



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**“Genotipificación de la Zona de Plasticidad (*jhp0940*,  
*jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*) de *Helicobacter pylori* en cepas  
de niños con enfermedad gastroduodenal del Instituto  
Nacional de Pediatría”**

TESIS  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:  
DAVID LEÓN CORTÉS

ASESORA: Dra. CAROLINA MARÍA ANTONIETA ROMO  
GONZÁLEZ

CO-ASESORA: M.C. ANDREA ÁNGELA BECERRIL OSNAYA

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2020



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Genotipificación de la Zona de Plasticidad (jhp0940, jhp0945, jhp0947 y jhp0949) de *Helicobacter pylori* en cepas de niños con enfermedad gastroduodenal del Instituto Nacional de Pediatría.

Que presenta el pasante: David León Cortés

Con número de cuenta: 312175139 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 28 de Enero de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Andrea Angela Becerril Osnaya	
VOCAL	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	
SECRETARIO	Q.F.B. Guadalupe Hernández Torres	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. David Ladislao Sánchez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

“La fuerza de tus pensamientos y el reflejo de tus acciones son la firma que dejas en este mundo”.

(Woody Allen)

“Hace doscientos cincuenta años un hombre humilde, llamado Leeuwenhoek, se asomó por vez primera a un mundo nuevo y misterioso, poblado por millares de diferentes especies de seres diminutos, algunos muy feroces y mortíferos, otros útiles y benéficos, e, incluso, muchos cuyo hallazgo ha sido más trascendental para la humanidad que el descubrimiento de cualquier continente o archipiélago.

[...]

Estos cazadores, en su lucha por registrar este microcosmos no vacilan en jugarse la vida. Sus aventuras están llenas de intentos fallidos, de errores y falsas esperanzas”

Paul de Kruif  
*Cazadores de microbios*

**Dedicatoria:**

Le dedico este trabajo a mi mamá, la mejor del mundo, que toda la vida ha estado a mi lado apoyándome en todo y siendo un ejemplo para mí; gracias a ella soy la persona soy ahora.

También a mi hermano Diego que es la persona más optimista e incondicional que conozco, toda la vida nos tendremos el uno al otro.

De corazón muchas gracias por todo a los dos.

De igual manera a mi familia, Angela González, Maricela, Alejandro, Nayeli, Rodrigo, Gerardo y Pilar; su compañía y apoyo a lo largo de los años ha sido fundamental en cada paso que doy.

## **Agradecimientos:**

Le agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, el lugar donde curse mi educación media superior y superior, mientras me formaba como persona y profesionista.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por abrirme sus puertas y regalarme una de las mejores etapas de mi vida.

Al Instituto Nacional de Pediatría y al Laboratorio de Bacteriología Experimental, por permitirme realizar mi servicio social y trabajo de tesis, además de ser mi primer acercamiento con el mundo profesional. Al proyecto No. 024/2019. Financiado por fondo federales del Instituto Nacional de Pediatría.

A los profesores de los cuales tuve la oportunidad de aprender a lo largo de la carrera, en especial a los pertenecientes al área de microbiología, Jonathan, David, Verónica, Guadalupe Avilés, Guadalupe Hernández, Heidi, Sandra y don Martín. Y un especial agradecimiento a la maestra Andrea Becerril, que mediante sus clases hizo que me acercara y cautivara por la bacteriología, al mismo tiempo que siempre me ha apoyado para continuar con mi formación profesional.

A mis amigos de la preparatoria, Ricardo, Marcos y Eli, que a pesar de las distancias y tiempos han estado presentes a lo largo de estos años.

A Frida y Jocelyn; las mejores amigas que cualquiera pudiese pedir y además unas grandes profesionistas.

A Luis Morelia, que a lo largo de estos años te has convertido en uno de mis mejores amigos.

A todos los amigos que tuve el placer de conocer a lo largo de la carrera, Omar, Moisés, Diana Andrea, Ángel Pino, Eda, Ariana, Pato, Wendy, Diana Trejo, Valeria, Carlos, Aremi y Jerel.

A Miguel Ángel, Mariana y Cesar, amigos que conocí en la recta final de la carrera, y que siempre hicieron un gran ambiente dentro y fuera del laboratorio.

Por último, pero más importante a la Dra. Carolina Romo por darme las herramientas, consejos y total apoyo para realizar este trabajo, es un ejemplo de profesionista e investigadora.

# INDICE

---

---

<b>1. Índice de tablas</b>	<b>2</b>
<b>2. Índice de figuras</b>	<b>3</b>
<b>3. Resumen</b>	<b>5</b>
<b>4. Introducción</b>	<b>6</b>
<b>5. Marco teórico</b>	<b>8</b>
<b>5.1. Antecedentes históricos</b>	<b>8</b>
<b>5.2. Clasificación taxonómica</b>	<b>9</b>
<b>5.3. Características microbiológicas y cultivo.</b>	<b>10</b>
5.3.1. Características microbiológicas	10
5.3.2. Cultivo.	11
<b>5.4. Epidemiología</b>	<b>12</b>
5.4.1. Prevalencia en niños	13
5.4.2. Prevalencia en México.	14
5.4.3. Transmisión	15
5.4.4. Colonización	16
5.4.5. Adherencia	17
<b>5.5. Historia natural de la enfermedad e infección.</b>	<b>18</b>
5.5.1. Manifestaciones clínicas	18
<b>5.6. Factores de virulencia</b>	<b>21</b>
5.6.1. Proteínas de membrana externa	21
5.6.2. VacA	22
5.6.3. CagA y la isla de patogenicidad <i>cagPAI</i>	23
5.6.4. DupA	24
<b>5.7. Evasión de la respuesta inmune</b>	<b>24</b>
<b>5.8. Zona de plasticidad</b>	<b>25</b>
5.8.1. Genoma de <i>Helicobacter pylori</i>	25
5.8.2. Zona de plasticidad (ZP)	28

5.8.3. Genes de la ZP asociados a enfermedad	30
<b>6. Justificación</b>	<b>36</b>
<b>7. Pregunta de investigación</b>	<b>36</b>
<b>8. Hipótesis.</b>	<b>36</b>
<b>9. Objetivos</b>	<b>37</b>
9.1. General	37
9.2. Particulares	37
<b>10. Metodología</b>	<b>38</b>
<b>11. Resultados</b>	<b>47</b>
<b>12. Análisis de resultados</b>	<b>54</b>
<b>13. Conclusiones</b>	<b>57</b>
<b>14. Referencias</b>	<b>58</b>
<b>15. Glosario de abreviaturas</b>	<b>64</b>

## 1. ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de <i>H. pylori</i> .	10
<b>Tabla 2.</b> Resumen de los genes <i>jhp0945</i> , <i>jhp0947</i> y <i>jhp0949</i> y su relación con enfermedad. CG: Cáncer gástrico, UD: Ulcera duodenal, G: Gastritis crónica.	34
<b>Tabla 3.</b> Primers utilizados para la identificación de <i>H. pylori</i> en biopsias gástricas mediante PCR punto final	40
<b>Tabla 4.</b> Preparación de la mezcla de reacción para la PCR tanto para <i>ureC</i> como <i>16SRNA<sub>r</sub></i> .	40
<b>Tabla 5.</b> Condiciones de amplificación para ambos genes.	41
<b>Tabla 6.</b> Primers utilizados para la genotipificación de los genes de <i>jhp0940</i> , <i>jhp0945</i> , <i>jhp0947</i> y <i>jhp0949</i> en cepas de <i>H. pylori</i> .	44
<b>Tabla 7.</b> Preparación de la mezcla de reacción de PCR para los genes <i>jhp0940</i> , <i>jhp0945</i> , <i>jhp0947</i> y <i>jhp0949</i> .	44



<b>Tabla 8.</b> Condiciones de amplificación para los genes de la ZP.-----	45
<b>Tabla 9.</b> Resultados generales de la genotipificación de los genes de la ZP en cepas de niños con manifestaciones gastroduodenales del INP. Verde: Presencia del gen. Rojo: Ausencia del gen. A es antro, C cuerpo e I incisura. -----	49
<b>Tabla 10.</b> Patrón genotípico de los genes <i>jhp0940</i> , <i>jhp0945</i> , <i>jhp0947</i> y <i>jhp0949</i> , entre las regiones del estómago de los 13 pacientes.-----	52

## 2. ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Fotografía de Warren (derecha) y Marshall (izquierda), realizada en Julio de 1984 (Pajares et al., 2006).-----	8
<b>Figura 2.</b> Morfología de <i>Helicobacter pylori</i> (Reshetnyak et al., 2017).-----	10
<b>Figura 3.</b> Crecimiento de <i>Helicobacter pylori</i> , en Agar Sangre de carnero. A. se observa el crecimiento de primo aislamiento de una biopsia gástrica. B. <i>H. pylori</i> sembrado por dilución americana después de diversos pases. Fotografías tomadas en el Laboratorio de Bacteriología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría. -----	11
<b>Figura 4.</b> Mapa de la prevalencia global de <i>Helicobacter pylori</i> . (Hooi et al., 2017). -----	12
<b>Figura 5.</b> Mapa de la prevalencia global de <i>Helicobacter pylori</i> en niños (Ortíz-Princz et al. 2016). -----	13
<b>Figura 6.</b> Seroprevalencia (■) y magnitud de la respuesta IgG anti <i>H. pylori</i> (□) en 11,650 sujetos mexicanos, por edad (Torres et al. 1998). -----	14
<b>Figura 7.</b> Resumen de los eventos que conducen a la colonización exitosa de <i>H. pylori</i> (Talebi Bezmin Abadi 2017). -----	16
<b>Figura 8.</b> Eventos que causan inflamación en la infección crónica por <i>H. pylori</i> (Talebi Bezmin Abadi 2017). -----	17
<b>Figura 9.</b> Resultados fisiopatológicos y clínicos de la infección crónica por <i>H. pylori</i> . La infección se asocia con 3 fenotipos potenciales, y se ilustran las características histológicas, fisiológicas y clínicas de cada uno, imagen obtenida de (Amieva et al., 2008). -----	19
<b>Figura 10.</b> Historia natural de la infección por <i>H. pylori</i> (Romo-González et al., 2010). ---	20
<b>Figura 11.</b> La zona de plasticidad de la cepa J99 ( <i>jhp0917-jhp0951</i> ). La ZP está compuesta de fragmentos TnPZ: tipo 1 ( <i>jhp0917-jhp0924</i> ), tipo 1b ( <i>jhp0944-jhp0951</i> ; <i>jhp0925</i> , <i>jhp0926</i> , potencialmente parte de <i>jhp0927</i> ) y el tipo 2 ( <i>jhp0943-jhp0930</i> ). Los	

cuadros azules y verde indican ORF exclusivos de J99 que no contiene la cepa 26695 y los cuadros negros indican ORF encontrados en ambas cepas (Romo-González et al., 2018). -----29

**Figura 12.** Identificación de ICEHptfs o ZP basada en el contenido de G + C de la cepa 26.695. En esta cepa hay tres ubicaciones que tienen una relación G + C significativamente baja, dos de las cuales son ICEHptfs y una es cagPAI (Waskito et al., 2018). -----30

**Figura 13.** Frecuencia de la presencia de los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* entre los aislados de *H. pylori* de diferentes regiones geográficas (Romo-González et al., 2018). -----32

**Figura 14.** Diagrama general del procesamiento de una muestra de biopsia gástrica, diagnóstico de *Helicobacter pylori* por PCR y cultivo. -----42

**Figura 15.** Diagrama general de la genotipificación de los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*, en DNA de cepas de *H. pylori*. -----46

**Figura 16.** Frecuencia de *H. pylori* obtenido por cultivo y PCR en 105 pacientes -----47

**Figura 17.** Crecimiento de *H. pylori* en Agar Sangre (5% de sangre de carnero). Primo aislamiento del cultivo de una biopsia gástrica, después de 5 días de incubación a 37°C, con 9% de CO<sub>2</sub>.-----47

**Figura 18.** Pruebas bioquímicas de catalasa y ureasa rápida. Cepas control de *H. pylori* (J99 y 26695) y un paciente, con resultado positivo a ambas pruebas. -----48

**Figura 19.** Reacción de PCR punto final de los genes *ureC* y 16SRNAr. El gen *ureC* amplifica un producto de 294bp y 16S RNAr de 522bp; diagnóstico de dos pacientes, en tres regiones del estómago, A: antro, C: cuerpo e I: Incisura. C+: control positivo, cepa ATCC J99; B: blanco. Paciente 1, negativo a *H. pylori*. Paciente 2, positivo a *H. pylori*. Gel de agarosa al 1.5%. Marcador de peso molecular de 100bp. -----48

**Figura 20.** Reacción de PCR punto final de los genes de la ZP. La figura muestra un gel de agarosa con la amplificación de cada uno de los genes en la cepa control positivo, cepa J99 y no en la cepa 26695 control negativo y en B el blanco de reacción: *jhp0940* muestra un producto de amplificación de 591bp, *jhp0945* de 1028bp, *jhp0947* de 511bp, *jhp0949a* de 787bp y *jhp0949b* de 250bp. Gel de agarosa al 1.5%. Marcador de peso molecular de 100bp.-----50

**Figura 21.** Frecuencia de *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*, entre los pacientes.-----50

**Figura 22.** Frecuencia de *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*, entre las cepas. -----51

### 3. RESUMEN

---

**Antecedentes.** La zona de plasticidad (ZP) de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es una región hipervariable dentro de su genoma la cual contribuye a su alta diversidad genética. Entre los genes que componen la ZP se encuentran *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* los cuales se han asociado con enfermedad gastroduodenal severa como úlcera duodenal y cáncer gástrico. **Objetivo:** Determinar la frecuencia de los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* en cepas de *H. pylori* aisladas de niños con enfermedad gastroduodenal del Instituto Nacional de Pediatría. **Metodología:** Se estudiaron 105 niños con manifestaciones clínicas gastroduodenales los cuales fueron sujetos a biopsia gástrica (BG) de tres regiones del estómago (antro, cuerpo e incisura), previo consentimiento informado y protocolo aprobado por el comité de investigación y ética del INP, No. de registro No. 024/2019. De cada región se realizó cultivo y se extrajo DNA para el diagnóstico por PCR utilizando los genes *16sRNA* (522 pb) y *ureC* (294 pb). En las cepas aisladas se extrajo DNA y mediante PCR punto final se identificaron los genes *jhp0940* (591bp), *jhp0945* (1028bp), *jhp0947* (611bp) y *jhp0949* (787bp y 300bp). **Resultados.** De 105 pacientes, 47 (44.8%) fueron positivos a *H. pylori* por cultivo y/o PCR en al menos una región del estómago; 13 pacientes (12.4%) fueron positivos tanto por cultivo como PCR y 34 (32.4%) solo por PCR. De los 13 pacientes se aislaron 29 cepas de estas ninguna tuvo el gen *jhp0940*; 10 (34.48%) tuvieron *jhp0945*, 11 (37.92%) *jhp0947* y 17 (58.62%) el *jhp0949*. La frecuencia de *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* entre los 13 pacientes fue de 38.5%; 46.2% y 53.8% respectivamente, en al menos una región del estómago y ninguno de los pacientes presento a *jhp0940* entre sus cepas. Respecto al patrón genómico de *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* en las cepas de los pacientes este se distribuyó de la siguiente manera: 1 (7.7%) presentó los tres genes; 2 (15.4%) no presentaron ninguno de estos genes y 10 (76.9%), tuvieron ausencia de uno o dos genes. De acuerdo a la región del estómago: 10 (76.9%) pacientes presentaron en sus cepas un solo patrón genotípico y 3 (23.1%) un genotipo mixto. **Conclusiones.** Entre las cepas de los pacientes *jhp0949* es el gen más frecuente y el gen *jhp0940* estuvo ausente; el patrón genómico de *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* es heterogéneo, lo cual nos habla de la diversidad genética que presentan estas cepas en estos niños.

## 4. INTRODUCCIÓN

---

El microambiente gástrico es hostil a microorganismos comensales debido a su baja presión parcial de oxígeno, y la presencia de altas concentraciones de ácido gástrico y enzimas digestivas. *H. pylori* es una bacteria que cuyo hábitat es el estómago la cual ha evolucionado para sobrevivir en este entorno. Sus adaptaciones a estas condiciones incluyen la capacidad de tolerar un entorno microaerófilo, la expresión de una enzima ureasa que modula el microambiente bacteriano al elevar el pH y los flagelos que proporcionan movilidad, lo que permite que *H. pylori* acceda a la profundidad de la mucosa gástrica, utilizando de ese modo las defensas de la mucosa del huésped para desarrollar un nicho de supervivencia (Burkitt et al., 2017).

*H. pylori* muestra una excepcional variabilidad en su genoma. Esta diversidad genética es necesaria para la colonización persistente en el estómago, donde es probable que se encuentren diferentes microentornos y condiciones cambiantes. (Armitano et al., 2013). Para lograr esta adaptación, el papel de ciertos genes es importante; la posesión de varios genes de virulencia como *cagA*, *cagPAI*, *vacA*, *dupA* y adhesinas, que además de ayudar en la colonización y supervivencia de *H. pylori*, se han asociado a patologías causadas por esta bacteria, dentro de estos genes asociados a enfermedad actualmente se encuentran otros genes putativos denominados *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*.

Las bacterias que tienen nichos restringidos tienen la peculiaridad de contener un genoma pequeño y compacto; el de *H. pylori* es de aproximadamente 1.6 Mb, más pequeño algunos genomas secuenciados de bacterias Gram negativas. Mediante la secuenciación de cepas de *H. pylori*, se han mostrado que algunos genes están presentes en unas cepas y ausentes en otras; estos son llamados genes específicos de cepa y equivalen a 6-7% del total del genoma; la mayor parte están localizados en regiones hipervariables, llamadas zonas de plasticidad (Romo-González et al., 2010).

La zona de plasticidad (ZP) de *H. pylori* es una región genómica que alberga genes que pueden intercambiarse entre cepas, lo que contribuye en gran medida a la

diversidad genética de esta bacteria; la presencia o ausencia de estos genes específicos de cepa refleja la adaptación y co-evolución de este patógeno dentro de su huésped. Entre los genes presentes en la ZP se encuentran, *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* y han ganado atención debido a su asociación con la enfermedad gastroduodenal (Romo-González et al., 2018), el presente trabajo estuvo enfocado en determinar la frecuencia de estos genes en cepas de *H. pylori* aisladas de niños con manifestaciones gastroduodenales del servicio de gastroenterología del Instituto Nacional de Pediatría.

## 5. MARCO TEÓRICO

---

### 5.1. Antecedentes históricos

---

En 1979, Robín Warren, un patólogo australiano de Perth, observó la presencia de bacterias curvadas en biopsias gástricas sometidas a exámenes histológicos. Estos microorganismos principalmente se encontraban en la capa mucosa que recubre el epitelio gástrico. Warren menciona que microorganismos similares ya habían sido encontrados y descritos en tejido gástrico en Europa en el siglo XIX, pero fueron ignorados por la imposibilidad de aislamiento (Cava et al., 2003).

En 1981 un profesor de medicina interna llamado Barry Marshall estuvo interesado en las observaciones de Warren; colaboraron para encontrar la técnica de cultivo adecuado para favorecer el crecimiento de la “nueva bacteria”. Por su parecido con *Campylobacter* eligieron el medio y los tiempos de incubación utilizados para esta bacteria (48 horas en anaerobiosis). Con este método fracasaron los primeros intentos. Sin embargo, a la vuelta de vacaciones de pascua, una placa de cultivo no había sido retirada de la

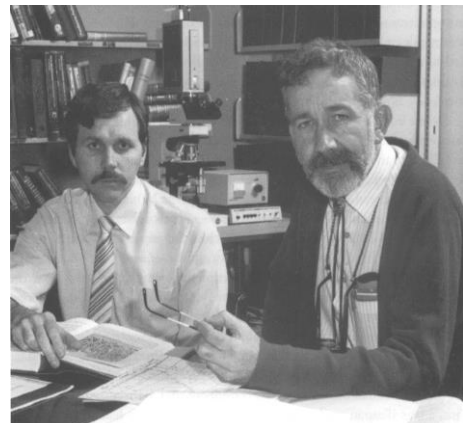


Figura 1. Fotografía de Warren (derecha) y Marshall (izquierda), realizada en Julio de 1984 (Pajares et al., 2006).

estufa. Al observar con atención la placa, comprueba la existencia de minúsculas colonias transparentes (Pajares et al., 2006). En 1984, Barry J. Marshall y J. Robin Warren escribieron juntos a *The Lancet*, para relatar que los bacilos curvados o espirales encontrados en 58 de 100 pacientes eran Gram negativos, flagelados y microaerófilos; se creía que se trataba de una nueva especie del género *Campylobacter* (Cava et al., 2003).

En 1984 la mayor parte de la comunidad científica aseguraba que la bacteria encontrada no era patógena; así que Marshall se inoculó con una suspensión de la bacteria aislada previamente de un paciente. Durante los seis primeros días, no

experimentó síntoma alguno, al séptimo día, le despertaron intensas; náuseas y vómitos. Al tomar una biopsia se observó por el endoscopio gastritis y en el cultivo crecieron las mismas colonias observadas previamente en los cultivos, cumpliendo así los postulados de Koch (Pajares et al., 2006).

Cuando Warren y Marshall anunciaron sus hallazgos, aún era una creencia en la enseñanza y práctica médica que los factores de estrés y estilo de vida eran las principales causas de la enfermedad de úlcera péptica. Sin embargo, estos investigadores refutaron ese dogma, y pronto quedó claro que una bacteria era la causante de la gastritis crónica. Inicialmente fue llamada “*Campylobacter pyloridis*” y hoy en día es llamado *Helicobacter pylori*. Este hallazgo revolucionó la gastroenterología, y los llevo a recibir en el 2005 el premio nobel de medicina, por comprobar que esta bacteria puede causar gastritis y estar asociada con el desarrollo de úlcera duodenal y cáncer gástrico (Ahmed, N., 2005).

## **5.2. Clasificación taxonómica**

---

El microorganismo conocido hoy como *H. pylori* fue introducido en la comunidad científica en 1982, Skirrow, un microbiólogo en el campo de *Campylobacter*, incluyó en este género al nuevo microorganismo, por lo que se le denominó *Campylobacter pyloridis*, el éxito del cultivo de la bacteria dio lugar a la aceptación de este nombre que posteriormente fue corregido a *Campylobacter pylori*. Estudios posteriores a nivel genético, resultó en la formación de un nuevo género denominado “*Helicobacter*” el análisis de la secuencia del gen *16SrRNA* condujo a la diferenciación de *H. pylori* a partir de especies de *Campylobacter*, esta herramienta ha sido importante en la clasificación de otros miembros de este género. Otras características importantes que diferencian las especies de *Helicobacter* de especies de *Campylobacter* incluyen la posesión de flagelos envainada, el perfil de ácidos grasos únicos, la falta de quinonas respiratorias, la enzima ureasa activa, la temperatura de crecimiento, un perfil de proteínas distinta, entre otras (Windsor et al., 2000).

La clasificación taxonómica para *H. pylori* es la siguiente:

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *H. pylori*.

Dominio:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Epsilonproteobacteria
Orden:	Campylobacterales
Familia:	Helicobacteraceae
Género:	<i>Helicobacter</i>
Especie:	<i>Helicobacter pylori</i>

### 5.3. Características microbiológicas y cultivo.

#### 5.3.1. Características microbiológicas

*H. pylori* es un bacilo Gram negativo, curvado y microaerófilico que se encuentra en la mucosa gástrica del estómago humano, tiene una morfología espiral en forma de sacacorchos cuando se encuentra en la mucosa gástrica y menos espiral cuando crece en medios de cultivo, esta forma se puede perder en los cultivos más viejos o sometidos a situaciones no favorables para su crecimiento adoptando forma cocoide. Presenta un tamaño de 0,5 a 1,0 micras de ancho y de 3 micras de largo. Tiene de 2 a 6 flagelos polares, para su movilidad y penetración de la capa mucosa gástrica; que están recubiertos por una vaina de estructura lipídica, igual que la membrana externa, que tiene la misión de proteger a los flagelos de su degradación en el medio ácido (Agudo, 2010).



Figura 2. Morfología de *Helicobacter pylori* (Reshetnyak et al., 2017).

*H. pylori* es una bacteria catalasa (+), oxidasa (+), y su característica principal es su alta actividad de la enzima ureasa; tiene la capacidad de sobrevivir a un rango

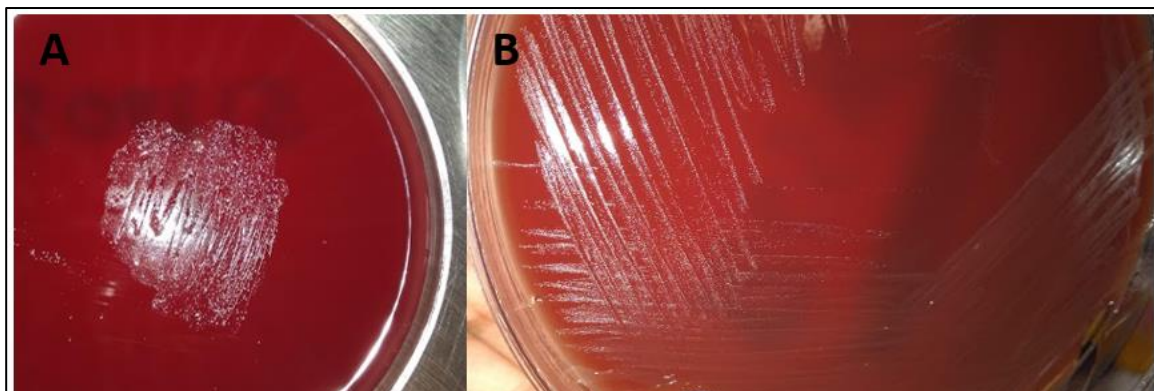


de pH entre 4.0 y 8.0 en ausencia de urea y en presencia de urea puede sobrevivir a un pH hasta de 2.5. La enzima ureasa de *H. pylori* hidroliza la urea a amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) y dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), la generación de amoníaco neutraliza el pH ácido, lo que permite elevar el pH en el microambiente (Dunne et al., 2014).

### 5.3.2. Cultivo.

El cultivo de esta bacteria es un desafío debido a la naturaleza fastidiosa de la bacteria, con requisitos particulares de crecimiento del medio y la atmósfera. Los medios enriquecidos como Agar Sangre o Agar Chocolate son ideales para su crecimiento; también se pueden utilizar Agar Brucella, Columbia Wilkins-Chalgren, infusión de cerebro-corazón o bases de Agar Trypticase, complementadas con sangre de oveja o caballo (Lopes et al., 2014).

*H. pylori* es microaerófilico; estos microorganismos requieren de bajas concentraciones de oxígeno para crecer, ya que utilizan a esta molécula como aceptor final de electrones, pero no toleran la concentración normal de  $\text{O}_2$  en el aire atmosférico, esto es consecuencia de su susceptibilidad a los radicales superóxidos (Negroni, 2009). Así que para un crecimiento óptimo se requieren niveles de  $\text{O}_2$  del 2 a 5%, la necesidad adicional de 5 a 10% de  $\text{CO}_2$  y alta humedad. Las condiciones microaerófilas de crecimiento son, 85% de  $\text{N}_2$ , 10% de  $\text{CO}_2$  y 5% de  $\text{O}_2$ . Y a una temperatura de 34 a 40 ° C, con un óptimo de 37 ° C (Kusters et al., 2006).



**Figura 3. Crecimiento de *Helicobacter pylori*, en Agar Sangre de carnero.** A. se observa el crecimiento de primo aislamiento de una biopsia gástrica. B. *H. pylori* sembrado por dilución americana después de diversos pases. Fotografías tomadas en el Laboratorio de Bacteriología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría.

## 5.4. Epidemiología

---

La prevalencia global de la infección por *H. pylori* en humanos se estima en un 50%. La asociación con el humano es muy antigua, estudios filogenéticos sugieren que las cepas de esta bacteria han evolucionado conjuntamente con las poblaciones humanas desde antes de la migración de los primeros humanos desde África, hace 58,000 años. (Burkitt et al., 2017).

En 2017 Hooi y colaboradores, publicaron una revisión sistémica y metaanálisis, sobre la prevalencia global de la bacteria, reuniendo datos de 62 países (incluido México) en 184 artículos revisados, obteniendo datos actualizados sobre la prevalencia de esta bacteria hasta la fecha. Esta revisión estima que en 2015 aproximadamente 4.400 millones de personas en todo el mundo eran positivas. Teniendo una amplia variación en la prevalencia entre regiones y países. Se encontraron prevalencias altas en África (79.1%), América Latina y el Caribe (63.4%) y Asia (54.7%). Por el contrario, se han reportado prevalencias bajas en América del Norte (37,1%) y Oceanía (24,4%) (Figura 4.) (Hooi et al., 2017).

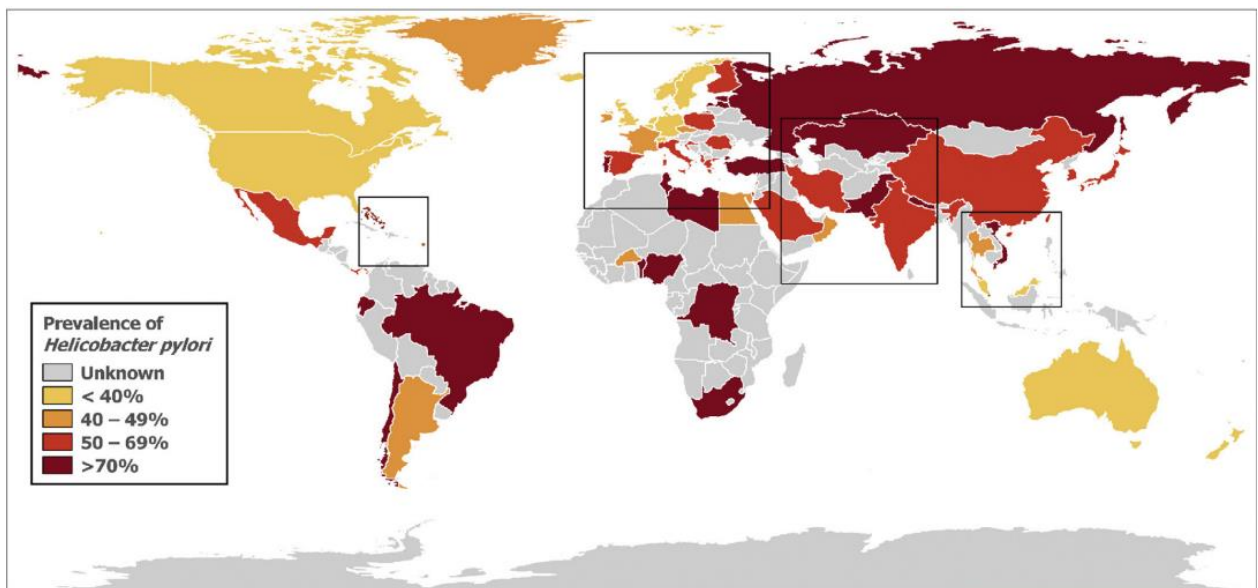


Figura 4. Mapa de la prevalencia global de *Helicobacter pylori*. (Hooi et al., 2017).

A comienzos del siglo XXI, la prevalencia de *H. pylori* ha disminuido en los países altamente industrializados del mundo occidental, mientras que se ha estancado a un alto nivel en los países en desarrollo y recientemente industrializados. Estas diferencias en la prevalencia probablemente reflejan el nivel de urbanización, saneamiento, acceso a agua limpia y un estado socioeconómico variado (Hooi et al., 2017).

#### 5.4.1. Prevalencia en niños

En 2016 el grupo de Ortiz-Princz y colaboradores, realizaron una revisión sobre la prevalencia de *H. pylori* en niños entre 2010-2015 encontrando una prevalencia variable relacionada con el estado socioeconómico. En África, los datos de prevalencia en niños varían de 40% a 80%, en Bangladesh de 50% a 60%, en India 22%, en Taiwán 12%, en Australia 15% y en Turquía 50%. En Hong Kong, la prevalencia en adolescentes es del 13%. En algunos países del continente americano, los datos son: Canadá 7%, Guatemala y México 30% - 50%, Brasil 30% y Chile 36%. La prevalencia mundial de la infección por *H. pylori* en niños (0-18 años) se representa en la Figura 5 (Ortiz-Princz et al., 2016).

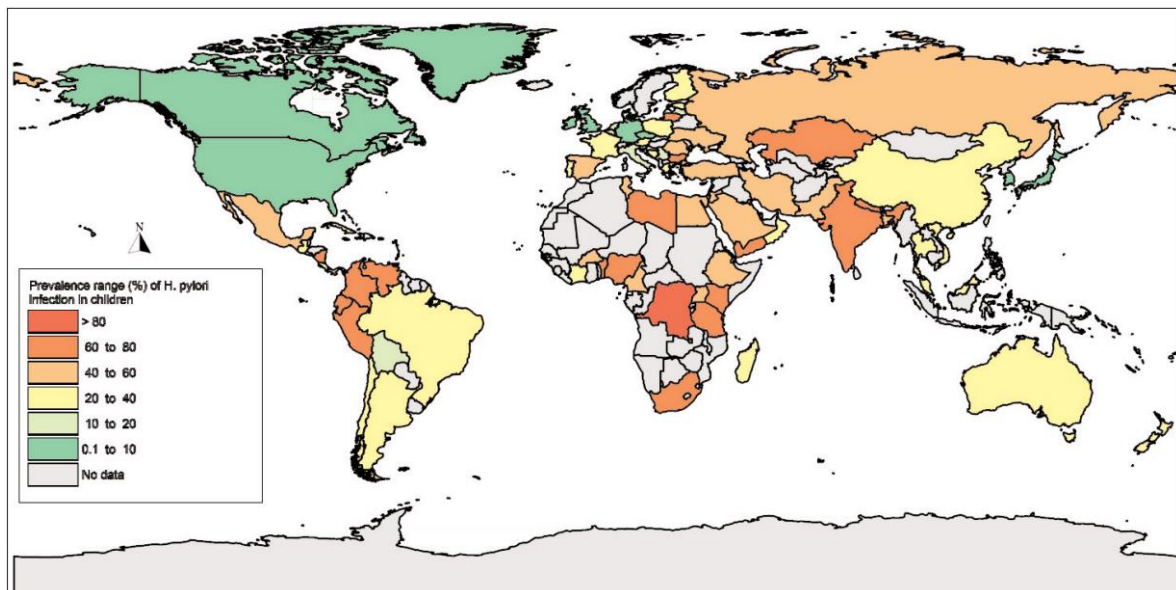


Figura 5. Mapa de la prevalencia global de *Helicobacter pylori* en niños (Ortiz-Princz et al. 2016).

Los factores de riesgo más comunes de infección por *H. pylori* en niños son las malas condiciones socioeconómicas e higiénicas y la alta densidad de población. La presencia de 3 o más niños en la familia, además de la falta de agua corriente y saneamiento, aumenta el riesgo de infección, además los niños que asisten a guarderías son más propensos a infecciones. En las últimas décadas, el estudio de la tasa de infección ha mostrado una disminución en el número de personas infectadas, esto está relacionado con la mejora de las condiciones socioeconómicas y el tratamiento antibiótico frecuente administrado para curar otras enfermedades. (Iwanczak et al., 2017). Es importante resaltar que la prevalencia de *H. pylori* depende del método de detección utilizado (Ortíz-Princz et al., 2016).

#### 5.4.2. Prevalencia en México.

En 1998 Torres y colaboradores dirigieron el estudio más amplio reportado en México hasta la fecha, para determinar la prevalencia seroepidemiológica de *H. pylori*, analizaron una muestra de 11,605 sueros de los cuales 7720 (66%) fueron seropositivos. En el estudio se observó que, a la edad de 1 año, el 20% estaban infectados; la seroprevalencia aumentó en la primera década y, a los 10 años, el 50% de los niños ya estaban infectados. Más del 80% de los adultos fueron positivos a los 25 años, y la seroprevalencia se mantuvo casi sin cambios al aumentar la edad (Torres et al., 1998).

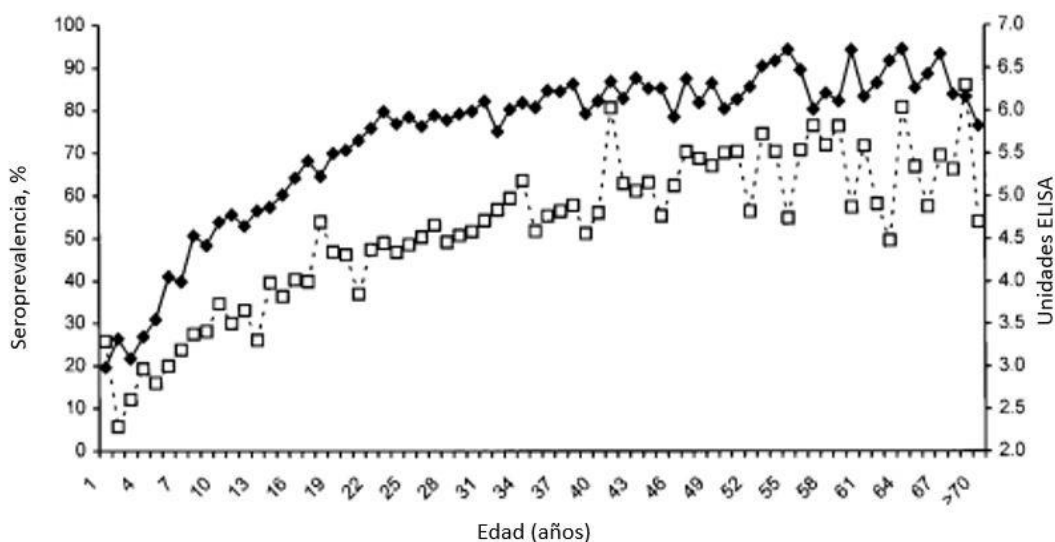


Figura 6. Seroprevalencia (■) y magnitud de la respuesta IgG anti *H. pylori* (□) en 11,650 sujetos mexicanos, por edad (Torres et al. 1998).

---

### 5.4.3. Transmisión

---

El alto número de personas colonizadas alrededor del mundo demuestra que *H. pylori* tiene una gran cantidad de estrategias de transmisión. La infección generalmente se contrae durante la infancia o la adolescencia, con informes casos positivos en los primeros meses de vida y tiende a persistir durante toda la vida a menos que se trate (Vanderpas et al., 2014). La transmisión de madre a hijo y de hermano a hermano parece más probable ya que los estudios longitudinales han demostrado que el riesgo de contraer la infección está altamente correlacionado con el estado de la madre y los hermanos, además está relacionado con condiciones de hacinamiento en el hogar y de la comunidad donde se vive. Se han sugerido fuentes de *H. pylori* potencialmente infecciosas, en base al hallazgo de DNA en una variedad de lugares, incluidas las aguas residuales y las fuentes de agua; sin embargo, el aislamiento de este bacilo viable de estas fuentes es extremadamente raro (Amieva et al., 2008).

Este microorganismo es frágil fuera del estómago porque es rápidamente destruido por una mayor tensión de oxígeno e incluso por la luz así que los modos de transmisión más probables parecen ser situaciones en las que el contenido gástrico se puede transferir rápidamente de persona a persona, como la transmisión gástrica-oral en asociación con gastroenteritis con vómitos, la transmisión oral-oral ya que *H. pylori* puede sobrevivir por períodos cortos después de que el contenido gástrico haya fluido hacia la cavidad oral y la transmisión fecal-oral puede ser posible en condiciones en las que la bacteria sobrevive al tránsito a través del tracto gastrointestinal inferior, lo cual es poco común en personas sanas. (Amieva et al., 2008).

#### 5.4.4. Colonización

El estómago humano consiste en una gran variedad de barreras físicas y químicas que proporcionan un entorno desfavorable para todo tipo de microorganismos. La colonización gástrica exitosa por cualquier microorganismo en este ambiente se debe a la existencia de varias habilidades para evitar condiciones ácidas hostiles y la capa mucosa viscosa (Talebi Bezmin Abadi, 2017).

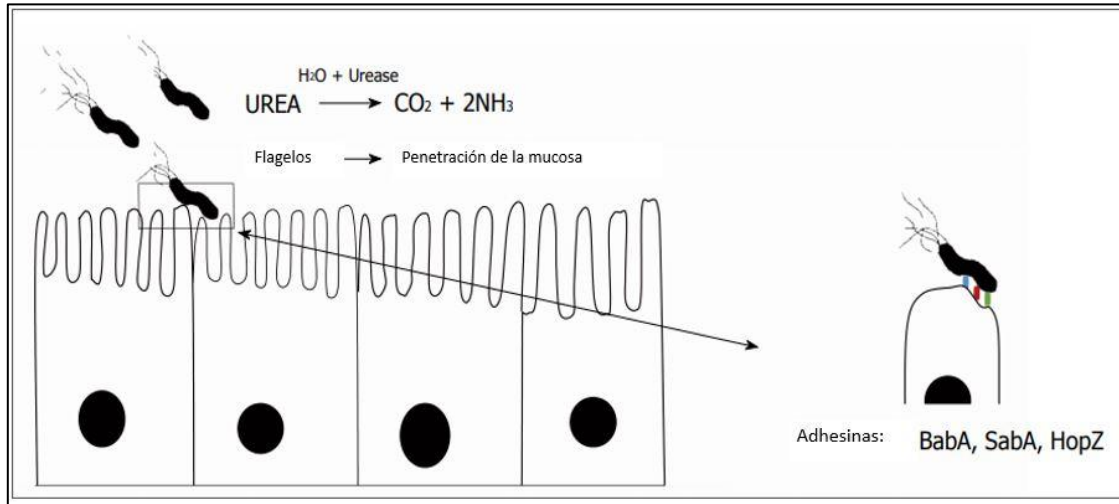


Figura 7. Resumen de los eventos que conducen a la colonización exitosa de *H. pylori* (Talebi Bezmin Abadi 2017).

La acidez del estómago (pH 1-2) es el primer peligro que amenaza la supervivencia bacteriana, ya que no es una bacteria acidófila, su crecimiento está limitado a pH neutro (5.5 a 8), pero tiene la capacidad de sobrevivir a pH ácido debido a que aumenta el pH periplásmico por la secreción de una gran cantidad de enzima ureasa; esta enzima es clave en la capacidad de evitar la acidez gástrica, la hidrólisis de la urea (que ocurre en el estómago) produce grandes cantidades de amoníaco, que luego se protona para crear amonio, creando así un ambiente bacteriano neutro. Para establecer una infección persistente, después de ingresar a la luz gástrica, penetra e infiltra la capa gruesa de moco que recubre a las células epiteliales del tracto gastrointestinal; la viscosidad de la mucosa es altamente dependiente de la acidez, en un pH más ácido el moco es más fuerte. La actividad de la ureasa facilita la penetración bacteriana en el moco, con la difusión de amoníaco en el estómago que aumenta el pH y brinda una oportunidad para que

*H. pylori* penetre profundamente utilizando su forma helicoidal y sus flagelos (Talebi Bezmin Abadi, 2017). Para permanecer en la capa mucosa, necesita utilizar sus flagelos polares para moverse, la capacidad de nadar con movimiento flagelar y de controlar la dirección del movimiento mediante respuestas quimiotácticas son esenciales para la colonización del estómago (Amieva et al., 2008).

#### 5.4.5. Adherencia

Aproximadamente el 20% de *H. pylori* en el estómago se encuentra adherido a la superficie de las células epiteliales; la adhesión incluye un tropismo específico para las uniones intercelulares, y a veces también se observan bacterias profundas en estos espacios, asociadas con cambios en el citoesqueleto en el sitio de adhesión, o algunas veces internalizadas en células epiteliales. Todas estas observaciones sugieren que la adhesión implica interacciones moleculares especializadas con la mucosa gástrica que pueden conducir a una unión fuerte y la modificación de la superficie celular (Amieva et al., 2008).

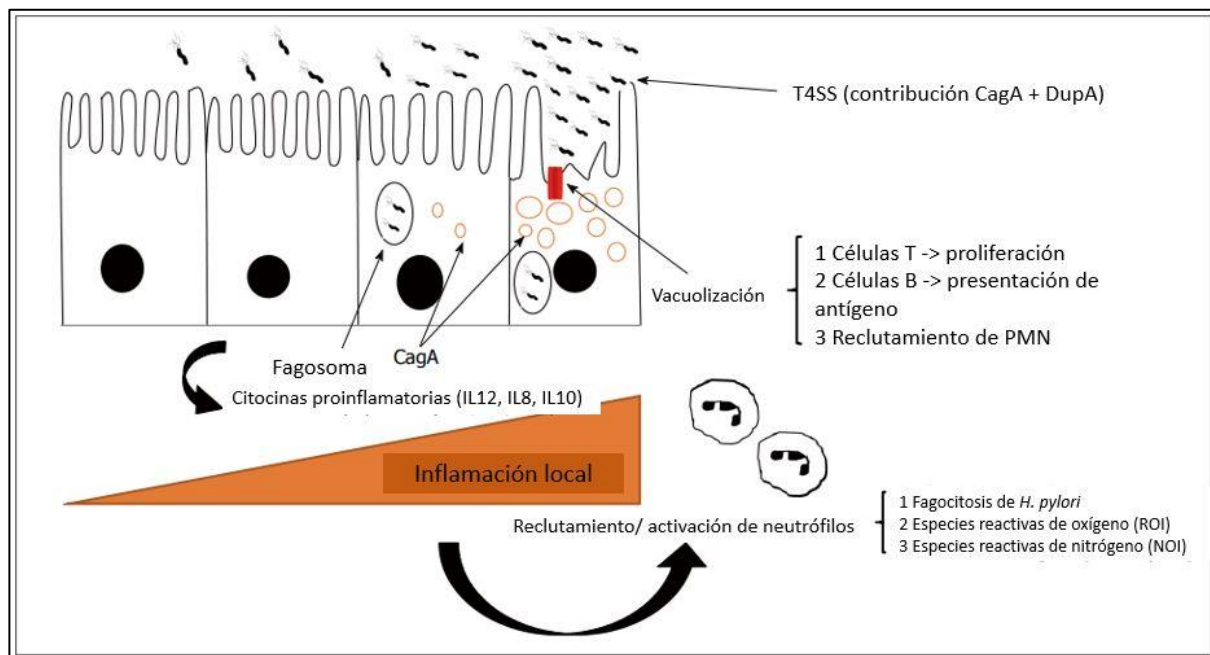


Figura 8. Eventos que causan inflamación en la infección crónica por *H. pylori* (Talebi Bezmin Abadi 2017).

*H. pylori* tiene más de 30 genes dedicados a la expresión de proteínas de la membrana externa; varios de estos se han clasificado como adhesinas, lo que sugiere modos de unión múltiples o variables a la superficie celular. Las adhesinas mejor estudiadas son proteínas de membrana externa que se unen a las modificaciones de carbohidratos en las glucoproteínas de la célula huésped (Amieva et al., 2008). Aunque la adherencia está mediada por proteínas de superficie (como, AlpA, AlpB, DupA, BabA, OipA, SabA y HopZ), no se ha demostrado una molécula específica esencial en los mecanismos de adhesión (Talebi Bezmin Abadi, 2017).

## **5.5. Historia natural de la enfermedad e infección.**

---

### **5.5.1. Manifestaciones clínicas**

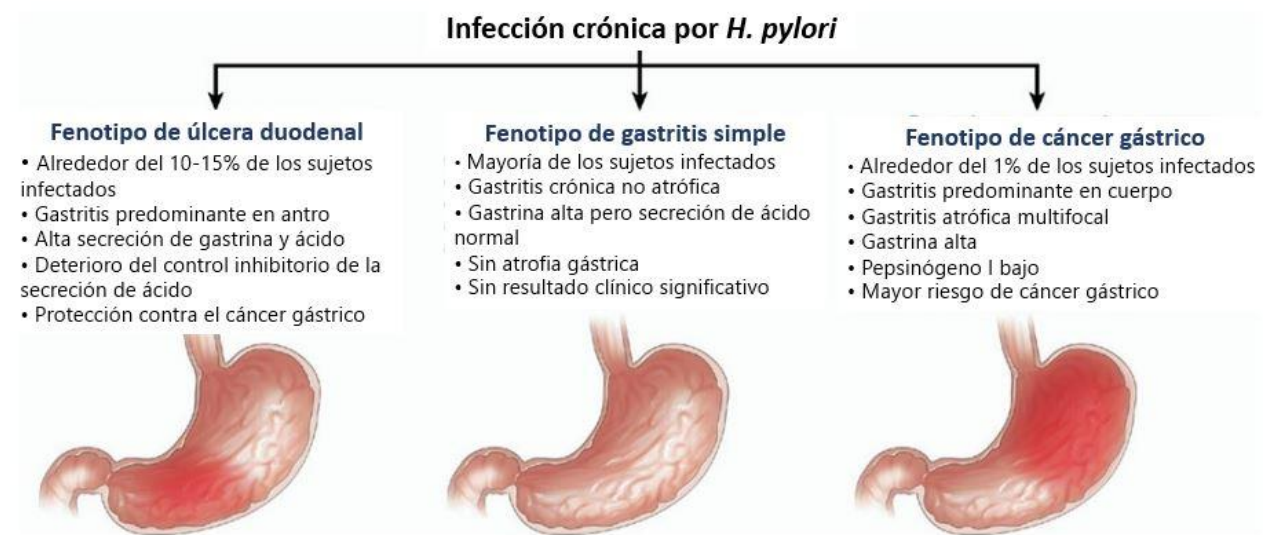
---

Una vez que al estómago del huésped es colonizado, *H. pylori* es capaz de inducir un proceso inflamatorio crónico, esto a largo plazo puede generar un daño evidenciado, como gastritis crónica, úlcera gástrica e incluso cáncer gástrico, sin embargo, la mayoría de las personas infectadas no presentan síntomas y permanecen así a lo largo de su vida; aproximadamente del 10 al 20% de las personas pueden desarrollar úlceras estomacales y/o úlceras duodenales, atrofia de la mucosa gástrica, metaplasia, displasia, linfoma o adenocarcinoma gástrico; el desarrollo de alguna patología depende de las características de virulencia de las bacteria, factores del huésped como polimorfismos en algunas interleucinas y los factores ambientales como el consumo de ciertos alimentos, hacinamiento, nivel socioeconómico, estrés, entre otros (Iwanczak et al., 2017).

Existen tres fenotipos gástricos principales asociados con la infección crónica por *H. pylori*, como se observa en la Figura 9. El fenotipo más común es de gastritis simple o benigna, se observa comúnmente en sujetos que son asintomáticos y que, en general, no desarrollan enfermedad gastrointestinal grave. El segundo fenotipo es el fenotipo de la úlcera duodenal y representa hasta el 15% de los sujetos infectados, se caracteriza por un patrón de gastritis con predominio en la región de



antro, los sujetos con este fenotipo tienen gastrina alta, mucosa del cuerpo relativamente saludable, producción de ácido muy alta y control inhibitorio defectuoso de la secreción de ácido gástrico; esta combinación de anomalías fisiopatológicas contribuye al desarrollo de úlceras pépticas, particularmente duodenales. El tercer y más grave fenotipo es el de cáncer gástrico que afecta aproximadamente al 1% de los sujetos infectados, se desarrollan como resultado directo de la inflamación crónica inducida por la infección y aumentan el riesgo de cáncer gástrico (Amieva et al., 2008).



**Figura 9. Resultados fisiopatológicos y clínicos de la infección crónica por *H. pylori*.** La infección se asocia con 3 fenotipos potenciales, y se ilustran las características histológicas, fisiológicas y clínicas de cada uno, imagen obtenida de (Amieva et al., 2008).

La IARC (Internacional Agency of Research on Cáncer) clasificó a *H. pylori* como un carcinógeno tipo I; entre los mecanismos que tiene para desencadenar esta patología, se encuentran la activación de señales intracelulares, inducción de cambios en la morfología celular mediados por la fosforilación de proteínas del citoesqueleto, daño al DNA, inducción de apoptosis e incremento en la proliferación celular compensatoria, inducción de mutaciones en genes supresores de tumores e inducción de sustancias reactivas al oxígeno (ROIs); únicamente la colonización crónica puede desencadenar todos estos mecanismos, por lo tanto en niños es poco

probable que presenten el desarrollo de úlcera péptica (duodenal o gástrica) y menos aún cáncer gástrico (Romo-González et al., 2010).

La forma más frecuente de gastritis en niños es la gastritis nodular, mientras que la gastritis atrófica y la metaplasia intestinal, que se presentan con mayor frecuencia en adultos, se encuentran con escasa frecuencia en niños (Sterbenc et al., 2019). En los niños la manifestación clínica que puede ser un indicativo a la infección por *H. pylori* es el dolor abdominal recurrente (DAR), que se define como al menos tres episodios de dolor, en un periodo de más de tres meses, en niños mayores de tres años, el dolor debe ser tan severo como para afectar la actividad del niño, con periodos asintomáticos entre los episodios y sin evidencia de enfermedad orgánica y debe considerarse como una señal de alarma para estudio de infección por *H. pylori* (Suárez-Cortina et al., 2007).

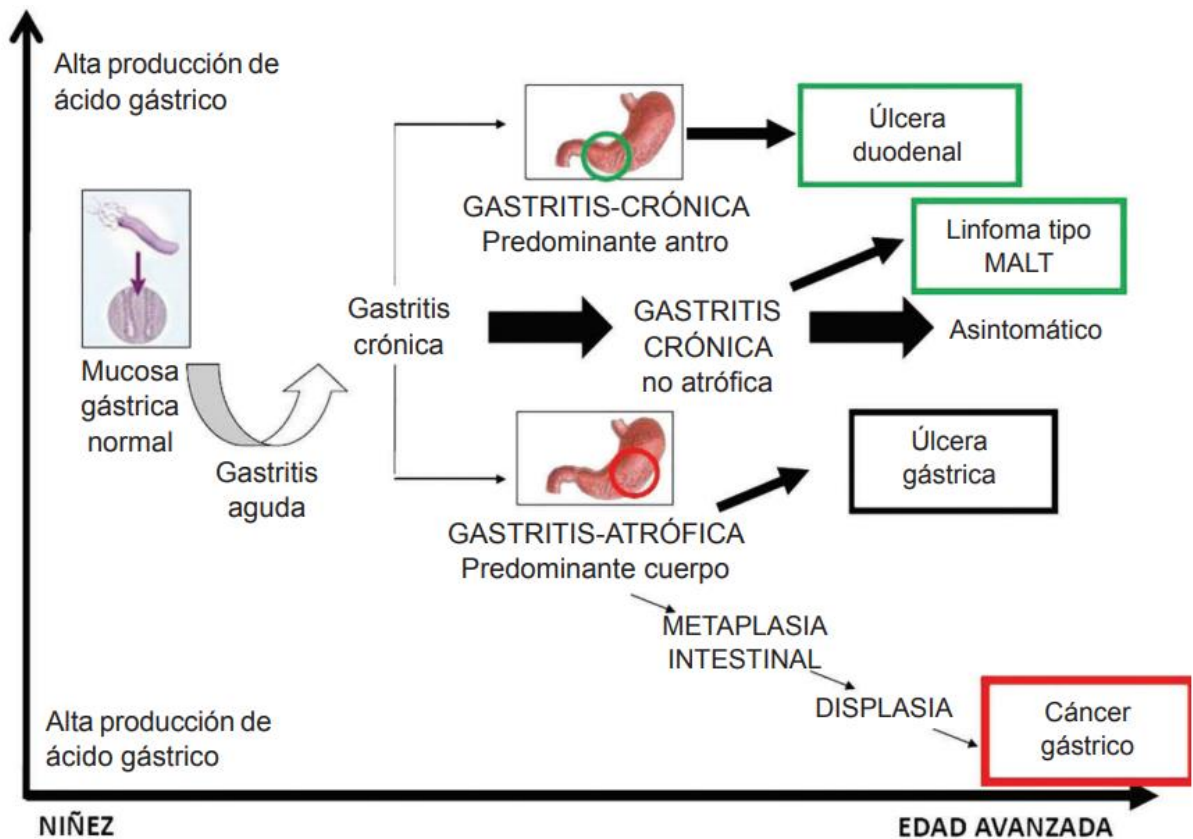


Figura 10. Historia natural de la infección por *H. pylori* (Romo-González et al., 2010).

## 5.6. Factores de virulencia

---

### 5.6.1. Proteínas de membrana externa

---

Las proteínas de membrana externa u OMP (por sus siglas en inglés) son necesarias para establecer una colonización duradera, esto mediante interacciones específicas con receptores del huésped. Aproximadamente el 4% del genoma de *H. pylori* codifica para OMP, lo que sugiere que estas proteínas son de vital importancia para el ciclo de vida bacteriano. Dentro de las más estudiadas y descritas, se encuentran BabA, OipA y SabA (Dunne et al., 2014).

- **BabA**

La adhesina de unión a antígeno del grupo sanguíneo o BabA por sus siglas en inglés, es codificada por el gen *babA2* y conduce a la adhesión celular efectiva mediando la interacción entre *H. pylori* y las células epiteliales (Talebi Bezmin Abadi, 2017). Esta adhesina permite la unión a los antígenos del grupo sanguíneo Lewis-b de la mucosa, lo que facilita la colonización bacteriana. Las cepas pueden clasificarse en función de la producción de BabA, en altos productores (BabA-H), que poseen actividad de unión de Lewis b, y BabA de bajos productores (BabA-L), que no pueden unirse a los antígenos de Lewis b. Hasta la fecha, se han identificado tres tipos alélicos de *babA*: *bab A1*, *bab A2* y *babB* (Sterbenc et al., 2019).

Los datos sobre la importancia del gen *babA2* en niños son escasos. Las asociaciones entre el gen y el resultado clínico son inconsistentes, son pocos estudios que correlacionan su presencia con un mayor grado de daño de la mucosa gástrica (Sterbenc et al., 2019).

- **OipA**

Es una proteína de membrana externa que sirve en la adhesión y la inducción de citocinas proinflamatorias (IL-8), es codificada por el gen *oipA*. Esta proteína se ha relacionado con una mayor densidad de colonización de *H. pylori*, infiltración de

neutrófilos y niveles altos de IL-8 en el estómago humano. El receptor correspondiente para OipA no ha sido identificado (Chang et al., 2018).

En niños, la frecuencia de *oipA* tiende a ser menor que en adultos, con frecuencias más altas entre las cepas pediátricas de poblaciones de alto riesgo en las que la incidencia de infección por *H. pylori* y enfermedades relacionadas es significativa. Además, se ha encontrado una mayor probabilidad de desarrollar úlcera péptica en niños en comparación con adultos, al tener una cepa *oipA* positiva (Sterbenc et al., 2019).

- **SabA**

Es una adhesina cuya función es mediar la interacción efectiva entre *H. pylori* y células epiteliales, codificada por el gen *sabA* (Talebi Bezmin Abadi, 2017). Además de los antígenos del grupo sanguíneo Lewis b (receptor de la adhesina BabA), los antígenos sialyl-Lewis x y sialyl-Lewis a son receptores funcionales, estos son reconocidos por la adhesina de unión al ácido siálico SabA (Sterbenc et al., 2019). También se une a los receptores sialilados en los neutrófilos, lo que conduce a la activación no opsónica de los neutrófilos, la fagocitosis de las bacterias y la inducción de la respuesta oxidativa (Dunne et al., 2014).

---

### 5.6.2. VacA

---

La citotoxina vacuolizante A deriva su nombre de la capacidad para inducir la formación de vacuolas en las células eucariotas. Se han descrito otras funciones celulares de VacA con influencia en la muerte de la célula huésped como el incremento de la expresión de IL8 que promueve la inflamación y contribuye a la colonización a largo plazo, proliferación y alargamiento celular, aumento en el nivel de señalización de MAPK y modula la autofagia (Talebi Bezmin Abadi, 2017).

Todas las cepas de *H. pylori* portan el gen *vacA*, pero con diferente capacidad de vacuolización, debido a variaciones en cinco regiones del gen, la región s (s1 y s2), región i (i1, i2, i3), región m (m1 y m2), región d (d1 y d2) y la región c (c1 y c2). La variante *vacA* s2 se considera menos patógena que la s1, ya que las toxinas VacA

s2 se producen y secretan a tasas más bajas y no pueden formar canales de membrana a través de los cuales VacA s1 induce la vacuolización de las células; VacA i1 también se asocia con una mayor actividad en comparación con VacA i2 y a diferencia de VacA m2, VacA m1 induce una disminución en los niveles intracelulares de glutatión y un aumento en el estrés oxidativo, lo que lleva a la autofagia y la apoptosis de las células huésped (Sterbenc et al., 2019).

---

### **5.6.3. CagA y la isla de patogenicidad *cagPAI***

---

El factor de virulencia más estudiado de *H. pylori* es la proteína CagA, producto del gen *cagA*, por sus siglas en inglés **cytotoxin associated gene A**). Después de la unión de *H. pylori* a las células epiteliales, las cepas que expresan la proteína pueden inyectarla a las células gástricas a través de un sistema de secreción de Tipo IV (T4SS) codificado por genes presentes en una isla de patogenicidad denominada *cagPAI*. Tras la translocación a la célula huésped, CagA puede ser fosforilada por las quinasas y actuar para subvertir los mecanismos de señalización. La *cagPAI* contiene 31 genes, muchos de los cuales participan en la síntesis y ensamblaje del T4SS del sistema de secreción (Dunne et al., 2014).

Los aislamientos de *H. pylori* se pueden dividir en dos grupos: *cagA* negativo y *cagA* positivo de acuerdo a la presencia o ausencia del gen. Después de que el gen es expresado y la proteína CagA traslocada, interactúa con múltiples moléculas de la célula huésped y es responsable de la desregulación de la transducción de la señal homeostática de las células epiteliales gástricas, la inducción de respuestas proinflamatorias que conducen a inflamación crónica de la mucosa gástrica y la inducción de carcinogénesis, a través de la modulación de la apoptosis, la interrupción de polaridad celular, alteración de las uniones celulares estrechas y promoción de inestabilidad genética. Por lo tanto, debido a sus rasgos inductores de cáncer, CagA fue designada como la primera oncoproteína bacteriana (Sterbenc et al., 2019).

En niños, *cagA* es el gen de virulencia mejor caracterizado. Similar a los adultos, la prevalencia en niños varía entre los diferentes países y regiones. Este gen se puede

encontrar en más de la mitad de los aislados obtenidos de niños sintomáticos; en niños mexicanos, las prevalencias *cagan* y *cagPAI* son de 63.3% y 71.4%, respectivamente (Romo-González et al., 2015).

---

#### 5.6.4. DupA

---

El gen promotor de la úlcera duodenal (*dupA*) está ubicado en la zona de plasticidad del genoma de *H. pylori*, codifica para la proteína DupA, la función de esta proteína aún no se conoce completamente; mediante estudios bioinformáticos se sabe que *dupA* codifica homólogos de la ATPasa VirB4 y se cree que está involucrada en la absorción / transferencia de DNA y la transferencia de proteínas. (Yamaoka et al., 2008). La detección de este gen se correlaciona con una mayor producción de IL-8 a partir de células epiteliales gástricas, tanto *in vivo* como *in vitro*, este aumento en la secreción de IL-8 del antro gástrico conduce al desarrollo de gastritis, una característica conocida de la enfermedad de la úlcera duodenal. La presencia de este gen está relacionada negativamente con el desarrollo de cáncer gástrico (Sterbenc et al., 2019).

### 5.7. Evasión de la respuesta inmune

---

Por la asociación entre *H. pylori* con los humanos a lo largo de nuestra coevolución, esta bacteria se ha adaptado para evadir la respuesta inmune y puede servir como un ejemplo de evolución bacteriana para mantener su nicho de supervivencia en humanos. La persistencia bacteriana solo puede ocurrir si *H. pylori* y el sistema inmune se adaptan de manera conjunta, luego de lograr una evasión inmune exitosa (Talebi Bezmin Abadi, 2017).

Las barreras físicas y químicas del sistema innato están involucradas en la respuesta contra la infección por *H. pylori*; la superficie epitelial gástrica juega un papel activo en la defensa de la mucosa, una vez penetrada la capa mucosa, el sistema innato actúa por medio de la fagocitosis por los macrófagos, *H. pylori* es altamente resistente a la muerte por estas células, se ha propuesto que esta bacteria induce la apoptosis dependiente de las mitocondrias en los macrófagos

además se ha descubierto una estrategia para inhibir la activación de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) y monocitos mediante la participación de CagA. Las cepas positivas a CagA aumentan la producción de IL8, una citocina que induce la infiltración de células inflamatorias; la misión principal de *H. pylori* es lograr una alteración en la función fagocítica y así facilitar la infección persistente (Talebi Bezmin Abadi, 2017).

La principal interferencia de *H. pylori* en la respuesta inmune adaptativa es su efecto inhibitorio sobre la proliferación de células T, a través de la unión de VacA a un ligando de superficie todavía desconocido en estas células. De igual manera, VacA es capaz de formar un canal selectivo de aniones en la membrana de la célula huésped, estos canales pueden causar vacuolas en estas células que conducen a la apoptosis; también VacA puede unirse a las mitocondrias y desencadenar la vía apoptótica asociada a estas. Otra manera de evadir la respuesta adaptativa es mediante la interrupción de la presentación de antígeno, por medio de la inhibición de la activación de las células presentadoras de antígeno y la inhibición de la exportación del MHC clase II a la superficie celular que es la razón principal de la presentación alterada del antígeno a las células dendríticas (Talebi Bezmin Abadi, 2017).

## **5.8. Zona de plasticidad**

---

### **5.8.1. Genoma de *Helicobacter pylori***

---

La interacción evolutiva entre microorganismos patógenos o comensales y sus hospederos es un proceso constante de adaptación, los genomas microbianos reflejan estos procesos evolutivos al desarrollar continuamente nuevas variantes de factores de adaptación al hospedero, uno de los mecanismos para generar esto es mediante la adquisición y pérdida de genes a través de la transferencia horizontal de estos. En los últimos años ha quedado claro que todo el conjunto de genes disponibles en una especie dada, puede ser mucho más grande que el genoma de un solo organismo, por lo tanto, se requiere la comparación del genoma de muchos

aislados de la misma especie para obtener una imagen del repertorio genético o lo que se conoce como el core de genes (Fischer et al., 2010).

Las bacterias que tienen nichos restringidos como *H. pylori* tienen la peculiaridad de contener un genoma relativamente pequeño y compacto. El genoma de esta bacteria es de ~1.6 Mb, más pequeño que otros genomas secuenciados de bacterias Gram negativas. Es importante mencionar que *H. pylori* fue la primera bacteria en la cual dos cepas fueron secuenciadas y comparadas (Romo-González et al., 2018). La primera cepa secuenciada fue la 26695 en 1997, de un paciente en Reino Unido diagnosticado con gastritis; y la segunda fue la J99 en 1999 de una cepa de una paciente de Estados Unidos, con ulcera duodenal; el análisis genómico comparativo de las dos cepas completamente secuenciadas reveló una cantidad significativa de variación genética entre sus genomas; el genoma de la cepa J99 es más corto (1, 643,831 pb) que el de la cepa 26695 (1, 667,867 pb) (Alm et al., 1999). A raíz de estas dos secuenciaciones se pudo comparar el contenido genómico de *H. pylori*, mostrando que hay genes presentes en una cepa y no en la otra, llamados genes específicos de cepa, los cuales equivalen a 6-7% del total del genoma del microorganismo (Romo-González et al., 2010).

Las cepas 26695 y J99 contienen 110 y 52 genes específicos de cepa, respectivamente y la mayor parte de estos están localizados en regiones hipervariables dentro del genoma llamadas zonas de plasticidad (ZP). Una de estas regiones hipervariables es la isla de patogenicidad *cagPAI* (Yamaoka et al., 2008). *H. pylori* se distingue de otras bacterias por la presencia de una gran diversidad genética, que se puede clasificar en: macrodiversidad (presencia y ausencia de genes) y microdiversidad (presencia de polimorfismo en algunos genes como *cagA*, *vacA*, *babA*) entre los aislamientos. Con el uso de métodos de *fingerprinting* se han genotipificado cepas de diferentes poblaciones, demostrándose diferencias entre los aislamientos de cada población e incluso entre aislamientos de un mismo individuo, sugiriendo con esto la presencia de una infección mixta (diferentes genotipos de *H. pylori* dentro de un individuo). Esta diversidad genética entre los aislamientos y la posibilidad de interacción bacteriana mediante el intercambio de



información genética permite la generación de cepas recombinantes mejor adaptadas al huésped (Romo-González et al., 2010).

Los aislamientos obtenidos de diferentes individuos exhiben una alta diversidad genética; las diferencias entre las cepas incluyen mutaciones puntuales en genes altamente conservados y la presencia de genes específicos de cepa. Los mecanismos para la generación de diversidad dentro de *H. pylori* incluyen el frecuente intercambio genético horizontal entre cepas y un alto nivel de mutación espontánea que ocurre durante un largo período de evolución dentro de un nicho altamente restringido, donde la respuesta inmunitaria se combina con factores ambientales propios del estómago y conducen a un alto grado de variación genética (Israel et al., 2001).

*H. pylori* utiliza su amplia capacidad de variación genética y antigénica como una estrategia para lograr una infección persistente, a corto plazo utiliza la regulación de genes en respuesta al ambiente en el que se encuentra y a largo plazo, utiliza su capacidad de competencia natural, altos índices de recombinación, mutación espontánea y mecanismos como la variación de fase, lo cual provoca diversidad genómica, adaptación, selección y persistencia (Romo-González et al., 2010).

La diversidad genética de este microorganismo, así como el largo tiempo que ha permanecido asociado al humano ha servido como un indicador del flujo de las migraciones humanas; permitiendo el reconocimiento de poblaciones distintas después de siglos de coexistencia en diferentes regiones geográficas, incluso después de miles de años. Algunos autores señalan que la evolución genética de la bacteria ha ido a la par con la del ser humano hasta llegar al punto en que *H. pylori*, ha modificado su diversidad genética a medida que se alejaba geográficamente de África (Falush et al., 2003).

---

### 5.8.2. Zona de plasticidad (ZP)

---

Las zonas de plasticidad se clasifican como elementos transponibles o elementos genéticos móviles (MGE por sus siglas en inglés). Un MGE es un tipo de material genético que puede moverse dentro del genoma (intracelular), puede transferirse de una especie a otra (intercelular) y se encuentra en todos los organismos tanto procariontes como eucariontes. Pueden tener diferentes roles en la evolución del microorganismo debido a las diversas fuentes de adquisición mediadas por transferencia horizontal de genes (Waskito et al., 2018).

El movimiento intracelular del DNA es una propiedad de los loci de recombinación promiscua que se denominan transposones, que se recombinan aleatoriamente o "saltan" entre los replicones. Como los transposones pueden "saltar" a fagos o plásmidos, también se pueden transferir con ellos a otras células (Frost et al., 2005). Fueron descubiertos hace más de 65 años por Barbara McClintock; también llamados "genes saltarines", ya que son elementos de DNA que se mueven independientemente de otros elementos genéticos, a diferentes ubicaciones en el DNA del huésped. Estos eventos de "salto" o transposición dan lugar a mutaciones que pueden ocurrir a altas frecuencias, en relación con las tasas de mutación normales. Los genes saltarines o transposones se han encontrado en prácticamente todos los organismos vivos, desde bacterias hasta humanos (Saier et al., 2018).

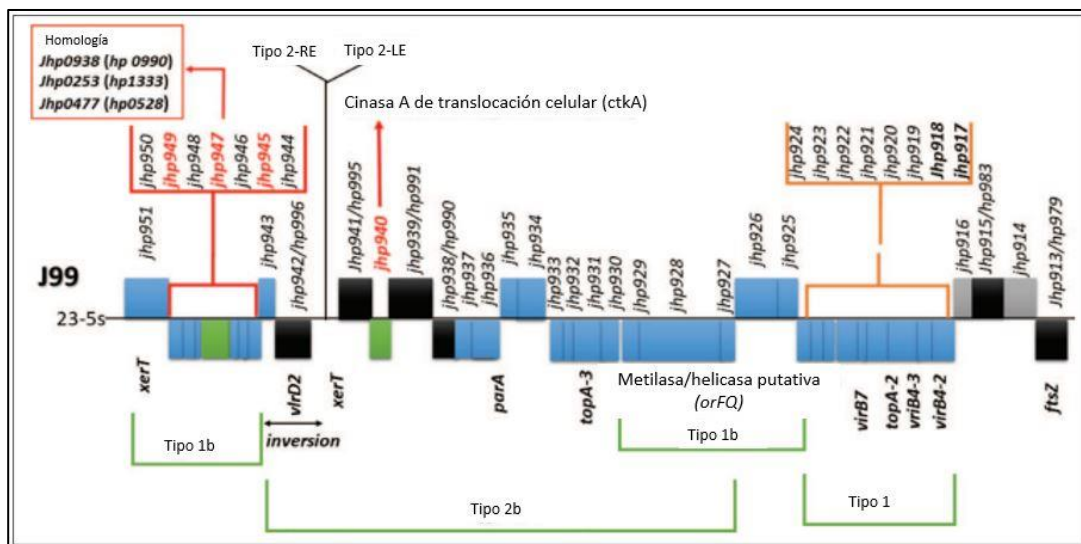
La zona de plasticidad de *H. pylori* está compuesta de MGE; estos MGE en las zonas de plasticidad tienen propiedades similares a las de los transposones y, por lo tanto, se conocen como transposones de zonas de plasticidad (TnPZ). Además, estas zonas se caracterizan por tener un bajo porcentaje de Guanina + Citocina, comparado con el resto del genoma, lo que indica que estos genes pudieron adquirirse por transferencia horizontal (Waskito et al., 2018).

La zona de plasticidad de la cepa J99 es la más caracterizada, tiene una longitud de 45 kb y está formada por 48 genes continuos que van desde *jhp0914* a *jhp0961*; los genes de interés en este trabajo de tesis se encuentran dentro de esta región (*jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*). La ZP contiene genes de función

desconocida (putativos), así como genes que codifican para sistemas de modificación de restricción, topoisomerasas, integrones, sistemas de secreción, proteínas de membrana externa y transposones, estos últimos pueden insertarse en un genoma sin recombinación. Esta inserción facilita la propagación de transposones entre especies bacterianas (Romo-González et al., 2015).

Kersulyte y colaboradores secuenciaron el cluster de genes de la ZP en diversas cepas de *H. pylori* y localizaron esta área en genomas de otras cepas depositadas en bases de datos, con el fin de comparar esta región entre ellas. Se observaron varios tipos de TnPZ con diferentes disposiciones genéticas o variaciones de secuencia de DNA lo que dio lugar a una clasificación, denominándose como TnPZ tipo 1, tipo 1b y tipo 2 (Kersulyte et al., 2009).

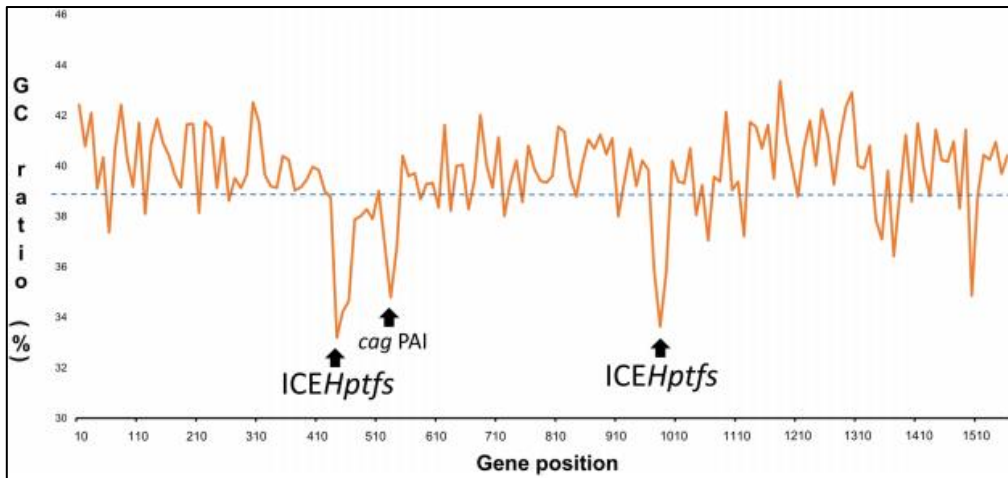
Los genes *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* se encuentran en una TnPZ tipo 1b, y *jhp0940* se encuentra en una TnPZ tipo 2 en la cepa J99. Además, dentro de la ZP se encuentran 7 marcos de lectura abierta (ORF), que son homólogos del sistema VirB de *Agrobacterium tumefaciens*, incluidos VirB4, VirB7, VirB8, VirB9, VirB10, VirB11 y VirD4, y por lo tanto también se le considera a esta zona como una región que alberga un nuevo tipo de sistema de secreción tipo 4 (T4SS), denominado T4SS3 (Kersulyte et al., 2009).



**Figura 11. La zona de plasticidad de la cepa J99 (*jhp0917-jhp0951*).** La ZP está compuesta de fragmentos TnPZ: tipo 1 (*jhp0917-jhp0924*), tipo 1b (*jhp0944-jhp0951*; *jhp0925*, *jhp0926*, potencialmente parte de *jhp0927*) y el tipo 2 (*jhp0943-jhp0930*). Los cuadros azules y verde indican

ORF exclusivos de J99 que no contiene la cepa 26695 y los cuadros negros indican ORF encontrados en ambas cepas (Romo-González et al., 2018).

Se ha predicho que esta zona se transfiere al genoma de *H. pylori* mediante conjugación como un elemento integrativo conjugativo (ICE) debido a esto, recientemente se ha propuesto el cambio de nombre de zona de plasticidad a elemento integrativo conjugativo de *Helicobacter pylori* que codifica para un sistema de secreción tipo 4 o ICEHptfs por sus siglas en inglés (Waskito et al., 2018).



**Figura 12. Identificación de ICEHptfs o ZP basada en el contenido de G + C de la cepa 26.695.** En esta cepa hay tres ubicaciones que tienen una relación G + C significativamente baja, dos de las cuales son ICEHptfs y una es cagPAI (Waskito et al., 2018).

---

### 5.8.3. Genes de la ZP asociados a enfermedad

---

Los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* se asocian con frecuencia a un mayor riesgo de enfermedades gastrointestinales particulares, como gastritis, úlcera gástrica y cáncer gástrico. Por este motivo, se han propuesto como biomarcadores de estas enfermedades (Romo-González et al., 2015).

- ***jhp0940*.**

Dentro de este grupo de genes es el más caracterizado, también es llamado cinasa A de translocación celular o *ctkA*. El gen *ctkA* es considerablemente variable en diferentes poblaciones geográficas y comprende parte del conjunto de genes

específicos de la cepa, codifica para la proteína proinflamatoria CtkA, una quinasa Ser/Thr (serina/treonina proteín quinasa) de tipo eucariota la cual se transloca en células humanas para aumentar la actividad de NF- $\kappa$ B de una manera dependiente de la quinasa, lo que conduce a una mayor activación de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8. En estudios donde se utiliza la proteína CtkA recombinante (rCtkA) se ha demostrado la inducción dosis dependiente de la secreción de citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-8 de macrófagos y células mononucleares cultivadas y respuestas proinflamatorias y pro-apoptóticas de macrófagos de ratón. Esto sugiere que CtkA puede contribuir a la inflamación gástrica crónica y la persistencia de *H. pylori*, lo que aumenta el riesgo inflamación, atrofia y cáncer gástrico (Alandiyjany et al., 2017).

Se ha reportado que el gen *ctkA* o *jhp0940* tiene una asociación positiva con un mayor riesgo de cáncer gástrico en algunas poblaciones y un menor riesgo de úlcera duodenal (Alandiyjany et al., 2017), Occhialini y colaboradores encontraron una asociación entre la presencia del gen *jhp0940* y cáncer gástrico en un estudio realizado en el año 2000 en Costa Rica (Occhialini et al., 2000). Aunque en estudios de genotipificación de aislamientos de *H. pylori* de individuos mexicanos con enfermedades gastroduodenales, *jhp0940* estuvo ausente en todos los aislamientos de cáncer gástrico (Romo-González et al., 2009); en Brasil, en aislamientos de pacientes con úlceras duodenales o cáncer gástrico, la presencia de *jhp0940* no mostró asociación con la enfermedad, ya que solo 3 de 200 tenían el gen y no se encontró asociación entre este gen y enfermedad (Santos et al., 2003); y en aislamientos de pacientes chinos con gastritis crónica activa, úlceras duodenales o cáncer gástrico tampoco se encontró asociación entre este gen y enfermedad (Gong et al., 2015). Por lo tanto, el papel de este gen en la infección y su asociación con enfermedad aun no es clara.

Con respecto a su prevalencia en el mundo, independientemente de la enfermedad que presentan los individuos donde se ha aislado y tipificado la cepa, se ha encontrado una alta variabilidad entre diversas regiones geográficas, como se muestran en la Figura 13; un estudio en India observó una prevalencia de menos

del 20% de este gen entre los aislados de *H. pylori* (Ganguly et al., 2016); en Argentina, su prevalencia se reportó en un 74.6%, y la frecuencia en aislamientos de individuos con gastritis crónica y úlcera péptica fue similar, esto indica que no hay asociación con una enfermedad específica (Armitano et al., 2013); Rizwan y colaboradores en el 2008 no encontraron una asociación entre los resultados clínicos y la prevalencia de *jhp0940* en aislados de siete países (India, Sudáfrica, Japón, Costa Rica, Perú, Francia y España) dentro de estos países la mayor prevalencia de este gen se observó en aislados de India (95%), Sudáfrica (100%) y Francia (100)%, en contraste con los de España, donde menos del 10% contenía este gen (Rizwan et al. 2008). Una posible explicación de los resultados variables con respecto a la prevalencia de *jhp0940* en diferentes regiones geográficas es que pudiera existir diversidad en la secuencia de este gen entre los aislamientos de las distintas regiones geográficas que no permite su identificación con un solo par de cebadores (Romo-González et al., 2018).

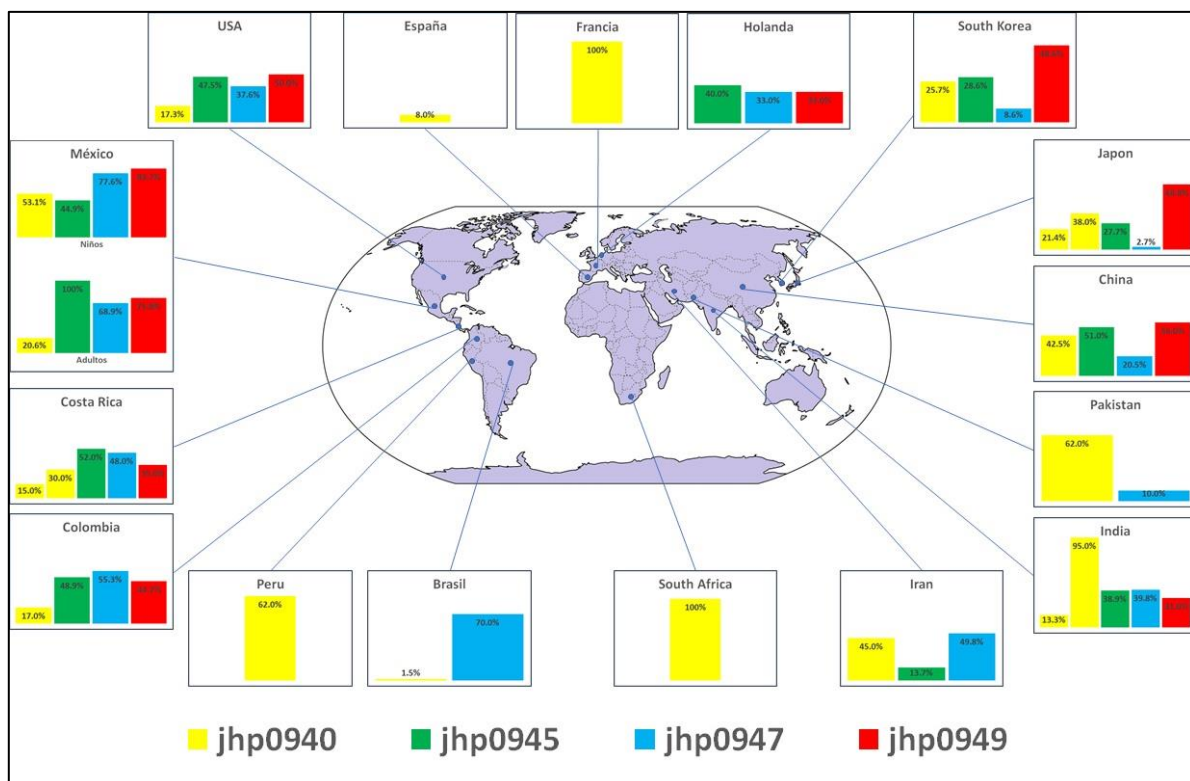


Figura 13. Frecuencia de la presencia de los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* entre los aislados de *H. pylori* de diferentes regiones geográficas (Romo-González et al., 2018).

- ***jhp0945, jhp0947 y jhp0949.***

La relación entre los genes *jhp0945, jhp0947 y jhp0949* y el desarrollo de enfermedad se observó en Costa Rica en el año 2000, donde se evaluó la prevalencia de 21 ORF presentes en la ZP de la cepa J99 (*jhp0914-jhp0961*) en 17 cepas de pacientes con cáncer gástrico y 26 cepas de pacientes con gastritis. Los resultados mostraron una alta prevalencia de *jhp0947* en pacientes con cáncer gástrico (Occhialini et al., 2000). Los estudios sobre la prevalencia de *jhp0945, jhp0947 y jhp0949* entre los aislados de diferentes regiones geográficas han propuesto a estos genes como marcadores de enfermedad, sugiriendo que podrían desempeñar un importante papel en la infección de *H. pylori*.

En un estudio en Brasil de 200 aislamientos de pacientes con úlceras duodenales, cáncer gástrico o gastritis, solo *jhp0947* mostró una asociación con cáncer gástrico y úlceras duodenales (Santos et al., 2003); en otro estudio en Brasil, no se observó una asociación entre *jhp0947* y las úlceras pépticas (Proenca et al., 2007); en una población holandesa con gastritis y úlceras duodenales, se evaluó la prevalencia del locus *jhp0945-jhp947-jhp0949*, encontrándose una asociación tanto de *jhp0947* como *jhp0949* con úlceras duodenales, mientras que *jhp0945* no se relacionó con esta enfermedad (de Jonge et al., 2004). Un estudio que incluyó 296 aislamientos occidentales (de Estados Unidos y Colombia) y 217 aislamientos de Asia (de Corea y Japón) reportaron que la prevalencia de *jhp0945, jhp0947 y jhp0949* difiere significativamente entre las dos regiones geográficas; en los individuos occidentales, la presencia de *jhp0945* fue mayor en los aislamientos obtenidos de pacientes con úlceras gástricas, úlceras duodenales o cáncer gástrico en comparación con los obtenidos de pacientes con gastritis (Sugimoto et al., 2012).

En estudios realizados de aislados asiáticos se ha reportado en cepas de origen chino, que la prevalencia de *jhp0945, jhp0947 y jhp0949* fue significativamente mayor en individuos con úlceras duodenales y cáncer gástrico en comparación a individuos con gastritis crónica, se relacionó al gen *jhp0945* con un mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico y proponen que la presencia de dicho gen podría ser considerada como un indicador de riesgo (Gong et al., 2015), en aislados de India,

la presencia de *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* se asocia con un mayor riesgo de enfermedades graves (Ganguly et al., 2016).

En una población holandesa un estudio reveló que la presencia de estos tres genes en las cepas de *H. pylori* indujo una mayor concentración de IL-12 en comparación a la cepa 26695, que no posee estos genes y la interrupción de este locus reduce la producción de IL-12 en las células monocíticas THP-1 (de Jonge et al., 2004); en cepas de la India se relacionó la presencia de estos genes con una mayor producción de IL-8 y la inducción de muerte celular por apoptosis (vía caspasa-3) en estudios *in vitro* en células de epitelio de adenocarcinoma gástrico (Ganguly et al., 2016). El gen *jhp0947* muestra homología en la región 5' con *jhp0477*, el cual codifica un homólogo de *virB9*, un componente importante del T4SS codificado por el *cagPAI*, pero aún no se ha descrito su función (Waskito et al., 2018).

Tabla 2. Resumen de los genes *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* y su relación con enfermedad. CG: Cáncer gástrico, UD: Úlcera duodenal, G: Gastritis crónica.

País de origen de las muestras	Relación gen-enfermedad	Autor
Costa Rica	Alta prevalencia de <i>jhp0947</i> en pacientes con CG.	Occhialini et al., 2000
Brasil	<i>jhp0947</i> muestra una asociación con CG y UD	Santos et al., 2003
	No se observa una asociación entre <i>jhp0947</i> y las UD	Proenca et al., 2007
Holanda	Asociación tanto de <i>jhp0947</i> como <i>jhp0949</i> con UD, mientras que <i>jhp0945</i> no se relaciona con esta enfermedad	de Jonge et al., 2004
	La presencia de <i>jhp0945</i> , <i>jhp0947</i> y <i>jhp0949</i> induce una mayor concentración de IL-12.	



Estados Unidos, Colombia, Corea y Japón	La prevalencia de <i>jhp0945</i> , <i>jhp0947</i> y <i>jhp0949</i> difiere significativamente entre regiones geográficas	Sugimoto et al., 2012
	En individuos occidentales, la presencia de <i>jhp0945</i> es mayor en los aislamientos obtenidos de pacientes con UD o CG en comparación a los pacientes con G.	
China	La prevalencia de <i>jhp0945</i> , <i>jhp0947</i> y <i>jhp0949</i> es mayor en individuos con UD y CG en comparación a individuos con G.	Gong et al., 2015
	Se relaciona al gen <i>jhp0945</i> con un mayor riesgo de desarrollar CG.	
India	La presencia de <i>jhp0945</i> , <i>jhp0947</i> y <i>jhp0949</i> se asocia con un mayor riesgo de enfermedades graves	Ganguly et al., 2016
	Se relaciona la presencia de <i>jhp0945</i> , <i>jhp0947</i> y <i>jhp0949</i> con una mayor producción de IL-8 y la inducción de muerte celular por apoptosis (vía caspasa-3)	

## 6. JUSTIFICACIÓN

---

---

Se conoce poco sobre las prevalencias de los genes de la ZP (*jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*) en niños. Estos genes son de importancia por la asociación que se ha encontrado en adultos con enfermedades gastroduodenales severas como úlcera gástrica y cáncer gástrico; por lo que es importante su estudio en pacientes pediátricos, para conocer el papel de estos genes en la etapa inicial de la infección por *H. pylori* y desde el punto de vista clínico en los niños infectados con *H. pylori* es importante identificar en la bacteria genes asociados a virulencia para dar un adecuado y oportuno manejo de la infección.

## 7. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

---

---

¿Cuál es la frecuencia de los genes de la ZP (*jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*) en cepas de *H. pylori* de niños con manifestaciones gastroduodenales del Instituto Nacional de Pediatría?

## 8. HIPÓTESIS.

---

---

La prevalencia de los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*, será similar a lo reportado previamente en niños en México.

El patrón genotípico de estos genes en las distintas regiones del estómago será heterogéneo dentro del paciente.

## 9. OBJETIVOS

---

### 9.1. General

---

Determinar la frecuencia de los genes de la zona de plasticidad (*jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*) de *Helicobacter pylori* en cepas aisladas de niños con enfermedad gastroduodenal del Instituto Nacional de Pediatría.

### 9.2. Particulares

---

- Diagnosticar mediante cultivo y PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) la infección por *H. pylori* en niños con enfermedad gastroduodenal.
- Identificar la presencia de los genes *jhp0945*, *jhp0947*, *jhp0949a*, *jhp0949b* y *jhp0940*, en las cepas de *H. pylori* mediante la técnica de (PCR).

## 10. METODOLOGÍA

---

**Pacientes.** – El diagnóstico de *Helicobacter pylori*, se realizó a partir de una biopsia gástrica, tomada por el servicio de gastroenterología del Instituto Nacional de Pediatría (INP), a pacientes con manifestaciones clínicas gastroduodenales previo consentimiento informado al paciente. La biopsia es tomada después de descartar otra causa orgánica de las manifestaciones clínicas gastroduodenales. Este trabajo forma parte del proyecto registrado (024-2019) en el INP autorizado por el comité de ética, bioseguridad e investigación del INP.

**Proceso de la muestra.** - Mediante una endoscopia se toma una biopsia de tres regiones del estómago (antro, cuerpo e incisura) cada una fue transportada en un tubo Eppendorf con 1ml de solución salina fisiológica (SSF) al laboratorio de Bacteriología Experimental de la Torre de Investigación. El procesamiento de la biopsia se debe realizar no más de tres horas después de la toma y se debe conservar a 4°C hasta su proceso. El aislamiento se realiza en condiciones de esterilidad (uso de mechero, y material de plástico estéril desechable) y con el equipo de protección adecuado (bata, guantes y cubre bocas).

En un homogeneizador de tejidos de vidrio esmerilado del tamaño de un tubo Eppendorf, se coloca la biopsia y 50 µL de SSF en la que se transporta la biopsia, y se procede a la disgregación mecánica del tejido. Del homogeneizado (el tejido disgregado en la SSF) de la biopsia se toman 30µL y se colocan en una placa de Agar Sangre (AS) de carnero, y se incuba a 37°C con 9% de CO<sub>2</sub>, de 5 a 8 días.

**Obtención de la cepa.**- Al revisar la placa de AS se seleccionan colonias con morfología sugestiva a *H. pylori* (pequeñas colonias traslucidas semejantes a gotas de rocío), este crecimiento se resiembró en una nueva placa de AS, y se incuba en las mismas condiciones (37°C con 9% de CO<sub>2</sub>) de 4 a 5 días, este proceso de siembra continua hasta obtener suficiente cantidad de colonias, para poder realizar pruebas bioquímicas (Gram, catalasa y ureasa) y de esta manera identificar a *H. pylori*. Una vez identificada la bacteria, se cosecha el crecimiento

correspondiente a dos placas de AS en 1mL de caldo Brucella con glicerol al 18% para congelar a -70°C y así preservar la bacteria; otras 2 placas más de AS se cosechan en 1mL de SSF para la extracción del DNA de la cepa para su posterior genotipificación.

**Extracción de DNA de biopsia gástrica.** - Al homogeneizado restante de la biopsia se extrae DNA, para el diagnóstico molecular de *H. pylori* mediante PCR punto final buscando los genes *16SRNA* y *ureC*. La extracción de DNA consiste en lo siguiente:

Aproximadamente a 500uL del homogeneizado de la biopsia se incuba con 600 µL de buffer (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0 + 0.1% sarcosina) + 20 µL de Proteinasa K (10 mg/mL) + 20 µL lisozima (5 mg/mL) incubando toda la noche a 50°C. Al día siguiente se incuban los tubos a 95°C por 5 minutos para inactivar la Proteinasa K. La extracción de DNA se realiza mediante la técnica de Fenol-Cloroformo, la cual consiste en:

- Agregar igual volumen de la solución Fenol: Cloroformo: Isoamílico, es decir, si en el tubo tenemos 300 µL del homogeneizado agregar 300 µL de la mezcla. Aplicar vortex durante 10 segundos y centrifugar a 14000 rpm / 10 min.
- Tomar la fase acuosa y transferirla a otro tubo (no tomar la interfase que contiene restos de proteínas) agregar igual volumen de Cloroformo isoamílico, centrifugar a 14000 rpm / 10 min.
- Tomar la fase acuosa y transferirla a otro tubo, agregar 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 Molar y el doble del volumen de isopropanol frio, mezclar suavemente y dejar precipitar toda la noche a -20°C.
- Al día siguiente centrifugar a 14000 rpm /10 min, lavar el botón de DNA con etanol al 70% centrifugando a 14000 rpm /10 min.
- Decantar el etanol y dejar secar el botón de DNA.
- Re-suspender el botón en 100 µL de agua libre de nucleasas y poner durante 15 min a 37°C o toda la noche a 4°C; para que el DNA se rehidrate.

- Resguardar a -20°C.

Una vez obtenido el DNA se cuantifica utilizando el equipo NANODROP 2000, donde se mide su concentración (ng/  $\mu$ L) y pureza, con la relación de las absorbancias 260nm/280nm, trabajando con muestras con un valor de 1.6 a 1.9, finalmente se guarda a -20°C hasta su uso, para realizar la PCR de diagnóstico de *H. pylori* en la cual se busca la amplificación de los genes *ureC* y *16S RNAr* mediante PCR punto final.

### **Diagnóstico de *H. pylori* mediante PCR punto final. -**

Tabla 3. Primers utilizados para la identificación de *H. pylori* en biopsias gástricas mediante PCR punto final

Gen	Nombre del primer	Oligonucleótidos de PCR	Producto (bp)	Referencia
<i>ureC</i>	GLMHP_F <i>UreC</i>	5' AGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT 3'	294	Abu-Almaali et al. 2012
	GLMHP_R <i>UreC</i>	3' AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC 5'		
<i>16S RNAr</i>	16sHP522_F	5' TGGCAATCAGCGTCAGGTAATG 3'	522	Abu-Almaali et al. 2012
	16sHP118_R	3' GCTAAAGAGATCAGCCTATGTCC5'		

Tabla 4. Preparación de la mezcla de reacción para la PCR tanto para *ureC* como *16SRNAr*.

Reactivo (concentración inicial)	Volumen
Buffer 10X	2.5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.5 $\mu$ L
dNTP's 10 mM	0.5 $\mu$ L
Primer F 10 mM ( <i>ureC</i> y <i>16S</i> )	1.25 $\mu$ L
Primer R 10 mM ( <i>ureC</i> y <i>16S</i> )	1.25 $\mu$ L
Muestra DNA	1 $\mu$ L
Taq polimerasa 5 U/ $\mu$ L	0.15 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas	18.35 $\mu$ L

Las reacciones se llevaron a un volumen total de 25  $\mu$ L.

Tabla 5. Condiciones de amplificación para ambos genes.

Paso	Temperatura	Tiempo
Hold desnaturalizar	94°C	5 min
Desnaturalizar	92°C	30 seg
Alinear	55°C	40 seg
Extender	72°C	40 seg
38 ciclos	-	-
Hold extender	72°C	5 min

El PCR se realizó en el termociclador ARKTIK de Thermo Scientific.

La electroforesis de los productos de PCR se realizó en un gel de agarosa al 1.5%, para observar las bandas en el bajo luz ultravioleta (UV) se utilizó como intercalador *Midori Green Advance*. Empleando un marcador de peso molecular de 100pb de la marca *Invitrogen*.

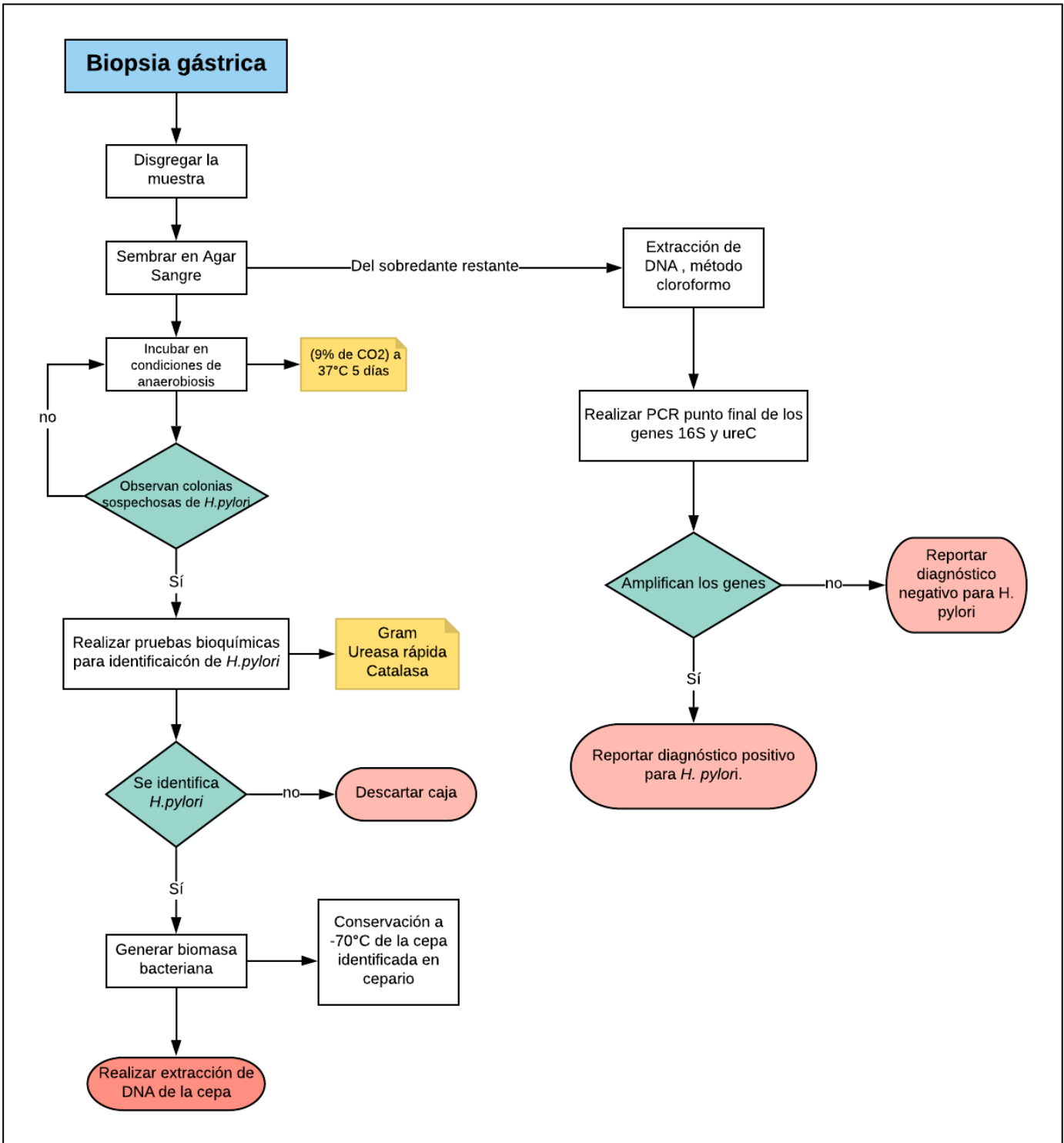


Figura 14. Diagrama general del procesamiento de una muestra de biopsia gástrica, diagnóstico de *Helicobacter pylori* por PCR y cultivo.



### **Obtención de DNA en cepas de *H. pylori*.** -

La biomasa obtenida del sembrado de *H. pylori* en una placa de agar sangre se cosecho y resuspendio en 1 mL de SSF y se extrajo DNA utilizando el kit *Wizard Genomic DNA Purification*. El proceso consiste en lo siguiente: Se centrifuga durante 2 minutos a 14000 rpm al termino, se elimina el sobrenadante. Al pellet obtenido se agregan 600 µL de solución de lisis disgregando totalmente, mediante movimientos mecánicos con la micropipeta y una incubación a 80°C durante 5 minutos. Posterior a la lisis, se adicionan 3 µL de la enzima RNAsa, se incuba durante 40 minutos a 37°C, para posteriormente adicionar 200 µL de solución de precipitación de proteínas, se incuba en hielo durante 5 minutos y luego se centrifuga durante 20 minutos a 14000 rpm. Al término de la centrifugación se transfiere el sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo preparado con 600 µL de isopropanol frío, para precipitar el DNA. Se deja a una temperatura de -20°C toda la noche.

Al día siguiente se lava el DNA con etanol frío al 70% y se deja secar el DNA durante 15 minutos en la *Vacuofuge™* o a 37°C por dos horas. Al tener el DNA totalmente seco se rehidrata con agua inyectable durante una hora a 37°C o toda la noche a 4°C. Con el DNA rehidratado se procede a cuantificar en el equipo NANODROP 2000. El DNA debe tener pureza adecuada (radio 260nm/280nm de 1.6 a 1.9) y una concentración mínima de 20 ng/ µL.

### **Genotipificación de los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* en cepas de *H. pylori*.**

Con el DNA obtenido de las cepas de cada región del estómago se realizó el PCR punto final para la identificación de los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* utilizando como control positivo la cepa ATCC J99 la cual contiene todos los genes que buscamos identificar, y como control negativo la cepa ATCC 26695 la cual carece de estos genes. A continuación, se muestran los primers utilizados, así como las condiciones de la mezcla de PCR y condiciones de amplificación.

Tabla 6. Primers utilizados para la genotipificación de los genes de *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* en cepas de *H. pylori*.

Gen	Nombre del primer	Oligonucleótidos de PCR	Producto (bp)	Referencia
<i>jhp0940</i>	jhp0940F jhp0940R	5' GAAATGTCCTATACCAATGG 3' 3' CCTAAGTAGTGCATCAAGG 5'	591	Occhialini et al. 2000
<i>jhp0945</i>	jhp0945F jhp0945R	5' CAATGCGACTAACAGCATAG 3' 3' CGCATTGCTGTCATCTTTG 5'	1028	Occhialini et al. 2000
<i>jhp0947</i>	jhp0947F jhp0947R	5' GATAATCCTACGCAGAACG 3' 3' GCTAAAGTCATTTGGCTGTC 5'	611	Occhialini et al. 2000
<i>jhp0949a</i>	jhp0949aF jhp0949aR	5' ATAGGAGTCGGTGCTTACTT 3' 3' AGCAACAACAAAGGCATGTA 5'	787	de Jonge et al. 2004
<i>jhp0949b</i>	jhp0949bF jhp0949bR	5' TTCAAAAAGTCCCCGAAATG 3' 3' GGATGTCCTGGCATGTCTCT 5'	200-300	Sugimoto et al. 2012

Tabla 7. Preparación de la mezcla de reacción de PCR para los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*.

Reactivo (concentración inicial)	Volumen
<b>Gen <i>jhp0940</i></b>	
Buffer 10X	2.5 µL
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.5 µL
dNTP's 10 mM	0.5 µL
Primer F 50 mM	0.25 µL
Primer R 50 mM	0.25 µL
Muestra DNA	1 µL
Taq polimerasa 5 U/µL	0.15 µL
Agua libre de nucleasas	18.85 µL
<b>Genes <i>jhp0945</i>, <i>jhp0947</i> y <i>jhp0949</i></b>	
Buffer 10X	2.5 µL
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.5 µL
dNTP's 10 mM	0.25 µL
Primer F 50 mM	0.2 µL
Primer R 50 mM	0.2 µL
Muestra DNA	1 µL
Taq 5 U/µL	0.2 µL
Agua libre de nucleasas	19.15 µL

Las reacciones se llevaron a un volumen total de 25 µL.

Tabla 8. Condiciones de amplificación para los genes de la ZP.

<b>Gen <i>jhp0940</i></b>		
<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Hold desnaturalizar</b>	94°C	5 min
<b>Desnaturalizar</b>	92°C	30 seg
<b>Alinear</b>	56°C	45 seg
<b>Extender</b>	72°C	2.3 min
<b>35 ciclos</b>	-	-
<b>Hold extender</b>	72°C	5 min
<b>Genes <i>jhp0945</i> y <i>jhp0947</i></b>		
<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Hold desnaturalizar</b>	94°C	5 min
<b>Desnaturalizar</b>	94°C	1 min
<b>Alinear</b>	62°C	1 min
<b>Extender</b>	72°C	1 min
<b>35 ciclos</b>	-	-
<b>Hold extender</b>	72°C	7 min
<b>Gen <i>jhp0949</i>, reacción <i>a</i> y <i>b</i></b>		
<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Hold desnaturalizar</b>	95°C	5 min
<b>Desnaturalizar</b>	95°C	30 seg
<b>Alinear</b>	48°C	30 seg
<b>Extender</b>	72°C	30 seg
<b>35 ciclos</b>	-	-
<b>Hold extender</b>	72°C	5 min

La PCR se realizó en el termociclador ARKTIK de Thermo Scientific.

Se definió presencia del gen *jhp0949* cuando fuera positivo la PCR con cualquiera de los dos juegos de primers utilizados. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5%, utilizando como intercalador *Midori Green Advance*, para observar las bandas en el gel, bajo luz ultravioleta (UV). Utilizando un marcador de peso molecular de 100pb de la marca *Invitrogen*, diseñada para el dimensionamiento del DNA en el rango de 100bp a 2000bp; consta de 13 fragmentos de DNA con bandas de referencia a 2000bp, 1500bp y 600bp para una fácil orientación.

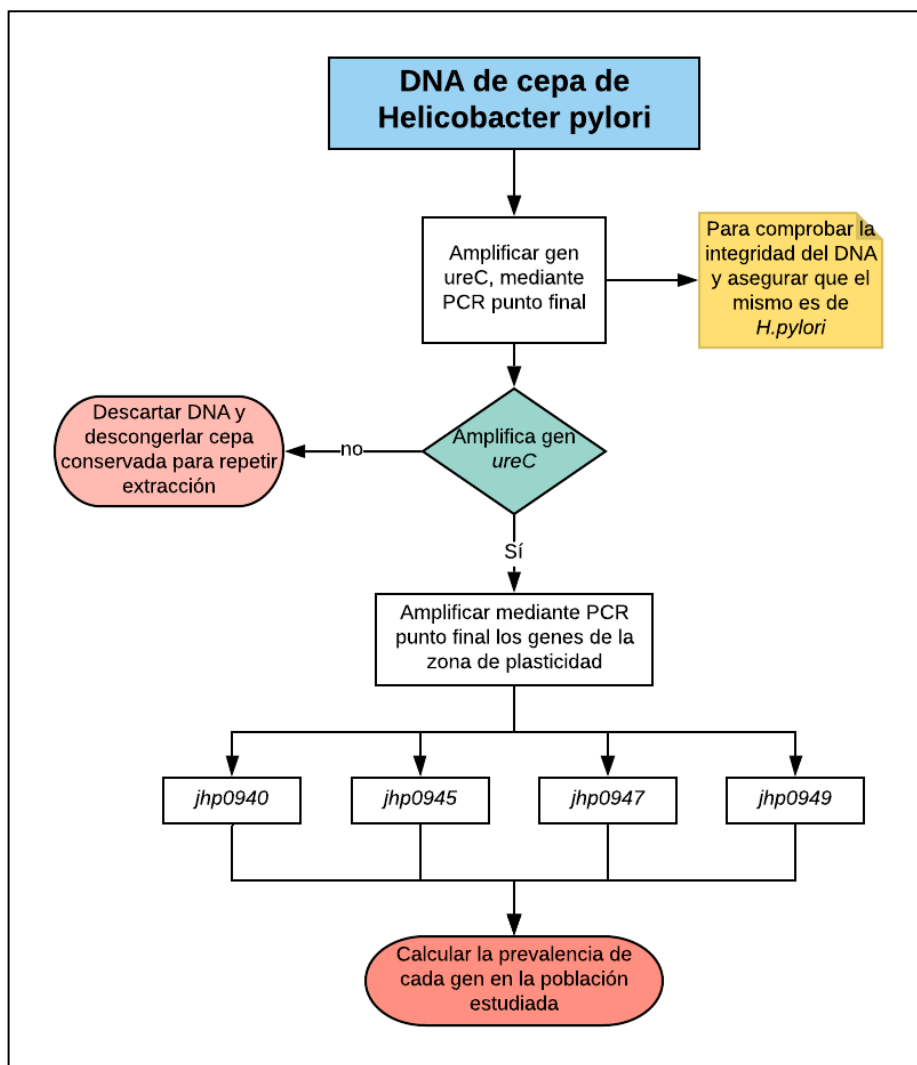


Figura 15. Diagrama general de la genotipificación de los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*, en DNA de cepas de *H. pylori*.

## 11. RESULTADOS

### Frecuencia de infección de *H. pylori* en la población estudiada. -

De 105 pacientes incluidos en el estudio, 47 (44.8%) fueron positivos a *H. pylori* por cultivo y/o PCR en al menos una región del estómago (antro, cuerpo o incisura), por lo tanto 58 pacientes (55.2%) fueron negativos. De los positivos, 13 (12.4%) fueron positivos tanto por cultivo como PCR y 34 (32.4%) solo por PCR.

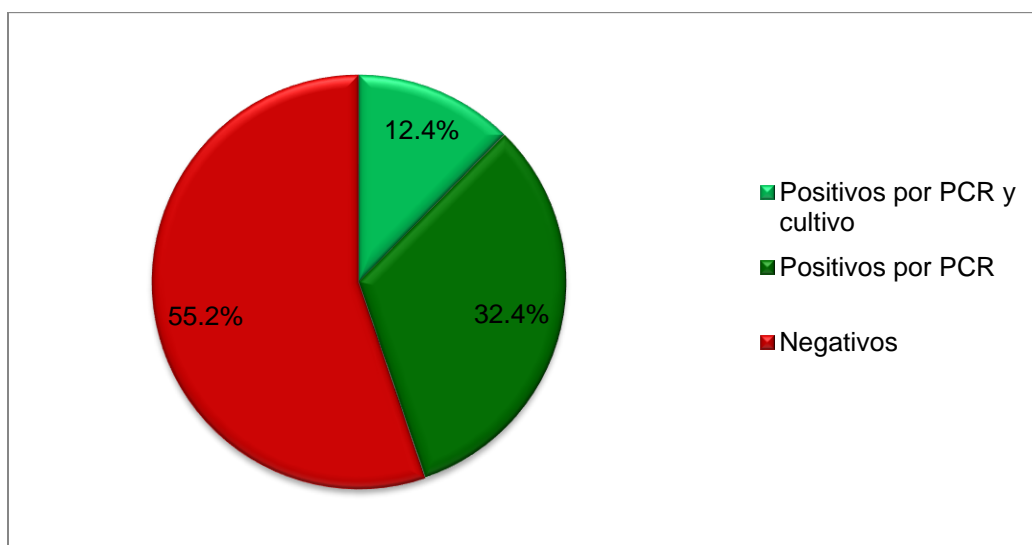


Figura 16. Frecuencia de *H. pylori* obtenido por cultivo y PCR en 105 pacientes



Figura 17. Crecimiento de *H. pylori* en Agar Sangre (5% de sangre de carnero). Primo aislamiento del cultivo de biopsia gástrica, después de 5 días de incubación a 37°C, con 9% de CO<sub>2</sub>.



Figura 18. Pruebas bioquímicas de catalasa y ureasa rápida. Cepas control de *H. pylori* (J99 y 26695) y cepa de un paciente, con resultado positivo a ambas pruebas.

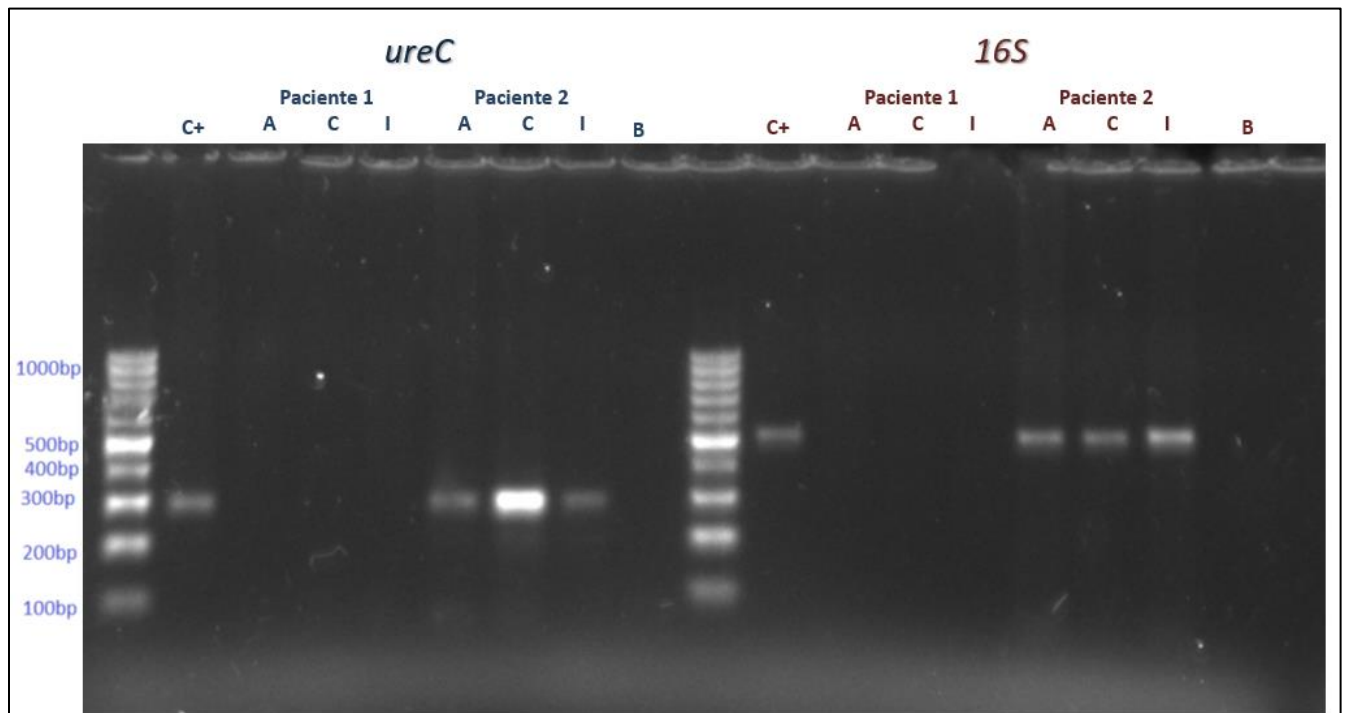


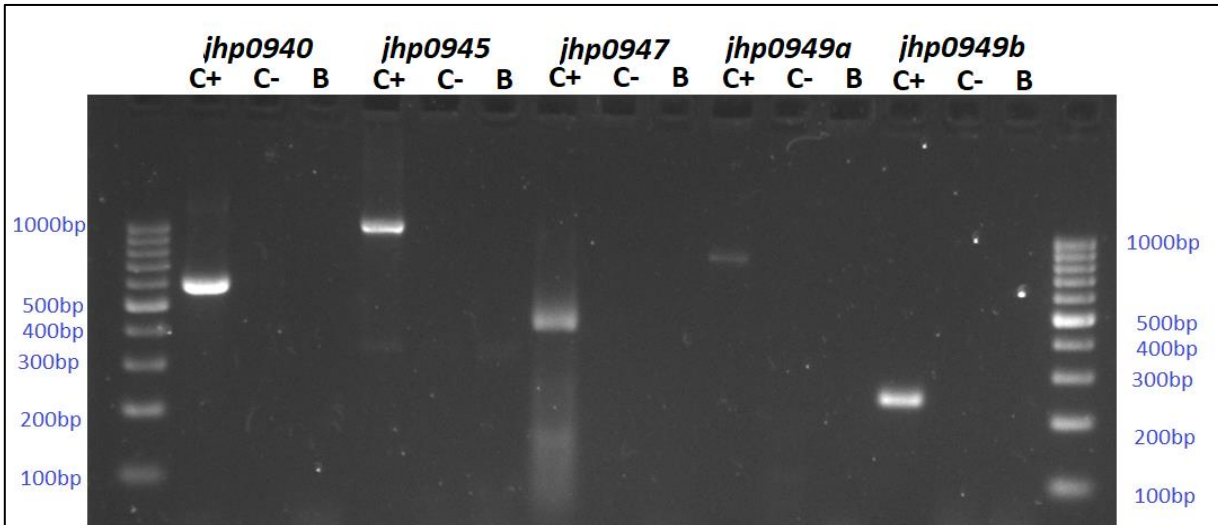
Figura 19. Reacción de PCR punto final de los genes *ureC* y *16SRNA*r. El gen *ureC* amplifica un producto de 294bp y *16S RNA*r de 522bp; diagnóstico de dos pacientes, en tres regiones del estómago, A: antro, C: cuerpo e I: Incisura. C+: control positivo, cepa ATCC J99; B: blanco. Paciente 1, negativo a *H. pylori*. Paciente 2, positivo a *H. pylori*. Gel de agarosa al 1.5%. Marcador de peso molecular de 100bp.

**Genotipificación de los genes de la ZP de *H. pylori* en la población estudiada.**

De los 13 pacientes que fueron cultivo positivo; se aislaron, 29 cepas, las cuales presentaron los siguientes resultados de genotipificación (Tabla 7).

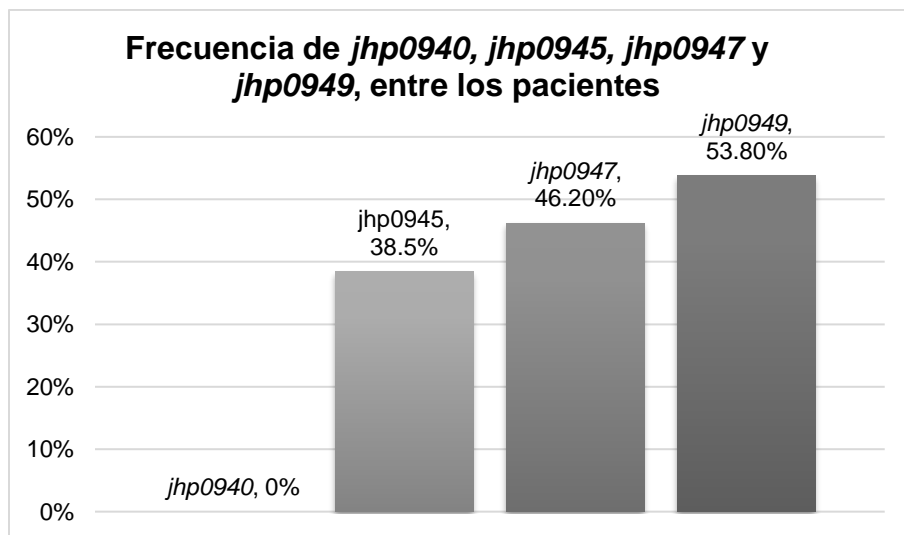
Tabla 9. Resultados generales de la genotipificación de los genes de la ZP en cepas de niños con manifestaciones gastroduodenales del INP. Verde: Presencia del gen. Rojo: Ausencia del gen. A es antro, C cuerpo e I incisura.

Paciente	Región	<i>jhp0940</i>	<i>jhp0945</i>	<i>jhp0947</i>	<i>jhp0949</i>
1	A	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
	I	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
2	C	Rojo	Rojo	Rojo	Verde
	I	Rojo	Rojo	Rojo	Verde
3	A	Rojo	Rojo	Verde	Rojo
	C	Rojo	Rojo	Verde	Rojo
	I	Rojo	Rojo	Verde	Rojo
4	A	Rojo	Rojo	Verde	Verde
	C	Rojo	Rojo	Rojo	Verde
	I	Rojo	Rojo	Rojo	Verde
5	I	Rojo	Rojo	Verde	Rojo
6	C	Rojo	Verde	Verde	Verde
	I	Rojo	Verde	Verde	Verde
7	A	Rojo	Verde	Verde	Verde
	C	Rojo	Rojo	Rojo	Verde
	I	Rojo	Verde	Verde	Verde
8	C	Rojo	Verde	Rojo	Verde
	I	Rojo	Verde	Rojo	Verde
9	C	Rojo	Verde	Rojo	Rojo
	I	Rojo	Verde	Rojo	Rojo
10	C	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
	I	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
11	A	Rojo	Rojo	Rojo	Verde
	C	Rojo	Verde	Rojo	Verde
	I	Rojo	Verde	Rojo	Verde
12	A	Rojo	Rojo	Verde	Rojo
	I	Rojo	Rojo	Verde	Rojo
13	A	Rojo	Rojo	Rojo	Verde
	I	Rojo	Rojo	Rojo	Verde



**Figura 20. Reacción de PCR punto final de los genes de la ZP.** La figura muestra un gel de agarosa con la amplificación de cada uno de los genes en la cepa control positivo, cepa J99 y no en la cepa 26695 control negativo y en B el blanco de reacción: *jhp0940* muestra un producto de amplificación de 591bp, *jhp0945* de 1028bp, *jhp0947* de 511bp, *jhp0949a* de 787bp y *jhp0949b* de 250bp. Gel de agarosa al 1.5%. Marcador de peso molecular de 100bp.

La genotipificación muestra que ninguna cepa de los pacientes presentan el gen *jhp0940*. La frecuencia de *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* entre los pacientes fue 38.5%; 46.2% y 53.8% respectivamente en al menos una región del estómago.



**Figura 21. Frecuencia de *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*, entre los pacientes.**



De las 29 cepas aisladas como se señaló, ninguna presentó el gen *jhp0940*; 10 (34.5%) presentaron el gen *jhp0945*, 11 (37.9%) el gen *jhp0947* y 17 (58.6%) tuvieron *jhp0949*.

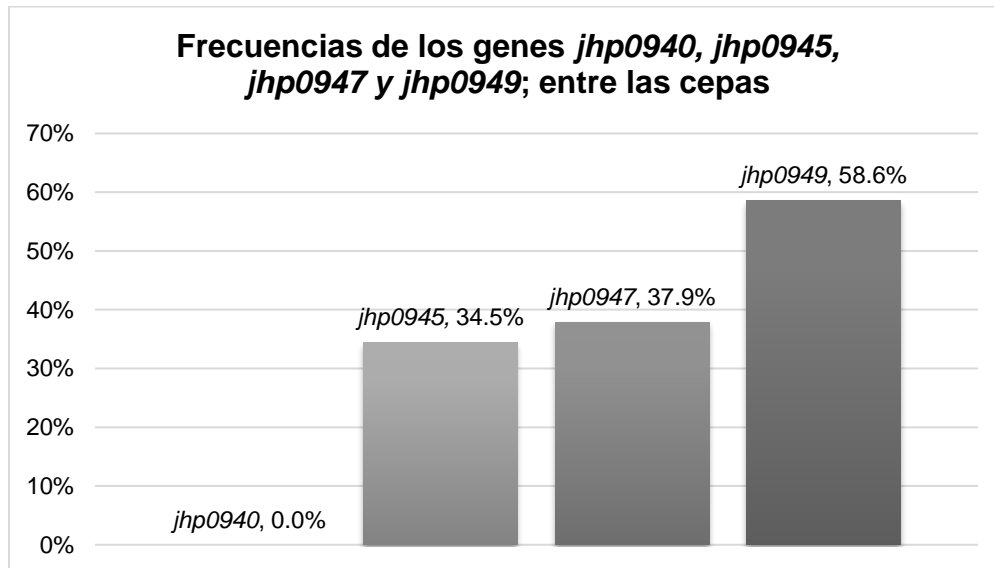


Figura 22. Frecuencia de *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*, entre las cepas.

Respecto al patrón genómico de distribución de *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* entre los pacientes se encontró lo siguiente: De acuerdo a la región del estómago: 10 (76.9%) pacientes presentaron un solo patrón genotípico y 3 (23.1%) un genotipo mixto en sus diferentes regiones como se observa a detalle en la Tabla 9 y se resume en la Tabla 10.

Tabla 10. Patrón genotípico de los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*, entre las regiones del estómago de los 13 pacientes.

Patrón genotípico en las distintas regiones del estómago	Número de pacientes	Contenido de genes en los pacientes
Único	10	1 presentó los tres genes
		2 no presentan ninguno
		7 presentaron ausencia de uno o dos genes
Mixto	3	En todos hubo ausencia de uno o dos genes

A continuación, se presentan ejemplos de la distribución de estos genes en las distintas regiones del estómago de los pacientes(A) y los diferentes patrones genotípicos encontrados en ellos, con infección única e infección mixta (B).

**A.**

- 10 pacientes (76.9%) presentaron un único patrón genotípico, todas sus regiones del estómago.

	<i>jhp0940</i>	<i>jhp0945</i>	<i>jhp0947</i>	<i>jhp0949</i>
<b>Antro</b>				
<b>Cuerpo</b>				
<b>Insisura</b>				

Verde, presencia del gen. Rojo, ausencia del gen

- 3 pacientes (23.1%) presentaron infección mixta (infección con diferente genotipo), en sus regiones del estómago.

	<i>jhp0940</i>	<i>jhp0945</i>	<i>jhp0947</i>	<i>jhp0949</i>
<b>Antro</b>				
<b>Cuerpo</b>				
<b>Insisura</b>				

Verde, presencia del gen. Rojo, ausencia del gen

**B.**

- De los pacientes con patrón único, 1 paciente presenta los tres genes

	jhp0940	jhp0945	jhp0947	jhp0949
Cuerpo				
Inisura				

Morado, presencia del gen. Amarillo, ausencia del gen

- 2 pacientes no presentan ninguno

	jhp0940	jhp0945	jhp0947	jhp0949
Antro				
Inisura				

Morado, presencia del gen. Amarillo, ausencia del gen

- 7 pacientes presentaron ausencia de uno o dos genes

		jhp0940	jhp0945	jhp0947	jhp0949
1	Cuerpo				
	Inisura				
2	Cuerpo				
	Inisura				

Morado, presencia del gen. Amarillo, ausencia del gen

- De los pacientes con patrón mixto, todos tienen ausencia de uno o dos genes.

	jhp0940	jhp0945	jhp0947	jhp0949
Antro				
Cuerpo				
Inisura				

Morado, presencia del gen. Amarillo, ausencia del gen

## 12. ANÁLISIS DE RESULTADOS

---

La mayoría de la información disponible sobre las frecuencias de *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* se ha obtenido de estudios en poblaciones adultas, a excepción del estudio realizado por Romo-González y colaboradores en 2015, donde se determinó la presencia de estos genes en una población pediátrica mexicana de una institución de salud diferente a la estudiada en este trabajo. En este estudio se encontró ausencia del gen *jhp0940* (*ctkA*) en los aislados de *H. pylori* este resultado no es similar a lo encontrado en otra población pediátrica dentro de nuestro país, ya que en el estudio antes mencionado se reporta una prevalencia de 53.1% entre esos pacientes. Existe controversia entre la presencia y ausencia de este gen y su relación con el cáncer gástrico, ya que su ausencia se ha encontrado en cepas aisladas de cáncer gástrico y no se ha asociado a enfermedad como ulcera péptica o gastritis (Romo-González et al., 2009 y Santos et al., 2003) aunque en un estudio si encuentran esa asociación (Occhialini et al., 2000). Otro estudio asocia la presencia de la proteína CtkA con una inflamación gástrica crónica y con la persistencia de *H. pylori*, ya que aumenta la actividad de NF-kB, que conduce a una mayor infiltración de neutrófilos en el moco gástrico, y esto conlleva a una elevada respuesta inflamatoria, distintivo de la infección con *H. pylori*; aumentando así el riesgo de resultados asociados a inflamación, como atrofia y cáncer gástrico (Alandiyjany et al., 2017).

Una de las hipótesis que podrían explicar la ausencia de *jhp0940*, es que la presencia de este es importante al inicio de la infección, y se va perdiendo conforme la infección se vuelve crónica, lo cual explicaría la ausencia de este gen en adultos con cáncer y la baja prevalencia en la asociación de este gen en gastritis crónica y ulcera-péptica en población adulta. En el caso de los niños aunque la edad promedio de la población estudiada fue 13 años, no sabemos cuánto tiempo podrían llevar infectados, esta población se caracteriza por presentar manifestaciones gastroduodenales, incluso algunos ya habían recibido tratamiento previo sin éxito para erradicar la bacteria, por ende, las cepas podrían estar más adaptadas a su nicho de supervivencia debido a un mayor tiempo de infección y por lo tanto

presentan un genotipo similar al reportado en adultos, donde este *jhp0940* está en baja frecuencia o ausente.

Por otro lado, respecto a los tres genes restantes *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*, en este trabajo, al igual que lo reportado por Romo-González y colaboradores en 2015 en otra población pediátrica, se encontró como el gen de mayor frecuencia a *jhp0949*, así como un patrón heterogéneo de estos.

Las frecuencias encontradas en este estudio fueron menores para los tres genes *jhp0945* (38.5%), *jhp0947* (46.2%) y *jhp0949* (53.8%) en comparación con lo anteriormente reportado *jhp0945* (44.9%), *jhp0947* (77.6%) y *jhp0949* (83.7%) (Romo-González et al. 2015). También se observó que además de ser el gen *jhp0949* el más frecuente en ambos estudios, este presenta un patrón uniforme entre las cepas estudiadas, es decir, está presente en los aislados de todas las regiones del estómago de un solo paciente, en contraste con *jhp0945* y *jhp0947* que se encuentran en un patrón mixto entre las regiones del estómago de cada paciente; esto podría significar que *jhp0949* es más conservado entre las cepas de *H. pylori*. Un punto importante a considerar es que en este estudio se trabajaron con aislados de diferentes regiones del estómago a diferencia del anterior estudio donde únicamente se aisló de una región del estómago, lo que nos lleva a reforzar lo señalado con respecto a su consistencia dentro del genoma de la bacteria.

Respecto al patrón de heterogeneidad de estos genes, de Jonge y colaboradores en 2004 reportaron la presencia de *jhp0947* asociada con *jhp0949*, lo cual no es observado en el presente estudio, donde se encontró mayor relación entre *jhp0945* y *jhp0949*; ya que solo en 5/11 (45.5%) de cepas positivas a *jhp0947* también lo fueron a *jhp0949*; en contraste con *jhp0945* y *jhp0949* donde 8/10 (80%) de las cepas presentaron ambos genes. La función de los genes *jhp0945-jhp0947-jhp0949* aún no se conoce, sin embargo, se ha propuesto, dado que son genes consecutivos y orientados en la misma dirección que posiblemente se expresen como un operón (Occhialini et al., 2000), para confirmar esta propuesta sería necesario realizar estudios de expresión de este locus en cultivos celulares y modelos animales.

Únicamente 2/13 (15.4%) de los pacientes no presentaron ninguno de los genes de la ZP, esto puede reforzar lo propuesto por Romo-González y colaboradores en el 2015, donde indica la ausencia de este cluster de genes de la ZP se encuentra con menor frecuencia en asilamientos de niños en comparación a los adultos.

Este estudio también permitió mostrar que un individuo puede estar infectado por diversos genotipos en diferentes regiones del estómago, a lo que llamamos infección mixta, los aislados de 3/13 (23%) pacientes presentaron este caso. Suerbaum y colaboradores reportan que la frecuente recombinación en *H. pylori* sugiere que las infecciones mixtas con diferentes cepas ocurren repetidamente (Suerbaum et al., 1998). Varios estudios de *fingerprinting* aplicados a aislados de *H. pylori* tomados de un mismo paciente han demostrado que diferentes cepas pueden derivar de una cepa ancestral, pero han sufrido cambios genómicos, fenómeno conocido como microevolución; por lo tanto, un solo paciente puede transportar dos o más cepas con un genotipo diferente (González-Vázquez et al., 2015), encontrándose diversos genotipos de los factores de virulencia más caracterizados como *cagA* y *vacA*, dentro de una misma región del estómago, al estudiar más de 2 colonias únicas. En nuestro caso lo que se observó fue infección mixta entre regiones del estómago, al genotipificar el aislado obtenido de tres distintas regiones, lo que demuestra infección por más de un genotipo en los niños infectados.

## 13. CONCLUSIONES

---

De 105 pacientes, el 44.8% resultaron positivos a *H. pylori*, y 13 de estos (12.4%) resultaron cultivo positivo.

De las 29 cepas obtenidas de los 13 pacientes el gen *jhp0940* estuvo ausente en todas las cepas y *jhp0949* fue el gen más frecuente (58.6%), para *jhp0945* la frecuencia fue 34.5% y para *jhp0947* 37.9%.

El patrón genómico de *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* en las cepas es muy heterogéneo, lo cual nos habla de la diversidad genética que presentan las cepas en estos pacientes, siendo esto relevante por la asociación de estos genes con enfermedad, por lo que si además de estos genes tienen otros que codifican para factores de virulencia como *cagA* y *cagPAI*, pueden ser cepas con riesgo a provocar mayor grado de inflamación.

Sería importante conocer la expresión de estos genes en la mucosa gástrica; además de relacionar el diagnóstico clínico y endoscópico con la presencia o ausencia de los genes de la ZP en población pediátrica y de esta manera conocer sobre su función y poder entender su papel en la infección por *H. pylori*.

## 14. REFERENCIAS

---

- Abu-Almaali H. M., Al-Khatibi H. A., y Nasr-Allah H. A. (2012). Duplex PCR primers for detection of *Helicobacter pylori* DNA directly from gastric biopsy samples. *Kerbala Journal of Pharmaceutical Sciences*. 3, 201-212.
- Agudo, S. (2010). *Estudio molecular de los factores de virulencia y de la resistencia a claritromicina en la infección por Helicobacter pylori*. (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.
- Ahmed, N. (2005). 23 years of the discovery of *Helicobacter pylori*: Is the debate over? *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 4(17).
- Alandiyjany, M., Croxall, N., Grov, J. y Delahay, R. (2017) A role for the tfs3 ICE-encoded type IV secretion system in pro-inflammatory signalling by the *Helicobacter pylori* Ser/Thr kinase, CtkA. *PLoS ONE* 12(7), 1-16.
- Alm, R., Ling, L., Moir, D., King, B., Brown, E., Doig, P., Smith, D., Noonan, B., Guild, B., DeJonge, B., Carmel, G., Tummino, P., Caruso, A., Uria-Nickelsen, M., Mills, D., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S., Jiang, Q., Taylor, D., Vovis, G., y Trust, T. (1999). Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 397, 176-180.
- Amieva, M. y El-Omar, E. (2008). Host-Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*, 134(1), 306-323.
- Armitano, R., Matteo, M., Goldman, C., Wonaga, A., Viola, L., Zerbetto, G. y Catalano, M. (2013). *Helicobacter pylori* heterogeneity in patients with gastritis and peptic ulcer disease. *Infection, Genetics and Evolution* 16, 377-385.
- Burkitt, M. D., Duckworth, C. A., Williams, J. M., y Pritchard, D. M. (2017). *Helicobacter pylori* induced gastric pathology: insights from in vivo. *The Company of Biologists Ltd | Disease Models & Mechanisms* 10, 89-104.
- Cava, F. y Cobas, G. (2003). Dos décadas de *Helicobacter pylori*. *Vaccimonitor* (12)1, 56-67.



- Chang, W., Yeh, Y., y Sheu, B. (2018). The impacts of *H. pylori* virulence factors on the development of gastroduodenal diseases. *Journal of Biomedical Science* 25(68).
- de Jonge, R., Kuipers, E., Langeveld, S., Loffeld, R., Stoof, J., van-Vliet, A. y Kusters, J. (2004). The *Helicobacter pylori* plasticity region locus *jhp0947-jhp0949* is associated with duodenal ulcer disease and interleukin-12 production in monocyte cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 41(2), 161-167.
- Dunne, C., Dolan, B., y Clyne, M. (2014). Factors that mediate colonization of the human stomach by *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology*, 20(19), 5610-5624.
- Falush, D., Wirth, T., Linz, B., Pritchard, J., Stephens, M., Kidd, M., Blaser, M., Graham, D., Vacher, S., Pérez-Pérez, G., Yamaoka, Y., Otto, K., Reichard, U., Katzowitsch, E., Wang, X., Achtman, M. y Suerbaum, S. (2003). Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*, 299, 1582-1585.
- Fischer, W., Windhager, L., Rohrer, S., Zeiller, M., Karnholz, A., Hoffmann, R., Zimmer, R., y Hass, R. (2010). Strain-specific genes of *Helicobacter pylori*: genome evolution driven by a novel type IV secretion system and genomic island transfer. *Nucleic Acids Research*, 38(18), 6089–6101.
- Frost, L., Leplae, R., Summers, A., y Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology* 3, 722-732.
- Ganguly, M., Sarkar, S., Ghosh, P., Sarkar, A., Alam, J. y Karmakar, B. (2016). *Helicobacter pylori* plasticity region genes are associated with the gastroduodenal disease manifestation in India. *Gut Pathogens*, 8, 10-25.
- Gong, Y., Peng, X., He, L., Liang, H., You, Y. y Zhang, J. (2015). The distribution of *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947*, *jhp0949* and *jhp0951* genes of *Helicobacter pylori* in China. *BMC Gastroenterology*, 15, 115-120.
- González-Vázquez, R., Córdova-Espinoza, M., Escamilla-Gutiérrez, A., Morales-Méndez, I., Ochoa-Pérez, S., Armendáriz-Toledano, F., Fonseca-

Nájera, J. y Giono-Cerezo S. (2015). Frequency of virulence genes in mixed infections with *Helicobacter pylori* strains from a Mexican population. *Revista de gastroenterología de México*, 81(1), 11-20.

- Hooi J., Lai W., Ng, W., Suen, M., Underwood, F., Tanyingoh, D., Malfertheiner, P., Graham, D., Wong, V., Wu, J., Chan, F., Sung, J., Kaplan, G. y Ng, S. (2017). Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* 153(2), 420-429.
- Israel, D., Salama, N., Krishna, U., Rieger, U. y Peek, R. (2001). *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. *Proc Natl Acad Sci*, (98)25, 14625- 14630.
- Iwanczak, B., Buchner, A., y Iwanczak, F. (2017). Clinical differences of *Helicobacter pylori* infection in children. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 26(7), 1131-1136.
- Kersulyte, D., Lee, W., Subramaniam, D., Anant, S., Herrera, P., Cabrera, L., Balqui, J., Barabas, O., Kalia, A., Gilman, R. y Berg, D. (2009). *Helicobacter pylori*'s plasticity zone are novel transposable elements. *PLoS ONE*, 4(9), 1-15
- Kusters, J. G., Vliet, A. H. M. Van, y Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 449–490.
- Lopes, A., Vale, F., y Oleastro, M. (2014). *Helicobacter pylori* infection – recent developments in diagnosis. *World Journal of Gastroenterology* 20(28), 9299-9313.
- Negroni, M., (2009). *Microbiología estomatológica, fundamentos y guía práctica*, Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Occhialini, A., Marais, A., Alm, R., Garcia, F., Sierra, R. y Mégraud, F. (2000) 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. *Infection and Immunity*, 68(11), 6240-6249.
- Ortíz-Princz, D., Daoud, G., Salgado-Sabel, A., y Cavazza, M. (2016). *Helicobacter pylori* infection in children: should it be carefully assessed. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 20, 1798-1813.

- Pajares J. M. y Gisbert J. P. (2006). *Helicobacter pylori*: its discovery and relevance for medicine. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 98(10), 770-785.
- Proença, J., Lopes, A., Olszanski, G., Russo, R., Vilela, M. y Fukuhara Y. (2007). Association between *Helicobacter pylori* genotypes and gastric disorders in relation to the *cag* pathogenicity island. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 59, 7-16.
- Reshetnyak, V., y Reshetnyak, T. (2017). Significance of dormant forms of *Helicobacter pylori* in ulcerogenesis. *World Journal of Gastroenterology* 23(27), 4867-4878.
- Rizwan, M., Alvi, A. y Ahmed, N. (2008). Novel protein antigen (JHP940) from the genomic plasticity region of *Helicobacter pylori* induces tumor necrosis factor alpha and interleukin-8 secretion by human macrophages. *Journal of Bacteriology*, 190(3), 1146-1151.
- Romo-González, C., Consuelo-Sánchez, A., Camorlinga-Ponce, M., Velázquez-Guadarrama, N., García-Zúñiga, M., Burgueño-Ferreira, J., y Coria-Jiménez, R. (2015). Plasticity Region Genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947*, and *jhp0949* of *Helicobacter pylori* in Isolates from Mexican Children. *Helicobacter*, 20(3), 231–237.
- Romo-González. C. y Coria-Jiménez. R. (2010). *Helicobacter pylori* un modelo de bacteria carcinogénica. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas* 15(4), 242-251.
- Romo-González, C. y Coria-Jiménez, R. (2018). *Helicobacter pylori* Genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* and *jhp0949* are Associated with Gastrointestinal Disease, *Helicobacter Pylori - New Approaches of an Old Human Microorganism*, Bruna Maria Roesler, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.81290. Available from: <https://www.intechopen.com/books/helicobacter-pylori-new-approaches-of-an-old-human-microorganism/-em-helicobacter-pylori-em-genes-em-jhp0940-em-em-jhp0945-em-em-jhp0947-em-and-em-jhp0949-em-are-ass>.

- Romo-González, C., Salama, NR., Burgeño-Ferreira, J., Ponce-Castañeda, V., Lazcano-Ponce, E., Camorlinga-Ponce, M. y Torres, J. (2009). Differences in genome content among *Helicobacter pylori* isolates from patients with gastritis, duodenal ulcer, or gastric cancer reveal novel disease-associated genes. *Infection and Immunity*, 77(5), 2201-2211.
- Saier Jr, M., Kukita, C., y Zhang, Z. (2018). Transposon-mediated directed mutation in bacteria and eukaryotes. *Front Biosci*, 22, 1458–1468.
- Santos, A., Queiroz, DM., Ménard, A., Marais, A., Rocha, GA. y Oliveira, C. (2003). New pathogenicity marker found in the plasticity region of the *Helicobacter pylori* genome. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 1651-1655.
- Sterbenc, A., Jarc, E., Poljak, M., y Homan, M. (2019). *Helicobacter pylori* virulence genes. *World Journal of Gastroenterology*, 25(33), 4870-4884.
- Suárez-Cortina, L. y Agrimbau, J. (2007). Dolor abdominal recurrente y *Helicobacter pylori*. *Revista Gastrohnup*, 9(1), 29-33.
- Suerbaum, S., Smith, J., Bapumia, K., Morelli, G., Smtith, N., Kunstmann, E., Dyrek, I. y Achtman, M. (1998). Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 12619–12624.
- Sugimoto, M., Watada, M., Jung, S., Graham, D. y Yamaoka Y. (2012). Role of *Helicobacter pylori* plasticity region genes in development of gastroduodenal diseases. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 441-448.
- Talebi Bezmin Abadi, A. (2017). Strategies used by *Helicobacter pylori* to establish persistent infection. *World Journal of Gastroenterology*, 23(15), 2870-2882.
- Torres, J., Leal-Herrera, Y., Perez-Perez, G., Gomez, a, Camorlinga Ponce, M., Cedillo-Rivera, R., Tapia-Conyer, R. y Muñoz, O. (1998). A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *The Journal of Infectious Diseases*, 178(4), 1089–1094.
- Vanderpas, J., Bontems, P., Miendje, V., y Cadranel, S. (2014). Follow-up of *Helicobacter pylori* infection in children over two decades (1988–2007): persistence, relapse and acquisition rates. *Epidemiology and Infectology*, 142, 767-775.

- Waskito, L., Yih-Wu, J., y Yamaoka, Y. (2018). The role of integrating conjugative elements in *Helicobacter pylori*: a review. *Journal of Biomedical Science*, 25(86), 23-36.
- Windsor, H. M., y O'Rourke, J. (2000). Bacteriology and taxonomy of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology Clinics of North America*, 29(3), 633–648.
- Yamaoka, Y. (2008). Roles of the plasticity regions of *Helicobacter pylori* in gastroduodenal pathogenesis. *Journal of Medical Microbiology*, 57(5), 545-553.

## 15. GLOSARIO DE ABREVIATURAS

---

- AS: Agar sangre
- BG: Biopsia gástrica
- bp: Pares de bases
- CtkA: Cinasa A de traslocación celular
- DAR: Dolor abdominal recurrente
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- Hp: *Helicobacter pylori*
- ICE: Elementos integrativo conjugativo
- ICEHptfs: Elemento integrativo conjugativo de *Helicobacter pylori* que codifica para un sistema de secreción tipo 4
- IL: Interleucina
- INP: Instituto Nacional de Pediatría
- MAPK: MAP cinasas
- MGE: Elementos genéticos móviles
- OMP: Proteínas de membrana externa
- ORF: Marcos de lectura abierta
- PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
- PMN: Polimorfos nucleares
- RNA: Ácido ribonucleico
- ROI: Especie reactiva de oxígeno
- rpm: Revoluciones por minuto
- SSF: Solución salina fisiológica
- T4SS: Sistema de secreción tipo 4
- TnZP: Transposones de zonas de plasticidad
- UV: Ultravioleta
- ZP: Zona de plasticidad