )	<i>cag</i> PAI	CG	NA	HP0424	NA	CG
JHP0616	NA	-	CG	NA	HP0425	NA	CG
JHP0927		-	CG	NA	HP0790	Metabolismo DNA	CG
JHP0960	NA	-	CG	NA	HP0992	NA	CG
JHP0961	NA	-	CG	JHP1301/1302	HP1409	NA	CG
JHP0474	HP0527 ( <i>cag7</i> )	<i>cag</i> PAI	CG	JHP1313	HP1410	NA	CG
				JHP0925	NA	-	CG
				NA	HP1426	Proteína hipotética	CG
				NA	HP0674	-	CG
				JHP0940	NA	-	CG

\*UD Úlcera duodenal  
\*\*CG Cáncer gástrico  
\*\*\*NA No asociado

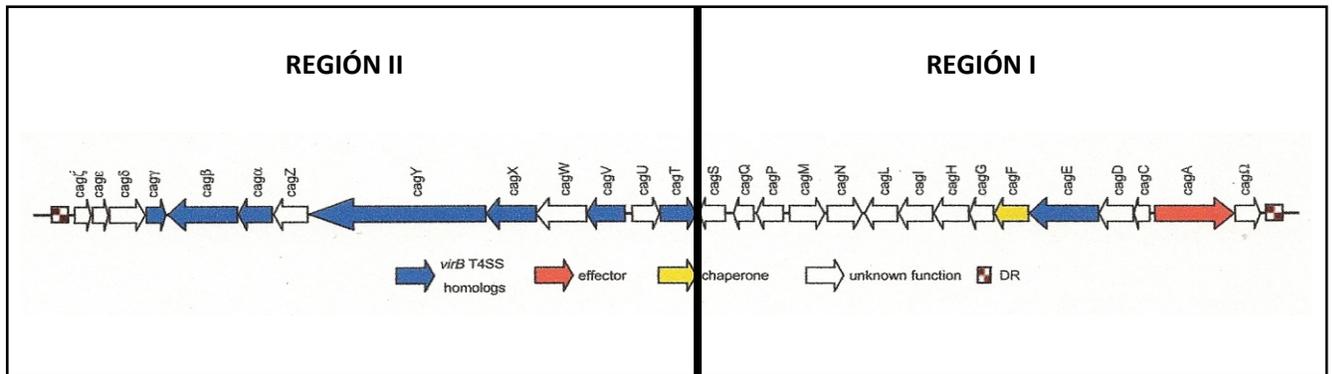
**Tabla 1.** Genes de *H. pylori* encontrados en mayor y menor frecuencia en enfermedad gastroduodenal propuestos por Romo-González et al; 2009. Muchos de estos genes no tienen una función descrita, otros están involucrados en el metabolismo del DNA y en membrana celular, pero cabe resaltar que 3 de los genes encontrados en mayor frecuencia en cáncer gástrico, forman parte de *cag* PAI.

## 1.6 ISLA DE PATOGENICIDAD *cag* PAI

*H. pylori* es una bacteria con gran variabilidad genética, posiblemente como consecuencia de múltiples factores, incluyendo una alta proporción de mutaciones, recombinación genética intraespecies y su larga historia de evolución. Los alelos correspondientes a diferentes cepas de *H. pylori* son de 92 a 99% idénticos en contenido de secuencias de nucleótidos (Suerbaum *et al*; 2007).

Una de las diferencias más importantes en contenido de genes entre cepas de *H. pylori* es la presencia o ausencia de la PAI. En Estados Unidos y Europa, cerca del 50 al 60% de las cepas de *H. pylori* contienen la *cag* PAI y el resto carecen de esta región cromosomal (Salama *et al*; 2000).

En otras zonas del mundo incluyendo Asia, casi todas las cepas contienen *cag* PAI. La isla codifica para la proteína CagA y para el sistema de secreción tipo IV. *cag* PAI está insertada en el gen *glutamato racemasa* y se encuentra formada por 27 a 32 genes entre los cuales está el gen *cagA*, cuya presencia es indicativa de la presencia de la isla, tiene aproximadamente 40 kb, su contenido de G+C es del 35% comparado con el 39% del resto del genoma. Esta isla, codifica para el sistema de secreción tipo IV similar al presentado en *Agrobacterium tumefaciens*, puede estar en una región continua o estar dividida en dos regiones por medio de secuencias de inserción IS605: región *cag* I y región *cag* II, estando *cagA* y *cagE* en la región I y considerándose como marcadores de esta región mientras que *cagT* se encuentra en la región II y se considera como marcador de la región II. En algunas cepas *cag* PAI puede estar flanqueada por secuencias repetidas directas (Akopyants *et al*; 1998; Censini *et al*; 1996). En la figura 2 se muestra la estructura de *cag* PAI.



Cell Microbiol 2006, 8(11)

**Figura 2.** Estructura de *cag* PAI. Se observa que en la región I se encuentran aproximadamente 14 genes entre ellos está *cagA*, mientras que en la región II se encuentran la mayoría de los genes homólogos al sistema de secreción de *A. tumefaciens*.

Se requieren 17 genes para que se lleve a cabo la translocación de la proteína CagA y 14 genes son esenciales para que se lleve a cabo la producción de IL8 (Fisher *et al*; 2001).

El sistema de secreción que posee forma una estructura tipo jeringa capaz de penetrar las células del epitelio gástrico, facilitando la translocación de CagA y peptidoglicanos (Asahi *et al*; 2000; Covacci *et al*; 1993; Fischer *et al*; 2001). Una vez translocada CagA se localiza en la superficie interna de la membrana plasmática donde sufre fosforilación de tirosinas por cinasas de la familia Src (SFK) (Higashi *et al*; 2002; Asahi *et al*; 2000).

*cag* PAI también afecta la respuesta inmune debido a su habilidad de inducir apoptosis de células T (Paziak-Domanska *et al*; 2000; Wang *et al*; 2001). La interacción entre el sistema de secreción tipo IV y las células del huésped resulta en la inducción de citocinas proinflamatorias en las células epiteliales, principalmente IL-8, una quimiocina altamente quimioattractante para neutrófilos (Wang *et al*; 2000).

La integridad de la isla o su ausencia juega un papel importante en el progreso de enfermedad gastroduodenal. Se ha reportado que la isla puede encontrarse completa, parcial o ausente y para ello se considera la presencia de algunos genes o combinación

de genes como marcadores de la presencia de la isla tales como *cagA*, *cagB*, *cagC*, *cagE*, *cagG*, *cagM*, *cagT*, *cag6*, *cag7*, *cag12*, *cag13*, *cag15*, etc, (Ali *et al*; 2005; Jenks *et al*; 1998; Maeda *et al*; 1999; Baghaei *et al*; 2009; Mateo *et al*; 2007; Kauser *et al*; 2004), pero el uso exclusivo de solo alguno de estos genes como marcador de la presencia de la isla no es suficiente (Maeda *et al*; 1999; Baghaei *et al*; 2009). La isla completa se encuentra en casos de úlcera duodenal y cáncer gástrico aunque el genotipo de una isla parcial está reportado que es más común que una isla completa o ausente, además se ha propuesto que las personas que poseen una isla completa tienen 10 veces más riesgo de desarrollar carcinoma gástrico (Ali *et al*; 2005; Nilsson *et al*; 2003); mientras que una isla incompleta está poco asociada con patologías gastroduodenales severas (Nilsson *et al*; 2003).

Hay pocos estudios realizados donde evalúen la integridad de la isla *cag* PAI mediante la determinación de la presencia de los 27 genes y no solamente de algunos marcadores (Nilsson *et al*; 2003).

En la tabla 2 se muestran los genes que forman parte de la isla de patogenicidad *cag* PAI y sus características.

Nomenclatura					Función	
26695	J99	A. <i>tumefaciens</i>	Censini <i>et al</i> ;1996		Translocación de CagA	Inducción de IL8
HP0520	JHP0469		<i>cag1</i>	<i>cagζ</i>	No	No
HP0521	JHP0470		<i>cag2</i>	<i>cagε</i>	No	No
HP0522	JHP0471		<i>cag3</i>	<i>cagδ</i>	Sí	Sí
HP0523	JHP0472	<i>virB1</i>	<i>cag4</i>	<i>cagy</i>	Sí	Sí
HP0524	JHP0473	<i>virD4</i>	<i>cag5</i>	<i>cagβ</i>	Sí	No
HP0525	JHP0474	<i>virB11</i>		<i>cagα</i>	Sí	Sí
HP0526	JHP0475	<i>virB11</i>	<i>cag6</i>	<i>cagZ</i>	Parcialmente	Parcialmente
HP0527	JHP0476	<i>virB10</i>	<i>cag7</i>	<i>cagY</i>	Sí	Sí
HP0528	JHP0477	<i>virB9</i>	<i>Cag8</i>	<i>cagX</i>	Sí	Sí
HP0529	JHP0478	<i>virB6</i>	<i>cag9</i>	<i>cagW</i>	Sí	Sí
HP0530	JHP0479	<i>virB8</i>	<i>cag10</i>	<i>cagV</i>	Sí	Sí
HP0531	JHP0480		<i>cag11</i>	<i>cagU</i>	Sí	Sí
HP0532	JHP0481	<i>virB7</i>	<i>cag12</i>	<i>cagT</i>	Sí	Sí
HP0534	JHP0482		<i>cag13</i>	<i>cagS</i>	No	No
HP0535	JHP0483		<i>cag14</i>	<i>cagQ</i>	No	No
HP0536	JHP0484		<i>cag15</i>	<i>cagP</i>	No	No
				<i>cagO</i>		
HP0537	JHP0485		<i>cag16</i>	<i>cagM</i>	Sí	Sí
HP0538	JHP0486		<i>cag17</i>	<i>cagN</i>	Parcialmente	Parcialmente
HP0539	JHP0487	<i>virB5</i>	<i>cag18</i>	<i>cagL</i>	Sí	Sí
HP0540	JHP0488		<i>cag19</i>	<i>cagl</i>	Sí	No
HP0541	JHP0489		<i>cag20</i>	<i>cagH</i>	Sí	Sí
HP0542	JHP0490		<i>cag21</i>	<i>cagG</i>	Sí	Parcialmente
HP0543	JHP0491		<i>cag22</i>	<i>cagF</i>	Sí	No
HP0544	JHP0492	<i>virB3/B4</i>	<i>cag23</i>	<i>cagE</i>	Sí	Sí
HP0545	JHP0493		<i>cag24</i>	<i>cagD</i>	Parcialmente	Parcialmente
HP0546	JHP0494	<i>virB2</i>	<i>cag25</i>	<i>cagC</i>	Sí	Sí
				<i>cagB</i>		
HP0547	JHP0495		<i>cag26</i>	<i>cagA</i>		
HP0548						
HP0549	JHP0496			<i>glr</i>		
<i>IS605</i>						

Tomb *et al*; 1997      Dawn I *et al*; 2001

**Tabla 2.** Genes que forman la *cag* PAI de *H. pylori*. En esta tabla se muestra la equivalencia de cada uno de los genes que conforman la isla tanto en la nomenclatura de la J99 como de a 26695, así como, los genes que son homólogos a *A. tumefaciens*. Se describen también los genes esenciales para la translocación de *cagA* y los esenciales para la inducción de IL8.

## 1.7 CARACTERÍSTICAS GENÓMICAS DE *H. pylori*

Dada la importancia que empezó a cobrar *H. pylori* a partir de su descubrimiento en 1987 se secuenció el genoma de la primera cepa de *H. pylori* 26695. Esta cepa se aisló de un paciente del Reino Unido que padecía gastritis (Tomb *et al*; 1997) y en 1998 se secuenció en E.U la segunda cepa J99 de un paciente americano con úlcera duodenal (Alm *et al*; 1999).

El genoma de la bacteria varía de 1,643,831 pb (J99) a 1,667,867 (26695) pb, su contenido de G+C es del 39%, pero se han encontrado 5 regiones en la cepa 26695 con diferente composición de G+C siendo la región 2, la que corresponde a la isla de patogenicidad, mientras en la J99 se encuentran 9 regiones con diferente contenido G+C. El 91% del genoma es codificante. La cepa 26695 tiene 1495 marcos de lectura abiertos, la J99 tiene 1590 marcos de lectura abiertos; 89 de ellos son específicos de la J99 y 117 lo son de la 26695 (Tomb *et al*; 1997; Alm *et al*; 1998). Esta bacteria es genéticamente muy heterogénea por lo que la cepa de una persona infectada es diferente a la cepa de otra persona (Kansau *et al*; 1996; Akopyants *et al*; 1998).

Actualmente, se han secuenciado otras cepas de *H. pylori* como la 908 aislada de úlcera duodenal (Devi *et al*; 2010), la B128 aislada en E.U. de un paciente con úlcera gástrica (McClain *et al*; 2009), la HPAG1 aislada en Suiza proveniente de un paciente con gastritis atrófica (Oh *et al*; 2006) y la G27 aislada en Italia (Baltrus *et al*; 2009).

*H.pylori* es considerada una bacteria con gran variabilidad genética la cual está dada no solo por la organización de cag *PAI* sino por otras regiones en el cromosoma de las cepas. La comparación de los genomas ha dado una idea del grado de conservación y variabilidad del genoma de la bacteria (Suebaum S; 2000).

Muchos de los reportes anteriores no hubieran sido posibles sin la ayuda de una herramienta de la biología molecular conocida como microarreglos la cual fue desarrollada por Patrick O. Brown (Brown PO, Botstein D, 1999). Esta metodología consiste en inmovilizar sobre una superficie un conjunto de genes representados sondas de productos de PCR o por sondas de oligonucleótidos en forma ordenada, los cuales se hibridarán con la secuencia complementaria, ya sea RNAm o DNA proveniente de la muestra en estudio marcada con un fluorocromo, así como, de la muestra con la que se quiere comparar marcada con otro fluorocromo y mediante la lectura de la fluorescencia emitida se pueden determinar genes presentes y/o ausentes así como genes con una mayor o menor expresión. Tiene la ventaja de que se pueden analizar un gran número de genes o el genoma completo en una sola laminilla, así como, procesar varias muestras en un solo ensayo (Ramírez *et al*; 2003).

Otro método de mucha importancia desde su descubrimiento ha sido la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual gracias a la accesibilidad que hoy en día se tienen de los equipos requeridos, la cantidad de DNA requerida, la enzima Taq polimerasa, así como, el diseño de iniciadores y sobre todo a la sensibilidad de la técnica ha permitido que sea utilizada como una herramienta en todos los campos de la investigación. Hay que considerar también que a partir de su descubrimiento se han derivado otros métodos moleculares que tienen como base la PCR como por ejemplo RAPD-PCR, RT-PCR, PCR anidada (Luque J, 2006). La PCR sigue siendo de gran ayuda para determinar factores de virulencia de *H. pylori* ya que muchos de los reportes de los genes que se han asociado a enfermedad o que están propuestos como marcadores de la presencia de la isla de patogenicidad por ejemplo, fueron realizados o validados mediante esta técnica (Jenks *et al*; 1998; Maeda *et al*; 1999; Kauser *et al*; 2004; Ali *et al*; 2005; Matteo *et al*; 2007; Romo González *et al*; 2009; Schmidt *et al*; 2010).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Se ha reportado que las cepas de *H. pylori* de diferentes orígenes clínicos tienen diversidad en el contenido de genes de *cag* PAI y del resto de su genoma, por lo que determinar la variabilidad genética en cepas de *H. pylori* aisladas de individuos mexicanos con diferentes enfermedades gastroduodenales, permitirá contribuir al conocimiento y estudio de genes marcadores de enfermedad que predispongan o conlleven al desarrollo de enfermedades gastroduodenales severas causadas por *H. pylori* como cáncer gástrico.

## **3. HIPÓTESIS**

De 54 genes de *Helicobacter pylori* que se estudiarán, se podrán obtener genes asociados a enfermedad gastroduodenal que pudieran ser considerados como posibles marcadores de enfermedad en cepas de población mexicana.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

- Analizar la frecuencia de 54 genes de *Helicobacter pylori* asociados a enfermedad en cepas provenientes de pacientes mexicanos con gastritis, úlcera duodenal y cáncer gástrico

### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar por PCR la utilidad de genes como posibles marcadores de enfermedad en cepas provenientes de población mexicana con gastritis, úlcera duodenal y cáncer gástrico.
- Validar el microarreglo desarrollado por la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMEIP) del Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI, con cepas de casos clínicos.
- Evaluar la integridad de la isla de patogenicidad *cag* PAI en cepas de población mexicana con enfermedad gastroduodenal.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 MATERIAL BIOLÓGICO:

- Cepas tipo de *H. pylori* 26695 y J99
- 60 cepas de *H. pylori* provenientes de biopsias de:
  - ✓ 20 pacientes con diagnóstico de gastritis no atrófica
  - ✓ 20 pacientes con úlcera duodenal
  - ✓ 20 pacientes con cáncer gástrico

Las cepas de *H. pylori* se encontraban conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  en el laboratorio de Bacteriología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMEIP) o se aislaron de pacientes que cumplieron los siguientes criterios:

-Criterios de inclusión:

Pacientes adultos con indicación médica de endoscopia de tubo digestivo y con diagnóstico histológico de gastritis no atrófica, úlcera duodenal o cáncer gástrico atendidos en el Hospital de Especialidades y de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS y del Instituto Nacional de Cancerología de la Secretaría de Salud.

-Criterios de exclusión:

Pacientes que recibieron tratamiento con antibióticos, antiinflamatorios, inmunosupresores, compuestos de bismuto e inhibidores de la bomba de protones; en las 4 últimas semanas antes de la toma de muestra, con diagnóstico de enfermedad autoinmune u otro cáncer no relacionado.

## **5.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *H. pylori***

Las biopsias gástricas de los pacientes fueron inoculadas en agar sangre de carnero al 5% en condiciones de microaerofilia (10% CO<sub>2</sub>), 37 °C de 2 a 7 días. La identificación de *H. pylori* se hizo con las pruebas de oxidasa, catalasa, ureasa y tinción de Gram. *H. pylori* es gram negativo, oxidasa, catalasa y ureasa positivo. De cada biopsia, se seleccionaron de 3 a 4 colonias de *H. pylori*, se propagaron en 6 cajas de agar sangre y fueron incubadas en las condiciones antes descritas, posteriormente se cosecharon las colonias crecidas y se resuspendieron en 1 ml de solución salina isotónica al 0.80% (ver Anexo 1 y 2), para la extracción de DNA. En el caso de las cepas que se encontraban previamente congeladas, se descongelaron y propagaron en agar sangre para extraer el DNA.

Asimismo, se propagaron las cepas de referencia 26695 y J99 en 10 cajas de agar sangre para extraer el DNA el cual se utilizó como control en los ensayos realizados en este trabajo.

## **5.3. EXTRACCIÓN DE DNA: MÉTODO DE ISOTIOCIANATO DE GUANIDINA (GES)**

El crecimiento bacteriano suspendido en 1 mL de solución salina, se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se desechó teniendo cuidado de no eliminar el botón celular. Se agregaron 400 µL de isotiocianato de guanidina (GES) mezclando suavemente, posteriormente, el tubo se colocó en hielo durante 10 minutos. Enseguida se agregaron 250 µl de acetato de amonio frío, se homogenizó y la mezcla se mantuvo en hielo por 5 minutos. El siguiente paso fue agregar 650 µl de cloroformo, se mezcló suavemente y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos. Se extrajo la fase acuosa en un tubo eppendorf previamente rotulado. Se agregaron, de nuevo 650 µl de cloroformo, se mezcló y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos, nuevamente se extrajo la fase

acuosa en un tubo limpio y previamente rotulado; a éste último tubo que contenía la fase acuosa se le agregaron 400 µl de propanol mezclándolo suavemente y dejándolo incubar toda la noche a -20°C; al día siguiente se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante teniendo cuidado de no eliminar el botón de DNA. El DNA precipitado, se lavó con 800 µL de etanol al 70% frío y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos para después decantar el sobrenadante. El botón de DNA se incubó 10 minutos a 43°C para eliminar el exceso de etanol. Una vez seco el DNA, se agregaron 100 µl de amortiguador TE y se incubó 10 minutos a 56°C. Finalmente, se homogenizó y se cuantificó el DNA obtenido en un espectrofotómetro Nanodrop y se realizó una electroforesis en agarosa al 1% para evaluar la integridad del DNA. El DNA cuantificado se almacenó a -20°C, hasta su uso.

Este procedimiento se realizó con cada una de las cepas aisladas de pacientes, así como, con las cepas de referencia de *H. pylori* J99 y 26695.

#### **5.4. DIFERENCIACIÓN DE CLONAS POR EL MÉTODO DE DNA POLIMÓRFICO AMPLIFICADO AL AZAR (RAPD)**

Para cada una de las clonas provenientes de las muestras clínicas se preparó una solución de DNA a una concentración de 40 ng/µl.

Se utilizaron los iniciadores 1254 y 1281 (ver anexo 3)

La reacción se llevó a cabo con 20 ng de DNA genómico de *H. pylori* de cada uno de los aislados, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 20 pmol de iniciadores, 1 U de Taq DNA polimerasa y 250 mM de cada nucleótido (dCTP, dGTP, dATP, y dTTP).

Se homogenizó el contenido de cada tubo de PCR evitando la formación de burbujas y se introdujo en el termociclador eppendorf en las siguientes condiciones: 4 ciclos de 94°C por

5 minutos, 36°C por 5 minutos y 72°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 3°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto; para terminar con 1 ciclo de 72°C por 10 minutos y uno de 4°C para mantener la reacción.

Al término de la reacción se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% con 10 µl de producto teniendo cuidado de colocar los productos de PCR de las clonas que provenían de una sola muestra juntas para poder observar los patrones RAPD. El gel se visualizó con syber green y se utilizó marcador de peso molecular de 1kb DNA. Las imágenes se observaron en un analizador de imágenes (Syngene, United Kingdom).

El criterio para considerar a los aislados de un paciente con diferente patrón RAPD fue considerado de acuerdo a previos reportes publicados de infección mixta en nuestra población (Salama *et al*; 2007). Más de 3 bandas claramente diferenciadas de un paciente se consideraron como un patrón diferente. Cuando en los aislados se observaron dos patrones RAPD diferentes se consideró como infección mixta (Romo-González *et al*; 2009).

Si no era concluyente la diferenciación de clonas por medio de los patrones RAPD se procedió a repetir el procedimiento pero ahora utilizando el iniciador 1281. Si todas las clonas de una muestra presentaban el mismo patrón RAPD se seleccionó solamente una clona para determinar por PCR la presencia o ausencia de los genes que se evaluaban; si había diferente patrón RAPD entre las clonas de una misma muestra, éstas se consideraron como clonas independientes para procesarse.

## **5.5 DETERMINACIÓN DE PRESENCIA O AUSENCIA DE 54 GENES POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

De todas las clonas seleccionadas por patrones RAPD se realizó la PCR de los 54 genes. La amplificación se llevó a cabo en un volumen de 25 µl el cual contenía 20 ng de DNA, a cada tubo se agregó 1X PCR amortiguador, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de cada deoxinucleótido, 2 U de Taq polimerasa y 30 mM de cada par de iniciadores. La mezcla de reacción se amplificó 35 ciclos de la siguiente manera: 30 seg a 92°C, 45 seg de alineamiento a una temperatura que iba de 50°C a 56°C dependiendo del gen (ver anexo 3) y 2.5 min a 72°C. Después del último ciclo, la extensión continuó por otros 5 min. Los productos fueron analizados en un gel de agarosa al 1% y visualizados en el analizador de imagen. El diseño de los iniciadores que se utilizaron fue el propuesto por Salama *et al*; 2000.

Se utilizó DNA de J99 y 26695 como controles en la PCR de cada gen.

## **5.6. MICROARREGLOS**

### **5.6.1. PREPARACIÓN DE LAS LAMINILLAS.**

Las laminillas de microarreglos estuvieron integradas por 54 genes que incluyen, los 30 genes asociados a enfermedad, en los que hay 3 genes de *cag* PAI. Además están contenidos los 24 genes restantes de la isla de patogenicidad. Cada gen está representado por sondas de productos de PCR (700 pb en promedio) y por sondas de oligonucleótidos (20 pb), impresas en ambos casos por duplicado. Cada laminilla contiene 16 submicroarreglos, por lo tanto en cada laminilla se pueden analizar 15 muestras de DNAs diferentes y un control. El diseño de los microarreglos fue realizado por la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del IMSS (Instituto

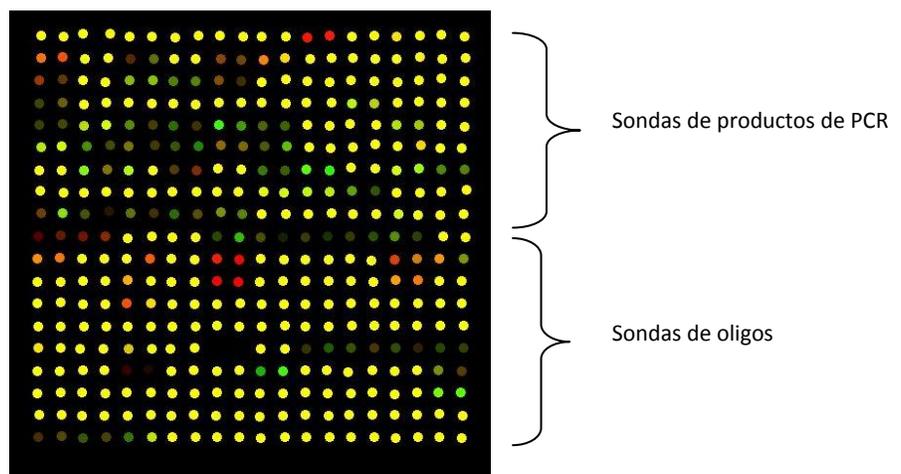
Mexicano del Seguro Social), en colaboración con la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. En la figura 3, 4 y 5 se ejemplifica el diseño de las laminillas que contienen los microarreglos. En la tabla 3 se muestra la posición de cada uno de los genes en el microarreglo. Las primeras filas corresponden a genes representados por sondas de productos de PCR y los demás a genes representados por sondas de oligos.



**Figura 3.** Posición de los submicroarreglos. La posición de cada uno que se presenta, se debe a que se emplea en la hibridación toda la laminilla, pero el escaner solo puede leer las primeras 8 posiciones, por lo que para leer la otra parte del microarreglo se gira 180°



**Figura 4.** Imágen de microarreglo híbrido



**Figura 5.** Imágen de un submicroarreglo híbrido. Se puede observar la variación en fluorescencia de cada uno de los puntos que representan a los genes evaluados en este estudio. Cada gen está impreso por duplicado siendo las primera 9 filas las que corresponden a genes representados por sondas de productos de PCR y las últimas 10 filas a genes representados por sondas de oligos.

HP0992	HP0992	HP0790	HP0790	HP0425	HP0425	HP0424	HP0424	HP1472	HP1472	HP0025	HP0025	HP0967	HP0967	HP1404	HP1404	HP0713	HP0713	HP005	HP0053
HP0674	HP0674	<i>cag7</i>	<i>cag7</i>	<i>cag23</i>	<i>cag23</i>	<i>cag10</i>	<i>cag10</i>	HP1405	HP1405	HP1381	HP1381	HP1499	HP1499	HP1426	HP1426	HP1410	HP1410	HP1409	HP1409
<i>cag11</i>	<i>cag11</i>	<i>cag9</i>	<i>cag9</i>	<i>cag8</i>	<i>cag8</i>	<i>cag6</i>	<i>cag6</i>	<i>virB11</i>	<i>virB11</i>	<i>cag5</i>	<i>cag5</i>	<i>cag4</i>	<i>cag4</i>	<i>cag3</i>	<i>cag3</i>	<i>cag2</i>	<i>cag2</i>	<i>cag1</i>	<i>cag1</i>
<i>cag21</i>	<i>cag21</i>	<i>cag20</i>	<i>cag20</i>	<i>cag19</i>	<i>cag19</i>	<i>cag18</i>	<i>cag18</i>	<i>cag17</i>	<i>cag17</i>	<i>cag16</i>	<i>cag16</i>	<i>cag15</i>	<i>cag15</i>	<i>cag14</i>	<i>cag14</i>	<i>cag13</i>	<i>cag13</i>	<i>cag12</i>	<i>cag12</i>
JHP0630	JHP0630	HP0713	HP0713	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	<i>cag26</i>	<i>cag26</i>	<i>cag25</i>	<i>cag25</i>	<i>cag24</i>	<i>cag24</i>	<i>cag22</i>	<i>cag22</i>
<i>cag10</i>	<i>cag10</i>	JHP0951	JHP0951	JHP0950	JHP0950	JHP0934	JHP0934	HP1499	HP1499	JHP0925	JHP0925	HP1410	HP1410	HP1409	HP1409	HP1472	HP1472	HP0025	HP0025
<i>cag3</i>	<i>cag3</i>	<i>cag2</i>	<i>cag2</i>	<i>cag1</i>	<i>cag1</i>	JHP0940	JHP0940	<i>cag7</i>	<i>cag7</i>	JHP0961	JHP0961	JHP0960	JHP0960	JHP0927	JHP0927	JHP0616	JHP0616	<i>cag23</i>	<i>cag23</i>
<i>cag14</i>	<i>cag14</i>	<i>cag13</i>	<i>cag13</i>	<i>cag12</i>	<i>cag12</i>	<i>cag11</i>	<i>cag11</i>	<i>cag9</i>	<i>cag9</i>	<i>cag8</i>	<i>cag8</i>	<i>cag6</i>	<i>cag6</i>	<i>virB11</i>	<i>virB11</i>	<i>cag5</i>	<i>cag5</i>	<i>cag4</i>	<i>cag4</i>
<i>cag25</i>	<i>cag25</i>	<i>cag24</i>	<i>cag24</i>	<i>cag22</i>	<i>cag22</i>	<i>cag21</i>	<i>cag21</i>	<i>cag20</i>	<i>cag20</i>	<i>cag19</i>	<i>cag19</i>	<i>cag18</i>	<i>cag18</i>	<i>cag17</i>	<i>cag17</i>	<i>cag16</i>	<i>cag16</i>	<i>cag15</i>	<i>cag15</i>
HP0967	HP0967	HP1404	HP1404	HP0713	HP0713	HP0053	HP0053	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	<i>cag26</i>	<i>cag26</i>
HP1499	HP1499	HP1426	HP1426	HP1410	HP1410	HP1409	HP1409	HP0992	HP0992	HP0790	HP0790	HP0425	HP0425	HP0424	HP0424	HP1472	HP1472	HP0025	HP0025
<i>cag4</i>	<i>cag4</i>	<i>cag3</i>	<i>cag3</i>	<i>cag2</i>	<i>cag2</i>	<i>cag1</i>	<i>cag1</i>	HP0674	HP0674	<i>cag7</i>	<i>cag7</i>	<i>cag23</i>	<i>cag23</i>	<i>cag10</i>	<i>cag10</i>	HP1405	HP1405	HP1381	HP1381
<i>cag15</i>	<i>cag15</i>	<i>cag14</i>	<i>cag14</i>	<i>cag13</i>	<i>cag13</i>	<i>cag12</i>	<i>cag12</i>	<i>cag11</i>	<i>cag11</i>	<i>cag9</i>	<i>cag9</i>	<i>cag8</i>	<i>cag8</i>	<i>cag6</i>	<i>cag6</i>	<i>virB11</i>	<i>virB11</i>	<i>cag5</i>	<i>cag5</i>
<i>cag26</i>	<i>cag26</i>	<i>cag25</i>	<i>cag25</i>	<i>cag24</i>	<i>cag24</i>	<i>cag22</i>	<i>cag22</i>	<i>cag21</i>	<i>cag21</i>	<i>cag20</i>	<i>cag20</i>	<i>cag19</i>	<i>cag19</i>	<i>cag8</i>	<i>cag18</i>	<i>cag17</i>	<i>cag17</i>	<i>cag16</i>	<i>cag16</i>
HP1410	HP1410	HP1409	HP1409	HP1472	HP1472	HP0025	HP0025	JHP0630	JHP0630	HP0713	HP0713	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS
JHP0960	JHP0960	JHP0927	JHP0927	JHP0616	JHP0616	<i>cag23</i>	<i>cag23</i>	<i>cag10</i>	<i>cag10</i>	JHP0951	JHP0951	JHP950	JHP0950	JHP0934	JHP0934	HP1499	HP1499	JHP0925	JHP0925
<i>cag6</i>	<i>cag6</i>	<i>virB11</i>	<i>virB11</i>	<i>cag5</i>	<i>cag5</i>	<i>cag4</i>	<i>cag4</i>	<i>cag3</i>	<i>cag3</i>	<i>cag2</i>	<i>cag2</i>	<i>cag1</i>	<i>cag1</i>	JHP0940	JHP0940	<i>cag7</i>	<i>cag7</i>	JHP0961	JHP0961
<i>cag18</i>	<i>cag18</i>	<i>cag17</i>	<i>cag17</i>	<i>cag16</i>	<i>cag16</i>	<i>cag15</i>	<i>cag15</i>	<i>cag14</i>	<i>cag14</i>	<i>cag13</i>	<i>cag13</i>	<i>cag12</i>	<i>cag12</i>	<i>cag11</i>	<i>cag11</i>	<i>cag9</i>	<i>cag9</i>	<i>cag8</i>	<i>cag8</i>
		MSS	MSS			<i>cag26</i>	<i>cag26</i>	<i>cag25</i>	<i>cag25</i>	<i>cag24</i>	<i>cag24</i>	<i>cag22</i>	<i>cag22</i>	<i>cag21</i>	<i>cag21</i>	<i>cag20</i>	<i>cag20</i>	<i>cag19</i>	<i>cag19</i>

**Tabla 3.** Diseño del microarreglo. Los genes que se encuentra en negritas son genes representados por sondas de productos de PCR, se encuentran posiciones en el microarreglo que no tienen impreso ningún gen sino únicamente amortiguador (MSS), también es importante observar que todos los genes están impresos por duplicado pero los genes de la isla *cag PAI* están impresos 4 veces en ambos microarreglos.

### 5.6.2. **MARCADO DE DNA<sub>TOTAL</sub> CON RANDOM PRIMER**

La selección de fluoróforos para marcar el DNA tanto de las clonas de *H. pylori* como de los controles fue la siguiente:

DNA cepas de <i>H. pylori</i> de origen clínico	Alexa 647
Control (DNA 26695 )	Alexa 647
DNA mezcla (26695 y J99)	Alexa 555

#### 5.6.2.1 Incorporación de aminoalil-dUTP

En un tubo estéril, se desnaturalizaron 29 µl conteniendo 5 µg de DNA proveniente de las muestras seleccionadas. Se incubaron durante 5 minutos a 94°C y 30 segundos a 65°C y posteriormente se colocaron en hielo durante 5 minutos (mezcla A). En otro tubo eppendorf limpio y estéril se agregaron (mezcla B): 15 µl random primer, 5 µl aminoalil dNTP y 1 µl klenow. El contenido de la mezcla B, se agregó al tubo que contenía el DNA desnaturalizado (mezcla A) dando un volumen final de 50 µl y se incubó a 37°C durante toda la noche.

#### 5.6.2.2 Purificación del aminoalil-DNA (aaDNA)

A los 50 µl de aaDNA se le adicionaron 300 µl de amortiguador de fosfatos (PB) (columnas Qiagen), se homogenizaron y se colocaron en la columna Qiagen dejándolo reposar por 5 minutos y posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 minuto. A la columna se le agregaron 750 µl de amortiguador de fosfatos para lavado (Institute for Genomic Research), se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 minuto y se decantó, la columna vacía se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm durante 1 minuto para eliminar el exceso de amortiguador de lavado, luego se transfirió la columna a un tubo eppendorf

nuevo y se agregó 30 µl de amortiguador de fosfatos para elución (Institute for Genomic Research), después de 1 minuto de reposo se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 minuto; este proceso de elución se repitió 2 veces. El contenido del tubo se concentró durante 30 minutos y la pastilla obtenida se resuspendió en 4.5 µl de NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M pH9 dejándolo reposar durante 10 minutos.

#### 5.6.2.3. Reacción de conjugación

Se disolvió el fluoróforo (alexa 555 ó alexa 647) en 80 µl de agua desionizada estéril, se homogenizó y se depositó en 8 tubos de PCR con 10 µl cada uno para después secarlos en el concentrador de DNA durante 10 minutos; se tomó un vial y se disolvió en 4.5 µl de DMSO homogenizando durante 10 segundos. El resto de los viales se almacenaron a -70°C hasta su uso. Los 4.5 µl del fluorocromo disuelto se agregaron a los 4.5 µl de aaDNA purificado mezclando con la pipeta suavemente para evitar la formación de burbujas y finalmente, se incubó en oscuridad durante 90 minutos.

#### 5.6.2.4. Purificación del aaDNA-alexa

Después del tiempo de incubación se agregaron 71 µl de agua desionizada estéril y 500 µl de amortiguador de captura (columnas Qiagen), se pasó por columna de Qiagen y se dejó reposar durante 5 minutos para posteriormente centrifugar a 14,000 rpm durante 1 minuto, se lavó 3 veces la columna con 300 µl de amortiguador PE (columnas Quiagen) centrifugando a 14,000 rpm durante 1 minuto, se centrifugó de nuevo la columna vacía para eliminar el exceso de etanol, el siguiente paso fue cambiar la columna a un tubo eppendorf nuevo y se agregaron 50 µl de agua desionizada estéril a 56°C dejando reposar durante 1 minuto para después centrifugar a 14,000 rpm durante 1 minuto, este

proceso se repitió 2 veces, por lo que se tuvo un volumen final de 100 µl. Finalmente, se cuantificó en espectrofotómetro nanodrop la cantidad de DNA marcado con fluoróforo en picomoles/µl y se almacenó a -70°C y en oscuridad hasta su uso.

### **5.6.3. HIBRIDIZACIÓN DE MICROARREGLOS MPX 16**

#### **5.6.3.1 Pretratamiento del microarreglo**

La laminilla se prehidrató exponiendo el lado impreso al vapor de agua a 60°C durante 10 segundos, se volteó para secar y se volvió a exponer al vapor, este proceso se realizó 3 veces. La laminilla se colocó con el lado impreso hacia arriba en el equipo entrecruzador para fijación de ácidos nucleicos a membranas (crosslinker) y se fijó con 2 ciclos de luz uv 0.12 j x cm<sup>2</sup>, enseguida se lavó con SDS 0.1% durante 1 minuto a temperatura ambiente, luego se lavó 2 veces con agua desionizada estéril a temperatura ambiente, después se pasó a un baño de agua en ebullición durante 2 minutos e inmediatamente a la solución de prehibridación a 42°C en la cual permaneció la laminilla durante 1 hora. Después de este tiempo se lavó 5 veces con agua desionizada estéril a temperatura ambiente y se secó por centrifugación a 1,500 rpm durante 5 minutos.

#### **5.6.3.2. Hibridación**

Se colocó una cuadrícula de goma sobre la laminilla del microarreglo que coincidía con la posición de los 16 submicroarreglos impresos para depositar las muestras a hibridar, por otro lado en un tubo eppendorf estéril se agregaron 4 picomoles de DNA de las muestras problema, marcado con el fluoróforo alexa 647 junto con 4 picomoles del DNA de 26695 y J99 marcados con el fluorocromo alexa 555 (2 picomoles de 26695 y 2 picomoles de J99, respectivamente); es decir, se hibridaron 8 picomoles en total, 4 de la muestra y 4 de los

controles. Se secaron en un concentrador durante 15 minutos y luego se agregaron 39  $\mu$ l de TE, se mezcló y se añadieron 15  $\mu$ l de SSC 20X, se mezcló y finalmente, se adicionaron 6  $\mu$ l de SDS 1% y se mezcló. El volumen final a hibridar fue de 60  $\mu$ l. Este volumen se desnaturalizó a 94°C por 5 minutos y después se mantuvo a 65°C para aplicar las muestras al microarreglo el cual previamente se colocó en un agitador a 42°C. Una vez depositadas las muestras a probar en la posición correspondiente del microarreglo éste fue cubierto con un adhesivo transparente para evitar la evaporación de la muestra. El microarreglo inoculado se colocó en una caja petri con tapa y se incubó durante 18 horas a 42°C y a 120 rpm.

#### 5.6.3.3. Lavados

Después del tiempo de incubación, se quitó el adhesivo transparente del microarreglo y se agregaron a cada pozo 100  $\mu$ l de SSC 2X con una pipeta multicanal, se aspiró y se llenó de nuevo la pipeta en el mismo pozo y se desecharon los 100  $\mu$ l que se habían agregado. De nuevo se repitió el lavado con SSC 2x por 2 veces más. La estructura de goma que se había adherido al microarreglo se quitó con cuidado y se colocó la laminilla en una solución de lavado de SSC 2X y SDS al 0.2% a temperatura ambiente durante 10 minutos y en agitación; enseguida se colocó la laminilla en una solución de SSC 2X a temperatura ambiente durante 10 minutos en agitación y finalmente, se pasó a una solución de SSC 0.2X a temperatura ambiente durante 10 minutos y en agitación. Al término de estos lavados la laminilla se centrifugó a 1,500 rpm por 5 minutos. Una vez seca la laminilla se almacenó en la oscuridad para su lectura en un escáner después de 24 horas.

#### **5.6.4. OBTENCIÓN DE VALOR DE CORTE DE MICROARREGLOS**

Se realizó mediante una titulación de los DNAs de controles J99 y 26695. Se marcó con alexa 647 el DNA de la 26695 y el DNA de J99 se marcó con alexa 555, se hibridaron a diferentes concentraciones empezando por 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 9 picomoles de cada uno de los controles; en los 8 pozos restantes del microarreglo se hibridaron los mismos controles a las mismas concentraciones pero ahora marcando a la 26695 con alexa 555 y la J99 con alexa 647 (anexo 4). Con esta titulación fue posible conocer la concentración, marcaje y valor de corte adecuados para la realización del ensayo de las muestras clínicas.

#### **5.6.5. INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE MICROARREGLOS**

El microarreglo fue escaneado utilizando el escáner Axon y para el análisis de los resultados obtenidos fue necesario transformarlos a valor numérico con el programa GENEPIX 3.0

Cada punto del microarreglo fue leído en 2 canales: Cy3 y Cy5 (equivalentes a alexa 555 y alexa 647) obteniéndose intensidades de fluorescencia de la imagen y del fondo para la lectura hecha en el canal Cy3 y para la señal Cy5. Se obtuvo la señal neta para cada uno de los puntos.

Visualmente la presencia de un punto amarillo indicaría que la muestra (alexa 647 que emite rojo) y el control (J99 y 26695, alexa 555 que emite verde) hibridó con el gen, por lo tanto se consideraría que el gen está presente, mientras que la presencia de un punto verde indicaría que únicamente el control hibridó por lo que se entendería que el gen no está en la muestra clínica sino solamente en el control (26695).

El punto de corte se estableció como la media +  $k$  desviaciones estándar, de tal manera que los genes que tuvieron un valor promedio con ambos fluorocromos mayor al punto de corte se consideraron genes presentes y un valor menor al punto de corte correspondió a genes ausentes.

Se consideró como diagnóstico positivo la presencia del gen.

El valor de  $k$  se seleccionó dependiendo de qué tanto se desea decir que un gen está ausente cuando no lo está y de qué tanto se desea decir que un gen está presente cuando no lo está; de tal manera que mientras mayor sea el valor de  $k$ , mayor sería la proporción de genes considerados como ausentes y menor la de genes presentes, por lo que de esta manera se asegura que los genes señalados como presentes es casi seguro que lo están pero entre los señalados como ausentes varios no lo estarán. Un valor de  $k$  pequeño da mayor seguridad al decir que un gen está ausente.

Si se considera una distribución normal de los datos, en la tabla 4 se indica el porcentaje de genes que realmente están ausentes y que podrían ser señalados como presentes.

k	% falsos negativos
1.00	15.9
1.04	15.0
1.28	10.0
1.64	5.0
2.00	2.3
2.33	1.0
3.00	0.1
3.09	0.1

**Tabla 4.** Valores de  $k$ . En esta tabla se observa que mientras menor es el valor de  $k$ , mayor es el % de falsos negativos que se obtendrían si se escogiera una  $k$  pequeña y a mayor valor de  $k$  seleccionado, se obtiene un menor % de falsos negativos.

#### 5.6.6 *ENSAYO DE MICROARREGLOS CON CEPAS DE H. pylori*

De las 64 clonas incluidas en este estudio se seleccionaron **15** clonas de diferentes pacientes. Se evaluaron 5 clonas de gastritis, 5 de úlcera duodenal y 5 de cáncer gástrico, para determinar la presencia o ausencia de los 54 genes impresos por duplicado tanto como con sondas de productos de PCR como con sondas de oligos (genes de *cag* PAI y genes a enfermedad).

#### 5.7 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se llevó a cabo mediante  $X^2$  considerando un nivel de significancia de  $p \leq 0.1$ . Se utilizó el programa Epi info y los datos de los microarreglos fueron analizados con el programa SAS.2.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 SELECCIÓN DE CLONAS PARA EL ANÁLISIS POR PCR Y MICROARREGLOS

En este trabajo, se incluyeron 64 clonas de *H. pylori*, aisladas de 60 pacientes con enfermedad gastroduodenal. En la tabla 5, se muestran las características generales de los pacientes incluidos.

ENFERMEDAD	No. PACIENTES	No. CLONAS	EDAD	SEXO (M/F)
Gastritis	20	20	20-59 años	9/11
Úlcera duodenal	20	22	36-86 años	14/6
Cáncer gástrico	20	22	29-79 años	11/9
TOTAL	60	64	20-86 años	34/26

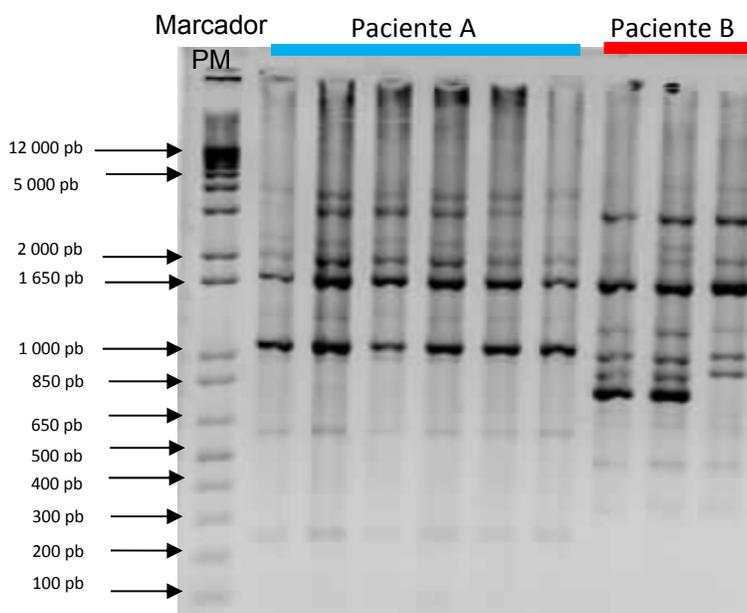
**Tabla 5.** Características de los pacientes y cepas incluidas en este estudio. La mayoría de las cepas incluidas correspondieron al sexo masculino en el caso de úlcera duodenal y cáncer gástrico aunque en gastritis fue casi similar la proporción. El mayor rango de edad se encontró en úlcera duodenal y cáncer gástrico, considerando que son patologías que para su desarrollo requieren de más tiempo de infección.

En algunas biopsias cultivadas solamente se obtuvo 1 colonia, por lo que en estos casos no se realizó diferenciación de clonas. De la mayoría de los aislados de *H. pylori* incluidos en este estudio, se tenían de 3 a 6 clonas, con éstas se verificó multiplicidad de infección realizando RAPD-PCR de cada una. Se efectuó RAPD-PCR con el iniciador 1254 a un total de 148 clonas, se obtuvo un 8.5% de pacientes con infección mixta. La infección mixta se encontró en 2 pacientes con úlcera duodenal (10%) y 2 pacientes con cáncer gástrico (14%) pero no se observó en los aislados de gastritis (Tabla 6).

ENFERMEDAD	NO. DE PACIENTES	NO. CLONAS	% INFECCIÓN MIXTA (PACIENTE)
Gastritis	13	47	0%
Úlcera Duodenal	20	54	10 (2)
Cáncer gástrico	14	47	14.3 (2)
<b>Total</b>	<b>47</b>	<b>148</b>	<b>8.5% (4)</b>

**Tabla 6.** Infección mixta obtenida en 47 pacientes determinada por RAPD-PCR. Aunque se incluyeron en este estudio 20 pacientes por cada grupo de enfermedad se puede observar que el número de pacientes incluidos en la determinación de infección mixta por RAPD-PCR es menor en el caso de gastritis además de presentar ausencia de la infección mixta. En úlcera duodenal y cáncer gástrico se observó infección mixta. 13 pacientes de un total de 60 pacientes no se incluyeron en esta prueba ya que solo se pudo aislar una sola colonia de sus biopsias.

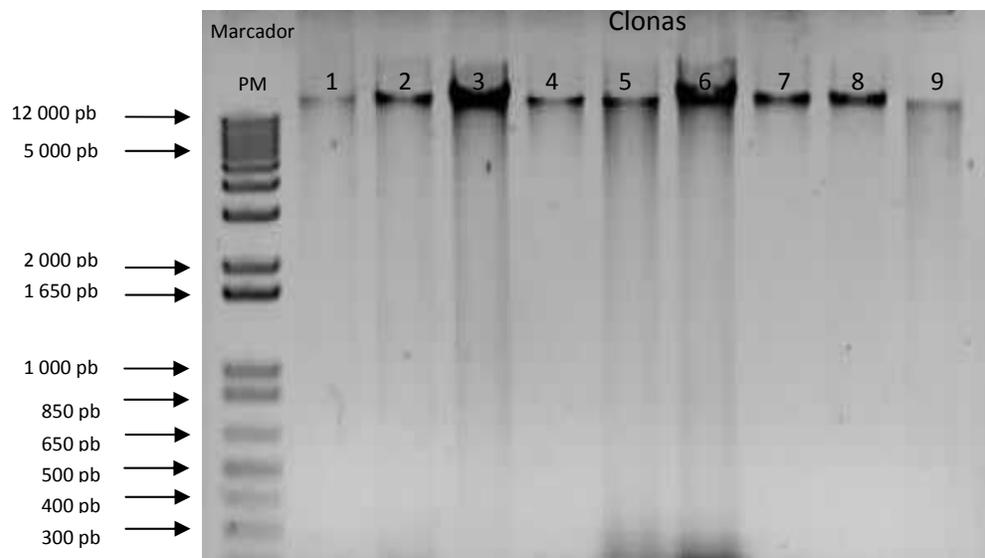
En la figura 6, se muestra un ejemplo de un gel obtenido por RAPD-PCR en donde se ejemplifica el tipo de bandas que se obtiene cuando un paciente no tiene infección mixta (A) en comparación de un paciente que sí la tiene (B).



**Figura 6.** Patrones RAPD obtenidos con iniciador 1254. En las 6 clonas obtenidas del paciente (A), se observa que hay un mismo número de bandas siendo la única diferencia entre estas bandas la intensidad con que se encuentran; el paciente (B) en su última clona, carece de una de las bandas de mayor intensidad que presentan las otras dos de sus clonas además de faltarle una banda de intensidad escasa que las otras dos clonas sí tienen. Se empleó como control DNA de la cepa 26695 la cual solamente amplifica una banda.

Para seleccionar las cepas de estudio, nos basamos en el patrón polimórfico del DNA obtenido por el patrón RAPD-PCR entre las clonas del mismo paciente. La mayoría de las clonas estudiadas mostraron patrones RAPD similares, por lo que en estos casos, se seleccionó una clona por paciente. En el caso de los 4 pacientes con infección múltiple, se incluyeron las 2 cepas diferentes.

Para el microarreglo, se consideró la concentración de DNA y fueron incluidas en el ensayo las 15 clonas con mayor concentración e integridad. En la figura 7 se muestra un ejemplo de la integridad y concentración del DNA cromosomal que presentaron las clonas utilizadas para el ensayo de microarreglos.



**Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los DNAs utilizados en el ensayo de microarreglos. Dado que los microarreglos requieren gran cantidad de DNA, era necesario asegurar que las clonas que se fueran a incluir en ellos, presentaran una banda muy visible como la clona 3 y 6 lo que indicaba que había gran cantidad de DNA mientras que en los casos de la clona 1 y 9 donde la banda era de menor intensidad pero bien definida, eran consideradas como aceptables para incluirlas en el microarreglo.

## 6.2 FRECUENCIA DE GENES DETERMINADA POR PCR EN ENFERMEDAD GASTRODUODENAL

En la tabla 7 y en la gráfica 1 se muestran las frecuencias obtenidas de los genes de *H. pylori* en cada una de las enfermedades gastroduodenales. Estos genes son los 30 que Romo-González propuso como marcadores de virulencia, dentro de los cuales se encuentran 3 que pertenecen a la isla de patogenicidad *cag* PAI. Los resultados mostraron gran variabilidad en el contenido de estos genes en las clonas estudiadas. El JHP0940/NA, se encontró ausente en las 64 clonas analizadas. El gen HP0927, estuvo ausente en todas las cepas de gastritis y presente únicamente en una sola cepa de úlcera duodenal (4.5%) y en dos de cáncer gástrico (9%). El gen HP1409 estuvo presente solamente en una clona de cáncer gástrico (4.5%). El gen JHP0616 estuvo presente en frecuencias muy bajas en los tres padecimientos.

Otros genes estuvieron presentes en frecuencias similares en las 3 enfermedades, por ejemplo: JHP0934 (45%, 50% y 50%) y el JHP0992 (50%, 59% y 50%) en cepas de gastritis, úlcera duodenal y cáncer gástrico, respectivamente.

Hubo 3 genes que estuvieron presentes en mayor frecuencia en gastritis, JHP0951 (90%), en comparación con las clonas de úlcera duodenal y cáncer gástrico: HP1499 (50%) y HP1404 (55%), respectivamente, siendo éste último el único estadísticamente significativo ( $p=0.06$ ). Por otro lado, solo hubo 2 dos genes que se encontraron en gastritis JHP0934 (45%), en menor frecuencia, en comparación con clonas de úlcera duodenal y cáncer gástrico, JHP0960 (55%) y JHP0961 (65%), respectivamente. No hubo diferencia estadísticamente significativa ( $p>0.1$ ).

En el caso de úlcera duodenal se observó que hubo más genes que estaban en menor frecuencia únicamente en esta enfermedad, pero solo 4 de ellos fueron estadísticamente significativos: HP0025 (68.2%), HP0424 (45.5%), JHP0630 (27.3%), HP1410 (40.9%),

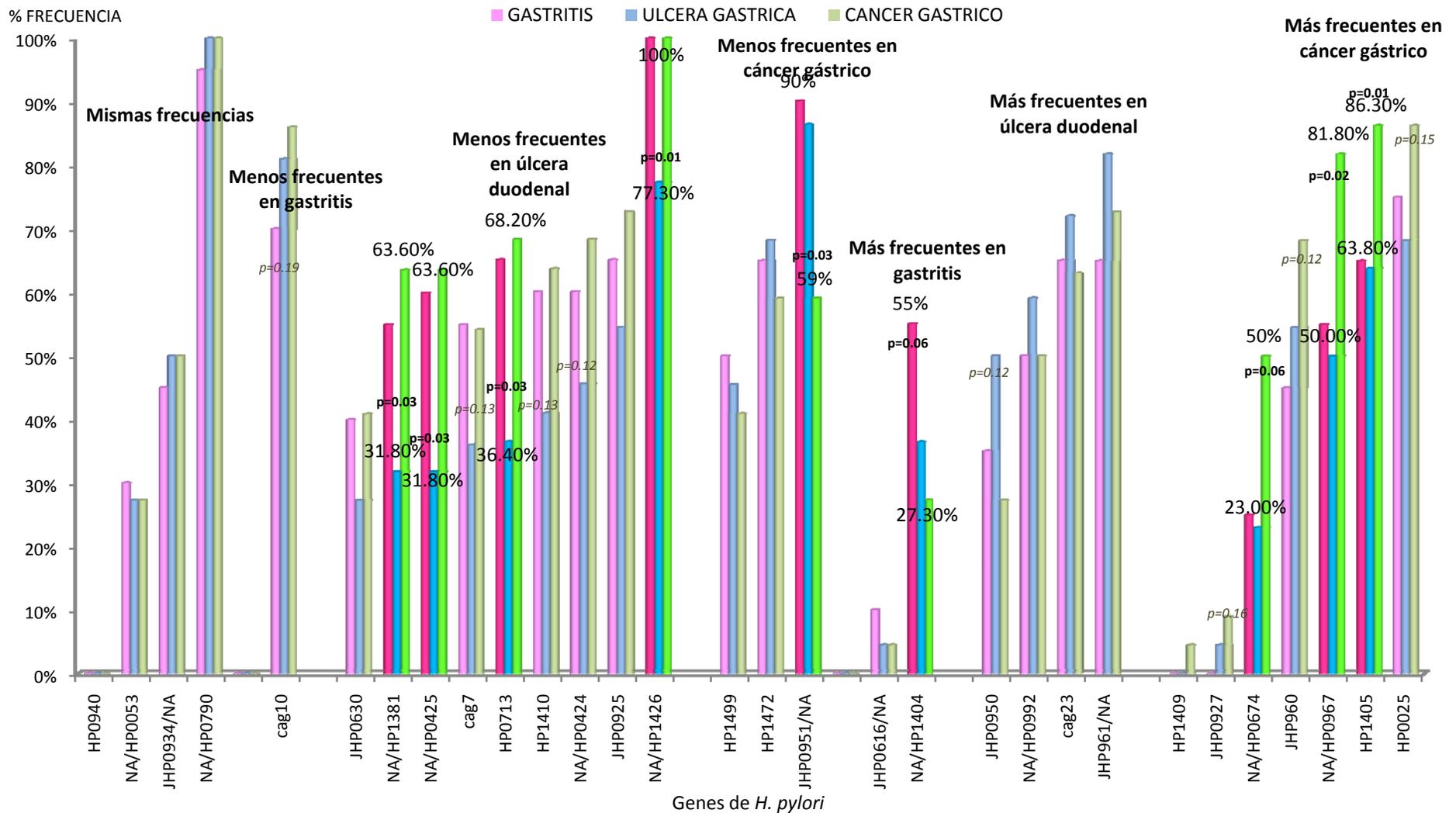
JHP0925 (54.4%), HP0713 (34.6%,  $p=0.03$ ), HP1426 (77.3%,  $p=0.01$ ), HP1381 (31.8%,  $p=0.03$ ), y HP0425 (31.8%,  $p=0.03$ ). También hubo genes que estaban en mayor frecuencia en clonas de úlcera duodenal y no en gastritis o cáncer gástrico como los genes HP1472 (68.2%), JHP0950 (50%), HP0992 (59.1%) y el gen JHP0962 (81.8%) pero sin ninguna significancia estadística.

Los genes HP0951 (59%,  $p=0.02$ ), HP1472 (59%), HP1499 (40.9%), HP1404 (27.3%) y el HP0950 (27.3%), se encontraron en menor frecuencia en cáncer gástrico que en gastritis o en clonas de úlcera duodenal. Los genes HP0025 (86%), HP0424 (68%), JHP0925 (72.7%), JHP0960 (68.2%), HP1381 (63.6%), HP0674 (50%,  $p=0.06$ ), HP1405 (86.3%,  $p=0.08$ ) y HP0967 (81.8%  $p=0.02$ ), se encontraron en mayor frecuencia, únicamente en cáncer gástrico, siendo los últimos tres los que presentaron diferencia estadísticamente significativa.

GEN	GASTRITIS N=20 (%)	UD N=22 (%)	CG N=22 (%)		GEN	GASTRITIS N=20 (%)	UD N=22 (%)	CG N=22 (%)
JHP0021/HP0025	15 (75)	15 (68)	19 (86)		<b>NA/HP01405</b>	13 (65)	14 (64)	19 (86)
NA/HP0424	12 (60)	10 (45)	15 (68)		<b>JHP0950/NA</b>	7 (35)	11 (50)	6 (27)
JHP0630/NA	8 (40)	6 (27)	9 (41)		<b>NA/HP0967</b>	11 (55)	11 (50)	18 (82)
JHP0651/HP0713	13 (65)	8 (36)	15 (68)		<b>NA/HP0992</b>	10 (50)	13 (59)	11 (50)
<b>NA/HP0790</b>	19 (95)	22 (100)	22(100)		JHP1303/HP1410	12 (60)	9 (41)	14 (64)
JHP0925/NA	13 (65)	12 (54)	16 (73)		JHP0961/NA	13 (65)	18 (82)	16 (72)
JHP0927/NA	0 (0)	1 (4.5)	2 (9)		<b>JHP1301/HP1409</b>	0 (0)	0 (0)	1 (4.5)
JHP0951/NA	18 (90)	19 (86)	13 (59)		NA/HP0053	6 (30)	6 (27)	6 (27)
NA/HP1426	20 (100)	17 (77)	22 (100)		NA/HP0425	12 (60)	7 (32)	14 (64)
JHP1365/HP1472	13 (65)	15 (68)	13 (59)		JHP0616/NA	2 (10)	1 (4.5)	1 (4.5)
<b>JHP1399/HP1499</b>	10 (50)	10 (45)	9 (41)		<b>JHP0934/NA</b>	9 (45)	11 (50)	11 (50)
<b>NA/HP0674</b>	5 (25)	5 (23)	11 (50)		JHP0960/NA	9 (45)	12 (54)	15 (68)
<b>JHP0940/NA</b>	0 (0)	0 (0)	0 (0)		<i>cag7</i>	11(55)	8(40)	12(60)
<b>NA/HP1404</b>	11 (55)	8 (36)	6 (27)		<i>cag10</i>	14(70)	18(82)	19(86)
NA/HP1381	11 (55)	7 (32)	14 (64)		<i>cag23</i>	13(65)	16(73)	14(64)

UD= úlcera duodenal CG= cáncer gástrico NA/ = gen específico de 26695 /NA= gen específico de J99

**Tabla 7.** Frecuencia de genes de *H. pylori* encontrada por PCR en cada enfermedad gastroduodenal. Estos genes previamente se habían propuestos como marcadores de enfermedad. Se pueden observar que el único gen ausente en las 3 enfermedades gastroduodenales es el JHP0940, mientras que el único gen que casi siempre estuvo presente en todos los casos y en una alta frecuencia es el NA/HP0790. Los genes JHP1399/HP1499, NA/HP0992, JHP1301/HP1409 y JHP0934/NA estuvieron presentes en similar frecuencia en las 3 enfermedades gastroduodenales. Llama la atención genes que se observan en una mayor frecuencia en una sola de las enfermedades como el NA//HP0674, NA/HP1404, NA/HP1405, JHP0950/NA y NA/HP0967.



**Gráfica 1.** Frecuencia de genes encontrados por PCR en mayor y menor frecuencia en enfermedad gastroduodenal. Se agruparon los genes de acuerdo a su frecuencia, teniendo en el 1er bloque los genes que presentaron casi la misma frecuencia en las 3 patologías, ya fuera en menor o mayor frecuencia. En el segundo bloque se agruparon los genes que presentaron una menor frecuencia únicamente en gastritis, en el 3er bloque los que tuvieron menor frecuencia en úlcera duodenal, indicando en negritas el valor que fue estadísticamente significativo, mientras que en cursiva se indican los genes que tuvieron cierta tendencia a ser significativos. En el 4to bloque está el único gen encontrado en menor frecuencia significativa en cáncer gástrico. En el 5to bloque está un único gen estadísticamente encontrado en mayor frecuencia en gastritis, El 6to bloque incluye genes con mayor frecuencia en úlcera duodenal pero ninguno de ellos estadísticamente significativo. Finalmente, en el último bloque se agruparon los genes con mayor frecuencia en cáncer gástrico siendo 3 de ellos los únicos con significancia estadística.

En las tablas 8 y 9 podemos observar los genes ya clasificados que se encontraron estadísticamente significativos en menor frecuencia y mayor frecuencia en una de las 3 enfermedades gastroduodenales incluyendo también los genes que tenían esa tendencia aunque su  $p$  no fuera significativa describiendo la función en la cual están involucrados así como, su localización.

Genes con menor frecuencia en úlcera duodenal				
Nombre del gen	Descripción	Proceso	Localización	Chi <sup>2</sup>
HP0713	Proteína hipotética	-	Fuera ZP*	p=0.06
NA/HP1426	Proteína hipotética	-	Fuera ZP	p=0.02
NA/HP1381	-	NA	Fuera ZP	p=0.03
NA/HP0425	-	NA	ZP1	p=0.06
<i>HP0424</i>	-	-	<i>ZP1</i>	<i>p=0.12</i>
<i>NA/HP1410</i>	-	-	<i>Fuera ZP</i>	<i>p=0.13</i>
<i>cag7</i>	<i>SST4</i>	<i>cag PAI</i>	<i>cag PAI</i>	<i>p=0.13</i>
Genes con menor frecuencia en cáncer gástrico				
Nombre del gen	Descripción	Proceso	Localización	Chi <sup>2</sup>
JHP0951	Integrasa/recombinasa		ZP2	p=0.02

\*ZP = Zona de plasticidad

**Tabla 8.** Genes de *H. pylori* presentes en menor frecuencia en enfermedad gastroduodenal. Únicamente hubo 4 genes estadísticamente significativos encontrados en menor frecuencia en úlcera duodenal, en cursiva gris se incluyen los genes cuya  $p$  se acercaba un poco al valor de significancia que se consideró en este estudio ( $p \leq 0.1$ ). No hubo ningún gen que se encontrara en menor frecuencia estadísticamente significativa en gastritis. Únicamente 2 genes se encuentran dentro de zonas de plasticidad.

Genes con mayor frecuencia en gastritis				
Nombre del gen	Descripción	Proceso	Localización	Chi <sup>2</sup>
NA/HP1404	Enzima restricción	Metabolismo DNA	Fuera ZP*	p=0.06
Genes con mayor frecuencia en úlcera duodenal				
Nombre del gen	Descripción	Proceso	Localización	Chi <sup>2</sup>
<i>JHP0950</i>	-	-	<i>ZP2</i>	<i>p=0.12</i>
Genes con mayor frecuencia en cáncer gástrico				
Nombre del gen	Descripción	Proceso	Localización	Chi <sup>2</sup>
NA/HP0674	-	NA	Fuera ZP	p=0.09
NA/HP1405	-	NA	Fuera ZP	p=0.08
NA/HP0967	<i>vapD</i>	Adaptación	Fuera ZP	p=0.06
<i>NA/JHP0960</i>	-	-	<i>ZP1</i>	<i>p=0.12</i>
<i>JHP0927/NA</i>	.	.	<i>ZP2</i>	<i>p=0.16</i>
<i>HP0025</i>	-	-	<i>Fuera ZP</i>	<i>P=0.15</i>

\*ZP= Zona de plasticidad

**Tabla 9.** Genes de *H. pylori* presentes en mayor frecuencia en enfermedad gastroduodenal. En esta tabla también se incluyen en cursiva gris los genes que tendían a estar en mayor frecuencia en enfermedad aunque no fuera significativa su *p*. En úlcera duodenal no hubo ningún gen que se encontrara en una mayor frecuencia. Todos los genes estadísticamente significativos se encontraron fuera de zonas de plasticidad.

### **6.3 Comparación de genes de *H. pylori* encontrados con mayor y menor frecuencia en cada una de las enfermedades gastroduodenales en comparación con los datos previamente publicados.**

En la tabla 10 y en las gráficas 2, 3, 4, se muestra un comparativo de los resultados que encontramos en nuestro estudio con respecto a los resultados de las frecuencias de los 30 genes que previamente fueron reportados en mayor y menor frecuencia en enfermedad gastroduodenal en población mexicana por Romo-González *et al*; 2009 y cuyo estudio fue realizado por medio de microarreglos a diferencia de nuestro estudio que se realizó con PCR.

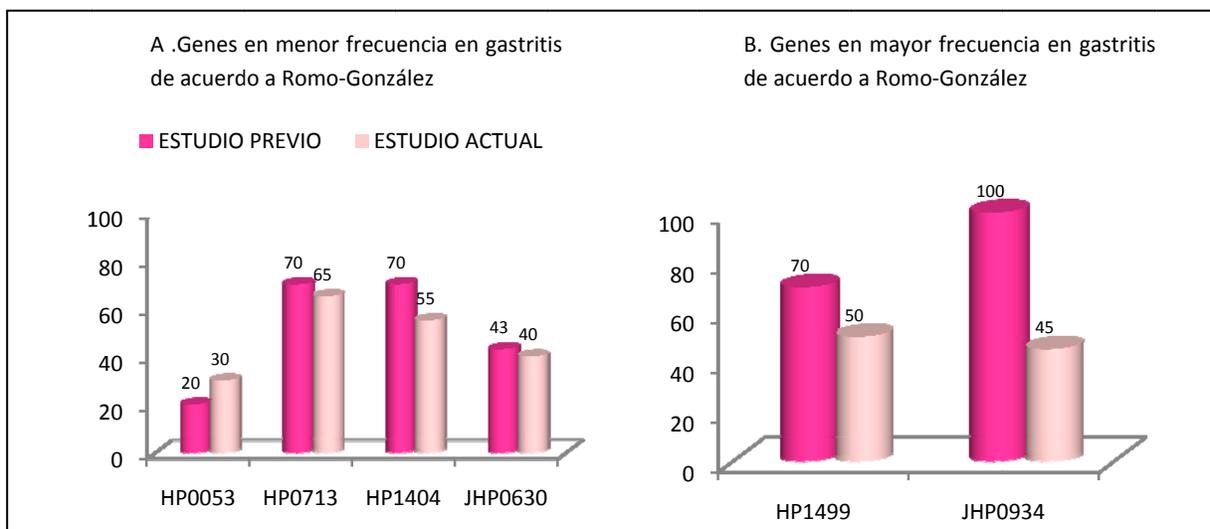
Como se puede observar en la tabla 10, no existe ningún gen que coincida en su frecuencia a enfermedad con los datos de Romo-González, ya que mientras un gen es reportado como ausente en cáncer gástrico, nosotros lo encontramos ausente pero en las tres enfermedades gastroduodenales; se observa también casos como el gen HP1404 que mientras nosotros lo encontramos en mayor frecuencia estadísticamente significativa en casos de gastritis, Romo-González lo reporta como un gen con menor frecuencia en aislados de gastritis. Otro tipo de discrepancias son las observadas, por ejemplo, en el gen HP0967, ya que en este estudio se reporta como un gen con mayor frecuencia en cáncer gástrico y Romo-González lo reporta como un gen con menor frecuencia pero en casos de gastritis. Llama la atención que, aunque están representados los genes que no tuvieron significancia estadística en estas tablas, sí se observa una tendencia de los genes JHP0950 (zona de plasticidad 2), JHP0927 (zona de plasticidad 2) y JHP0960 (zona de plasticidad 1) a presentarse con la misma asociación en úlcera duodenal y cáncer gástrico, respectivamente, a la asociación que publica el estudio previo, los cuales de haber tenido un valor de  $p$  estadísticamente en nuestro estudio, serían los únicos genes que podrían haber coincidido en su asociación a enfermedad en ambos estudios.

Frecuencia en enfermedad reportada por Romo-González (2009)		GEN	Frecuencia en enfermedad encontrada en este estudio	
	p			p
Ausente en cáncer gástrico	-	HP0940	Ausente en todas las enfermedades	-
Ausente en cáncer gástrico	-	HP0674	Más frecuente en cáncer gástrico	0.02
Menor frecuencia en gastritis	0.092	HP1404	Más frecuente en gastritis	0.06
Menor frecuencia en gastritis	0.057	JHP0630		0.34
<b>Menor frecuencia en gastritis</b>	0.099	<b>HP0053</b>		0.84
Menos frecuente en gastritis	0.029	HP0713	Menos frecuente en úlcera duodenal	0.03
Menos frecuente en úlcera duodenal	0.093	HP0967	Más frecuente en cáncer gástrico	0.02
Menos frecuente en úlcera duodenal	0.036	HP0025	<i>Más frecuente en cáncer gástrico</i>	<i>0.15</i>
Menos frecuente en úlcera duodenal	0.043	HP1472		0.50
Menos frecuente en cáncer gástrico	0.020	HP0424	<i>Más frecuente en cáncer gástrico</i>	<i>0.12</i>
<b>Menos frecuente en cáncer gástrico</b>	0.081	<b>HP0425</b>	Menos frecuente en úlcera duodenal	0.03
Menos frecuente en cáncer gástrico	0.024	HP0790		0.20
Menos frecuente en cáncer gástrico	0.060	HP0992		0.50
Menos frecuente en cáncer gástrico	0.081	HP1409		0.50
Menos frecuente en cáncer gástrico	0.081	HP1410	<i>Menos frecuente en úlcera duodenal</i>	<i>0.13</i>
Menos frecuente en cáncer gástrico	0.052	JHP0925		0.20
Menos frecuente en cáncer gástrico	0.008	HP1426	Menos frecuente en úlcera duodenal	0.02
Más frecuentes en gastritis	0.033	HP1499		0.50
Más frecuentes en gastritis	0.090	JHP0934		0.74
<b>Más frecuente en úlcera duodenal</b>	0.085	<b>HP1381</b>	<b>Menos frecuente en úlcera duodenal</b>	0.03
Más frecuente en úlcera duodenal	0.079	HP1405	Más frecuente en cáncer gástrico	0.08
<b>Más frecuente en úlcera duodenal</b>	0.074	<b><u>JHP0950</u></b>	<b><i>Más frecuente en úlcera duodenal</i></b>	<b><i>0.12</i></b>
Más frecuente en úlcera duodenal	0.037	JHP951	Menos frecuente en cáncer gástrico	0.02
Más frecuente en cáncer gástrico	0.041	JHP0616		0.47
<b>Más frecuente en cáncer gástrico</b>	0.059	<b><u>JHP0927</u></b>	<b><i>Más frecuente en cáncer gástrico</i></b>	<b><i>0.16</i></b>
<b>Más frecuente en cáncer gástrico</b>	0.068	<b><u>JHP0960</u></b>	<b><i>Más frecuente en cáncer gástrico</i></b>	<b><i>0.12</i></b>
Más frecuente en cáncer gástrico	0.076	JHP0961		0.2
Más frecuente en cáncer gástrico	0.09	<i>cag7</i>	<i>Menos frecuente en úlcera duodenal</i>	<i>0.13</i>
Más frecuente en cáncer gástrico	0.09	<i>cag10</i>		0.19
Más frecuente en cáncer gástrico	0.09	<i>cag23</i>		0.51

**Tabla 10.** Comparación de genes encontrados en menor y mayor frecuencia en enfermedad gastroduodenal con respecto a los datos publicados por Romo-González *et al*; 2009. En esta tabla podemos observar que ningún gen se encontró estadísticamente significativo, en menor o mayor frecuencia en la misma enfermedad gastroduodenal en ambos estudios. Los resultados fueron muy variados ya que genes que estuvieron reportados como más frecuentes en una enfermedad, nosotros los encontramos en la misma enfermedad pero con menor frecuencia (por ejemplo: HP1381); genes reportados con menor frecuencia en una enfermedad, nosotros los reportamos con menor frecuencia también, pero en distinta enfermedad (por ejemplo: HP0425) o genes previamente reportados con mayor o menor frecuencia en alguna enfermedad, en nuestro estudio no se encontró que tuvieran algún valor estadísticamente significativo (HP053) para poder clasificarlos. En cursiva y negritas se indican 3 genes que tenían cierta tendencia a coincidir en ambos estudios aunque estadísticamente no lo fueron.

### 6.3.1 Comparación de % de frecuencias encontradas en estudio previo (Romo-González) por microarreglos con % de frecuencias encontradas en este estudio por PCR

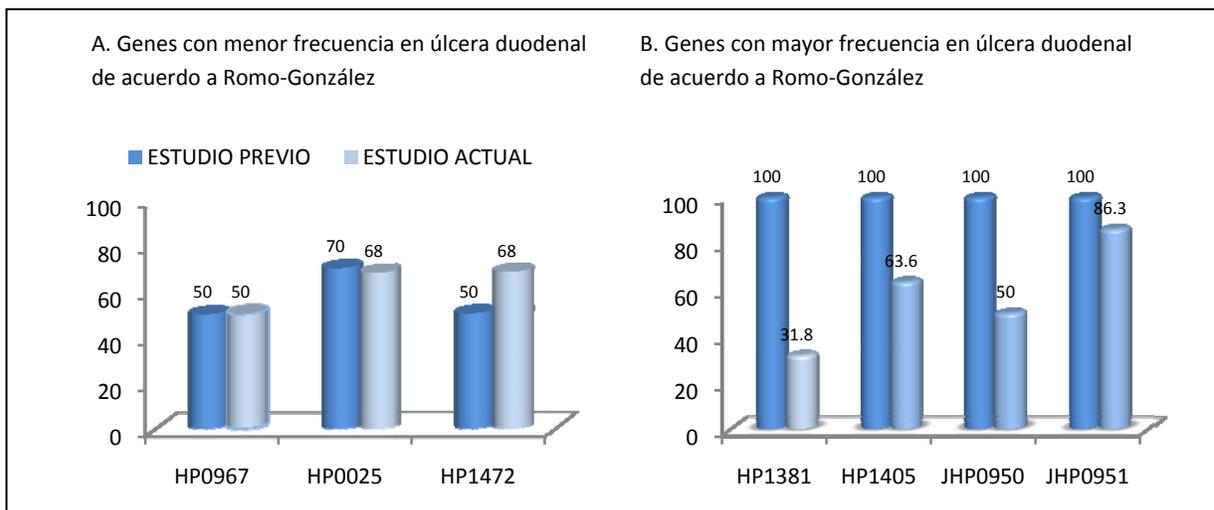
En la gráfica 2 se muestran las frecuencias encontradas (datos no publicados) por Romo-González *et al*; 2009 en sus 10 muestras de gastritis, en los genes que publicó, se encontraban en una menor frecuencia en esta enfermedad gastroduodenal (A) y en mayor frecuencia (B), en comparación con las que frecuencias que nosotros encontramos en esos mismos genes y en la misma enfermedad pero en nuestros 20 pacientes de ese grupo. Se observa que en los genes que Romo-González encuentra en menor frecuencia en gastritis, tienen una frecuencia muy similar a la que nosotros encontramos a pesar de haber sido determinadas por diferentes metodologías (Microarreglos vs PCR), lo cual no se observa en los genes que reporta que están presentes en una mayor frecuencia en gastritis donde la variación es mayor.



**Gráfica 2.** Comparación de frecuencias encontradas en genes con menor y mayor frecuencia en gastritis, de acuerdo a Romo-González con respecto a nuestros resultados, en muestras de gastritis. Se observa que las frecuencias obtenidas en los genes previamente encontrados en úlcera duodenal son muy similares con respecto a nuestros datos, variando únicamente el JHP0934

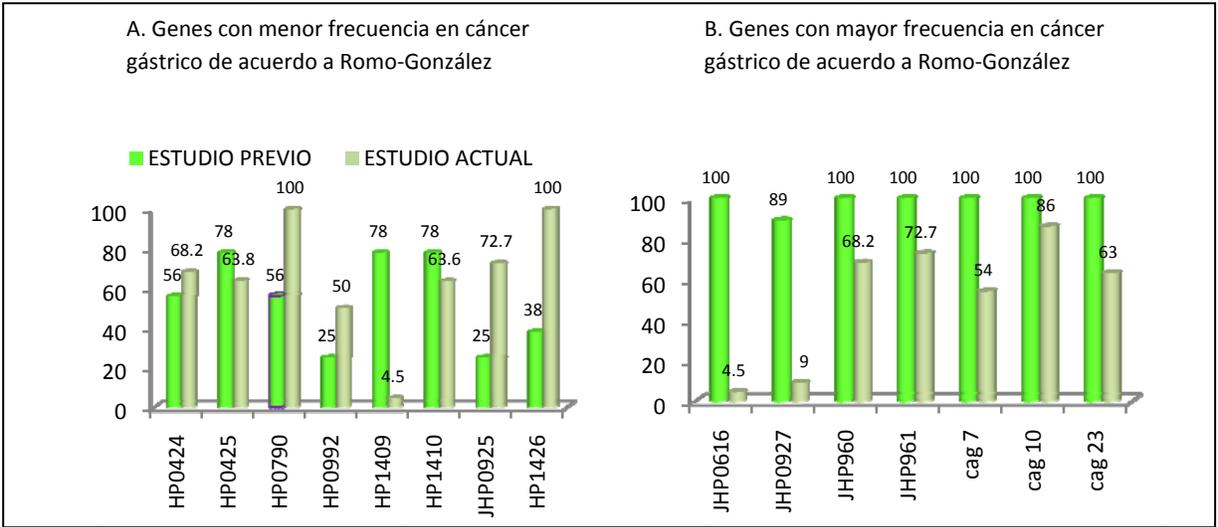
En la gráfica 3 se muestra la frecuencia obtenida por microarreglos en sus 10 muestras de úlcera duodenal en los genes que encontró con menor (A) y mayor frecuencia (B) en la

misma enfermedad, en comparación con las frecuencias obtenidas por nosotros en los 20 pacientes con úlcera duodenal incluidos en nuestro estudio. Se observa que se presenta la misma situación que en el caso presentado en la gráfica 2, es decir, los genes que reporta con menor frecuencia tienen casi la misma frecuencia que nosotros reportamos, lo cual no se observa en los genes que reporta con mayor frecuencia en úlcera duodenal en donde, en la mayoría de esos genes no hay similitud.



**Gráfica 3.** Comparación de frecuencias encontradas en genes con menor y mayor frecuencia en úlcera duodenal, de acuerdo a Romo-González con respecto a nuestros resultados, en muestras de úlcera duodenal. En la parte A de la gráfica se observan frecuencias muy similares en ambos estudios pero en la parte B de la gráfica no hay similitud en los resultados, únicamente el gen JHP0951 es el que presenta un valor similar.

En la gráfica 4 se muestran los resultados que se obtuvieron en 9 muestras de cáncer gástrico en el estudio previo en comparación con los resultados obtenidos en los 20 pacientes con cáncer gástrico incluidos en nuestro estudio. Se observa que en los genes que Romo-González encontró con menor frecuencia en cáncer gástrico, algunos de ellos sí coinciden en el valor de frecuencia obtenido en este estudio pero también hay genes cuyo valor está muy diferente, situación que también se presentó en los genes que reporta con mayor asociación a enfermedad.



**Gráfica 4.** Comparación de frecuencias encontradas en genes con menor y mayor frecuencia en cáncer gástrico, de acuerdo a Romo-González con respecto a nuestros resultados, en muestras de cáncer gástrico. En ambas partes de la gráfica se observa la gran variabilidad en los resultados siendo los genes HP1409, JHP0616 y JHP0927 los ejemplos más característicos. Únicamente el gen cag10 presenta mayor similitud.

### 6.3.2 Comparación de frecuencias encontradas en 13 genes en estudio previo (Romo-González) por PCR con frecuencias encontradas en este estudio por PCR

Romo-González para validar sus resultados obtenidos por microarreglos, realizó PCR de únicamente 13 genes, por lo que nuestro siguiente paso fue ahora comparar los resultados que se obtuvieron en ese estudio con los que nosotros obtuvimos en esos mismos genes, de tal manera que ahora la comparación de resultados unificaba las metodologías en ambos estudios (PCR).

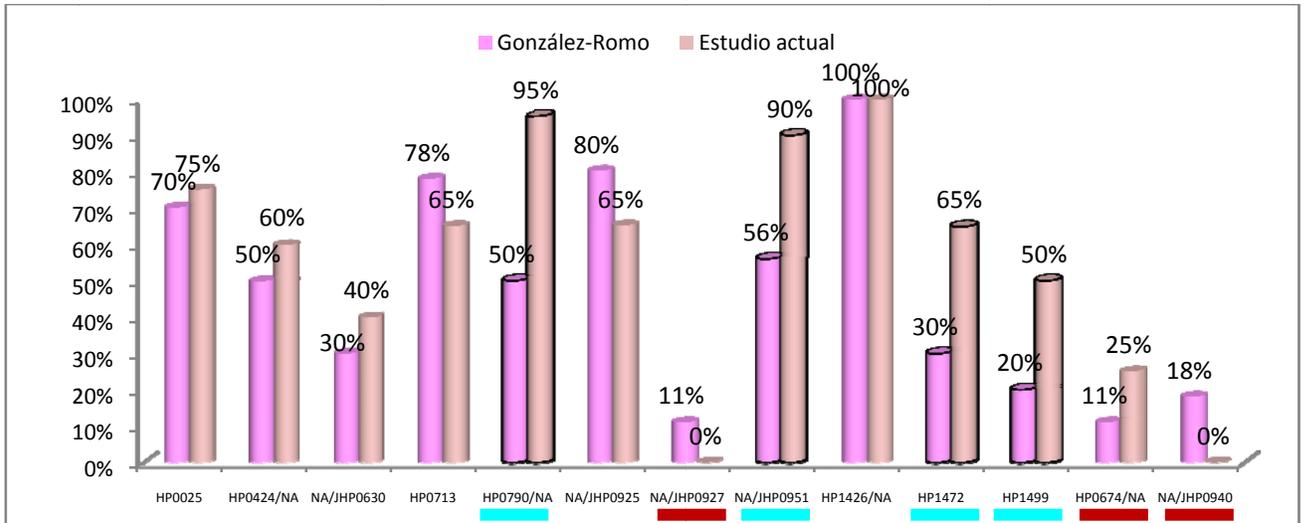
En tabla 11 se muestran los % de frecuencia en que se obtuvieron en cada una de las enfermedades gastroduodenales de esos 13 genes, se muestra también el número de muestras en los cuales se determinó la presencia o ausencia de dichos genes, ya que en el reporte previo no siempre fue el mismo número de muestras evaluadas por PCR.

GEN	GASTRITIS		ÚLCERA DUODENAL		CÁNCER GÁSTRICO	
	*Romo-González n/N (%)	Estudio actual n/N (%)	*Romo-González n/N (%)	Estudio actual n/N (%)	*Romo-González n/N (%)	Estudio actual n/N (%)
HP0025	7/10 (70)	15/20 (75)	6/10 (60)	15/22 (68)	9/10 (90)	19/22 (86.3)
HP0424/NA	5/10 (50)	12/20 (60)	5/10 (50)	10/22 (45.5)	6/10 (60)	15/22 (68.2)
NA/JHP0630	3/10 (30)	8/20 (40)	2/10 (20)	6/22 (27.3)	3/10 (30)	9/22 (40.9)
HP0713	7/9 (77.8)	13/20 (65)	7/10 (77.8)	8/22 (36.4)	10/10 (100)	15/22 (68.2)
HP00790/NA	5/10 (50)	19/20 (95)	9/10 (9)	22/22 (100)	10/10 (100)	22/22 (100)
NA/JHP0925	8/10 (80)	13/20 (65)	3/9 (33.3)	12/22 (54.4)	5/10 (50)	16/22 (72.7)
NA/JHP0927	1/9 (11.1)	0/20 (0)	0/9 (0)	1/22 (4.5)	4/10 (40)	9/22 (9)
NA/JHP0951	5/9 (55.6)	18/20 (90)	7/9 (77.8)	1/22 (86.3)	7/9 (77.8)	13/22 (59)
HP1426/NA	10/10 (100)	20/20 (100)	8/10 (80)	17/22 (77.3)	6/10 (60)	22/22 (100)
HP1472	3/10 (30)	13/20 (65)	2/10 (20)	15/22 (68.2)	3/10 (30)	13/22 (59)
HP1499	2/10 (20)	10/20 (50)	4/10 (40)	10/22 (45.5)	3/10 (30)	9/22 (40.9)
HP0674/NA	1/9 (11.1)	5/20 (25)	0/10 (0)	5/22 (22.7)	1/10 (10)	11/22 (50)
NA/JHP0940	2/11 (18.2)	0/20 (0)	3/12 (25)	0/22 (0)	0/10 (0)	0/22 (0)

\*Resultados no publicados

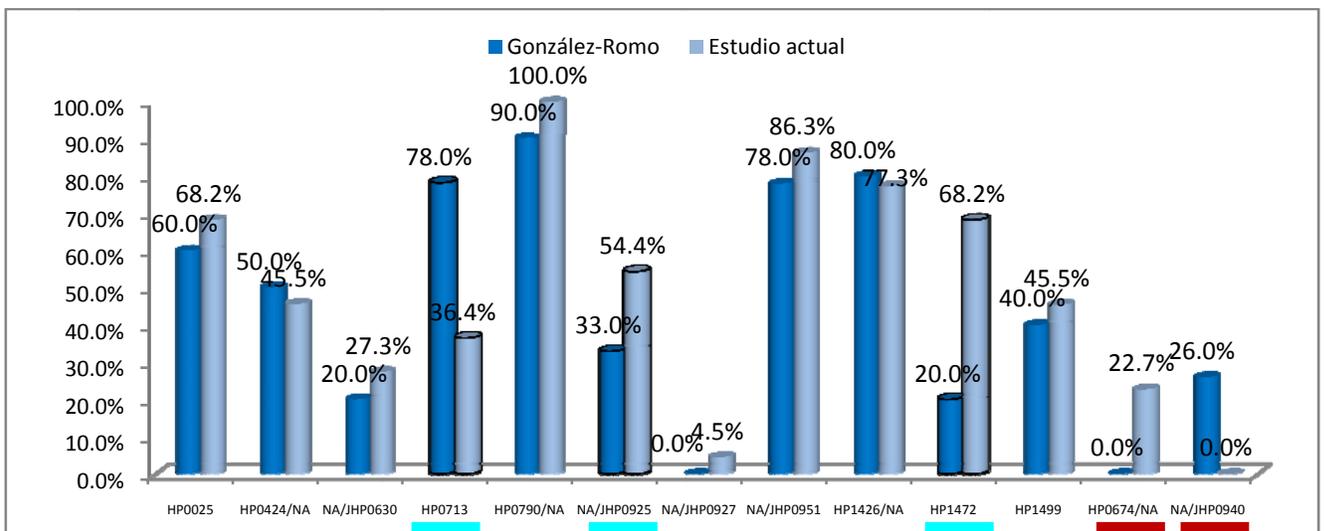
**Tabla 11.** Frecuencias encontradas por PCR en 13 genes reportadas por Romo-González y obtenidas en este estudio. En esta tabla sobresale el hecho de que no siempre fue el mismo número de muestras analizadas en el estudio previo ya que en algunos genes, para la misma enfermedad, variaba de 10 a 12 muestras (por ejemplo, el gen JHP0940), mientras que en nuestro estudio siempre se mantuvo el mismo número de muestras.

En la gráfica 5 se muestran las frecuencias de los 13 genes ya mencionados, encontrados en el estudio previo y en el actual, en muestras de gastritis. Llama la atención que en la mayoría de los genes hay una gran similitud en los valores obtenidos llegando incluso a ser del 100% (HP1426), y aunque en otros casos no hay tanta igualdad sí se observa la tendencia de los genes a estar presentes en una menor frecuencia (HP0927, HP0674 y JHP0940); también hay genes que presentaron frecuencias contrastantes (HP0790, JHP0951, HP1472 y HP1499).



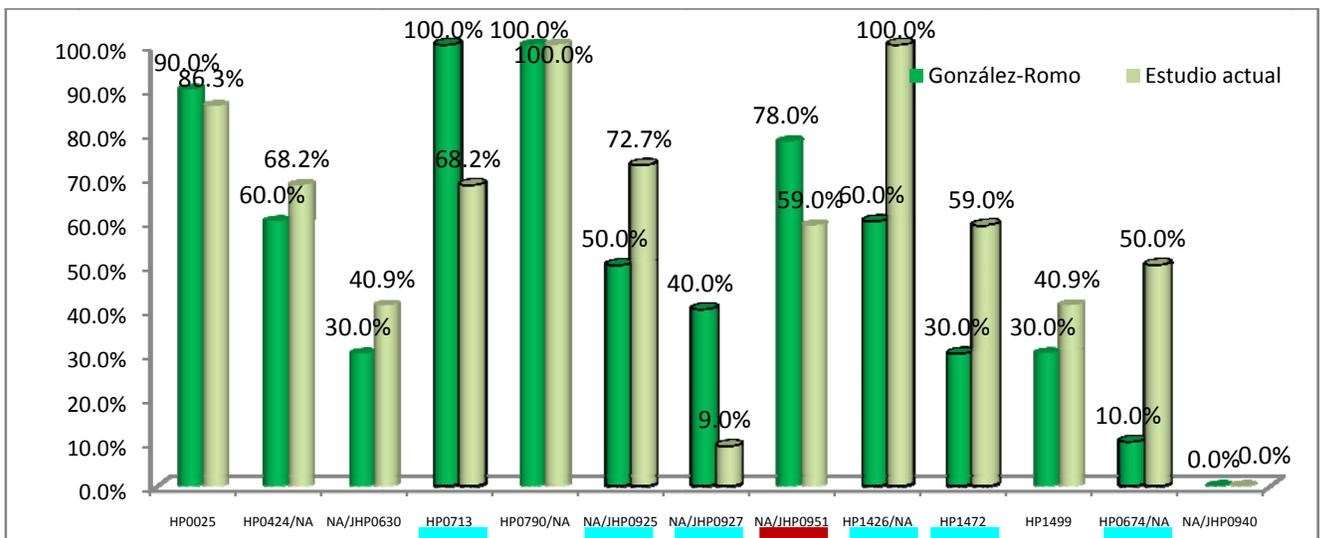
**Gráfica 5.** Frecuencias obtenidas en 13 genes por Romo-González y en el presente estudio en muestras de gastritis. En su mayoría se observa la misma frecuencia y en algunos casos no es igual el valor encontrado pero se puede observar la tendencia que existe del gen a estar en una menor frecuencia, estos genes están subrayados en rojo. Los genes cuyo resultado fue muy discrepante están marcados en azul.

En la gráfica 6, mostramos los resultados obtenidos pero ahora en muestras de úlcera duodenal. De nuevo el gen HP1472 muestra discrepancia, mientras que el HP0674 y JHP0940 repiten la tendencia a estar en menor frecuencia que se presentó en la gráfica anterior.



**Gráfica 6.** Frecuencias obtenidas en 13 genes por Romo-González y en el presente estudio en muestras de úlcera duodenal. Los genes subrayados en azul son los de diferente frecuencia mientras que los subrayados en rojo son los genes que tienen la misma tendencia a encontrarse en menor frecuencia. En esta enfermedad se observa que hay mayor número de genes cuyo resultado fue muy similar.

En la gráfica 7 mostramos los resultados obtenidos para muestras de cáncer gástrico. Encontramos que únicamente 6 genes presentaron resultados muy similares e incluso iguales para los genes HP0790 y JHP0940. El gen HP0713, JHP0925 y HP1472 mantienen la misma discrepancia observada en la gráfica anterior de presentarse en muy diferentes frecuencias. Solamente el gen JHP0925, a pesar de que no presenta la misma frecuencia en ambos estudios, es el único al cual se le observa una tendencia a presentarse en mayor frecuencia.



**Gráfica 7.** Frecuencias obtenidas en 13 genes por Romo-González y en el presente estudio en muestras de cáncer gástrico. Únicamente el gen JHP0951 fue quien presentó frecuencia diferente pero con tendencia a estar en mayor frecuencia. Hubo mayor número de genes con resultados muy contrastantes (HP0713, JHP0925, JHP0927, HP1426, HP1272 y HP0674).

#### **6.4 FRECUENCIA DE GENES DE *cag* PAI Y GENES ASOCIADOS A ENFERMEDAD DETERMINADOS POR MICROARREGLOS**

En la tabla 12 y 13 se encuentran los resultados obtenidos en las 15 muestras evaluadas en ambos microarreglos para la colección de los 54 genes. En general, sin separar por enfermedad, notamos que hay diferencias importantes entre la presencia-ausencia de los genes estudiados, entre microarreglos con sondas de productos de PCR y microarreglos con sondas de oligos (40/54 genes). Para su análisis se separaron en 2 grupos: genes asociados a enfermedad y genes de *cag* PAI.

En las gráficas 8 y 9 observamos las diferencias que hubo entre las frecuencias de mismos genes pero determinados en los diferentes microarreglos (oligos y productos de PCR)

Se observó que las frecuencias de los genes de obtenidos en los microarreglos de los productos de PCR son muy diferentes a los obtenidos en los microarreglos con sondas de oligos ya que en estos últimos, en las 15 clonas evaluadas la isla de patogenicidad tiende a estar presentes casi en todos los casos, siempre presente e intacta o incompleta pero nunca ausente. También es importante mencionar que los genes *virB11*, *cag21*, *cag23* y *cag24* se encontraron siempre ausentes en el microarreglo con sondas de productos de PCR y siempre presentes en el microarreglo con sondas de oligos.

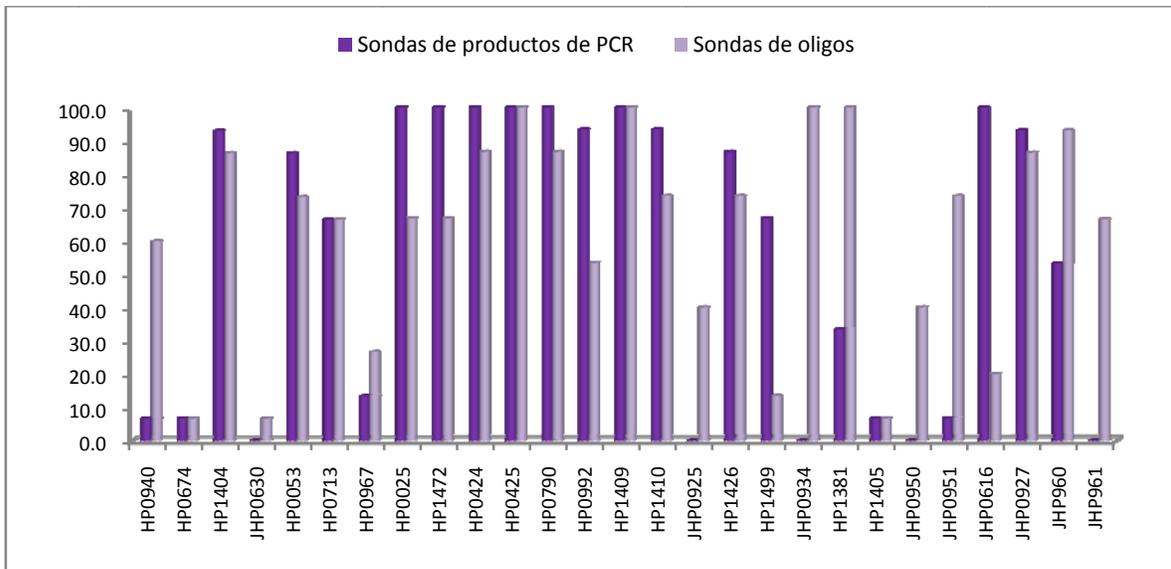
Con respecto a las frecuencias de los genes asociados a enfermedad se encontró que también había una gran variabilidad en ambos microarreglos ya que por ejemplo el gen JHP0934 nunca se determinó por el microarreglo de sondas de productos de PCR pero siempre estuvo presente en el microarreglo de sondas de oligos, o sucedía lo contrario, como el caso del gen HP1404 y JHP0616.

GEN	GASTRITIS N=5		ÚLCERA DUODENAL N=5		CÁNCER GÁSTRICO N=5		TOTAL N=15 (%)	
	Microarreglo Productos de PCR	Microarreglo Oligos	Microarreglo Productos de PCR	Microarreglo Oligos	Microarreglo Productos de PCR	Microarreglo Oligos	Microarreglo Productos de PCR	Microarreglos Oligos
<b>JHP0940/NA</b>	0	4	1	2	0	3	1 (6.7)	9 (60)
NA/HP0674	0	0	1	0	0	1	1 (6.7)	1 (6.7)
NA/HP1404	5	4	5	5	4	4	14 (93.3)	13 (86.7)
JHP0630/NA	0	0	0	0	0	1	0	1 (6.7)
NA/HP0053	3	5	5	3	5	3	13 (86.7)	11 (73.3)
HP0713	3	4	3	2	4	4	10 (66.7)	10 (66.7)
NA/HP0967	0	1	1	2	1	1	2 (13.3)	4 (26.7)
<b>HP0025</b>	5	5	5	4	5	1	15 (100)	10 (66.7)
<b>HP1472</b>	5	3	5	4	5	3	15 (100)	10 (66.7)
NA/HP0424	5	5	5	4	5	4	15 (100)	13 (86.7)
NA/HP0425	5	5	5	5	5	5	15 (100)	15 (100)
NA/HP0790	5	5	5	5	5	3	15 (100)	13 (86.7)
<b>NA/HP0992</b>	5	2	5	4	4	2	14 (93.3)	8 (53.3)
HP1409	5	5	5	5	5	5	15 (100)	15 (100)
HP1410	5	5	4	3	5	3	14 (93.3)	11 (73.3)
<b>JHP0925/NA</b>	0	3	0	2	0	1	0	6 (40)
NA/HP1426	5	4	3	3	5	4	13 (86.7)	11 (73.3)
HP1499	4	1	2	0	4	1	10	2 (13.3)
<b>JHP0934/NA</b>	0	5	0	5	0	5	0	15 (100)
<b>NA/HP1381</b>	2	5	1	5	2	5	5	15 (100)
NA/HP01405	0	0	0	0	1	1	1 (6.7)	1 (6.7)
<b>JHP0950/NA</b>	0	4	0	1	0	1	0	6 (40)
<b>JHP0951/NA</b>	0	5	0	3	1	3	1 (6.7)	11 (73.3)
<b>JHP0616/NA</b>	5	0	5	2	5	1	15 (100)	3 (20)
JHP0927/NA	5	5	4	4	5	4	14 (93.3)	13 (86.7)
<b>JHP0960/NA</b>	3	5	2	5	3	4	8 (53.3)	14 (93.3)
<b>JHP0961/NA</b>	0	4	0	2	0	4	0	10 (66.7)

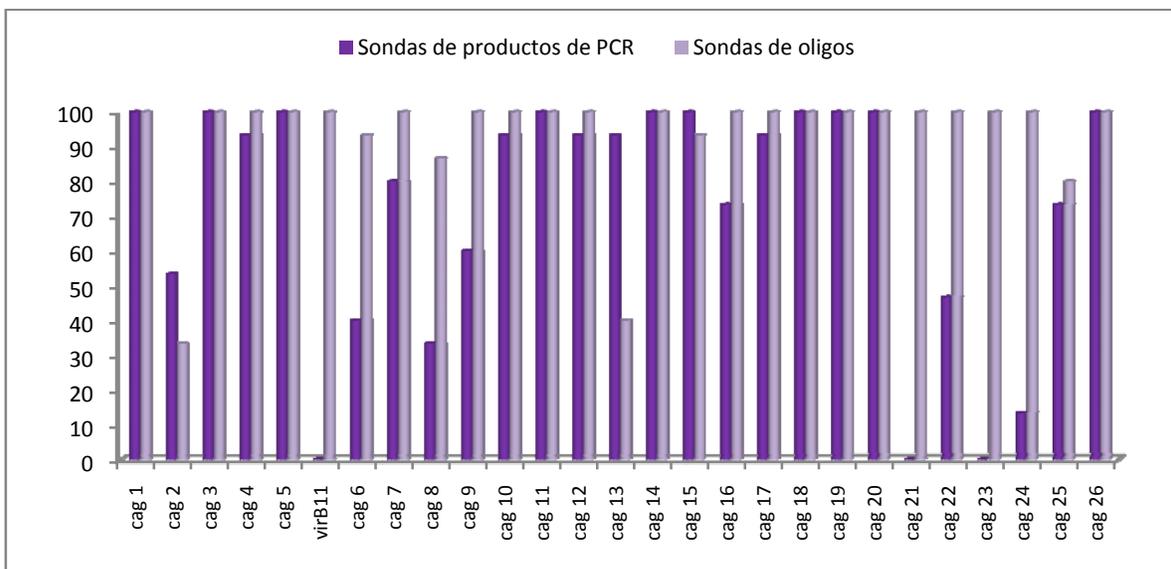
**Tabla 12.** Frecuencia de genes asociados a enfermedad, obtenida por microarreglos con sondas de oligos y con microarreglos con sondas de productos de PCR en 15 muestras. En negritas se observan los genes que tuvieron resultados contradictorios, mientras que el resto de los genes presentó similitud o igualdad en sus frecuencias.

GEN	GASTRITIS N=5		ÚLCERA DUODENAL N=5		CÁNCER GÁSTRICO N=5		TOTAL N=15 (%)	
	Microarreglo Productos de PCR	Microarreglo Oligos						
<i>cag1</i>	5	5	5	5	5	5	15 (100)	15 (100)
<i>cag2</i>	3	2	2	1	3	2	8 (53.3)	5 (33.3)
<i>cag3</i>	5	5	5	5	5	5	15 (100)	15 (100)
<i>cag4</i>	5	5	4	5	5	5	14 (93.3)	15 (100)
<i>cag5</i>	5	5	5	5	5	5	15 (100)	15 (100)
<b><i>virB11</i></b>	0	5	0	5	0	5	0	15 (100)
<b><i>cag6</i></b>	3	5	1	4	2	5	6 (40)	14 (93.3)
<i>cag7</i>	5	5	2	5	5	5	12 (80)	15 (100)
<b><i>cag8</i></b>	3	5	0	4	2	4	5 (33.3)	13 (86.7)
<i>cag9</i>	5	5	1	5	3	5	9 (60)	15 (100)
<i>cag10</i>	5	5	4	5	5	5	14 (93.3)	15 (100)
<i>cag11</i>	5	5	5	5	5	5	15 (100)	15 (100)
<i>cag12</i>	5	5	3	5	5	5	13 (86.7)	15 (100)
<b><i>cag13</i></b>	5	2	4	1	5	3	14 (93.3)	6 (40)
<i>cag14</i>	5	5	5	5	5	5	15 (100)	15 (100)
<i>cag15</i>	5	5	5	4	5	5	15 (100)	14 (93.3)
<i>cag16</i>	5	5	3	5	3	5	11 (73.3)	15 (100)
<i>cag17</i>	5	5	4	5	5	5	14 (93.3)	15 (100)
<i>cag18</i>	5	5	5	5	5	5	15 (100)	15 (100)
<i>cag19</i>	5	5	5	5	5	5	14 (93.3)	15 (100)
<i>cag20</i>	5	5	5	5	5	5	15 (100)	15 (100)
<b><i>cag21</i></b>	0	5	0	5	0	5	0	15 (100)
<b><i>cag22</i></b>	3	5	1	5	3	5	7 (46.7)	15 (100)
<b><i>cag23</i></b>	0	5	0	5	0	5	0	15 (100)
<i>cag24</i>	1	5	0	5	1	5	2 (13.3)	15 (100)
<i>cag25</i>	4	4	5	4	2	4	11 (73.3)	12 (80)
<i>cag26</i>	5	5	5	5	5	5	15 (100)	15 (100)

**Tabla 13.** Frecuencias de genes de *cag PAI* obtenidas por microarreglos con sondas de oligos y con microarreglos con sondas de productos de PCR en 15 muestras. En negritas se observan los genes que tuvieron resultados diferentes mientras que el resto de los genes presentó similitud o igualdad en sus frecuencias.



**Gráfica 8.** Comparación de genes asociados a enfermedad determinados por microarreglos con sondas de oligos y con microarreglos con sondas de productos de PCR en 15 muestras. Se observa la gran variabilidad en los resultados, siendo muy notoria la discrepancia mostrada por el gen JHP0934, JHP0951 y JHP0961. Los genes HP0425, HP1409 y HP1405 mostraron la misma frecuencia en ambos microarreglos.



**Gráfica 9.** Comparación de genes de cag PAI determinados por microarreglos con sondas de oligos y con microarreglos con sondas de productos de PCR en 15 muestras. Se observa que el gen virB11, cag21 y cag23 se encontraron siempre ausentes en un microarreglo pero siempre presentes en el otro aunque también hubo genes como el cag1 o cag3 que estuvieron siempre presentes en ambos microarreglos.

## 6.5. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LOS MICROARREGLOS

Los resultados de los microarreglos se validaron mediante PCR. Considerando que de las 64 clonas a las cuales se les determinó la presencia o ausencia de 54 genes por medio de PCR, se seleccionaron 10 de ellas para evaluarlas por microarreglos, de tal manera que se tenían resultados de las frecuencias de los 54 genes por PCR, por microarreglos de productos de PCR y por microarreglos de oligos (anexo 5) y con estos datos se procedió a calcular la sensibilidad y especificidad, así como, el valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del método de microarreglos. En el anexo 6 se muestra un ejemplo de estos cálculos realizados (resultados de la clona 2006-0781).

Este procedimiento se realizó únicamente para 10 clonas evaluadas por microarreglos obteniendo los siguientes resultados generales mostrados en la tabla 14.

	Microarreglos Productos de PCR	Microarreglos Oligos
Sensibilidad (%)	63.9	75.2
Especificidad (%)	53.2	46.7
Valor predictivo positivo (VPP) (%)	77.4	79.8
Valor predictivo negativo (VPN) (%)	37.1	53.7

**Tabla 14.** Comparación de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los microarreglos evaluados en este estudio. Se observa que hubo mayor sensibilidad pero poca especificidad en los microarreglos que tenían sondas de oligos a diferencia de los microarreglos con sondas de productos de PCR que mostraron menor sensibilidad pero mayor especificidad, aunque con sondas de oligos, tanto el VPP y el VPN es mayor.

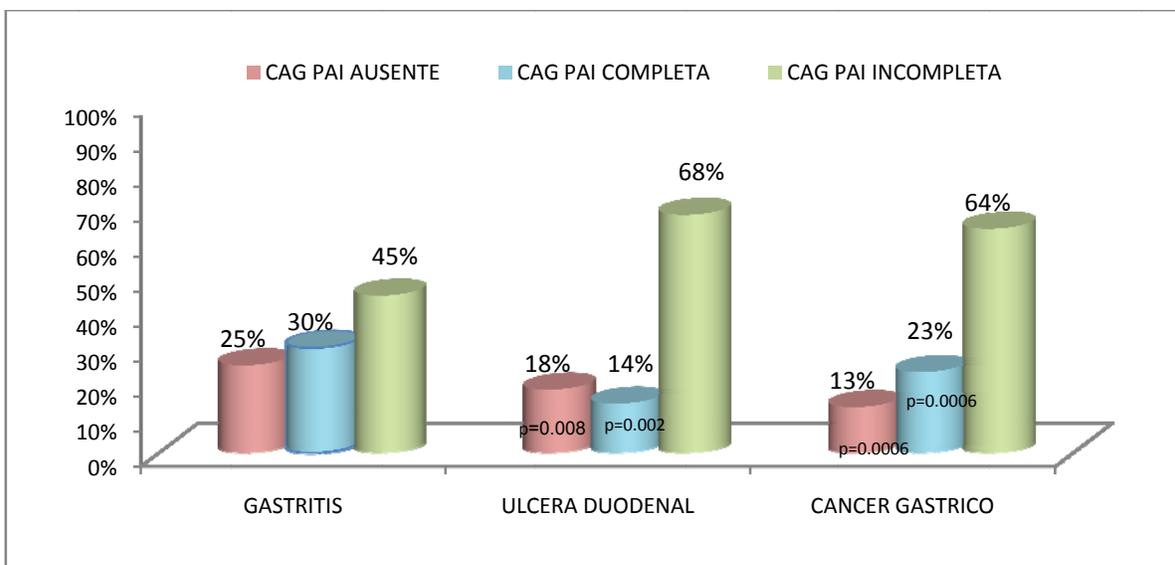
## 6.6 FRECUENCIA DE GENES E INTEGRIDAD DE *cag* PAI

Los resultados obtenidos con los genes de la *cag* PAI, se dividieron en tres posibilidades: ausente (no había isla), incompleta (faltaba al menos un gen) y completa (contenía los 27 genes) (Tabla 15).

<i>cag</i> PAI	GASTRITIS No (%)	ÚLCERA DUODENAL No (%)	CÁNCER GÁSTRICO No (%)	TOTAL No (%)
Ausente	<b>5(25)</b>	4 (18)	3 (13)	12 (19)
Completa	6 (30)	3 (14)	5 (23)	14 (22)
Incompleta	9 (45)	15(68)	14(64)	<b>38 (59)</b>

**Tabla 15.** Frecuencia de *cag* PAI ausente, completa e incompleta en 64 aislados de *H. pylori* determinada por PCR. El mayor % encontrado corresponde al genotipo de una isla incompleta. El mayor % de una isla ausente se encontró en gastritis.

La ausencia de *cag* PAI fue más frecuente en clones de aislados de gastritis (25%), seguida por clones de aislados de úlcera duodenal (18%) y cáncer gástrico (13%), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. La mayoría de las clones tuvieron *cag* PAI incompleta ya que al menos 1 de los genes de los 27 que se determinaron estaba ausente, observándose una diferencia estadísticamente significativa si se comparaba con la presencia de *cag* PAI ausente y completa en el caso de úlcera duodenal y cáncer gástrico (Gráfica 10). Las clones de los aislados de úlcera duodenal fueron los que mostraron la frecuencia más alta de *cag* PAI incompleta en el 68% de las clones. La presencia de la *cag* PAI completa fue más frecuente en las clones de los aislados de gastritis, seguida por cáncer gástrico y úlcera duodenal en el 30%, 23%, 14% de las clones, respectivamente.



**Gráfica 10.** Frecuencia de la integridad de *cag PAI* en enfermedad gastroduodenal determinada por PCR. Se observa que el genotipo más común en todos los casos fue el de una isla incompleta en comparación a una isla ausente, siendo mayor la frecuencia observada en úlcera duodenal,

Cuando la isla *cag PAI* estuvo incompleta, es decir, faltaba al menos 1 gen de los 27 determinados, los resultados mostraron que la mayoría de las cepas presentaron variabilidad en la presencia de los 27 genes (tabla 16, gráfica 11). Hay diferencias importantes en la presencia y ausencia de genes entre los tres padecimientos. En gastritis, los genes menos frecuentes fueron *cagε* (*cag2*), *cagY* (*cag7*) y *cagH* (*cag20*), presentes en un 66.7, 44.4 y 55.6%, respectivamente. En úlcera duodenal, encontramos que los genes de la isla con menor frecuencia fueron *cagε* (*cag2*), *cagβ* (*cag5*), *cagY* (*cag7*), *cagW* (*cag9*), *cagU* (*cag11*) y *cagL* (*cag18*) en el 46.7, 80, 33.3, 66.7, 80 y 46.7%, respectivamente. Para cáncer gástrico los genes menos frecuentes fueron *cagε* (*cag2*) en el 57.1%, así como, *cagY* (*cag7*) en el 50, *cagL* (*cag18*) en el 71.4%, *cagI* (*cag19*) en el 78.6% y *cagE* (*cag23*) en el 64.3%.

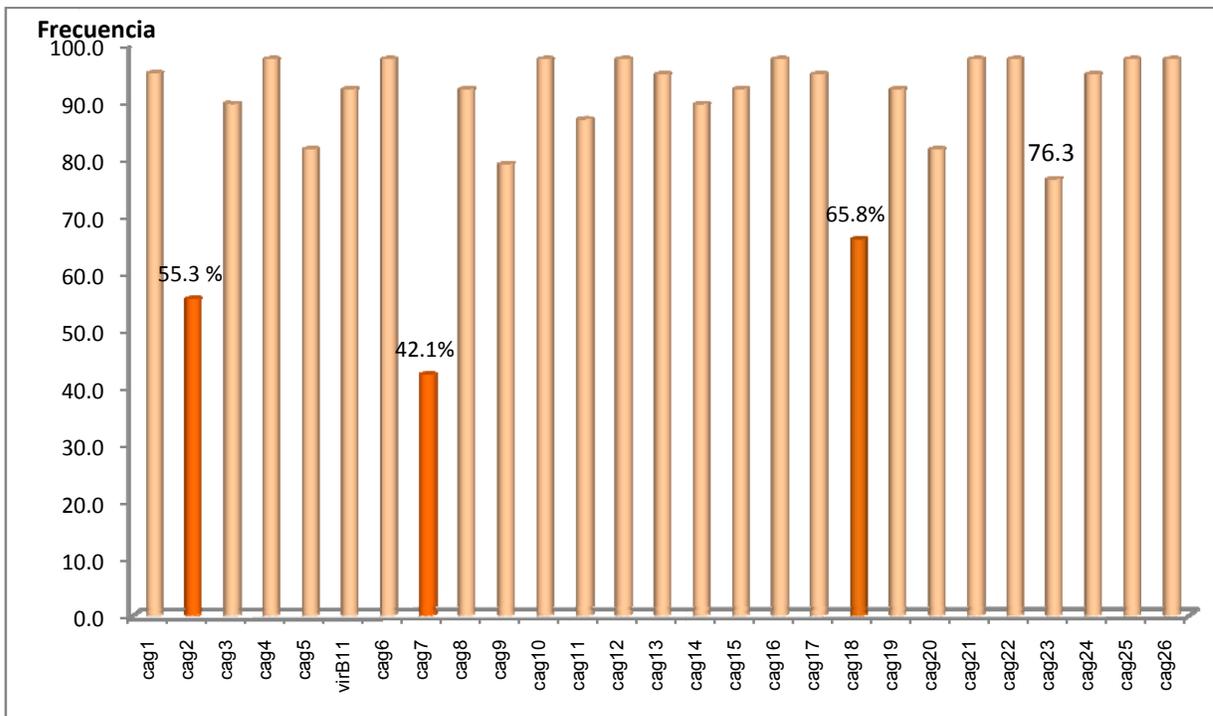
No hubo algún gen que siempre estuviera presente en todas las clonas cuando la isla estaba incompleta ni tampoco un gen que siempre estuviera ausente cuando la isla

estaba incompleta, pero en todos los aislados independientemente del origen clínico que tuvieron, siempre estaban en menor frecuencia los genes *cagE* (*cag2*), *cagY* (*cag7*) y *cagL* (*cag18*) cuando la isla estaba incompleta.

En el caso de *cagA*, un gen muy relacionado a la patogénesis de *H. pylori*, en este estudio se identificó en casi el 97.4% (37/38) de las clonas, con variaciones no significativas entre los aislados de gastritis (100%), úlcera duodenal (100%) o cáncer gástrico (92.9%).

GENES DE <i>cag</i> PAI		GASTRITIS N=9 (%)	ÚLCERA DUODENAL N=15 (%)	CÁNCER GÁSTRICO N=14 (%)	TOTAL N= 38 %	GENES DE <i>cag</i> PAI		GASTRITIS N=9(%)	ÚLCERA DUODENAL N=15(%)	CÁNCER GÁSTRICO N=14N (%)	TOTAL N=38 (%)
<i>cag</i> ζ	<i>cag1</i>	8 (88.9)	15 (100)	13 (92.9)	36 (74.7)	<i>cag</i> S	<i>cag13</i>	8 (88.9)	15 (100)	13 (92.9)	35 (92.1)
<b><i>cag</i> ε</b>	<b><i>cag2</i></b>	<b>6 (66.7)</b>	<b>7 (46.7)</b>	<b>8 (57.1)</b>	<b>21 (55.3)</b>	<i>cag</i> Q	<i>cag14</i>	9 (100)	13 (86.7)	12 (85.7)	34 (89.5)
<i>cag</i> δ	<i>cag3</i>	7 (77.8)	15 (100)	12 (85.7)	34 (89.5)	<i>cag</i> P	<i>cag15</i>	8 (88.9)	14 (93.3)	13 (92.9)	35 (92.1)
<i>cag</i> γ	<i>cag4</i>	9 (100)	15 (100)	13 (92.9)	37 (97.4)	<i>cag</i> M	<i>cag16</i>	9 (100)	15 (100)	13 (92.9)	37 (97.4)
<i>cag</i> β	<i>cag5</i>	7 (77.8)	12 (80)	12 (85.7)	31 (81.6)	<i>cag</i> N	<i>cag17</i>	9 (100)	14 (93.3)	13 (92.9)	36 (74.7)
<i>cag</i> α	<i>virB11</i>	9 (100)	14 (93.3)	12 (85.7)	35 (92.1)	<b><i>cag</i> L</b>	<b><i>cag18</i></b>	<b>8 (88.9)</b>	<b>7 (46.7)</b>	<b>10 (71.4)</b>	<b>25 (65.8)</b>
<i>cag</i> Z	<i>ca 6</i>	9 (100)	15 (100)	13 (92.9)	37 (97.4)	<i>cag</i> I	<i>cag19</i>	9 (100)	15 (100)	11 (78.4)	35 (92.1)
<b><i>cag</i> Y</b>	<b><i>cag7</i></b>	<b>4 (44.4)</b>	<b>5 (33.3)</b>	<b>7 (50)</b>	<b>16 (42.1)</b>	<i>cag</i> H	<i>cag20</i>	5 (55.6)	14 (93.3)	12 (85.7)	31 (81.6)
<i>cag</i> X	<i>cag8</i>	9 (100)	14 (93.3)	12 (85.7)	35 (92.1)	<i>cag</i> G	<i>cag21</i>	9 (100)	15 (100)	13 (92.9)	37 (97.4)
<i>cag</i> W	<i>cag9</i>	8 (88.9)	10 (66.7)	12 (85.7)	30 (78.9)	<i>cag</i> F	<i>cag22</i>	9 (100)	15 (100)	13 (92.9)	37 (97.4)
<i>cag</i> V	<i>cag10</i>	8 (88.9)	15 (100)	14 (100)	37 (97.4)	<b><i>cag</i> E</b>	<b><i>cag23</i></b>	<b>7 (77.8)</b>	<b>13 (86.7)</b>	<b>9 (64.3)</b>	<b>29 (76.3)</b>
<i>cag</i> U	<i>cag11</i>	9 (100)	12 (80)	12 (85.7)	33 (86.8)	<i>cag</i> D	<i>cag24</i>	9 (100)	14 (93.3)	13 (92.9)	36 (74.7)
<i>cag</i> T	<i>cag12</i>	9 (100)	15 (100)	13 (92.9)	37 (97.4)	<i>cag</i> C	<i>cag25</i>	9 (100)	14 (93.3)	14 (100)	37 (97.4)
						<i>cag</i> A	<i>cag26</i>	9 (100)	15 (100)	13 (92.9)	37 (97.4)

**Tabla 16.** Frecuencia de genes de *cag* PAI analizados por PCR en 38 clonas de *H. pylori* que tuvieron la isla incompleta. Se observa que *cag2*, *cag7*, *cag18* y *cag23* se encuentran en menor frecuencia en las 3 enfermedades, además no se observa ningún gen que siempre esté presente en todos los casos



**Gráfica 11.** Frecuencia de genes en *cag PAI* incompleta determinada por PCR en 38 clonas de *H. pylori* de pacientes con enfermedad gastroduodenal. Aquí observamos en forma más notoria la baja frecuencia encontrada en *cag2*, *cag7*, *cag18* y *cag23* con respecto al resto de los genes que forman la isla.

## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La presencia de *cag* PAI en cepas positivas de *H. pylori* está asociada al desarrollo de enfermedad grave en los individuos infectados. En este trabajo comparamos la frecuencia de 30 genes de *H. pylori* que previamente se propusieron como genes asociados a enfermedad gastroduodenal en población mexicana, así como, la integridad de la isla de patogenicidad que fue determinada por la presencia total, parcial o ausencia de 27 genes que la conforman.

Dentro del estudio, revisamos la variabilidad genética de las cepas de *H. pylori* por su patrón de RAPD-PCR, encontrando que en las clonas de 47 pacientes que se analizaron por RAPD-PCR, hubo 4 pacientes (8.5%) que presentaron infección múltiple. Estos resultados son similares a lo reportado en un estudio realizado, en el mismo laboratorio de la UIMEIP (Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI) en el que se obtuvo 8.3% de infección mixta (González Valencia). A diferencia del reporte anterior, Romo González *et al*; 2009, encontró 34% de infección mixta empleando también la técnica de RAPD-PCR en población mexicana, aunque al analizar por el método de microarreglos el contenido genético de las clonas con diferente patrón RAPD, no encontró alguna diferencia entre esas clonas. Hay que considerar que en éste último estudio emplearon 4 iniciadores para RAPD mientras que nosotros únicamente utilizamos 2 lo cual pudo haber influido en la frecuencia de infección mixta reportada en ambos estudios. El resultado obtenido en este estudio reafirma lo publicado en relación a que en población mexicana hay coinfección con múltiples cepas de *H. pylori* (Morales- Espinoza *et al*; 1999, González Valencia *et al*; 2000). Con respecto a lo publicado en otros países, se encuentra reportada una infección mixta de 11% (Talarico *et al*; 2009) lo cual es aproximado con nuestros datos a pesar de ser de diferente región geográfica y tipo de población.

Cuando analizamos los resultados obtenidos por PCR para los 54 genes estudiados en las 64 clonas evaluadas, encontramos genes que iban desde los que siempre estuvieron ausentes, casi siempre presentes en las 3 enfermedades gastroduodenales, así como, los que estuvieron en mayor o menor frecuencia en una de las enfermedades gastroduodenales.

### **Genes siempre ausentes en las 3 enfermedades gastroduodenales**

El gen JHP0940 estuvo ausente en las cepas de las 3 enfermedades gastroduodenales estudiadas. La función de este gen es de respuesta al contacto de *H. pylori* con la mucosa gástrica de gerbo (Graham *et al*; 2006), puede ser que la bacteria lo utilice únicamente en la interacción inicial con la mucosa gástrica y después prescindiera de él lo cual explicaría la ausencia encontrada de este gen en nuestro estudio.

Nuestro resultado coincide con lo reportado por otros autores (Santos *et al*; 2003), en donde no lo encuentran ausente pero sí en muy baja frecuencia (1.5%), aunque también hay reportes en donde a diferencia de nosotros, la presencia de este gen está asociada a cáncer gástrico encontrándolo en una frecuencia del 45% (Occhialini *et al*; 2000). Estos resultados discordantes confirman lo propuesto por Santos *et al*; 2003, que la diferencia encontrada puede deberse a la variabilidad en las regiones de plasticidad de cepas de *H. pylori* aisladas en distintas áreas geográficas.

*En población mexicana previamente se reportó como un gen ausente únicamente en cáncer gástrico (Romo-González et al; 2009). Las discrepancias encontradas en nuestro estudio con respecto a los datos previamente publicados en población mexicana por Romo-González serán discutidas más adelante.*

### **Genes casi siempre presentes en las 3 enfermedades gastroduodenales**

El gen HP0790 se encontró entre un 95 al 100% en este estudio en las 3 enfermedades. Se encuentra reportado que este gen participa en el metabolismo del DNA, así como, en la modulación de la respuesta inmune (Björkholm *et al*; 2002). Este gen se encuentra fuera de la zona de plasticidad, es decir, no está en dentro de la zona de variabilidad genética por lo tanto tiende a estar más conservado y dado que participa en funciones básicas de la bacteria como lo son los procesos involucrados con el DNA y la respuesta inmune, los cuales son procesos que están en continua acción, se podría explicar la alta frecuencia encontrada en las 3 enfermedades gastroduodenales. *(A diferencia de nuestro resultado, el reporte previo en población mexicana (Romo-González) lo encuentra menos frecuente únicamente en cáncer gástrico (55.6%) pero siempre presente en gastritis y úlcera duodenal.* El gen HP0053 se ha reportado como un gen asociado a aislados cag PAI (-) (Terry *et al*; 2005), aunque la frecuencia obtenida de cag PAI ausente en nuestro estudio fue de 19% no coincide con el 30% obtenido de este gen.

### **Distribución de los genes menos frecuentes en úlcera duodenal y cáncer gástrico.**

En este estudio no encontramos ningún gen en menor frecuencia en gastritis.

Entre los genes menos frecuentes en úlcera duodenal en comparación con cáncer gástrico están los genes: HP0713, HP1381, NA/HP1426 y NA/HP0425; todos localizados fuera de la zona de plasticidad excepto el NA/HP0425. Los genes HP0713 y HP1381, no tiene una función conocida ni tampoco reportes de su frecuencia en otros países, por lo que difícilmente encontramos alguna relación que justifique su baja frecuencia en úlcera duodenal, sobre todo porque al estar en una zona conservada se esperaría que su frecuencia fuera similar en las 3 enfermedades gastroduodenales. *Al gen HP0713 el*

*reporte anterior en población mexicana lo encuentra menos frecuente en gastritis, mientras que al HP1381 más frecuente en úlcera duodenal.*

El gen NA/HP1426 codifica para una proteína hipotética conservada localizada fuera de la zona de plasticidad. El único antecedente publicado que se tiene de este gen es que su frecuencia es menor en aislados que son *cag* PAI (+) (Salama *et al*; 2000). Dado que este gen siempre se encontró en todas las clonas de gastritis y cáncer gástrico pero no en úlcera duodenal podríamos hipotetizar que la proteína que expresa estaría más involucrada en procesos de regulación de pH que se pierden en alguna etapa de la historia natural de la infección, aunque es necesario realizar más estudios ya que su sola baja frecuencia encontrada en úlcera duodenal no es suficiente para suponer lo anterior.

*El estudio previo de Romo-González lo encuentra más frecuente en cáncer gástrico.*

Para el gen HP0425 se encuentra reportado que participa en la regulación de la respuesta al ácido, está localizado dentro de una zona de plasticidad y presenta una homología con la exonucleasa RecJ de *E. coli* (Oh *et al*; 2006;). Se ha observado también que este gen se activa en cepas mutantes que carecen del sistema de adaptación a respuesta ácida independiente de la ureasa (Pflock *et al*; 2006). Tomando en cuenta lo anterior, si consideramos que en la úlcera duodenal la secreción ácida está aumentada, *H. pylori* estaría sometido a un pH muy ácido el cual sería neutralizado a su alrededor principalmente por la ureasa y no por este gen que también participa en la regulación del pH lo cual justificaría su baja frecuencia en úlcera duodenal. *El reporte de Romo-González lo encuentra menos frecuente en cáncer gástrico.*

En lo que se refiere al cáncer gástrico, el gen que encontramos en menor frecuencia fue el JHP0951, el cual se encuentra dentro de una zona de plasticidad y cuya función se ha relacionado a la modulación de la respuesta al pH bajo (ácido) y a concentraciones bajas de hierro (Carlson *et al*; 2006). En nuestro estudio lo encontramos en una frecuencia de

86-90% en gastritis y úlcera duodenal, enfermedades en las cuales el pH del estómago es bajo y en las cuales el gen podría estar participando para modular la respuesta a este pH bajo y dado que en cáncer gástrico las células parietales secretoras de HCl se encuentran afectadas en su función, el pH del estómago aumenta (pH alcalino) entonces no sería tan requerido este gen por la bacteria para la regulación de un pH alcalino. *El estudio de Romo-González lo reporta más frecuente en úlcera duodenal.*

### **Distribución de los genes más frecuentes en gastritis y cáncer gástrico.**

Únicamente hubo un gen encontrado más frecuentemente en gastritis: NA/HP1404. Este gen se encuentra fuera de la zona de plasticidad y está implicado en el metabolismo del DNA además de ser un gen proinflamatorio en un modelo animal (ratón) (Björkholm *et al*; 2001), por lo que es posible que al ser un gen involucrado en el proceso inflamatorio su presencia sea requerida mayormente durante la primera etapa de la enfermedad gastroduodenal donde el proceso inflamatorio es el primer signo encontrado en la enfermedad (gastritis). *El reporte previo lo encuentra en menor frecuencia en gastritis.*

En lo que se refiere a úlcera duodenal no hubo ningún gen encontrado en mayor frecuencia en esta enfermedad.

Para cáncer gástrico, encontramos que los genes NA/HP0674, NA/HP1405 y NA/HP0967 fueron los que se encontraron en mayor frecuencia en esta enfermedad. *El gen NA/HP0674 llama la atención que fue uno de los reportados previamente como ausente en cáncer gástrico y en este estudio se encontró en mayor frecuente en la misma enfermedad gastroduodenal.* Este gen se encuentra fuera de la zona de plasticidad y su función aún permanece sin conocerse y tampoco existe un reporte de su frecuencia en otros países. Por otro lado el gen NA/HP1405 localizado fuera de la zona de plasticidad y de función desconocida, se ha visto que se encuentra sobre regulado en cepas con

mutaciones en sensores a pH ácido, así como, cuando *H. pylori* es sometido a condiciones de crecimiento ácidas (Bury-Moné *et al*; 2004). Dado que en el cáncer gástrico existe la condición de hipoclorhidria, difícilmente se podría justificar la mayor frecuencia encontrada de este gen en esta enfermedad, considerando la función que tiene este gen en pH altos y no en pH bajos. *El estudio de Romo González lo reporta en mayor frecuencia en úlcera duodenal.* Finalmente, JHP0967 fue el otro gen que se encontró en mayor frecuencia en esta enfermedad. Este gen también se conoce como *vapD* ya que está relacionado con el gen de la proteína D asociada a virulencia de *Dichelobacter nodosus*, se encuentra fuera de la zona de plasticidad y está involucrado en la adaptación de la bacteria en condiciones atípicas lo cual podría justificar la alta frecuencia encontrada en cáncer gástrico, enfermedad en la cual la mucosa gástrica ya perdió su integridad, lo que dificultaría que la bacteria se mantuviera en un hábitat hostil, aumentando de esta manera la expresión de este gen. El único antecedente de la frecuencia de este gen que se tiene en población mexicana es el dato de una frecuencia encontrada del 38% aunque en ese estudio no incluyeron población con cáncer gástrico (Morales Espinoza *et al*; 2008). *Romo-González lo encuentra en una menor frecuencia en úlcera duodenal.*

En nuestro estudio se encontró que los genes que previamente se habían reportado por Romo-González *et al*; 2009, en mayor o menor frecuencia, así como, ausentes en alguna de las enfermedades gastroduodenales al compararlos con los nuestros, no encontramos ninguna similitud en los resultados a pesar de que ambos estudios fueron realizados con cepas mexicanas aunque con diferentes metodologías. Una posible respuesta a estas discrepancias encontradas podría ser el tamaño de muestra utilizado tanto en un estudio como en otro ya que Romo-González evaluó 10 pacientes con gastritis, 10 con úlcera duodenal y 9 con cáncer gástrico mientras que nosotros evaluamos 20 pacientes de cada enfermedad gastroduodenal. Otra posible causa que pudiera considerarse es que los aislados estudiados tanto en un estudio como en otro fueron de diferentes años (2006-

2010 vs 1997), por lo que pudieron reflejar situaciones epidemiológicas diferentes que implicaran cambios genéticos en las cepas de *H. pylori* que infectan a la población mexicana. La tercera causa de las diferencias encontradas es que pudiera atribuirse a que las cepas evaluadas previamente, pertenecieron a pacientes reclutados principalmente del Hospital General de México el cual es un hospital de concentración donde se reciben pacientes de toda la república mexicana mientras que las cepas analizadas en nuestro estudio provienen principalmente de hospitales del D.F. (Hospital de Oncología y Hospital de Especialidades del CMN siglo XXI, así como, del Hospital de Cancerología, SSA). Lo anterior reafirma lo encontrado por Jenks *et al*; 1998, donde propone que hay diferencias en el contenido genético de *H. pylori* de diferentes localizaciones geográficas, así como, lo publicado por Wook *et al*; 2004 en aislados coreanos donde encuentra grados variables de diversidad genética en diferentes regiones del país. Schmit *et al*; 2010; al igual que en nuestro estudio encuentra diferencias en presencia y ausencia de ciertos genes en población de un mismo país pero de diferente grupo étnico debido a la gran variabilidad genética que presenta *H. pylori*.

Al realizar el análisis estadístico se encontró que había genes que si no eran estadísticamente significativos sí mostraban una tendencia a estar menos o más frecuentes en cierta enfermedad y entre ellos sobresalen los genes: JHP0950 que tiende a estar más frecuente en úlcera duodenal y los genes JHP0927 y JHP0960 cuya tendencia es a estar más frecuentes en cáncer gástrico. La tendencia de estos 3 genes a estar en mayor frecuencia en úlcera duodenal y cáncer gástrico, respectivamente, es la misma que reportó Romo-González pero con significancia estadística. El mismo comportamiento de estos genes en ambos estudios, que emplearon diferentes muestras de una misma población y diferentes metodologías con el mismo objetivo, sugiere que probablemente si se empleara otra técnica de biología molecular diferente a microarreglos para determinar la presencia y/o ausencia de estos genes en enfermedad gastroduodenal

y si se observara la misma tendencia con significancia estadística podrían ser considerados estos genes también, como marcadores de úlcera duodenal y cáncer gástrico.

Además hay que considerar que los microarreglos no son tan sensibles como la PCR ya que hay reportes que indican un 7% de diferencias entre resultados de microarreglos en comparación con PCR (Nilsson *et al*; 2003; Salama *et al*; 2000), por lo que otra causa de las variaciones encontradas en los resultados encontrados en el estudio previo y el actual, es que a pesar de que los iniciadores que se emplearon en las PCR realizadas en este estudio fueron los mismos iniciadores utilizados para amplificar los productos de PCR que se imprimieron en el microarreglo de Romo-González, pudiera ser que no hubiera una alineación correcta del iniciador en la PCR debido a una variación en la secuencia de nucleótidos, consecuencia de la variabilidad genética que presenta *H. pylori*, por lo que el gen adyacente a la mutación pudiera ser detectado por microarreglos pero no amplificado por PCR, es decir, la PCR pudo haber no amplificado a pesar de que el gen estuviera presente. Lo anterior corrobora lo propuesto por Nilsson *et al*; 2003, al validar resultados de microarreglos con PCR y por Kivi *et al*; 2007, al publicar que los microarreglos no detectan variabilidad en las secuencias no representadas en la sonda impresa como resultado de mutaciones menores o acomodados alterados de los genes del cromosoma.

Eliminando la variable de la diferente metodología empleada en ambos estudios, así como, la frecuencia obtenida en determinada enfermedad, tanto en un reporte como en el otro, y con el objetivo de observar si se presentaba la misma tendencia en la frecuencia de los genes con una misma metodología, el siguiente paso fue comparar los resultados obtenidos por Romo-González por PCR para 13 genes (resultados no publicados) con nuestros resultados obtenidos en esos mismos 13 genes por PCR (utilizando los mismos iniciadores en ambos estudios); se encontró que en la mayoría de estos genes la

frecuencia era muy similar a pesar de que fueron diferente número de aislados evaluados, esto podría sugerir que estos genes en población mexicana son muy conservados independientemente del origen geográfico mientras que los genes HP1472,HP0674 y HP00713 que presentaron porcentajes de frecuencias muy diferentes en ambos estudios en las 3 enfermedades gastroduodenales podrían ser genes que están sujetos a una mayor variabilidad genética. De acuerdo a Santos *et al*; 2003, existe una diversidad geográfica considerable entre la secuencia de genes de *H. pylori* por lo que puede suceder que los iniciadores empleados no amplifiquen el producto, sin que esto signifique que el gen esté ausente, por lo que lo más recomendable sería usar más de un par de iniciadores. Una explicación del por qué unos genes están presentes en unas cepas y no en otras es que estos genes pudieron ser adquiridos por transferencia horizontal (Terry *et al*; 2005).

La PCR ha sido una herramienta útil en el campo de la biología molecular y muchos hallazgos encontrados en microbiología se deben a ella gracias a su sensibilidad y bajo costo pero también hay que considerar que los iniciadores empleados se diseñan con base en la secuencia del gen que se desea amplificar y si existe una gran variabilidad en la secuencia de los genes de *H. pylori* que se desean amplificar pudieran considerarse como una desventaja de esta técnica. Una limitante de este estudio es que no hubo una validación de la PCR empleada con alguna técnica más sensible como lo es Southern blot.

Los microarreglos diseñados por la UIMEIP, que incluía la colección de 54 genes, contenían sondas que representaban a estos genes con oligos, así como, sondas de productos de PCR teniendo estos últimos las mismas secuencias de las sondas empleadas en el microarreglo de Romo-González (Salama *et a*;,2000). Se encontró que en el caso de los genes de la isla de patogenicidad había una mayor similitud de los

resultados entre ambos microarreglos pero hubo genes como *cag2* y *cag13* donde la frecuencia observada fue muy diferente. En el caso del gen *cag2* la frecuencia obtenida en el microarreglo de sondas de oligos coincide con lo reportado por Romo-González en su microarreglo de productos de PCR al encontrarlo en baja frecuencia en todos los casos de enfermedad gastroduodenal. Al validar ambos microarreglos con la PCR, se obtuvo una mayor sensibilidad para determinar la presencia de un gen en el microarreglo diseñado con sondas representadas con oligos lo cual coincide con lo esperado, ya que los oligos empleados por ser de menor tamaño (25 pb en promedio) se pegan con mayor especificidad a la sonda que los productos de PCR (700 pb en promedio). Un dato que llama la atención es que hubo genes de la isla de patogenicidad que se encontraron en el microarreglo de sondas de productos de PCR completamente ausentes en las 15 muestras incluyendo los controles lo cual no puede ser posible ya que las sondas tanto de oligos como de productos de PCR fueron diseñadas en base a la secuencia de las cepas J99 y 26695 las cuales fueron utilizadas como controles en el ensayo además de que estas cepas poseen la isla de patogenicidad *cag PAI*. Al comparar las frecuencias de los 27 genes restantes de la colección de 54 genes, se encontró una mayor variación en los resultados ya que un mismo gen estaba ausente en un microarreglo y con mayor frecuencia en el otro lo cual se vió reflejado en los resultados de sensibilidad y especificidad encontrados en estos microarreglos lo cual no coincide con lo reportado por Salama *et al*; 2000 en su microarreglo ya que los datos de sensibilidad y especificidad que reporta son mayores que los nuestros (95 y 98%, respectivamente).

Considerando que el microarreglo diseñado por la Unidad de Investigación estuvo basado en el microarreglo de Salama, las discrepancias observadas en ambos, se deben principalmente a que para determinar este valor de sensibilidad y especificidad Salama utilizó un software *Web primer* para el diseño de los iniciadores en base a las secuencias de las cepas 26695 y J99 y en el cual se asignaba cuales iniciadores eran específicos

para la J99, cuales eran específicos para la 26695 y cuales eran comunes a ambas cepas, de tal manera que la sensibilidad y especificidad la determinó si el DNA de la cepa 26695 que usó como control hibridaba o no con las sondas impresas en el microarreglo de acuerdo a su clasificación (exclusivas de J99, exclusivas de 26695 y comunes a ambas) pero nunca realizó PCR para comprobar que la exclusión también se presentaba *in vitro* por PCR; en nuestro estudio sí se realizó esta técnica para determinar la sensibilidad y especificidad de los microarreglos, empleando como controles en las PCR's, el DNA de J99 y de 26695 y observando que los genes que Salama clasificó como exclusivos de 26695 eran amplificados también por la J99 pero los genes que clasificó como exclusivos de la J99 no eran amplificados por la 26695. Esta incongruencia no generó mayor problema en nuestro estudio ya que el objetivo era ver si estaba o no presente el gen y no determinar si un gen era o no exclusivo de J99 o de 26695.

La baja sensibilidad y especificidad encontrada en el microarreglo de sondas de productos de PCR de este estudio, se debió principalmente a limitaciones encontradas en la impresión de estas zonas ya que los genes de la isla de patogenicidad estuvieron impresos 4 veces en diferente columnas, pero a pesar de ser el mismo gen las lecturas obtenidas en una columna determinaban que el gen estaba ausente y en la otra columna el resultado correspondía a un gen presente; se encontraron también entre estos genes lecturas en una columna que correspondían al doble de la lectura encontrada para el mismo gen pero impreso en otra columna; hubo también lecturas de genes impresos que correspondían a puntos vacío. Estas condiciones se encontraron en los 16 submicroarreglos de productos de PCR y en los mismos genes pero no se observaron en los submicroarreglos de oligos en donde a pesar de estar impresos los mismos genes también 4 veces en diferente columna, las lecturas eran reproducibles a pesar de estar impresos en diferente posición. Por lo tanto, a pesar de que la impresión de los microarreglos es hecha por un robot no queda exenta de errores.

Al analizar la integridad de la isla de patogenicidad, se encontró que el genotipo más común en las 3 enfermedades gastroduodenales era el de una isla incompleta (59%). Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Mahaboob *et al*; 2005 (62%) y por Baghaei *et al*; 2009 (62%), a pesar de que nuestro criterio para considerar que la isla estaba incompleta fue la ausencia de al menos 1 gen de los 27 que la conforman mientras que en estos reportes únicamente consideran la ausencia de 1 gen de un total de 4 a 9 genes de la isla que evalúan únicamente. Resultados diferentes han sido reportados por Nilsson *et al*; 2003 (15%), cuyo trabajo publicado es de los pocos en los que determinaron la presencia o ausencia de los 27 genes que conforman la isla, por Schmidt *et al*; 2010 (19%) y por Ikenoue *et al*; 2001(2.4%), quienes encuentran una menor frecuencia de una isla incompleta en enfermedad gastroduodenal. La mayor frecuencia de una isla completa la encontramos en los casos de gastritis, este resultado difiere con la mayoría de los reportes previos hechos por Mahaboob *et al*; 2005, Jenks *et al*; 1998 y Nilsson *et al*; 2003, donde la presencia de una isla completa está más frecuentemente encontrada en enfermedad gastroduodenal grave (úlceras duodenales y cáncer gástrico) y coincide únicamente con lo reportado por Baghaei *et al*; 2009 y por Ikenoue *et al*; 2001 donde al utilizar únicamente *cagA*, *cagE*, *cagI* y *cagT*, determinan que la isla está presente.

La diversidad en el contenido de genes de la isla de patogenicidad ya había sido notado en cepas de casi todo el mundo (Blaser M, 2001; Jenks *et al*; 1998). Las discrepancias o similitudes encontradas en relación a la integridad de la isla en nuestro estudio con respecto a reportes anteriores se debe, de nueva cuenta, a la gran diversidad que muestra *H. pylori* en el mundo (Maeda *et al*; 1999) además de que *cag* PAI es altamente inestable y muy fácilmente puede perderse o sufrir reacomodos genéticos (Jenks *et al*; 1998) pero sobre todo se debe a los genes o combinaciones de genes que utilizan los autores para considerar la integridad de la misma que van desde *cagA*, *cagB*, *cagC*, *cagE*, *cagM*, *cagY*, *cagT*, *cagQ*, *cagS*, *cagI*, LEC, etc, mientras que para Ikenouea *et al*;

*cagE* es un mejor marcador de la presencia de la isla, Jenks *et al*; 1998 propone que *cagA* no es un buen marcador de la isla y Schmidt *et al*; 2010; propone que el uso de al menos 5 genes de la isla no es suficiente para determinar su presencia.

En este estudio, encontramos que *cag2*, *cag7* y *cag18* eran los genes que se encontraron en menor frecuencia, cuando la isla estaba incompleta, en comparación con los genes considerados como marcadores de la isla (*cagA*, *E* y *T*)., lo anterior coincide con el reporte previo realizado en población mexicana (Romo-González *et al*; 2009) en el que encuentra a *cag2* en menor frecuencia en los genes de la isla, esta baja frecuencia pudiera deberse a que es un gen que no es esencial para la inducción de IL-8, ni para la translocación de CagA por lo que la bacteria puede prescindir de él, aunque por otro lado se ha reportado en otros estudios que para amplificar este gen requieren más de 1 par de iniciadores (Shmit *et al*; 2010) por lo que esta situación es una limitante en nuestro estudio ya que solo se usó un solo par de iniciadores. A *cag7* lo encontramos en menor frecuencia en las 3 enfermedades gastroduodenales analizadas, siendo un gen indispensable para la translocación de CagA e inducción de IL-8 y a diferencia del caso anterior, para amplificarlo se utilizaron 2 pares de iniciadores. El gen *cag18* (*cagL*) es una adhesina homóloga a virB5, que se une a la  $\beta$ -integrina de la célula epitelial gástrica y es de gran importancia en el proceso de colonización, y esencial tanto para la translocación de CagA como para la inducción de IL8 (Censini *et al*; 1996). Al encontrarse en menor frecuencia en úlcera duodenal en comparación con cáncer gástrico y gastritis, podría deberse a que al iniciar el proceso de colonización durante la gastritis la bacteria requiera indispensablemente este gen para iniciar su adherencia y en el caso del cáncer gástrico, al presentar el hábitat gástrico alteración en su morfología celular con probable pérdida de integrinas, la bacteria no sea capaz de adherirse correctamente, aumentando de esta manera la presencia de este gen de la isla. Otro dato que coincide con nuestros resultados es el hecho de que *cag7* (*cagY*) y *cag18* (*cagL*) cubren local o parcialmente el

pili de la bacteria (Andrezejewska *et al*; 2006) y ambos genes fueron encontrados en bajas frecuencias en nuestro estudio.

*H. pylori* exhibe una gran variabilidad genética debido a una combinación de factores que incluyen una tasa alta de mutación, competencia para captar DNA extraño, capacidad para la recombinación homóloga y una consecuencia de esta diversidad genética es la variación en enfermedad gastroduodenal que resulta en las personas infectadas.

Finalmente, consideramos que se obtendrían resultados más uniformes si se empleara para el diseño de los iniciadores, ya sea para PCR o para la impresión de los microarreglos, una cepa mexicana secuenciada para disminuir la variabilidad geográfica ya que la J99 y la 26695 utilizadas en este estudio, son de diferente origen geográfico y con lo cual se reflejaría realmente que genes en población mexicana pudieran considerarse como marcadores de enfermedad. Además también sería adecuado emplear más de 2 pares de iniciadores para determinar la presencia de genes, así como, utilizar más de una técnica para validar los resultados. No hay que olvidar que la gastritis, úlcera duodenal y cáncer gástrico son enfermedades multifactoriales y en este estudio únicamente se evaluaron los factores bacterianos.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio son importantes ya que se proponen genes marcadores de enfermedad diferentes a los que se habían considerado que lo eran en población mexicana, corrobora que *H.pylori* presenta una gran variabilidad genética, además expone las limitaciones que pueden llegar a tener los microarreglos como una herramienta para determinar presencia o ausencia de genes de *H. pylori*, sin olvidar que es de los pocos estudios que hay en los cuales, para determinar la integridad de *cag* PAI, considera a los 27 genes que la conforman.

## 8. CONCLUSIONES

De acuerdo a nuestra población estudiada y metodología empleada:

1. *H. pylori* muestra gran variabilidad genética en población mexicana
2. HP1404 es un gen que puede considerarse como marcador de gastritis
3. HP0674, HP1405 y HP0967 son genes que se proponen como marcadores de cáncer gástrico
4. Existen limitaciones en los microarreglos diseñados por la Unidad de Investigación para la identificación de genes de *H. pylori* como marcadores de enfermedad
5. Es indispensable el uso de más de una técnica molecular para validar los resultados obtenidos.
6. La isla de patogenicidad incompleta representa el genotipo más común en población mexicana

## 9. PERSPECTIVAS

Entre las perspectivas futuras está considerada la secuenciación de una cepa de *H. pylori* aislada de un paciente mexicano a partir de la cual pudieran diseñarse los iniciadores específicos para cada gen que requiera ser estudiado, poniendo especial interés en los genes propuestos en este estudio como marcadores de cáncer gástrico por ser la enfermedad gastroduodenal más severa y determinar si se expresan o no, así como, investigar en que nucleótido de su secuencia es más frecuente una mutación. Se espera también, corregir la impresión del microarreglo diseñado por la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias y rediseñarlo con iniciadores obtenidos de una cepa de *H. pylori* mexicana, así como, estandarizar Southern blot para validar los resultados obtenidos por PCR.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Warren J, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* 1983; 1(8336):1273-1275
2. World health Organization International Agency for Research on IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. 1994; 61: 177-220
3. Kuster J, Gerrits M, Van Strijp J, Vandenbroucke-Grauls C. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect and Immunity* 1997; 65(9): 3672-3679.
4. Mobley HL, Mendz GL, Hazell SL. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. ASM, Press. Washington, DC. 2001.
5. Kuster J, Van Vliet H, Kuipers E. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(3): 440-490
6. Solnik J, Shauer D. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin Microbio Rev* 2001; 14(1): 59-97
7. Bardhan P. Epidemiological features of *Helicobacter pylori* infection in developing countries. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 973-978
8. Pérez Pérez G, Rothenbacher D, Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2004, 9(1): 1-6
9. Malaty H, Graham D. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1994; 35: 742-745.
10. Torres J, Leal-Herrera Y, Pérez-Pérez G, Camorlinga Ponce M, Cedillo-Rivera R, Tapia-Conyer R, Muñoz O. A community-based seroepidemiological study of *Helicobacter pylori* in México. *J Infect Dis* 1998; 178(4): 1089-1094
11. Ferguson D, Li C, Patel N, Mayberry W, Chi D, Thomas E. Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. *J Clin Microbiol* 1993; 31(10): 2802-2804
12. Brown L. *Helicobacter pylori*, Epidemiology and routes of transmission 2000; 22(2): 283-297

13. Allaker R, Young K, Hardie J, Domizio P, Meadows N. Prevalence of *Helicobacter pylori* at oral and gastrointestinal sites in children: evidence for possible oral-to-oral transmission. *J Med Microbiol* 2002; 51: 312-317
14. Leung W, Siu K, Kwok C, Chan S, Sung R, Sung J. Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implication in gastro-oral-transmission. *Am J Gastroenterol* 1999; 94(10): 2881-2884
15. Kuipers E, Thijs J, Festen H. The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; 9(suppl 2): 59-69
16. Blaser M, Pérez-Pérez G, Kleanhouts H, Cover T, Peek R, Chyou P, *et al.* Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Can Res* 1995; 55(15): 2111-2115.
17. Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1998; 48(1): 3554-3560.
18. Blaser J. *Helicobacter pylori*: its role in disease. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 386-393
19. Guarner J, Mohar A, Parsonet J, Halperin D. The association of *Helicobacter pylori* with gastric cancer and preneoplastic gastric lesions in Chiapas, México. *Cancer* 1993; 71: 297-301
20. Covacci A, Telford J, Del Giudice G, Parsonet J, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 1999; 284: 1328-1333
21. Cullen J, Collins J, Christiansen K, Epis J, Warren J, Cullen K. Abstract Digestive diseases week 1993. *Gastroenterology* 1994; 104: A60.
22. Kuipers E, Lundell L, Klinkenberg E, Havu N, Festen H, Liedman B, *et al.* Atrophic gastritis and *Helicobacter pylori* infection in patients with reflux esophagitis treated with omeprazole or fundoplication. *N Engl J Med* 1996; 334 (16):1018-1022
23. Zimaity H, Ramchatesingh J, Saeed M, Graham D. Gastric intestinal metaplasia: subtypes and natural history. *J Clin Pathol* 2001; 54: 679-683.
24. Zhang C, Yamada N, Wu Y, Wen M, Matsuhisa T, Matsukura N. *Helicobacter pylori* infection, glandular atrophy and intestinal metaplasia in superficial gastritis, gastric erosion, erosive gastritis, gastric ulcer and early gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11(6): 791-796.

25. Piñol-Jiménez F, Paniagua Estévez M. Cáncer gástrico: factores de riesgo. Rev Cubana Oncol 1998; 14(3): 171-179
26. Wroblewski L, Peek R, Wilson K. *Helicobacter pylori* and gastric ulcer: factors that modulate disease risk. Clin Microbiol Rev 2010; 23(4): 713-739
27. Aravena E. *Helicobacter pylori* y cáncer gástrico. Gastr Latinoam 2007; 18(2): 129-132
28. Polk D, Peek R. *Helicobacter pylori*: gastric ulcer and beyond. Nature Rev 2010; 10: 410-414
29. Asahi M, Azuma T, Ito S, Ito Y, Suto H, Nagi Y, et al. *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. J Exp Med 2000; 191(4): 593-602
30. Edwards N, Monteriro M, Faller G, Walsh E, Moran A, Roberts I, et al. Lewis X structures in the O antigen side-chain promote adhesion of *Helicobacter pylori* to the gastric epithelium. Mol Microbiol 2000; 35(6): 1530-1539
31. Rivas-Traverso F, Hernández F. *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. Rev Biomed 2000; 11: 187.205
32. Atherton J, Cao P, Peek R, Tummuru M, Blaser M, Cover T. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. J Biol Chem 1995; 270 (30): 17771-17777
33. Atherton J, Peek R, Tham K, Cover T, Blaser M. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 1997; 112: 92-99
34. Avilés-Jiménez F, Letley D, González-Valencia G, Salama N, Torres J, Atherton JC. Evolution of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin in a human stomach. J Bacteriol 2004; 186: 5182-5185.
35. Covacci A, Censini S, Bugnole M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, et al. Molecular characterization of the 128 kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90(12): 5791-5795

36. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree J, Ghiara P, Borodowsky M, *et al.* *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I. specific and disease-associated virulence factors. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 14648-14653
37. Hideaki H, Ryouhei T, Syuichi M, Toshiro S, Takeshi A, ahiro A, Anori H. SHO-2 Tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. Science 2002; 295 (5555): 683-686
38. Lam T, Tomohisa U, Kazunari M, Toshio J, Atsugu M. *Helicobacter pylori* virulence and the diversity of gastric. J Med Microbiol 2008; 57: 1445-1453.
39. Oleastro M, Monteiro L, Lehours D, Mégraud F, Ménard A. Identification of markers for *Helicobacter pylori* strains isolated from children with peptic ulcer disease by suppressive subtractive hybridization. Infect Immun 2006; 74(7): 4064-4074
40. Rizwan M, Alvi A, Ahmed N. Novel protein antigen (JHP0940) from the genomic plasticity region of *Helicobacter pylori* induces tumor necrosis factor alpha and interleukin-8 secretion by human macrophages. J Bacteriol 2008; 190(3):1146-1151
41. Santos A, Magalhaes DM, Menard A, Marais A, rocha GA, Oliveira CA, *et al.* New pathogenicity marker found in the plasticity region of the *Helicobacter pylori* genome. J Clin Microbiol 2003; 41(4): 1651-1655
42. Shmidt H, Andre S, Kaakoush N, Engstrand L, Eriksson L, Goh KL, *et al.* The prevalence of the duodenal ulcer promoting gene (dup A) in *Helicobacter pylori* isolates varies by ethnic group and is not universally associated with disease development: a case-control study. Gut Pathogens 2009; 1: 5-14
43. Fischbach W, Chan AO, Wong BC. *Helicobacter pylori* and gastric malignancy. Helicobacter 2005; 10: 534-539
44. Salama N, Guillemin K, Mc Daniel T, Sherlock G, Tompkins L, Falkow S. A whole genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97(26): 14668-14673
45. Romo Gonzalez C, Salama N, Burgueño-Ferreira J, Ponce Castañeda V, Lazcano-Ponce E, Camorlinga Ponce M, Torres J. Differences in genome content among *Helicobacter pylori* isolates from patients with , duodenal ulcer, or gastric reveal novel disease-associated genes. Infect Immun 2009; 77(5): 2201-2211

46. Suerbaum S, Josenhans C. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5(6): 441-452
47. Akopyants N, Clifton S, Kersulyte D, Crabtree J, Youree B, Reece C, *et al.* Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Molecular Microbiol* 1998; 21(1): 37-53
48. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree J, Ghiara P, Borodovsky M, *et al.* *cagA*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14648-14653
49. Dawn I, Salama N, Krishna A, Rieger U, Atherton J, Falkow S, Peek RM. *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. *PNAS* 2001; 98(25): 14625-14630.
50. Fisher W, Püls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, Haas R. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori cag* pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of Interleukin-8. *Molecular Microbiol* 2001; 42(5): 1337-1348
51. Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, *et al.* Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(22): 14428-14433.
52. Paziak-Domán B, Chmiela M, Jarosin A, Rudnicka W. Potential role of *cagA* in the inhibition of T cell reactivity in *Helicobacter pylori* infections. *Cell Immunology* 2000; 202(2): 136-139
53. Wang J, Brooks E, Bamford K, Denning T, Pappo J, Ernst P. Negative selection of T cells by *Helicobacter pylori* as a model for bacterial strain selection by immune evasion. *J Immunol* 2001; 167: 926-934
54. Tomb J, White O, Kerlavage A, Clayton R, Sutton G, Fleischmann R, Ketchum K, *et al.* The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; 388(7): 539-547.
55. Alm R, Ling L, Moir D, King B, Brown E, Doig P, *et al.* Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1999; 397(14): 176-180

56. Mc Clain M, Shaffer C, Israel D, Peek R, Cover T. Genome sequence analysis of *Helicobacter pylori* strains associated with gastric ulceration and gastric. BMC Genomics 2009; 10: 1-14
57. Oh J, Kling-Backhed H, Giannakis M, Xu J, Fulton R, Fulton L, Cordum H, *et al.* The complete genome sequence of a chronic atrophic *Helicobacter pylori* strain: evolution during disease progression. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103(26): 9999-10004
58. Baltrus D, Amieva M, Covacci A, Lowe T, Merell D, Ottemann K, *et al.* The complete genome sequence of *Helicobacter pylori* strain G27. J Bacteriol 2009; 191(1); 447-448
59. Devi H, Taylor T, Avasthi T, Kondo S, Suzuki Y, Megraud F, Ahmed N. Genome of *Helicobacter pylori* strain B38. J Bacteriol 2010; 192(24): 6488-6489
60. Suebaum S. Genetic variability within *Helicobacter pylori*. Inter J Medical Microbiol 2000; 290: 175-181
61. Brown P, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. Nature 1999; 21:32-37
62. Ramírez J, Chávez L, Santillán J, Guzmán S. Microarreglos de DNA. Mensaje Bioquímico 2003; 27: 97-116
63. Sutera V, Han E, Rajman L, Lovett S. Mutational analysis of the RecJ exonuclease of *Escherichia coli*: Identification of phosphoesterase motifs. J Bacteriol 1999; 181(19): 6098-6102
64. Morales-Espinoza R, González-Valencia G, Delgado G, Méndez J, Torres J, Craviota A. Frequency and characterization of *vapD* gene in *Helicobacter pylori* strains of different *vacA* and *cag*-PAI genotype. Bioquímica 2008; 33(2): 43-50
65. Occhialini A, Marais A, Alm R, García F, Sierra R, Mégraud F. Distribution of open reading frames of plasticity region of strain J99 in *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric carcinoma and gastritis patients in Costa Rica. Am Soc Microbiol 2000; 68(11): 6240-6249
66. Oleastro M, Monteiro L, Lehours D, Mégraud F, Ménard A. Identification of markers for *Helicobacter pylori* strains isolated from children with peptic ulcer disease by suppressive subtractive hybridization. Infect Immun 2006; 74(7): 4064-4074

67. Santos A, Magalhaes D, Menard A, Marais A, Rocha G, Oliveira C, *et al.* New pathogenicity marker found in the plasticity region of the *Helicobacter pylori* genome. J Clin Microbiol 2003; 41(4): 1651-1655
68. Luque JL. Biología Molecular e Ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Elsevier. España, Madrid. 2006.
69. Jenks P, Mégraud F, Labigne A. Clinical outcome after infection with *Helicobacter pylori* does not appear to be reliably predicted by the presence of any of the genes of the *cag* pathogenicity island. Gut 1998; 43: 752-758
70. Maeda S, Yoshida H, Ikenoue T, Ogura K, Kanai F, Kato N, *et al.* Structure of *cag* pathogenicity island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates. Gut 1999; 44(3): 336-341
71. Kauser F, Khan A, Hussain M, Carrol I, Ahmed N, Tiwari S, *et al.* The *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* is disrupted in the majority of patient isolates from different human populations. J Clin Microbiol 2004; 42(11): 5302-5308
72. Ali M, Khan A, Tiwari S, Ahmed N, Rao V, Habibullah C. Association between *cag*-pathogenicity island and *Helicobacter pylori* isolates from peptic ulcer, gastric carcinoma, and non-ulcer dyspepsia subjects with histological changes. Worl J Gastroenterol 2005; 11(43): 6815-6822
73. Matteo M, Granados G, Pérez C, Olmos M, Sánchez C, Catalano M. *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island genotype diversity within the gastric niche of a single host. J Med Microbiol 2007; 56: 664-669
74. Morales-Espinosa R, Castillo-Rojas G, Gonzalez-Valencia G, Ponce de León S, Cravioto A, Atherton J, *et al.* Colonization of Mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strains with different *vacA* and *cagA* genotypes. J Clin Microbiol. 1999; 37 (9):3001-4
75. Baghaei K, Shokrzadeh L, Jafari F, Dabiri H, Yamaoka Y, Bolfion M, *et al.* Determination of *Helicobacter pylori* virulence by analysis of the *cag* pathogenicity island isolated from Iranian population. Dig Liver Dis 2009; 41(9): 634-638
76. Salama N, González-Valencia G, Deatherage B, Avilés-Jiménez F, Atherton J, Grahama D, *et al.* Genetic analysis of *Helicobacter pylori* strain populations

- colonizing the stomach at different times postinfection. *J Bacteriol* 2007; 189(10): 3834-3845
77. Talarico S, Gold B, Fero J, Thompson D, Guarner J, Czinn S, *et al.* Pediatric *Helicobacter pylori* isolates display distinct gene coding capacities and virulence gene marker profiles. *J Clin Microbiol* 2009; 47(6):1680-1688
78. Nilsson C, Sillén A, Eriksson L, Strand M, Enroth H, Normank S, *et al.* Correlation between *cag* pathogenicity island composition and *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal disease. *Am Society Microbiol* 2003; 71(11): 6573-6581
79. Yakkob J, Jafri W, Abbas Z, Abid S, Khan R, Jafri N, *et al.* Low prevalence of the intact *cag* pathogenicity island in clinical isolates of *Helicobacter pylori* in Karachi, Pakistan. *Brit J Biomed Sci* 2009; 66(3): 137-142
80. Graham J, Peek R, Krishna U, Cover TL. Global analysis of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. *Gastroenterol* 2002; 123: 1637-1648.
81. Pflock M, Finsterer N, Joseph J, Mollenkopf T, Meyer T, Beier D. Characterization of the AsrRS regulon of *Helicobacter pylori* involved in acid adaptation. *J Bacteriol* 2006; 188: 3449-3462
82. Carlson E, Nystrom J, Svennerholm M, Nilsson C. Characterization of the outer membrane protein profile from disease-related *Helicobacter pylori* isolates by subcellular fractionation and nano-LC FT-ICR. MS analysis. *J Proteome* 2006; 5: 3197-3204
83. Björkholm B, Guruge J, Oh J, Syder A, Salama N, Guikklemmin K, *et al.* Colonization of germ free transgenic mice with genotyped *Helicobacter pylori* strains from a case-control study of gastric cancer reveals a correlation between host responses and Hsds components of type I restriction-modification systems. *J Biol Chem* 2002; 277: 34191-34197.
84. Bury-Moné S, Thiberge J, Contreras M, Maitournam A, Labigne A, Reuse H. Responsiveness to acidity via metal ion regulators mediates virulence in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 2004; 53: 623-638.
85. Andrzejewska J, Lee S, Olbermann P, Lotzing N, Katzowitsch L, Achtman M, *et al.* Characterization of the pilin ortholog of the *Helicobacter pylori* Type IV *cag* pathogenicity apparatus, a surface-associated protein expressed during infection. *J Bacteriol* 2006; 188(16): 5865-5877

## ANEXOS

### ANEXO 1. MATERIAL Y REACTIVOS

#### MATERIAL

Asas de siembra

Cajas petri

Hisopos estériles

Pipetas automáticas de 1000, 100, 50,10 y 1 µl

Labsystems E89892. 4500. USA. Finnpiquette Digital.

Puntas desechables para pipetas automáticas

Tubos de PCR

Axygen genuine quality 33219 Central Avenue,  
Union City,USA

Tubos eppendorf 1.5 mL

Tubos falcon 50 mL

Labcon/BD

Adhesivo para microarreglos

Superestructura para microarreglos

Matraz erlenmeyer 1000 y 250 mL

Pyrex, México

#### EQUIPO

Analizador de imagen Syngen

Bioquim Quality Research Products

Balanza analítica

SA 210 Scientech

Balanza granataria

PB 3002. Mettler, Toledo

Baño de hibridación

Bellco Glass INC, Vineland, New Yersey,USA.

Cámara de electroforesis

CLP Continental Lab Products

Campana de flujo laminar

Nuaire

Centrífuga para portaobjetos

Eppendorf 5810R, Germany

Entrecruzador (crosslinker)

Fuente de poder

Bio Rad PAC 1000

Incubadora de CO<sub>2</sub>

Thermo Cientific

Microcentrífuga

Nicrocl 17R. IEC. Thermo Electron Corporation

Espectrofotómetro (nanodrop)

ND-1000-Spectrophotometer

Refrigerador -70<sup>0</sup>C

Puffer Hubbardi

Scanner de lectura para microarreglos

Concentrador

Concentrador eppendorf 5301

Termociclador eppendorf

Thermal cycler

## REACTIVOS

Acetato de amonio	JT Baker 9507-02 Mallinckrodt Edo. México
Ácido acético glacial	JT Baker 9507-02 Mallinckrodt Edo. México
Agar sangre	BBL <sup>IM</sup> Becton Dickinson MD 21152, USA.
Agarosa	Invitrogen. 15510-027. Faraday Av. USA
Agua desionizada estéril	PISA SA de CV. Guadalajara, México
Albúmina bovina	JT Baker 9507-02 Mallinckrodt Edo. México
Alexa 555	Molecular probes. Invitrogen
Alexa 647	Molecular probes. Invitrogen
Aminoalil dUTP 1 mg	Sigma
Caldo Brucella	BBL <sup>IM</sup> Becton Dickinson MD 21152, USA.
Citrato de sodio trihidratado	JT Baker 9507-02 Mallinckrodt Edo. México
Cloroformo	JT Baker 9175-02. Mallinckrodt Edo. México
Dimetil sulfóxido (DMSO)	Sigma Chemical D-8779. St Louis, USA
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	Boehringer Mannheim Corporation Indianapolis, USA
EDTA	JT Baker 9507-02 Mallinckrodt Edo. México
Etanol	JT Baker 9014-03 Mallinckrodt Edo. México
Generador de CO <sub>2</sub>	Beckton Dickinson Gas Pack EZ BD. 260680, Maryland, USA
Glicerol	JT Bajer 2136-02
Isopropanol	Sigma Chemical. St Louis, USA
Isotiocianato de guanidina GES	JT Baker 9507-02 Mallinckrodt Edo. México
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	JT Baker 9507-02 Mallinckrodt Edo. México
KHPO <sub>4</sub>	JT Baker 9507-02 Mallinckrodt Edo. México
Kit de marcado (Random primer, klenow, dNTP 100mM)	Randoms primers DNA labeling system Cat. 18187013 Invitrogen
Kit de columnas Amersham	Cy Scribe GFX Spin purification Kit, cat 27-9606-02. Amersham Biosciences
Kit de columnas Quiagen	QIAquick Spin Columns 50, QIAGEN, Catálogo 28106

Kit de PCR	Bio Tec Mol. MP001
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck 64271. Germany
NaCl	JT Baker 3624-05. Mallinckrodt Edo. México
NaHCO <sub>3</sub>	Técnica Química SA. México
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Técnica Química SA. México
NaOH	Merck 64271. Germany
N-lauril sarcocina	Sigma Chemical L5125. St Louis, USA
Tris base	Molecular Biology Certified IB 70142 IBI Scientific

## ANEXO 2. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

### Agar sangre de carnero 5%

Base de agar sangre	5 g
Sangre de carnero	100 mL
Agua destilada	1000 mL

Esterilizar en autoclave (15 minutos a 121°C y 15 lb). Cuando el medio tenga una temperatura aproximada de 65°C, agregar en condiciones de esterilidad, sangre de carnero, homogenizar y vaciar en cajas petri estériles desechables.

### Caldo brucella con glicerol al 15%

Caldo brucella	2.4 g
Agua destilada	100 mL
Glicerol	15 mL

Homogenizar y esterilizar en autoclave, alicuotar en criotubos.

### Solución salina 0.85%

NaCl	0.85 g
Agua destilada	100 mL

Esterilizar en autoclave. Alicuotar 1 mL en criotubos

### Solución stock EDTA 0.5 M pH 8

EDTA	180.1 g
NaOH	20 g
Agua destilada	1000 mL

Agregar el EDTA a 800 mL de agua desionizada y agitar vigorosamente con agitador magnético, agregar el NaOH y los 200 mL de agua desionizada restantes. Ajustar pH a 8.

#### Sarkocil 1%

N-lauril sarcocina	1 g
Agua desionizada	100 mL

.

#### Solución de GES

Isotiocianato de guanidina	59.1 g
Solución stock EDTA 0.5 M pH8	20 mL
Sarkocil 1%	5 mL
Agua desionizada	100 mL

#### Acetato de amonio 7.5 M

Acetato de amonio	58.4 g
Agua desionizada	100 mL

#### Etanol 70%

Etanol absoluto	70 mL
Agua destilada	30 mL

#### Etanol 95%

Etanol absoluto	95 mL
Agua destilada	5 mL

#### Solución stock Tris 1 M pH8

Tris base	121.1 g
Agua destilada	1000 mL

Ajustar el pH con HCl concentrado

#### Amortiguador TE

Solución stock Tris 1 M pH8	1 mL
Solución stock EDTA 1 M pH8	0.2 mL
Agua desionizada	98.2 mL

#### Amortiguador TAE 50X

Tris base	242 g
Acido acético glacial	57.1 mL
EDTA 0.5 M pH8	100 mL
Agua desionizada	1000 mL

#### Amortiguador TE

Solución stock Tris 1 M pH8	1 mL
Solución stock EDTA 1 M pH8	0.2 mL
Agua desionizada	98.2 mL

#### Amortiguador TAE 1X

Amortiguador TAE 50x	20 mL
Agua desionizada	1000 mL

#### Agarosa 1%

Agarosa	1 g
Amortiguador TAE 1X	100 mL

Disolver con calentamiento

#### Aminoalil dUTP

Aminoalil dUTP	1 mg
Agua desionizada estéril	319 $\mu$ l

Hacer alícuotas de 40  $\mu$ l y almacenar a -70°C. La concentración final de aminoalil es de 6 mM.

#### Aminoalil dUTP (solución de trabajo)

dATP 100 mM	1 $\mu$ l
dCTP 100 mM	1 $\mu$ l
dGTP 100 mM	1 $\mu$ l
dTTP 100 mM	1 $\mu$ l
Aminoalil dUTP 6 mM	40 $\mu$ l
Agua desionizada	26.8 mL

Mezclar y almacenar a  $-70^{\circ}\text{C}$

#### $\text{KPO}_4$ 1 M pH 8.5

$\text{K}_2\text{HPO}_4$	16.54 g
$\text{KHPO}_4$	0.680 g
Agua desionizada	100 mL

Ajustar pH a 8.5

#### Amortiguador de fosfatos para lavados de DNA marcado

$\text{KPO}_4$ 1 M pH 8.5	0.25 mL
Agua desionizada estéril	7.65 mL
Etanol 95%	42.12 mL

Homogenizar y almacenar en refrigeración.

#### Amortiguador de fosfatos para elución

$\text{K}_2\text{PO}_4$ 1 M pH 8.5	0.2 mL
Agua desionizada estéril	49.8 mL

#### Solución stock de $\text{NaHCO}_3$ 0.2 M pH9

$\text{NaHCO}_3$	0.84 g
Agua desionizada estéril	50 mL

#### Solución stock de Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub>

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.05 g
Agua desionizada estéril	50 mL

#### NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M. Solución de trabajo

Solución stock de NaHCO <sub>3</sub> 0.2 M pH9	25 mL
Solución stock de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2.75 mL
Agua desionizada estéril	22.25 mL

Alicuotar en viales de 5 mL y almacenar a -20°C

#### Solución stock SDS 10%

Dodecil sulfato de sodio	10 g
Agua desionizada estéril	100 mL

Calentar a 68°C y ajustar pH a 7.2

#### SDS 1% Solución stock

SDS 10 %	5 mL
Agua desionizada estéril	49.5 mL

#### Solución stock SSC 20X

NaCl	175.32 g
Citrato de sodio trihidratado	88.23 g
Agua desionizada	1000 mL

Ajustar pH a 7 y filtrar en membrana de 1.2 mm y esterilizar

#### BSA 1%

Albúmina bovina	0.5 g
Agua desionizada estéril	50 mL

Solución de prehibridación (SSC 5X, SDS 0.1% y BSA 1%)

SSC 20X solución stock	12.5 mL
SDS 10%	0.5 mL
BSA 1%	37 mL

SSC 2X

Solución stock SSC 20X	5 mL
Agua desionizada estéril	45 mL

SSC 2X y SDS 0.2%

Solución stock SSC 20X	5 mL
Solución stock SDS 10%	1 mL
Agua desionizada estéril	44 mL

SSC 0.2%

Solución stock SDS 10%	0.5 mL
Agua desionizada estéril	49.5 mL

SDS 1% Solución stock

SDS 10 %	5 mL
Agua desionizada estéril	49.5 mL

SDS 1% Solución stock

SDS 10 %	5 mL
Agua desionizada estéril	49.5 mL

### ANEXO 3. TABLA DE INICIADORES

#### Iniciadores de RAPD-PCR

Nombre	Secuencia
1254	5'-CCGCAGCAA-3'
1281	5'-AACGCGCAAC-3'

#### Iniciadores utilizados para PCR

Gen	Forward	Reverse	Tamaño del producto (pb)	Temperatura de alineamiento °C
NA/HP0053	'GACATTAGAAAAACACAAAATGCG	'GCTTGAAAGCTCTTAAATCGTTT	1204	56
HP0713	'ATCTCAATTATAAGATGAAAACC	'GTATTAAGTTTTGCTCTAAAACGCT	162	56
NA/HP1404	'ACAGAACGCATGGACGCA	'ACTTTTTTAACCCTAATGGCGTG	211	50
JHP0630/NA	'ATCAGTTTTAAATCATACGA	'TTTGAATTATTTTTAGAGC	795	50
NA/HP0967	'AAAACGCAGTGAATCTCTCAAAG	'AAACAATCTTGATAGCCGGCA	240	56
HP0025	'ATCAAGCGGTGCTTTTAGCC	'CTCCCGTCGCCTTTATCTATTC	583	56
HP1472	'AAGTTCAACAACGAGTTAAGAAGT	'GGGCATTTGGTTTTTTAAAAT	1989	56
NA/HP0424	'GATGAGAGCGGGAAGCCA	'AAAATTTCCATGTCTATTGCCCTT	1818	56
NA/HP0425	'TTAAAAGAAGCCAAACAGCACC	'TTTAAAATCCTCTTTTGCAAAGC	1170	56
NA/HP0790	'GACTCTATCCAACACATTACCCCA	'ATATCCACAGAAGCAAAACCTGAA	266	50
NA/HP0992	'ATTAGCTGAGGTTTTACTAGGTGC	'TATTACTTGCGGAAATTCTTTAGA	193	56

Gen	Forward	Reverse	Tamaño del producto (pb)	Temperatura de alineamiento °C
HP1409	'TGATGGCAAAAATAGATGTAGAAT	'GTGTAAAACAGGCGTGATAGTGT	1688	56
HP1410	'AAGATGTCAAAGAAAAGGATTTT	'CACACCTCTAGCGCTACC	1108	56
JHP0960/NA	'TCTAAAGACATGATGAAAGCCT	'TATTGGTTTGATAAAAATTCTAGTTGCT	157	56
NA/HP1426	'CTCGTTGGAAAGAAAGTTCAAGAA	'AAATAACCGATGAAAACTTCTCA	487	56
HP1499	'TCTAATCTCAATTATCCCAAAGTG	'TATTGGTATCCCCACTCTTCTTT	742	50
JHP0934/NA	'AAGAACAAGCCCAAGATACCC	'ACCCTTGCTCTCTAAAATCTCTTT	965	56
NA/HP1381	'AGCGAAATGGGGTATTTGGA	'AGGGTTTTATAGGCGTTGGAGA	180	50
NA/HP01405	'ATGCCTATGAATATAAGTGTAGAACC	'CAAACCACTTAAATTTTCCAAGTCTT	102	50
JHP0950/NA	'AAAGCGCATCAATTTCAAATCCTATT	'CTTTGAAGCACTAGATAATGGATTTT	91	50
JHP0951/NA	'CCTGGTCGACTGCTTGAAAAAAAATGTGCGTTTC	'CCACCTCGAGCACGGGTTATTGTTATTTGCACTAGAA	748	56
HP0530	'AAAATTTGGTTGGGGGTGTG	'TGCCTTATTTTTTGGATTCCACTTC	710	50
HP0544	'CAAGAGGTTCAAAGCGCC	'CCTTTATTTGTTGATACATTTGCC	2893	56
JHP0616/NA	'ATAATTCTGAAGAATGGCAAATGC	'AGCGTGTTGCAATAAGTTTATT	715	56
JHP0927/NA	'CCTGGTCGACTGCTTGAAAAAAAATGTGCGTTTC	'CCACCTCGAGCACGGGTTATTGTTATTTGCACTAGAA	1297	56
JHP0925/NA	'TCTAAAGACATGATGAAAGCCT	'TATTGGTTTGATAAAAATTCTAGTTGCT	133	56
JHP0961/NA	'AAAAGATGAGAATGGGTATTTTGC	'ATCGGCTTCTAAATCTCCCAA	137	56
HP0527	'CAACAAGATTCACCCCAAGATTT	'CCACCTTTGGGGCTTGTG	5735	50
NA/HP0674	'GATTTAAAGAATTTAAAGGAACG	'TTGACTTGACTCTTTCAACAAAGGA	507	58
JHP0940/NA	'TGCCAACCATTGATTTTACTTTTT	'ATCATCTGCGTTGTCATAAGGG	929	56

<b>Gen</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>	<b>Tamaño del producto (pb)</b>	<b>Temperatura de alineamiento °C</b>
<i>cag1</i>	'GGCTGACACAATCAATACAACCTGA	'TGCTTGAGATTTTTGAGTTTCGTT	298	50
<i>cag2</i>	'CAAAGAGGATTGAGTAGTGTCTCA	'CACACTAGCAGTCCATTTACTT	113	56
<i>cag3</i>	'GTTTAGAAAAGTAGCAACCGCTGT	'TTGTCGTATTTGAGCTTGTCTTT	1404	56
<i>cag4</i>	'GAGAAATGGATTGGTCTGACTTTG	'AAGCGCCATTAGGGTTGTGT	454	50
<i>cag5</i>	'AGTTTCATAGGGTTAATAGCGTTA	'CCACAGGCACTAAAGATTTATCA	2167	56
<i>virB11</i>	'GAGCTTTAAAAGAAGCGGCATT	'TCACACTGTTTGTGGTGGTTGA	916	56
<i>cag6</i>	'GCTCTCTTATGGGAAATGCAAAT	'TTGGGTTATCAATTTAGCTCTTTC	527	50
<i>cag7</i>	'CAACAAGATTCACCCCAAGATTT	'CCACCTTTGGGGCTTGTG	5737	50
<i>cag8</i>	'CGCAATAGAAGCAGCAGCAC	'CTTTTTAATCACACGCTCCAATTC	1480	56
<i>cag9</i>	'TGATTTGCCATTGTTTCAAAT	'AGATCCACCAACTCTTCCAACC	1516	56
<i>cag10</i>	'AAAATTTGGTTGGGGGTGTG	'TGCCTTATTTTTTGATTCCAATTC	710	50
<i>cag11</i>	'ATCATGGACCTAATCCGCTAA	'TAAATCAAATAGCCCATACCTATG	559	56
<i>cag12</i>	'ATCGGTGCGACAATTCTGTG	'TAACTTCTTCCTCTTTGGCTTGC	745	56
<i>cag13</i>	'AAAAGTTATTGAGAGTTTGAAGA	'CACTCCTTTTTCTTTCATGTATTT	529	50
<i>cag14</i>	'AAGGACTGATCATGGGAAAAA	'TTATTAGTGGTTTTGTCTGATTTG	289	56
<i>cag15</i>	'TTCAAACATTCTTTCAACAAACA	'AGAACCAATTTTGCCATTGA	298	50
<i>cag16</i>	'TGTTTGCCTTTGGAGTTTTG	'GTTCCTTTTTGCATAGTGGTTTTG	1024	56
<i>cag17</i>	'TCAAAAAAGTAGGTTCTGTGCTC	'CGATTGTTTGAGAATGCTGCA	838	56
<i>cag18</i>	'TTGCTCTTGTCTGTTTTGATGG	'TGATCTTACTTGATTGCCTTTCTT	667	50

<b>Gen</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>	<b>Tamaño del producto (pb)</b>	<b>Temperatura de alineamiento (°C)</b>
<i>cag19</i>	'GTAGTAATAACGCTTGAACCCGC	'GCAATGTTTCTTGCTGTCGTTT	1055	56
<i>cag20</i>	'TGCAGGATTCTTATCGGAAATTT	'CACGATTATTTTAGTTTGCACCCT	1072	56
<i>cag21</i>	'TGGTGTCTTATCATTGGCATGTT	'AAGATCGGTGGTAAAAATGATGAA	380	56
<i>cag22</i>	'ATGATGTCTTGACGATTTTGGATA	'TGTTTTGATTTTTTTGATCGAGC	747	56
<i>cag23</i>	'CAAGAGGTTCAAAGCGCC	'CCTTTATTTGTTGATACATTTGCC	2893	56
<i>cag24</i>	'TTCAGTTCGTATGGGTTAGCAAAT	'CCGCTTCACATGTAATCGTATAAA	544	56
<i>cag25</i>	'CCAATCCTTTAATGGCGGTC	'CCTCCGCTCTCGCCAATA	268	56
<i>cag26</i>	'CCTGATCAAAAACCAATCGTTG	'ATTCTTGGAGGCGTTGGTGTA	1422	50

#### ANEXO 4. DISEÑO DE MICROARREGLO DE TITULACIÓN

<p>26695 (Alexa 555) 2 pmol + J99 (Alexa 647) 2 pmol <b>TOTAL 4 pmol</b></p>	<p>26695 (Alexa 555) 3 pmol + J99 (Alexa 647) 3 pmol <b>TOTAL 6 pmol</b></p>
<p>26695 (Alexa 555) 4 pmol + J99 (Alexa 647) 4 pmol <b>TOTAL 8 pmol</b></p>	<p>26695 (Alexa 555) 5 pmol + J99 (Alexa 647) 5 pmol <b>TOTAL 10 pmol</b></p>
<p>26695 (Alexa 555) 6 pmol + J99 (Alexa 647) 6 pmol <b>TOTAL 12 pmol</b></p>	<p>26695 (Alexa 555) 7 pmol + J99 (Alexa 647) 7 pmol <b>TOTAL 14 pmol</b></p>
<p>26695 (Alexa 555) 8 pmol + J99 (Alexa 647) 8 pmol <b>TOTAL 16 pmol</b></p>	<p>26695 (Alexa 555) 9 pmol + J99 (Alexa 647) 9 pmol <b>TOTAL 18 pmol</b></p>
<p>26695 (Alexa 647) 9 pmol + J99 (Alexa 555) 9 pmol <b>TOTAL 18 pmol</b></p>	<p>26695 (Alexa 647) 8 pmol + J99 (Alexa 555) 8 pmol <b>TOTAL 16 pmol</b></p>
<p>26695 (Alexa 647) 7 pmol + J99 (Alexa 555) 7 pmol <b>TOTAL 14 pmol</b></p>	<p>26695 (Alexa 647) 6 pmol + J99 (Alexa 555) 6 pmol <b>TOTAL 12 pmol</b></p>
<p>26695 (Alexa 647) 5 pmol + J99 (Alexa 555) 5 pmol <b>TOTAL 10 pmol</b></p>	<p>26695 (Alexa 647) 4 pmol + J99 (Alexa 555) 4 pmol <b>TOTAL 8 pmol</b></p>
<p>26695 (Alexa 647) 3 pmol + J99 (Alexa 555) 3 pmol <b>TOTAL 6 pmol</b></p>	<p>26695 (Alexa 647) 2 pmol + J99 (Alexa 555) 2 pmol <b>TOTAL 4 pmol</b></p>

ANEXO 5. RESULTADOS DE 10 MUESTRAS EVALUADAS POR PCR, MICROARREGLOS DE PCR Y MICROARREGLOS DE OLIGOS. 1= Presente 0= Ausente

GEN	Clona 2006-406			Clona 2006-647			Clona 2006-781			Clona 2006-690			Clona 2006-791			
	PCR	Microarreglos		PCR	Microarreglos		PCR	Microarreglos		PCR	Microarreglos		PCR	Microarreglos		
		PCR	Oligos													
<i>cag1</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<i>cag2</i>	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>cag3</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>cag4</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
<i>cag5</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>virB11</i>	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1
<i>cag6</i>	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0
<i>cag7</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1
<i>cag8</i>	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0
<i>cag9</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
<i>cag10</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
<i>cag11</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>cag12</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
<i>cag13</i>	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
<i>cag14</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>cag15</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
<i>cag16</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
<i>cag17</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
<i>cag18</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>cag19</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>cag20</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>cag21</i>	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1
<i>cag22</i>	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1
<i>cag23</i>	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1
<i>cag24</i>	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1
<i>cag25</i>	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
<i>cag26</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

GEN	Clona 2007-078			Clona 2008-022			Clona 2006-814			Clona 2008-019			Clona 2008-029		
	PCR	Microarreglos		PCR	Microarreglos		PCR	Microarreglos		PCR	Microarreglos		PCR	Microarreglos	
		PCR	Oligos												
<i>cag1</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>cag2</i>	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
<i>cag3</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>cag4</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>cag5</i>	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>virB11</i>	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1
<i>cag6</i>	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
<i>cag7</i>	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
<i>cag8</i>	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0
<i>cag9</i>	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
<i>cag10</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>cag11</i>	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>cag12</i>	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>cag13</i>	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
<i>cag14</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>cag15</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>cag16</i>	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
<i>cag17</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>cag18</i>	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>cag19</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>cag20</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
<i>cag21</i>	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1
<i>cag22</i>	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
<i>cag23</i>	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1
<i>cag24</i>	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
<i>cag25</i>	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
<i>cag26</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

1= Presente 0= Ausente

GEN	Clona 2006-406			Clona 2006-647			Clona 2006-781			Clona 2006-690			Clona 2006-721		
	PCR	Microarreglos		PCR	Microarreglos		PCR	Microarreglos		PCR	Microarreglos		PCR	Microarreglos	
		PCR	Oligos												
HP0025	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
NA/HP0424	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
JHP0630/NA	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
HP0713	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
NA/HP0790	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
JHP0925/NA	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0
JHP0927/NA	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0
JHP0951/NA	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0
NA/HP1426	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
HP1472	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1
HP1499	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
NA/HP0674	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
JHP0940/NA	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
NA/HP1404	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1
NA/HP1381	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
NA/HP01405	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
JHP0950/NA	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
NA/HP0967	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NA/HP0992	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0
HP1410	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0
JHP0961/NA	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0
HP1409	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1
NA/HP0053	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0
NA/HP0425	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
JHP0616/NA	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0
JHP0934/NA	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
JHP0960/NA	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1

1=Presente 0=Ausente

GEN	Clona 2007-078			Clona 2008-022			Clona 2006-814			Clona 2008-019			Clona 2008-029			
	PCR	Microarreglos		PCR	Microarreglos		PCR	Microarreglos		PCR	Microarreglos		PCR	Microarreglos		
		PCR	Oligos													
HP0025	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	
NA/HP0424	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
JHP0630/NA	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
HP0713	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
NA/HP0790	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
JHP0925/NA	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
JHP0927/NA	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0
JHP0951/NA	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0
NA/HP1426	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
HP1472	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
HP1499	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
NA/HP0674	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
JHP0940/NA	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
NA/HP1404	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0
NA/HP1381	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1
NA/HP1405	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
JHP0950/NA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NA/HP0967	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
NA/HP0992	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
HP1410	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
JHP0961/NA	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0
HP1409	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1
NA/HP0053	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1
NA/HP0425	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
JHP0616/NA	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
JHP0934/NA	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1
JHP0960/NA	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0

1= Presente 0=Ausente

ANEXO 6. EJEMPLO DE CÁLCULO DE SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD, VPP Y VPN DE MICROARREGLOS CON SONDAS DE PRODUCTOS DE PCR Y CON SONDAS DE OLIGOS.

		PCR		
		Presentes	Ausentes	Total
Microarreglos (Productos de PCR)	Presentes	28 (a)	5 (b)	33
	Ausentes	13 (c)	8 (d)	21
	Total	41	13	54

		PCR		
		Presentes	Ausentes	Total
Microarreglos (Oligos)	Presentes	34 (a)	7 (b)	41
	Ausentes	7 (c)	6 (d)	13
	Total	41	13	54

	Microarreglos de PCR	Microarreglos de Oligos
Sensibilidad = $\frac{a}{a+c} \times 100$	68.3%	82.9%
Especificidad = $\frac{d}{b+d} \times 100$	61.5%	46.1%
VPP = $\frac{a}{a+b} \times 100$	84.9%	83%
VPN = $\frac{d}{c+d} \times 100$	38.1%	46%

## ANEXO 7. ABREVIATURAS

CagA	Proteína asociada a la citotoxina A
<i>cag</i> PAI	Isla de patogenicidad <i>cag</i> PAI
CG	Cáncer gástrico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GC	Gastritis crónica
IL	Interleucina
IS	Secuencia de inserción
LPS	Lipopolisacárido
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMN	Polimorfonucleares
RAPD	Amplificación de DNA polimórfico al azar
TNF	Factor de necrosis tumoral
UD	Úlcera duodenal
VPP	Valor predictivo positivo
VPN	Valor predictivo negativo
VacA	Citotoxina vacuolizante