



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Identificación de los factores de virulencia *cagA* y *cagPAI* en cepas de *Helicobacter pylori*
obtenidas en el Instituto Nacional de Pediatría.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA

MIGUEL ANGEL ROJAS CRUZ

ASESOR: Dra. CAROLINA MARIA ANTONIETA ROMO GONZÁLEZ

CO-ASESOR: M.C. ANDREA ANGELA BECERRIL OSNAYA

CUAUTITLÁN 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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
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

Identificación de los factores de virulencia cagA y cagPAI en cepas de *Helicobacter pylori* obtenidas en el Instituto Nacional de Pediatría.

Que presenta el pasante: Miguel Angel Rojas Cruz
Con número de cuenta: 311119253 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 14 de Enero de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M en C. Andrea Angela Becerril Osnaya	
VOCAL	Q.F.B. Dulce María Ruvalcaba Sil	
SECRETARIO	M. en C. María Guadalupe Avilés Robles	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo	

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

LMCF/cga*

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de Tesis lo dedico de manera muy especial a mi familia. Mi papá Víctor Manuel por apoyarme toda mi vida, mi hermano Luis Ernesto por siempre mostrarme la realidad de las cosas y centrarme para no perder el camino, mi y principalmente a mí mamá Maricela Cruz Rangel por siempre apoyarme en todo momento y siempre estar ahí para ayudarme en mis momentos más difíciles y disfrutar conmigo los mejores, sin dejar de lado el apoyo incondicional para poder finalizar este trabajo.

Un agradecimiento especial a mi asesora Carolina Romo por brindarme la oportunidad de trabajar en un proyecto de investigación y tenerme la confianza para apoyarla dentro de las actividades del laboratorio. También le agradezco a la profesora Andrea Becerril por brindarme los conocimientos previos necesarios de bacteriología, así como su recomendación para poder trabajar con la Doctora Carolina.

De igual manera agradezco a mis amigos que conocí en la Facultad David, Luis Morelia, “Los niños del árbol” Ricardo, Fernando y Beto por acompañarme en este largo camino donde tuve la fortuna de encontrarlos y caminar con maravillosas personas. Pero quiero agradecer principalmente a mi mejor amiga Mariana Espinosa Matías a la cual también dedico este trabajo por siempre acompañarme en los mejores y peores momentos, por apoyarme siempre en todo y por poder recorrer el camino de la facultad juntos haciendo el MEJOR EQUIPO de laboratorio :D. De verdad es la mejor persona que pude conocer en la facultad y espero tener la fortuna de poder seguir compartiendo los mejores momentos por siempre.

También quiero dedicar este trabajo a dos personas muy especiales a mi amiga y vecina María Fernanda que siempre ha estado acompañándome desde mi infancia y a mi amigo Getsemaní Daniel con el cual compartí muchas cosas especiales y me acompañó en mi camino de universitario.

Finalmente, pero no menos importante a mi perrito MOMO del cual aprendí algo muy importante: En la vida siempre hay tiempo para hacer todo, tómalo con calma, relájate y nunca dejes de demostrar tu afecto a todos.

GRACIAS

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. MARCO TEORICO.....	3
3.1. Características microbiológicas.....	3
3.2 Cultivo	4
3.3 Metabolismo.....	4
3.4 Evolución y epidemiología.....	5
3.5 Transmisión y colonización.....	7
3.6 Patologías.....	7
3.7 Dolor abdominal crónico y su asociación con <i>H. pylori</i>	8
3.8 Genoma de <i>H. pylori</i>	9
3.9 Factores de virulencia.....	9
3.10 <i>cagA</i>	13
3.10.1 Prevalencia del gen <i>cagA</i> en niños.....	14
3.10.2 Mecanismo de acción de la proteína CagA en la infección y su relación con el Sistema de Secreción Tipo IV (T4SS).....	16
3.11 Isla de Patogenicidad <i>cagPAI</i>	18
4 JUSTIFICACIÓN.....	22
5 HIPÓTESIS.....	22
6 OBJETIVOS.....	22
6.2 Objetivo General.....	22
6.3 Objetivos Particulares.....	22
7 METODOLOGÍA.....	23
8 RESULTADOS.....	29
9 ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	33
10 CONCLUSIÓN.....	36
11 ANEXOS.....	37
12 REFERENCIAS.....	39

INDICE DE TABLAS

1. Prevalencia de <i>cagA</i> en niños.....	15
2. Volumen de reactivos para máster mix <i>16sRNAr</i> y <i>ureC</i>	26
3. Condiciones de reacción <i>16sRNAr</i> y <i>ureC</i>	26
4. Volumen para máster mix <i>cagPAI</i> y <i>cagA</i>	27
5. Condiciones de reacción para la isla de patogenicidad <i>cagPAI</i>	27
6. Condiciones de reacción para el gen <i>cagA</i>	28
7. Diagnóstico de <i>H. pylori</i> en biopsias gástricas de niños con manifestaciones gastroduodenales.....	29
8. Frecuencia de <i>H. pylori</i> por región del estómago.....	29
9. Resultados de genotipificación de cepas de <i>H. pylori</i>	30
10. Frecuencia genotípica de los 8 pacientes con patrón único.....	32
11. Frecuencia de <i>cagA</i> y <i>cagPAI</i> en 11 pacientes en al menos una región del estómago.....	32
12. Frecuencia de <i>cagA</i> y <i>cagPAI</i> en 25 cepas aisladas de 11 pacientes.....	32
13. Descripción de oligonucleótidos utilizados en la PCR.....	37

INDICE DE FIGURAS

1. <i>Helicobacter pylori</i>	3
2. Prevalencia de <i>H. pylori</i> en niños en el mundo.....	6
3. Patologías asociadas a la infección por <i>H. pylori</i>	8
4. Mecanismo de infección <i>H. pylori</i> : disrupción de la barrera epitelial y patogénesis.....	17
5. Componentes del T4SS.....	20
6. Modelo alternativo de ensamblaje del T4SS.....	21
7. Resultados en gel de agarosa para la identificación de la isla de patogenicidad <i>cagPAI</i> y el gen <i>cagA</i>	31
8. Esquema de PCR empty site.....	37

1. Resumen

Antecedentes: *Helicobacter pylori* (Hp) es una bacteria asociada con gastritis crónica, úlcera péptica y cáncer gástrico. Esta bacteria se adquiere normalmente a edad temprana. En niños la infección por Hp se ha asociado a dolor abdominal recurrente (DAR) sin embargo, puede ocasionar gastritis o úlcera péptica. La prevalencia de Hp en niños oscila entre 10-40% en países desarrollados y hasta un 80% en países en desarrollo. El gen *cagA* y la presencia de la isla de patogenicidad *cagPAI* son importantes factores de virulencia asociados al desarrollo de enfermedad. **Objetivo:** Determinar la frecuencia del gen *cagA* y la isla de patogenicidad *cagPAI* en cepas aisladas de niños con manifestaciones gastroduodenales del Instituto Nacional de Pediatría. **Material y métodos:** El presente trabajo forma parte del proyecto No. 024/2019 aprobado por los comités de investigación, ética, y bioseguridad del Instituto Nacional de Pediatría. Se estudiaron 84 niños con manifestaciones clínicas gastroduodenales los cuales fueron sujetos a biopsia gástrica en tres regiones del estómago antro, cuerpo e incisura; de cada región se realizó cultivo y se extrajo DNA para el diagnóstico de Hp por PCR utilizando los genes *16sRNA* (522 pb) y *ureC* (294 pb). En las cepas aisladas también se extrajo DNA y mediante PCR se identificaron los genes de *cagA* (349 pb) y la isla de patogenicidad *cagPAI* (360 pb), mediante PCR empty site punto final. **Resultados:** De 84 pacientes, 39 (46.4%) fueron positivos para Hp por cultivo y/o PCR en al menos una región del estómago (antro, cuerpo o incisura) de estos solo 11 pacientes (13.1%) fueron positivos tanto por cultivo como por PCR y 28 (33.3%) solo por PCR. De estos 11 pacientes se obtuvieron 25 cepas de diferentes regiones del estómago. La frecuencia de *cagA* y *cagPAI* de los 11 pacientes fue 100% y 72.7% respectivamente en al menos una región del estómago. Respecto al patrón *cagA/cagPAI* la distribución fue: 8/11 (72.2%) *cagA+/cagPAI+*; 4/11 (18.2%) *cagA-/PAI+*; 2/11 (18.2%) *cagA-/cagPAI-*. La distribución de las 25 cepas aisladas fue: 17/25 (68%) *+cagA/+cagPAI*; 6/25 (24%) *cagA-/cagPAI+*; 2/25 (8%) *cagA-/cagPAI-*. **Conclusiones:** El patrón *cagA+/cagPAI+* es el más frecuente entre los aislados de *H. pylori* de la población de estudio, lo cual es relevante por la importancia que tienen estos factores de virulencia para la patogenicidad de la bacteria y su asociación con enfermedad.

2. INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es una bacteria que afecta a más del 50% de la población mundial. Su importancia ha sido tal, que a menos de dos décadas de su descubrimiento rápidamente se secuenció su genoma completo, se han descrito sus factores de virulencia y se acepta su participación en la causalidad de las gastritis, úlcera péptica y cáncer gástrico. Se ha postulado que la infección se adquiere de manera temprana por diferentes vías como; oro-oral, orogástrica y fecal-oral. (Rivas, et al, 2000)

Esta infección causa gastritis en la mayoría de los pacientes infectados, aunque la mayoría de ellos permanece asintomática, *Torres et. al. 2000* menciona que la infección no está asociada con sintomatología específica en niños y que la enfermedad úlcero-péptica es muy rara en niños menores de 10 años. Algunos de los síntomas más comunes en niños son dolor epigástrico, náuseas, vómito, con menos frecuencia y la aparición de dolor abdominal recurrente (DAR). Sin embargo, está establecido que la infección está asociada a úlcera duodenal sin ser la causa en específico. Además, esta infección incrementa el riesgo de desarrollar cáncer gástrico, siendo atípico en menores de 40 años y sin desarrollo en niños. (Torres, et al, 2000)

H. pylori posee importantes factores de virulencia ampliamente descritos como CagA, la isla de patogenicidad *cagPAI*, la citotoxina VacA, algunas adhesinas como BAbA, OipA y recientemente genes de la zona de plasticidad del genoma de *Helicobacter pylori* como *dupA*, todos ellos están involucrados en la patogenicidad de la bacteria.

Este trabajo se enfocó en la genotipificación de *cagA* y *cagPAI* en asilados clínicos de niños. El gen *cagA* (citotoxina asociada al gen A) codifica para la proteína oncogénica CagA, el gen forma parte de la isla de patogenicidad denominada *cagPAI*, esta isla está compuesta por 31 genes aproximadamente, los cuales codifican para un sistema de secreción tipo IV.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Características microbiológicas

H. pylori es un bacilo curvo Gram negativo mide entre 2-4 micrómetros manteniendo una forma helicoidal. También se puede encontrar en forma cocoide, esta morfología se debe a su largo tiempo en cultivo *in vitro* o cuando la cepa proviene de un individuo con largos esquemas de tratamiento. Sin embargo, esta forma algunos autores la han considerado una forma no viable. (Kusters, et al, 1997).

H. pylori tiene 2 a 6 flagelos unipolares, de 3 micrómetros de longitud aproximadamente. Estos flagelos le confieren motilidad a la bacteria y facilita el movimiento en soluciones viscosas como el moco que se encuentra sobre el epitelio gástrico. En contraste a muchos otros microorganismos gastrointestinales, estos carecen de adhesinas fimbriales (O'Toole, et al, 2000).

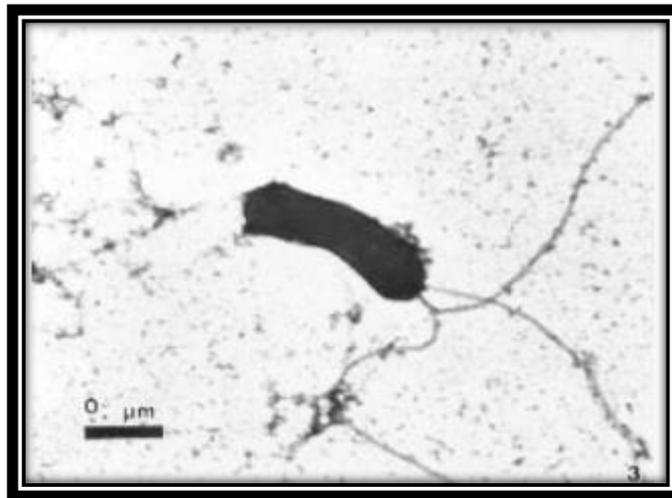


Figura 1 Helicobacter pylori (Rivas et al, 2000)

La principal característica de *H. pylori* es una bacteria microaerofílica, para su crecimiento óptimo requiere una concentración de oxígeno de 2 a 5% y adicionalmente requiere de un 5 a 10% de dióxido de carbono y un alto grado de humedad. Aunque, en muchos laboratorios se utilizan condiciones microaerofílicas estándar como 85% de nitrógeno, 10% de dióxido de carbono y 5% de oxígeno. La temperatura puede variar entre 34 y 40 °C siendo la óptima, para su crecimiento, de 37 °C. A pesar de que su habitat natural es el epitelio gástrico, se considera que *H. pylori* es una bacteria neutrofílica. Esta bacteria puede

sobrevivir expuesta a un pH menor de 4, sin embargo, puede crecer en un rango de 5.5 a 8.0, siendo el óptimo el pH neutro (Scott, et al, 2002).

3.2 Cultivo

H. pylori es una bacteria fastidiosa debido a su complejo aislamiento *in vitro*, por los factores de crecimiento requeridos para su mantenimiento en medios de cultivo. A menudo los medios se suplementan con sangre y/o suero ya que aportan los nutrientes necesarios para su crecimiento, además de proporcionar protección del efecto tóxico de las cadenas de ácidos grasos. También se pueden implementar otros suplementos como la Beta-ciclodextrina o el Iso Vilatex (Taneera, et al, 2002).

Comúnmente se utilizan medios sólidos para el cultivo y aislamiento de la bacteria estos pueden ser Agar Brucella o Columbia suplementados con un lisado de sangre de caballo o cordero. De forma alternativa se puede suplementar con suero fetal bovino. Sin embargo, para el primer aislamiento se recomienda incorporar al medio una combinación de distintos antibióticos como: Vancomicina, Trimetoprim, Polimixina B y Anfotericina B (Skirrow, et al, 1977).

Para el crecimiento en medio líquido usualmente se utiliza Caldo Brucella, Mueller Hinton e Infusión cerebro-corazón (BHI). Todos suplementados con una concentración de 2 a 10% de suero fetal bovino o 0.2 a 1.0% de Beta-ciclodextrina (Reynolds, et al, 1994).

3.3 Metabolismo

Gracias a estudios genéticos y bioquímicos se ha demostrado que *H. pylori* tiene rutas metabólicas muy reducidas y que carece de rutas biosintéticas para algunos aminoácidos. Como consecuencia solo se puede cultivar en medios que contengan aminoácidos adicionales como arginina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina y valina.

H. pylori es una bacteria ureasa, catalasa y oxidasa positiva, características que son utilizadas frecuentemente para su identificación. También pueden metabolizar glucosa, siendo este el único carbohidrato fermentable que puede utilizar.

Todos estos descubrimientos se han realizado gracias a estudios genéticos, específicamente de la secuenciación del genoma de *H. pylori*, así como el estudio de los genes que lo componen (Kusters, et al, 2006).

3.4 Evolución y epidemiología

La relación entre *H. pylori* y los humanos comenzó hace 100,000 años. Un estudio filogenético predice que la bacteria se diseminó desde el este de África al mismo tiempo que el humano moderno (Linz, et al, 2007).

Por todo el mundo se han encontrado diferentes especies de *Helicobacter* en diferentes mamíferos, además de los humanos. Por lo que se especula, esta bacteria es ancestral en mamíferos y que los humanos fueron infectados por ancestros de las cepas modernas (Cover, et al, 2009).

Las infecciones por *H. pylori* actualmente ocurren de manera mundial, aunque es más frecuente encontrarla en países en vías de desarrollo, principalmente en comunidades con nivel socioeconómico bajo. Otro factor importante es la migración de personas provenientes de lugares con alta prevalencia y su hacinamiento en comunidades distintas (Torres, et al, 2000).

También se ha encontrado que la prevalencia de esta bacteria tiene un comportamiento inversamente proporcional al nivel socioeconómico de la población, en países desarrollados la prevalencia es más baja comparada con la encontrada en países en vías de desarrollo (Fiedorek, et al, 1991).

Estudios muestran que en países subdesarrollados más del 80% de la población es positivo a *H. pylori* incluso en niños, principalmente estos porcentajes son encontrados en pruebas serológicas. La prevalencia en países industrializados generalmente se encuentra alrededor de 40% y considerablemente baja en niños y adolescentes comparados con adultos y ancianos (Genta, et al, 2002).

Estudios sugieren que la infección ocurre principalmente en niños y se incrementa con la edad; se cree que el núcleo de la infección es el hogar en los primeros 3 años. La prevalencia

de la infección en diferentes poblaciones de niños varía del 10 al 80%. Observándose bajas prevalencias en países de Norte América, Europa occidental, así como en Japón y algunos países asiáticos. En contraste se han encontrado altas prevalencias en África, India, Bangladesh y Latinoamérica. Algunos factores de riesgo son: bajo nivel económico, alto hacinamiento, historia de úlcera en la madre, padres y hermanos infectados con *H. pylori*, número de niños en casa, pobre estado nutricional, ausencia de agua potable y baño o letrina en casa, consumo de vegetales crudos, contacto con animales y asistencia a guarderías (Torres, et al, 2000).

Esta bacteria ha sido muy estudiada, principalmente en adultos, sin embargo, en niños los estudios son muy escasos alrededor del mundo. En Irlanda se realizó un estudio de 1997 a 2001 donde se demostró una prevalencia en niños pequeños mínima, del 12% (9/75). En contraste a esto, en otro estudio realizado en Bangladesh, se demostró una gran prevalencia en niños, obteniendo un 47.5% (50/105) de niños infectados en un periodo de 2 años (Koriet, et al, 2018).

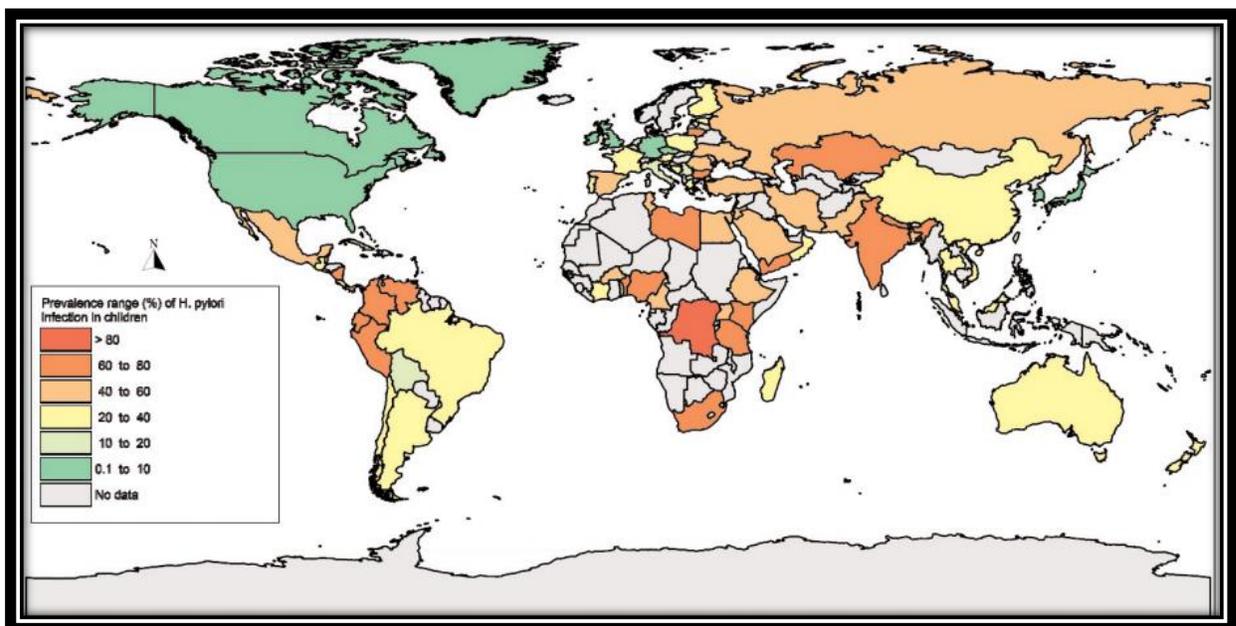


Figura 2 Prevalencia de *H. pylori* en niños en el mundo (Ortiz, et al, 2016)

3.5 Transmisión y colonización

A lo largo del tiempo en que se ha estudiado la asociación entre *H. pylori* y la infección en humanos, aún no se ha llegado a establecer un mecanismo de infección definitivo. Sin embargo, se han postulado algunas rutas: gastro-oral y oral-fecal, posicionándose como las primeras vías de infección (Feldam, et al, 1998). Otras rutas incluyen el consumo de agua y alimentos contaminados, contacto con animales como gatos, perros y ovejas y el contacto cercano con familiares infectados previamente. Sin embargo, no existe evidencia contundente que afirme que estas vías son definitivas para contraer la infección (Dore, et al, 2001).

3.6 Patologías

La infección por *H. pylori* es un factor importante para desarrollar distintos desordenes gástricos dependiendo de factores del hospedero, de la bacteria y del medio ambiente. La infección por *H. pylori* induce gastritis, ya que la bacteria se infiltra en la mucosa del epitelio, comúnmente en la región de cuerpo y antro del estómago ocasionando un proceso crónico de inflamación. La historia natural de la infección se puede dividir en dos fases; en la fase aguda en donde hay una proliferación de la bacteria, ocasionando inflamación y la aparición de algunos síntomas. Posteriormente disminuye la inflamación y se establece la gastritis superficial crónica difusa, en este momento el hospedero permanece asintomático y así puede permanecer por décadas (Torres, et al, 2000).

Posteriormente si la infección no es tratada se desarrolla una cronicidad que puede conllevar a úlcera gástrica o duodenal o bien cáncer gástrico, esto dependerá de la región del estómago en la que la bacteria tenga una mayor proliferación, si la bacteria prolifera principalmente en cuerpo puede llegar a desarrollar cáncer gástrico o ulcera gástrica. Cuando se desarrolla en la región de antro la mayor afectación que puede tener es la aparición de una úlcera duodenal. Sin embargo, la aparición del cáncer gástrico solo ocurre en adultos (Bauer, et al, 2011).

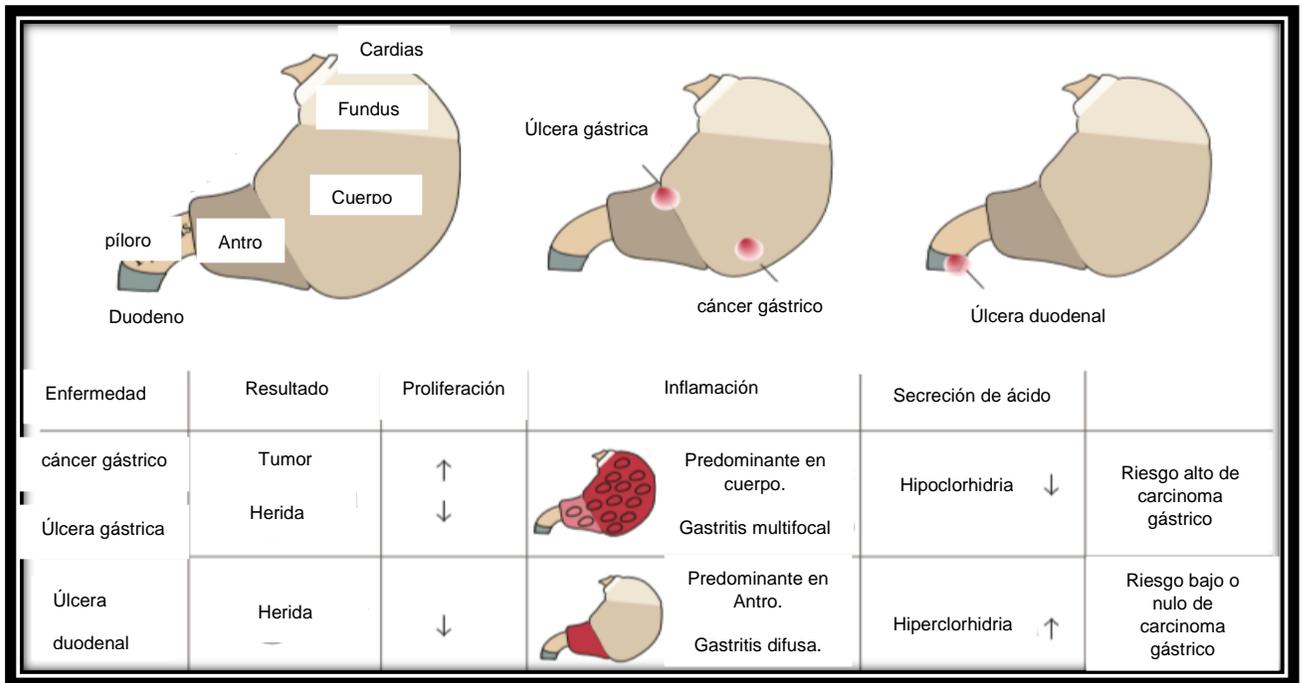


Figura 3 Patologías asociadas a la infección por *H. pylori* (Bauer, et al, 2011)

3.7 Dolor abdominal crónico y su asociación con *H. pylori*

El dolor abdominal recurrente (DAR) es un problema común en el campo pediátrico, siendo causa frecuente de atención médica, tanto en áreas de consulta ambulatoria como de urgencias. Por lo general representa un reto de diagnóstico dentro de la comunidad de pediatras, gastroenterólogos y cirujanos de niños. Repercute en la atención hospitalaria por varias razones, ocupación de camas en urgencias, consumo de estudios y tratamientos farmacológicos empíricos, muchos de ellos inefectivos.

El rol de *H. pylori* en la producción de DAR de tipo orgánico es muy incierto y poco específico. Algunos de estos han aportado diferentes relaciones. Por ejemplo, en un estudio basado en endoscopia se demostró que la prevalencia es del 16.8% y otro en serología muestra una prevalencia del 53%. Sin embargo, es un hecho que *H. pylori* es causante de úlcera duodenal en edades pediátricas, informando una relación que va del 90 al 100% de los estudios realizados (Herbert, et al, 1999).

3.8 Genoma de *Helicobacter pylori*

Los primeros genomas secuenciados de *H. pylori* fueron obtenidos de las cepas 266697 y J99. El tamaño del genoma es de aproximadamente de 1.7 Mpb, con una concentración de Citocina + Guanina que va del 30 al 40%. La cepa 26695 de *H. pylori* consta de 1587 genes mientras que la cepa J99 contiene 1491 genes. Ambos genomas contienen dos copias de los genes *16S*, *23S* y *5S rRNA* (Heuermann, et al, 1995).

Se ha demostrado que *H. pylori* es genéticamente heterogénea, manteniendo una relación distante entre colonias. Esta heterogeneidad es debida a la respuesta de la bacteria ante las condiciones gástricas y respuesta inmune del hospedero (Kuipers, et al, 2000).

La heterogeneidad de la bacteria tiene como consecuencia el reordenamiento del DNA de tal forma que ocurre una inserción o eliminación de secuencia de pares de bases. Por lo tanto, suelen tener una concentración de citocina + guanina, característica que hace que contenga regiones plásticas o móviles en donde se pueden encontrar islas de patogenicidad o genes asociados a virulencia los cuales desempeñan un papel importante en la patogenicidad de la bacteria (Kusters, et al, 2006).

3.9 Factores de virulencia

H. pylori presenta factores de patogenicidad que le permiten adaptarse al medio, produciendo sustancias que neutralizan los ácidos permitiendo que la bacteria permanezca en el estómago adherida al epitelio gástrico.

Se han propuesto varios factores de virulencia asociados a la enfermedad, como la isla de patogenicidad *cagPAI* dentro de la cual está presente el gen *cagA* el cual codifica para una proteína considerada como oncogénica. Otros genes también se encuentran asociados a virulencia tales como *vacA* (codifica para una citotoxina vacuolizante), *babA* y *OipA* (codifica para adhesinas), entre otros como *dupA* y genes de la zona de plasticidad *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*.

La presencia de ellos se ha asociado con el genotipo más virulento de la bacteria ya que se han observado asociadas este tipo de cepas a un mayor riesgo de enfermedad úlcero-

péptica, adenocarcinoma gástrico o linfoma tipo MALT, ninguno de ellos implica por sí mismo el desarrollo de una enfermedad en concreto (Yamaoka, et al, 2010).

H. pylori tiene los siguientes productos bacterianos o estrategias que le atribuyen su patogenicidad:

Ureasa: es la enzima más abundante producida por *H. pylori*, su actividad depende del pH alrededor de la bacteria. El hábitat natural de la bacteria se encuentra por debajo de la capa mucosa, donde el pH se aproxima a la neutralidad. Para protegerse del pH ácido durante la colonización la bacteria acumula una gran cantidad de ureasa en el citoplasma, en el espacio periplásmico y en su superficie. La ureasa es una metaloenzima que hidroliza la urea presente en el estómago en amonio y dióxido de carbono. De esta forma el amonio aumenta el pH, elevándolo hasta 6 o 7 neutralizando el ácido clorhídrico del estómago, esto le propicia un microambiente que le permite sobrevivir mientras se mueve para llegar al epitelio gástrico (Moblely, et al, 1996).

Flagelos: Le confieren una gran movilidad para colonizar la mucosa gástrica, contrarrestando el peristaltismo y penetrando la capa de mucina secretada por las células de la superficie. Además, la morfología espiral de la bacteria facilita la movilidad en la viscosidad del moco gástrico, ya que la bacteria produce una proteasa que digiere el moco, lo que facilita su avance (Cervantes, et al, 2006).

Proteínas de membrana externa (PME): La adherencia de la bacteria a la mucosa gástrica es fundamental para la colonización, ya que le confiere mecanismos de protección frente a la acidez gástrica, además de minimizar el ser eliminada por el peristaltismo, el vacío gástrico o el desprendimiento de la capa mucoide por regeneración. Se ha demostrado que existen cinco grandes familias de PME, como *BabA*, *SabA*, lipoproteína asociada a la adherencia *AlpA* y *AlpB*, *HopZ*, *Hpa*, *DupA*, MAP (Cover, et al, 2006).

Bab-A (blood antigen binding adhesión): Esta adhesina interactúa con las células epiteliales a través de los antígenos de Lewis B de los grupos sanguíneos ABO del humano. Aunque se han identificado tres alelos *bab* (*babA1*, *babA2* y *babB*), solo *babA2* es funcionalmente activo. Los estudios sugieren que la proteína está involucrada en la glicosilación de la

mucosa del hospedero lo que le permite a la bacteria adaptarse para colonizar y persistir (Paniagua, et al, 2009).

HpaA (*Helicobacter pylori adhesin A*): Es una de las principales proteínas de la membrana externa de *H. pylori*, al igual que otras de ellas, actúa como adhesina. Es un antígeno de membrana que es reconocido por los anticuerpos humanos, por lo que puede ser usado en los ensayos serológicos y para el desarrollo de vacunas (Asphaloum, et al, 2006).

SabA (*sialic acid binding adhesión*): Es una adhesina que se une a los receptores expresados por el tejido gástrico inflamado. Además, es asociado al desarrollo de metaplasia intestinal, atrofia y cáncer gástricos. También, se pueden unir a neutrófilos, estimulándolos para inducir la producción de especies reactivas de oxígeno, lo que causa daño oxidativo en el epitelio gástrico (Yamaoka, et al, 2008).

OipA: Es una proteína de membrana externa cuya función es la adhesión. Está asociada al desarrollo de inflamación gástrica y a una mayor aparición de Interleucina 8 (IL-8) (Yamaoka, et al, 2000).

Proteína activadora de neutrófilos (NAP): Es codificada por el gen *napA*; tiene función de bacterioferritina para captar los iones ferrosos libres intracelulares que pueden dañar el DNA de *H. pylori* protegiéndola del estrés oxidativo. Puede actuar como adhesina cuando se secreta o se expresa en la superficie bacteriana, tiene afinidad por las ceramidas presentes en las membranas plasmáticas celulares. Además, atrae neutrófilos a la zona infectada para inducir la producción de radicales libres de oxígeno que dañan la superficie gástrica (Jung, et al, 2012).

Antioxidantes: La enzima superóxido dismutasa ayuda a la detoxificación de los metabolitos reactivos de oxígeno catalizando la transformación del superóxido en peróxido de hidrógeno donde interviene la catalasa o peroxidasa transformando el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Stent, et al, 2012).

Fosfolipasas: Degradan el complejo lípido-gluco-proteico de la capa de moco que cubre a las células epiteliales gástricas y es el que aporta protección (Geis, et al, 1993).

Citotoxina vacuolizante *VacA*: Es codificada por el gen *vacA*, se encuentra en todas las cepas de *H. pylori*; induce la vacuolización, así como múltiples actividades celulares, incluyendo la formación de canales en la membrana, liberación del citocromo C de la mitocondria, lo cual induce apoptosis. La actividad vacuolizante solo se presenta en un 50 a 60% de las cepas a pesar de que todas contienen en el gen y dicha actividad es reversible (Rhead, et al, 2007).

Estudios han demostrado que la bacteria se adhiere a las paredes gástricas y genera dicha toxina, ocasiona la formación de poros, por los cuales, ocurre un vaciamiento celular de urea y aniones que requiere la bacteria para formar su microambiente. Existen estudios que sugieren que la proteína ayuda a la persistencia por acciones de supresión inmunológica específica, impiden la maduración de fagosomas en los macrófagos, inhibiendo selectivamente la presentación antigénica de las células T y bloqueando su proliferación. Aunque no se tienen perfectamente definidos los mecanismos, contribuyen en la aparición de carcinogénesis gástrica (Yamaoka, et al, 1998).

Zona de plasticidad: Es una zona que en su mayoría alberga genes específicos de cepa, entre estos genes se encuentra *dupA* (*jhp0917-jhp0918*), *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*. Estos genes se han propuesto como marcadores de enfermedades gastrointestinales debido a su prevalencia en aislamientos de pacientes con gastritis, ulcera duodenal y cáncer gástrico. Además, están asociados con la inducción de citosinas proinflamatorias por la vía de activación NF- κ B. La prevalencia de estos genes es variable entre las cepas de niños y adultos, así como entre las cepas de diferentes regiones geográficas (Romo et. al. 2015; Romo et al, 2018). El gen más estudiado de esta zona es el gen *dupA*. Según diversos estudios este gen es asociado a la aparición de ulcera gástrica. (Boyanova, et al, 2010).

3.10 CagA

La proteína CagA (Citotóxina asociada al gen *cagA*) es el factor de virulencia más estudiado, esta proteína es codificada por el gen *cagA*. Este gen se encuentra aproximadamente en el ~60% de los aislamientos de *H. pylori*.

Este gen forma parte de la isla de patogenicidad de *H. pylori*, la cual codifica para un sistema de secreción tipo IV, *cagA* se utiliza como un marcador de la isla, de ahí el nombre de isla de patogenicidad *cagPAI*. Hace algunos años se consideraban cepas virulentas aquellas que poseían este gen y esto dio a la clasificación de cepas *cagA+* y *cagA-*, ya que la presencia de este gen juega un papel importante en el desarrollo de las gastritis atrófica, úlcera péptica y cáncer gástrico. Actualmente se habla de cepas con mayor virulencia aquellas que poseen la *cagPAI* y la presencia de este gen dentro de la isla (Figueiredo, et al, 2001).

El gen *cagA* contiene un extremo 5' que está altamente conservado y un extremo 3' que es variable. La región variable 3' contiene un número de repeticiones de una secuencia de aminoácidos por lo que *cagA* presenta variación de tamaño e influye en la patogenicidad de las cepas consideradas como *cagA+*. (Reyes et al. 2007)

CagA es una proteína de 140 KD que contiene motivos de fosforilación tirosina (Glutamato, Prolina, Isoleucina, Tirosina y Alanina, EPIYA) con el carboxilo terminal en la región variable de la proteína. Estos motivos se clasifican como EPIYA-A, -B, -C o -D y se distinguen según sea la secuencia de aminoácidos que flaquean en los motivos EPIYA. La mayor parte de las variantes de *cagA* alrededor del mundo son los motivos EPIYA-A y EPIYA-B, mientras que EPIYA-C se han encontrado con más frecuencia en regiones occidentales como Europa, Norte América y Australia. El motivo EPIYA-D se encuentra exclusivamente en cepas de Hp del este de Asia. Las cepas que contiene el motivo EPIYA-D inducen de manera significativa mayor producción de IL-8 en las células epiteliales gástricas comparada con cepas con motivos PEIYA-A, -B o -C (Noto, et al. 2012).

La proteína *CagA* con más motivos EPIYA es más frecuentes en cepas asociadas a casos de gastritis atrófica y cáncer gástrico lo que sugiere una asociación entre el tamaño de la región variable 3' de la *cagA* y el resultado clínico (Reyes, et al, 2007).

3.10.1 Prevalencia del gen *cagA* en niños.

En niños, el gen más estudiado es *cagA*. La prevalencia de este gen, al igual que en los adultos, varía dependiendo de la región y país. En países de occidente el gen *cagA* se encuentra en más de la mitad de los aislados de *H.pylori* obtenidos de niños sintomáticos. Nombrando algunos países, Polonia muestra una prevalencia de 60.8%, Eslovenia 59.6% y Estados Unidos con una prevalencia de 70%. Aunque esto no es una regla, ya que en Portugal se encontró una sorprendente prevalencia de 22.4%. En algunos países de oriente la prevalencia es mayor al 50%, por ejemplo, en Irán se reportan prevalencias que van de 60 al 70% y en Turquía son de 55 al 60%. Las prevalencias reportadas de algunos países en vías de desarrollo en América son altas, en Venezuela se reporta una prevalencia mayor al 70%, en Colombia y Brasil se reportan 66% y 75% respectivamente y en México la prevalencia reportada fue del 63.3%. Los países con mayor prevalencia son Corea con 94%, China con 94.4% y Japón con 100%. Cabe señalar que en estos países la prevalencia es muy similar entre niños y adultos. (Sterbenc, 2019)

Tabla 1 Prevalencia de *cagA* en niños

Países	Prevalencia (%)
Polonia	60.8
Eslovenia	59.6
E.U.A	70.6
Portugal	22.4
Irán	60-70
Turquía	55.6-61
Venezuela	73
México*	63
Colombia**	66.1
Brasil**	75
Corea	94
Japón	100
China	94.4

* también se reporta una prevalencia de *cagPAI* de 71.4%

** Los estudios fueron realizados en niños asintomáticos

3.10.2 Mecanismo de acción de la proteína CagA en la infección y su relación con el Sistema de Secreción Tipo IV (T4SS)

La proteína CagA es translocada a las células epiteliales gástricas a través del T4SS (sistema de secreción tipo IV) el cual es codificado por la isla *cagPAI* (Cervantes, et al, 2016)

La exposición apical de algunas moléculas de integrina Beta1 y fosfatidilserina estimulan el pilus T4SS para inyectar CagA y peptidoglicano a las células epiteliales gástricas. La proteína CagA inyectada provoca una ruptura de las uniones estrechas célula-célula y pérdida de polaridad de ellas, esto desencadena la activación de NF- κ B y la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-8. Estas citocinas pueden alterar la secreción de moco e inducir cambios en la secreción de ácido gástrico y la homeostasis. También atraen a las células inmunitarias para infiltrarse desde el torrente sanguíneo a la mucosa gástrica donde causan un daño sustancial en los tejidos del sitio de infección (Tegtmeyer, et al, 2011).

El blanco molecular de CagA más estudiado es una fosfatasa SHP-2 (protein tyrosine phosphatase). En el gen que codifica a esta proteína, se han encontrado mutaciones y polimorfismos que están relacionados con la carcinogénesis gástrica. La activación de SHP-2 por CagA contribuye a la proliferación celular excesiva. Sin embargo, una variación en el número de sitios de fosforilación implica una distinta efectividad en su unión a SPH-2 y, por lo tanto, una activación diferente (Cervantes, et al, 2016).

CagA puede inducir múltiples vías para desencadenar la motilidad y el alargamiento de las células, proliferación celular, así como inhibición de apoptosis. La interacción de cada una de estas vías podría dar como resultado una desregulación sustancial y la transformación oncogénica de las células epiteliales gástricas. Actualmente se han identificado 9 factores de las células del hospedero que actúan con CagA en la fosforilación: fosfatasa Shp-1, proteínas *Grb2*, *Grb7* y *Crk*, fosfoinositidil-3-cinasa, Ras GTPasa y tirosincinasas; *Csk*, *Src* y *Abl*. La obtención de CagA fosforilada ocasiona un rearrreglo en las fibras de actina del citoesqueleto ocasionando una deformación y elongación de las células del hospedero que en estudios *in vitro* se conoce como el fenómeno pico de colibrí, en el cual las células sufren una deformación adquiriendo esta forma. Sin embargo, no todas las interacciones de *CagA* son dependientes de la fosforilación, se han identificado 12 interacciones donde *CagA* no

se encuentra fosforilada, estas interacciones inducen la disrupción de las uniones celulares, la pérdida de la polaridad celular y la inducción de respuestas proinflamatorias y mitogénicas (Figura4) (Tegtmeyer, et al, 2011).

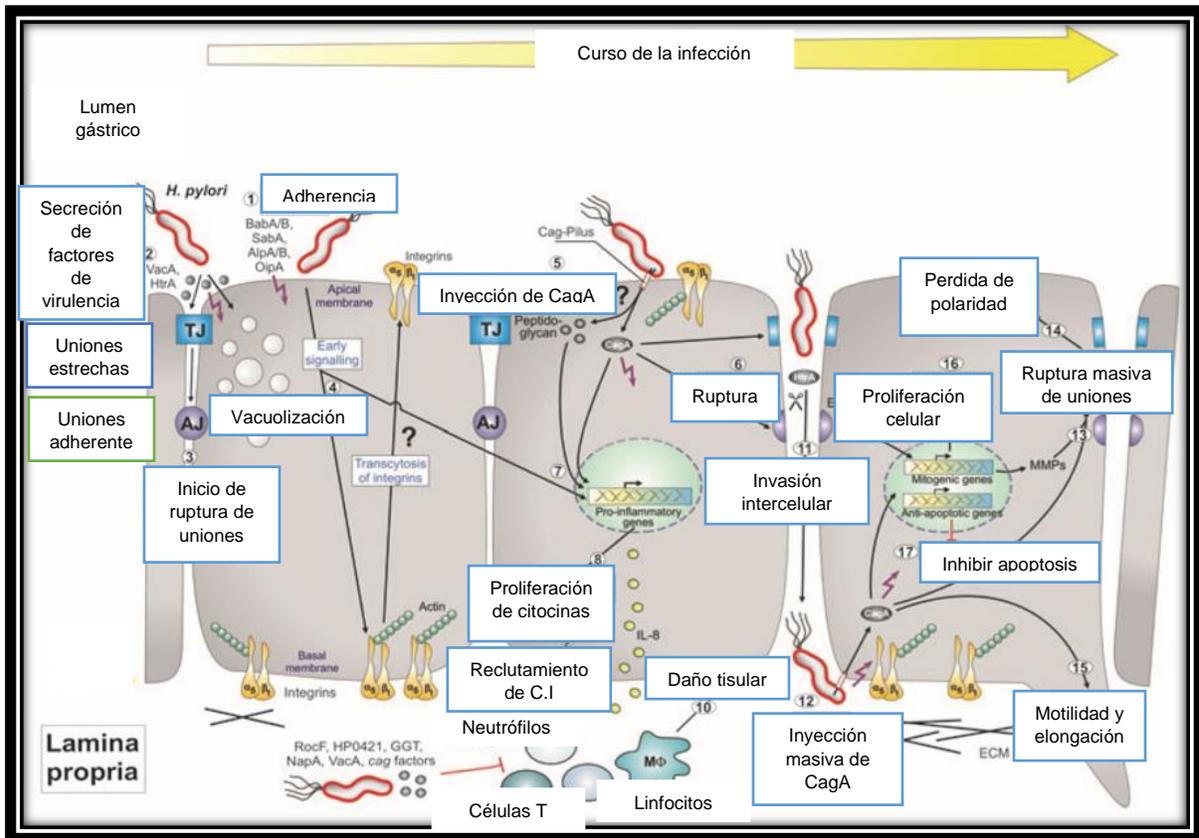


Figura 4 Mecanismo de infección *H. pylori*: disrupción de la barrera epitelial y patogénesis (Tegtmeyer, et al, 2011)

La Figura 4 muestra el proceso de la infección por *Helicobacter pylori*. (1) *H. pylori* expresa adhesinas (*BabA*, *BabB*, *SabA*, *AlpA*, *AlpB* y *OipA*) para adherirse a la superficie celular (2) *H. pylori* comienza a secretar factores de virulencia en el medio (3) que ocasionan una leve ruptura de las uniones estrechas y adherentes en un punto temprano de la infección. (4) En las células, VacA causa vacuolización celular, un marcador del proceso de ulceración. (5) Integrinas en la superficie celular (*Beta1*) estimulan el T4SS para inyectar *CagA* y peptidoglicano en la célula. (6) uno de los objetivos de *cagA* es la disrupción de uniones estrechas y adherentes. (7) comienza la activación de NF-κB (8) y la proliferación de citocinas proinflamatorias IL-8 (9) Estas alteran la secreción de moco y la secreción de ácido

alterando la homeostasis, además de atraer células inmunes que se infiltran desde torrente sanguíneo a la mucosa gástrica (10) ocasionando daño tisular en el lugar de la infección. (11) *H. pylori* expresa numerosos factores para llamar células inmunes lo que ocasiona la disrupción de las uniones celulares, permitiendo el paso de la bacteria al espacio intercelular. (12) De esta forma la bacteria accede a otras integrinas e inyecta CagA. (13) La inyección de *CagA* a la célula puede inducir la disrupción de uniones celulares (14) y la pérdida de polaridad. (15) finalmente CagA puede inducir múltiples vías para alterar la motilidad y elongación celular (16), activar genes miogénicos, proliferación celular (17) e inhibir la apoptosis. El resultado de todo esto es una substancial desregulación y transformación oncogénica de las células del epitelio gástrico.

3.11 Isla de Patogenicidad *cagPAI*

La isla de patogenicidad es un segmento de 40Kb con un contenido de G + C de 35%. La isla tiene 27marcos de lectura abiertos, entre los que se encuentra el gen *cagA*. Los genes de *cagPAI* no se expresan constitutivamente, si no que responden a señales ambientales y están regulados por diversos factores como: nivel del oxígeno, la osmolaridad, el pH y la presencia de ácidos grasos volátiles de cadena corta (Olbermann, et al, 2010).

La *cagPAI* codifica un sistema de secreción tipo IV (T4SS) que inyecta la proteína CagA y peptidoglicano en las células epiteliales del hospedero.

Se ha demostrado que *cagPAI* codifica componentes funcionales del Sistema de Secreción Tipo IV (T4SS). Este sistema se representa como una aguja que sobresale de la superficie de la membrana bacteriana y es inducida por el contacto con las células del hospedero para inyectar factores de virulencia (Rohde, et al, 2003).

Además, se ha encontrado que *Agrobacterium*, *Bordetella*, *Bartonella*, *Legionella*, *Anaplasma* y otros patógenos mantienen un T4SS, sin embargo, el microorganismo que guarda más similitud con *H. pylori* es *Agrobacterium*, el cual se ha usado como modelo para investigaciones en cuanto al T4SS.

T4SS mantiene una conformación típica de 11 proteínas *VirB* (codificadas por los genes *virB1*-*virB11*) y las llamadas proteínas de acoplamiento (ATPasa *VirD4*). Dentro de las proteínas *VirB* se pueden dividir en tres categorías: A) Componentes de cuerpo o canal putativo (*VirB6-11*). B) Componentes asociados al pilus (*VirB2, 3 y 5*). C) Componentes energéticos (ATPasas: *VirB4 y VirB11*). La *VirB1* es una mureinasa encargada de la lisis de mureína permitiendo el acoplamiento del T4SS en una determinada localización (Figura 5) (Tegtmeyer, et. al, 2011).

Se han realizado estudios para identificar los genes indispensables para la producción del T4SS, dentro de estos se encuentra *cagM, cagT, cagV, cagX, cag3, cagL y cagI*, los cuales se ha demostrado, participan en la producción del *pilus* del sistema de secreción (Johnson, et al, 2014).

Se ha propuesto un segundo modelo donde el apéndice del T4SS se encuentra unido con proteínas conocidas como *CagY* en lugar de encontrarse con la proteína *VirB5*. Estas proteínas son largas, aproximadamente de 205KDa, encontrándose de forma transmembrana. Teniendo en cuenta estos dos modelos no se puede llegar a una conclusión definitiva, ya que no está claro si el T4SS está constituido por las proteínas *VirB5* o por *CagY* (Rohde, et al, 2003).

Por otro lado, también se han reportado modelos donde el pilus del T4SS se encuentra rodeado de proteínas *CagL* las cuales también interactúan con la integrina B1 para inducir la unión con la célula del hospedero mediante un proceso de activación de proteínas.

Sin embargo, no se encuentra totalmente claro la relación que guardan *CagY y CagL* con *CagA*, pero, se ha demostrado que son importantes para el desarrollo de la infección ya que una supresión de los genes que codifican para *CagY y CagL* muestra una alteración en la función del T4SS (Figura6) (Jiménez, et al, 2009).

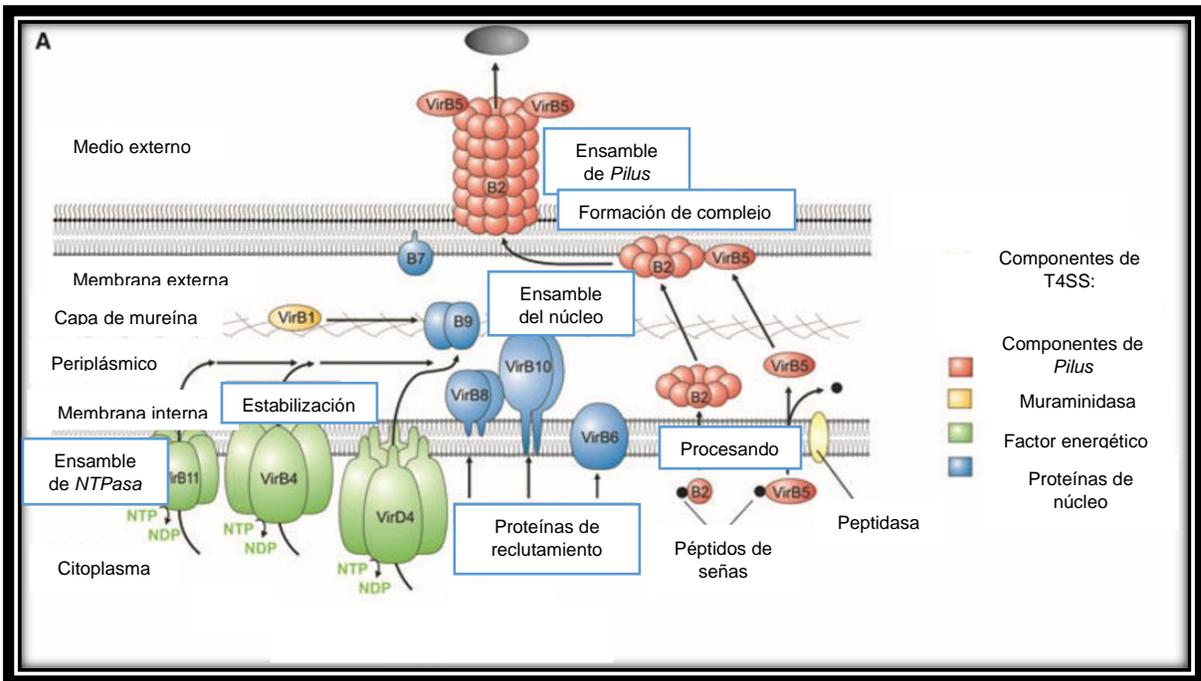


Figura 5 Componentes del T4SS (Tegtmeyer et al, 2011)

En la figura 5 se muestra el modelo de ensamblaje estructural del T4SS en *Helicobacter pylori*. Se ilustra un prototipo del mecanismo VirB/VirD4 del T4SS. El T4SS es un complejo multiproteico, abarca el interior y exterior de la membrana de *H. pylori* y otras bacterias Gram negativas. La proteína de acoplamiento VirD4 y los componentes estructurales (VirB1-VirB11) son gradualmente requeridos para la secreción y son representados de acuerdo con su función propuesta. Un modelo de ensamblaje de T-pilus en *Agrobacterium* (Bacteria que guarda una estrecha relación con *H. pylori* en su T4SS) muestra una propuesta de interacción secuencial entre VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 conduciendo a la formación de complejos VirB2-VirB5. Al estar ensamblado el T4SS desencadena la secreción sustratos citoplasmáticos de la bacteria dentro de la célula del hospedero.

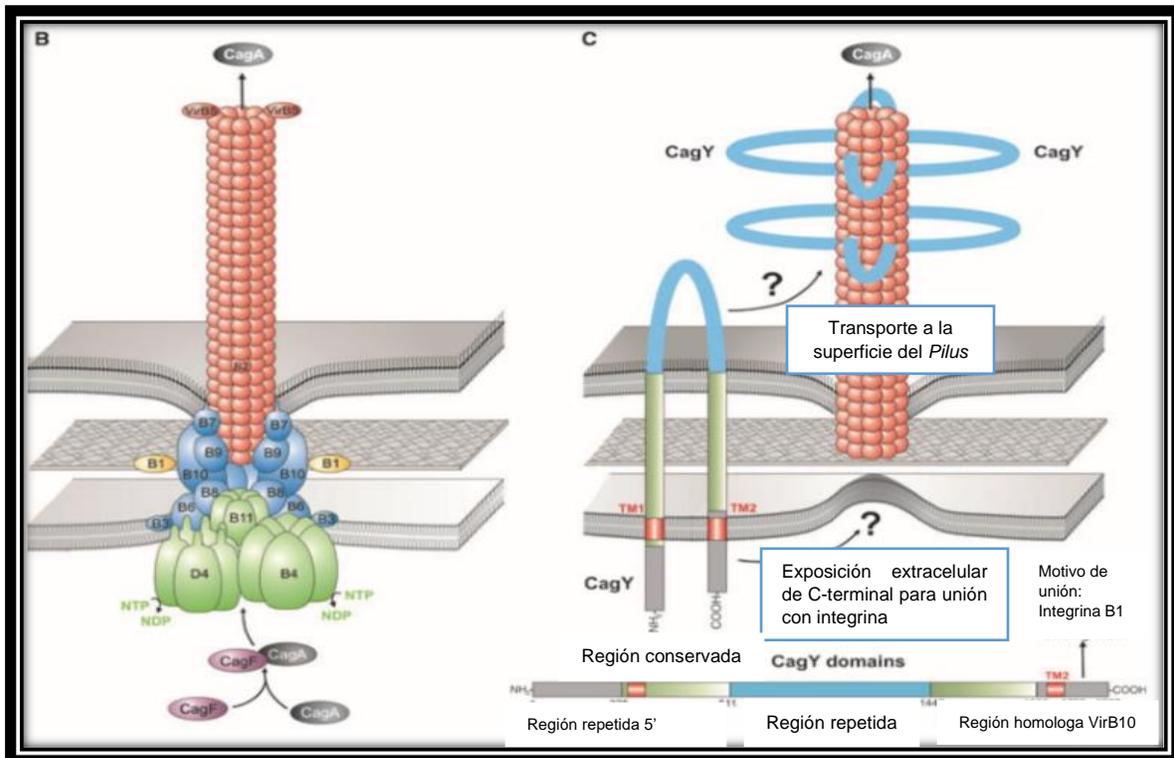


Figura 6 Modelo alternativo de ensamblaje del T4SS (Tegtmeyer, et al, 2011)

B) Modelo 1 del mecanismo de ensamblaje del T4SS en *H. pylori* asumiendo que todas las proteínas VirB1-11 son codificadas por la *cagPAI* siendo un modelo similar al modelo de *Agrobacterium*. En este modelo se reporta que los sustratos del T4SS son CagA y peptidoglicano. C) El modelo 2 propone que se requieren las mismas proteínas VirB que en el modelo anterior con una gran diferencia, que la superficie del pilus es conjugada con moléculas de CagY. En contraste a VirB10 en muchos T4SS, la VirB10 de *H. pylori* (CagY) es una proteína de aproximadamente 250kDa, siendo considerada como una proteína muy larga con dos dominios transmembranales (TM1 y TM2) que le otorgan una forma de hélice en la superficie celular. Esta parte de la proteína es expuesta en el espacio extracelular y transportada a la superficie del pilus por un transportador y mecanismo que aún no se conoce. Sin embargo, información reciente ha demostrado que la terminación carboxílica de CagY se puede unir a los receptores integrina B. sin embargo el proceso de exposición de CagY en espacio extracelular y el proceso de unión a la integrina es aún desconocido.

4 JUSTIFICACIÓN

La genotipificación de *H. pylori* es llevada a cabo con baja frecuencia, pero es importante para identificar la virulencia de la bacteria y conocer si existe una asociación entre la presencia de los factores de virulencia *cagA* y *cagPAI* con la manifestación clínica del paciente y, por lo tanto, dar un mejor y oportuno manejo de la infección.

5 HIPOTESIS

Las cepas de *Helicobacter pylori* presentan los genes *cagA* y *la cagPAI* como factores de virulencia.

6 OBJETIVOS

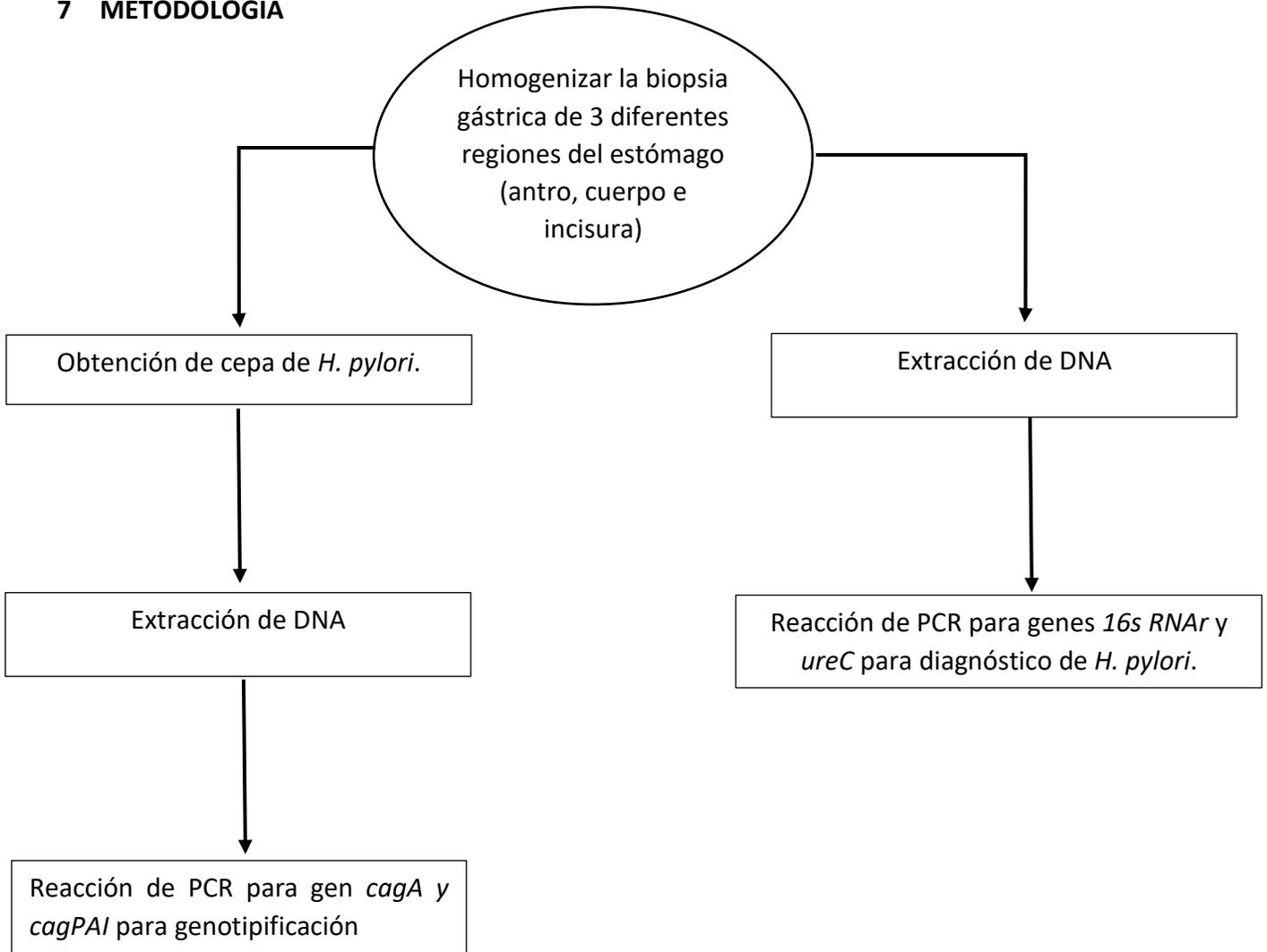
6.1 Objetivo general

- ❖ Determinar, mediante la técnica PCR punto final, los factores de virulencia *cagPAI* y *cagA* en cepas de *Helicobacter pylori*, aisladas de niños con manifestaciones gastroduodenales.

6.2 Objetivos particulares

- ❖ Realizar el diagnóstico de *H. pylori* por cultivo y PCR punto final (genes *ureC* y *16S RNA*) a partir de biopsias gástricas.
- ❖ Realizar la extracción y cuantificación de ADN en cepas de *H.pylori*.
- ❖ Genotipificación de *cagA* en cepas de *H.pylori* mediante PCR punto final
- ❖ Identificación de la *cagPAI* en cepas de *H.pylori* mediante PCR empty site

7 METODOLOGÍA



Procesamiento de biopsia gástrica para primo aislamiento de *H. pylori*

1. Cada biopsia fue colocada en un tubo eppendorf con solución salina fisiológica al 0.9% y transportada del área de endoscopia al laboratorio de bacteriología experimental en hielo, la biopsia fue depositada en un homogeneizador de vidrio esmerilado para proceder a su disgregación.
2. Se agrego aproximadamente 80uL de solución salina fisiológica y homogenizo hasta disgregar el tejido.
3. Se coloco de 30-50_{uL} del homogenizado y deposito en una caja Petri de agar sangre de carnero al 10% con y sin antibiótico.

4. Se extendió el homogenizado en las cajas petri e incubar de 5-8 días a 37°C y 9%CO₂
5. Se traspaso todo el homogenizado restante a un tubo eppendorf para la extracción del DNA de biopsia gástrica.

Obtención de cepa de *H. pylori*

1. Se revisó el crecimiento y determino si es positivo o negativo en un microscopio estereoscópico.
2. Se realizó un sembrado masivo en cuadrantes de distintas colonias en una caja petri de agar sangre al 10% y se dejó incubar a las mismas condiciones de primo aislamiento.
3. Se revisó el crecimiento y se realizó tinción de Gram y pruebas bioquímicas características de *H. pylori* como ureasa y catalasa, las cuales fueron positivas.
4. Se realizó un sembrado masivo en dos cajas petri completas, para la obtención de biomasa.
5. La biomasa obtenida de dos cajas Petri se cosecho de la siguiente manera: el crecimiento de una caja se congelo en 500uL de caldo brucella al 18% de glicerol y el crecimiento de otra caja se colocó en un tubo eppendorf con 500uL de solución salina fisiológica al 9% para la extracción de DNA de la cepa.

Extracción de DNA de biopsia gástrica

1. Al homogenizado de biopsia gástrica se le colocó 500_{uL} de Buffer de lisis, (Tris. HCl 10_{mM} pH8 + 0.1% sarcosina) 20_{uL} de Proteinasa K (10_{mg/mL}) y 20_{uL} de Lizozima (5_{mg/mL}) a 50°C durante 12 horas.
2. Se incubó la muestra a 95°C durante 5 minutos para la inactivación de enzimas.
3. Se agrego 540_{uL} de Cloroformo-Fenol-Isoamilico, homogenizar en Vortex y centrifugó a 14,000_{rpm} por 10 minutos.
4. Se tomó fase acuosa (~400_{uL}) y se agregó el mismo volumen de Cloroformo isoamílico, se homogenizo en Vortex y centrifugo a las mismas condiciones.

5. Se tomó fase acuosa (~300_{uL}) y se agregó 1/10 de Acetato de amonio (30_{uL}) y 600_{uL} de isopropanol frío.
6. Se mezcló por inmersión y se dejó en incubación por 12 horas a -20°C.
7. Se centrifugó a 14,000_{rpm} por 10 minutos y se decantó
8. Se lavó el Pellet con 500_{uL} de ETOH al 70% frío y se centrifugó a las mismas condiciones por 13 minutos.
9. Se decantó y se secó el tubo para eliminar los restos de ETOH al 70%
10. Se hidrató el DNA con 100_{uL} de agua destilada, estéril y libre de nucleasas.
11. Se incubó a 55°C por 15 minutos y se guardó el DNA obtenido a -20°C.

Extracción de DNA de cepa por Wizard® Genomic DNA purification kit

1. Se agregó 600_{uL} de solución de lisis al tubo con cepa y se mezcló con micropipeta
2. Se incubó por 5 minutos a 80°C y posteriormente se enfrió.
3. Se agregó 3_{uL} de solución de RNasa y se mezcló.
4. Se incubó a 37°C 60 minutos y se dejó enfriar.
5. Se agregó 200_{uL} de solución de precipitación de proteínas y se mezcló en Vortex.
6. Se Incubó en hielo por 5 minutos
7. Se Centrifugó a 15000 rpm por 3 minutos
8. Se transfirió el sobrenadante a un tubo que contenía 600_{uL} de isopropanol frío y se mezcló.
9. Se centrifugó a 15000 rpm por 3 minutos y se decantó el sobrenadante
10. Se agregaron 600_{uL} etanol al 70% frío y se mezcló.
11. Se centrifugó a 15000 rpm por 3 minutos
12. Se aspiró el etanol y se dejó secar el pellet por 15 minutos
13. Se rehidrató el pellet de DNA con 100_{uL} de solución de rehidratación y se dejó incubar por 1 hora a 65°C

PCR para identificar *H. pylori* en biopsia gástrica: Genes *16S RNAr* y *ureC*

1. Se realizó un Máster Mix multiplicando los volúmenes por el número de muestras a realizar y se homogenizo en vortex.

Tabla 2 Volumen de reactivos para máster mix *16sRNAr* y *ureC*

Reactivos	Volumen μL
Buffer 10x	2.5
MgCl ₂ 25mM	1.5
dNTPs 10mM	0.5
Primer <i>16s</i> F y R 50mM	0.88
Primer <i>ureC</i> F y R 50mM	1.25
Taq Polimerasa 5U/ μL	0.15
H ₂ O Libre de nucleasas para <i>ureC</i>	16.85
H ₂ O Libre de nucleasas para <i>16s</i>	17.59

2. Se agregó 1 μL de muestra DNA en microtubos.
3. Se agregó 24 μL del Máster Mix en los microtubos con muestra.
4. Se realizó la reacción de PCR

Tabla 3. Condiciones de reacción *16sRNAr* y *ureC*

Paso	Temperatura	Tiempo
<i>Hold</i> desnaturalizar	94°C	5 _{min}
Desnaturalizar	92°C	30 _{seg}
Alinear	55°C	40 _{seg}
Extender	72°C	40 _{seg}
38 ciclos	-	-
<i>Hold</i> extender	72°C	5 _{min}

[Se entiende la palabra *Hold* como: mantener a una temperatura constante]

5. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5%
 - La información técnica de los *primers* utilizados se encuentra en el apartado de anexos.
 - Para validar un resultado como positivo se debe de observar la aparición de una banda a 294 pb para el gen *ureC* o 522 pb para el gen *16s*.

PCR punto final para la identificación del gen *cagA* y la isla de patogenicidad *cagPAI* mediante PCR empty site (ver anexo)

1. Se realizó un *Máster Mix* multiplicando los volúmenes por el número de muestras a realizar y se homogenizo en vortex.

Tabla 4 Volúmenes para máster mix *cagPAI* y *cagA*

Reactivos	Volumen _{uL}
Buffer 10x	2.5
MgCl ₂ 25mM	1.5
dNTPs 10mM	0.5
Primer F y R 50mM	0.25
Taq Polimerasa 5u/uL	0.15
H ₂ O libre de nucleasas.	18.85

2. Se agregó 1_{uL} de muestra DNA en microtubos.
3. Se agregó 24_{uL} del *Máster Mix* en los microtubos con muestra.
4. Se realizó la reacción de PCR

Tabla 5. Condiciones de reacción para la isla de patogenicidad *cagPAI*

Paso	Temperatura °C	Tiempo
Hold desnaturalizar	98	5 _{min}
Desnaturalizar	94	1 _{min}
Alinear	57	1 _{min}
Extender	72	1 _{min}
35 ciclos	-	-
Hold extender	72	6 _{min}

Tabla 6. Condiciones de reacción para el gen *cagA*

Paso	Temperatura	Tiempo
Hold desnaturalizar	94	5 _{min}
Desnaturalizar	94	1 _{min}
Alinear	52	1 _{min}
Extender	72	1 _{min}
38 ciclos	-	-
Hold extender	72	6 _{min}

5. Los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5%
- La información técnica de los *primers* utilizados se encuentra en el apartado de anexos.
 - Un resultado fue considerado como positivo, para la isla de patogenicidad *cagPAI*, cuando se encuentra ausente la banda de amplificación de 360pb ya que se realizó PCR *empty site*, (ver anexo) en caso de no encontrarse la isla de patogenicidad debe encontrarse una banda de 360pb. Para validar nuestros resultados utilizamos una cepa control positivo tanto para el gen *cagA* como para la *cagPAI*, esta fue la cepa ATCC *hp J99* (contienen tanto *cagA* como *cagPAI*) y cómo control negativo la cepa *hp 251* (no contiene *cagA* ni la isla de patogenicidad *cagPAI*).
 - Un resultado positivo para el gen *cagA*, fue observar la aparición de una banda a 349 pb. Se utilizaron las mismas cepas control que para *cagPAI* como se mencionó.

8. RESULTADOS

Durante un periodo de un año se diagnosticaron 84 pacientes sintomáticos a *H. pylori*, de ellos 39 (46.4%) fueron positivos por cualquiera de los métodos de diagnóstico utilizados, PCR o cultivo en al menos uno de los sitios del estómago (antro, cuerpo o incisura) , de estos solo 11 (13.1%) pacientes fueron positivos tanto por PCR como por cultivo.

Tabla 7 Diagnóstico de *H. pylori* en biopsias gástricas de niños con manifestaciones gastroduodenales.

Número total de pacientes estudiados n= 84				
Negativos n (%)	Positivos solo por PCR n (%)	Positivos solo por cultivo n (%)	Positivos por PCR y cultivo n (%)	Total
45 (53.5)	28 (33.3)	0 (0)	11 (13.1)	84

Tabla 8 Frecuencia de *H. pylori* por región del estómago

Número total de pacientes estudiados n= 84	
Pacientes positivos a <i>H. pylori</i> distribuidos por región del estómago	
PCR 28 (100%)	PCR y cultivo 11 (100%)
Antro= 1 (3.6%)	Antro= 0 (0)
Cuerpo= 3 (10.7%)	Cuerpo= 0 (0)
Incisura= 0 (0%)	Incisura= 1 (9.1%)
Dos regiones= 3 (10.7%)	Dos regiones= 5 (45.45%)
Tres regiones= 21 (75%)	Tres regiones= 5 (45.45%)

Resultados de genotipificación de cepas

De los 11 pacientes se obtuvieron 25 cepas de diferentes regiones del estómago (antro, cuerpo e incisura) para su genotipificación.

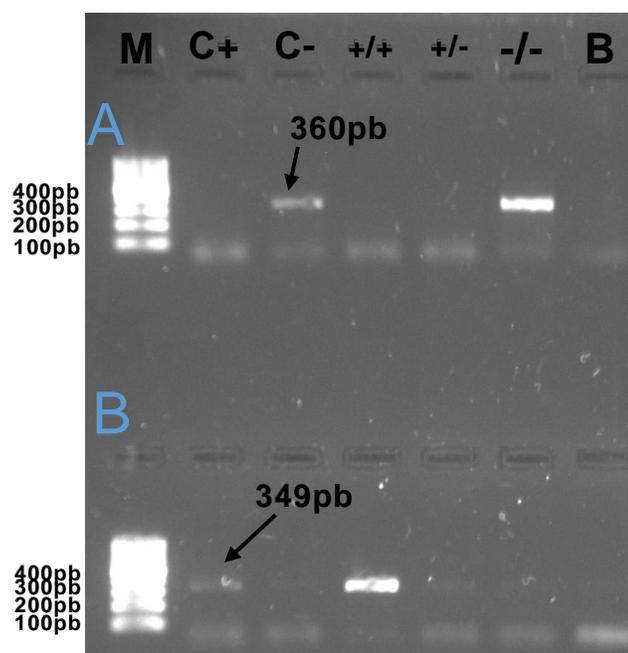
Tabla 9 Resultados de genotipificación de cepas de *H. pylori*

Paciente	Región	PAI	cagA
A	Antro	+	+
	Incisura	-	-
B	Cuerpo	+	+
	Incisura	+	+
C	Antro	+	-
	Cuerpo	+	-
	Incisura	+	+
D	Antro	+	+
	Cuerpo	+	+
	Incisura	+	+
E	Incisura	+	-
F	Cuerpo	-	-
	Incisura	+	-
G	Antro	+	+
	Cuerpo	+	+
	Incisura	+	+
H	Cuerpo	+	+
	Incisura	+	+
I	Cuerpo	+	+
	Incisura	+	+
J	Cuerpo	+	-
	Incisura	+	-
K	Antro	+	+
	Cuerpo	+	+
	Incisura	+	+

En la tabla 6 se muestran los resultados de genotipificación del gen *cagA* y la isla de patogenicidad *cagPAI*. (+) y (-) significa presencia y ausencia respectivamente del factor de

virulencia. En algunas regiones se muestra la presencia de ambos factores de virulencia (+)(+), en otros la presencia de uno (+)(-)y en otros la ausencia de ambos factores (-)(-), mostrando los 3 tipos de resultados posibles respectivamente. Además, se encontraron patrones mixtos de *cagPAI* (verde) y *cagA* (Naranja) dentro de un mismo paciente, evidenciando la presencia de infección mixta, es decir, distinto genotipo dentro de un paciente.

Figura 7. Resultados en gel de agarosa para la identificación de la isla de patogenicidad *cagPAI* y el gen *cagA*.



PCR de gen *cagA* e isla de patogenicidad *cagPAI*. La figura 1 muestra los genotipos de algunas cepas de este estudio: Panel A. PCR empty site de Isla de patogenicidad *cagPAI*. Panel B. PCR punto final de gen *cagA*. Marcador de peso molecular 100pb (M); Control positivo cepa *J99* (C+); control negativo cepa *251* (C-); cepa con presencia de isla de patogenicidad *cagPAI* y presencia de gen *cagA* (+/+); cepa con presencia de isla de patogenicidad *cagPAI* y ausencia de gen *cagA* (+/-); cepa son ausencia de isla de patogenicidad *cagPAI* y ausencia de gen *cagA* (-/-) blanco (B)

Tabla 10. Frecuencia genotípica de los 8 pacientes con patrón único.

Gen	Frecuencia
<i>cagA</i> +	6/8 (75%)
<i>cagA</i> -	3/8 (37.5%)
<i>cagPAI</i> +	8/8 (100%)
<i>cagPAI</i> -	0/8 (0%)
<i>cagPAI</i> +/ <i>cagA</i> +	6/8(75%)
<i>cagPAI</i> +/ <i>cagA</i> -	2/8 (25%)
<i>cagPAI</i> -/ <i>cagA</i> -	0/8 (0%)

El genotipo más frecuente es *cagPAI*+/*cagA*+ con un porcentaje mayor al 50%

Tabla 11 Frecuencia de *cagA* y *cagPAI* en 11 pacientes en al menos una región del estómago

Gen	Frecuencia
<i>cagA</i>	8/11 (72.7%)
<i>cagPAI</i>	11/11(100%)
<i>cagPAI</i> +/ <i>cagA</i> +	8/11 (72.7%)
<i>cagPAI</i> +/ <i>cagA</i> -	4/11 (36.4%)
<i>cagPAI</i> -/ <i>cagA</i> -	2/11 (18.2%)

Se observa que todos los pacientes están infectados con cepas que contienen *cagPAI* y más del 50% contienen *cagA*.

Tabla 12 Frecuencia de *cagA* y *cagPAI* en 25 cepas aisladas de 11 pacientes

Gen	Frecuencia
<i>cagA</i>	17/25 (68%)
<i>cagPAI</i>	23/25 (92%)
<i>cagPAI</i> +/ <i>cagA</i> +	17/25 (68%)
<i>cagPAI</i> +/ <i>cagA</i> -	6/25 (24%)
<i>cagPAI</i> -/ <i>cagA</i> -	2/25 (8%)

Se observa que la infección con el genotipo *cagPAI*+/*cagA*+ es el más frecuente.

9. ANALISIS DE RESULTADOS.

La prevalencia de infección de Hp en niños alrededor del mundo es variable; estudios reportados en países de Europa muestran que en Bélgica la prevalencia es de 11%, en Portugal 66.2% y en Irán 50.0%. (Leonardo H. et. Al. 2014). En Brasil y China se reporta una prevalencia que va del 20 al 40% En países desarrollados como E.U.A, Canadá e Inglaterra la prevalencia reportada es de 0.1-10%. (Ortiz et. al 2016) En países centroamericanos las prevalencias reportadas van del 60-80%, también países que reportan una prevalencia de 60-80%, se encuentran en el continente asiático, específicamente India y Kazajistán y el único país que reporta una prevalencia mayor a 80% es la República democrática del Congo en África. (Ortiz et al, 2016). En México un estudio realizado en el año 2006 encontró una prevalencia del 18 al 25% por serología buscando antígeno en heces (Calva R. et al. 2006) Sin embargo uno de los estudios más importantes en México realizado por el Dr. Javier Torres demostró, por medio de estudios inmunológicos, que el 20% de los niños en México se encuentra infectado desde la edad de un año y que a la edad de 10 años la prevalencia de niños infectados es del 50% observándose una tendencia positiva conforme la edad aumenta (Torres et al. 2005) En este estudio se encontró una prevalencia de 46.4% de pacientes infectados, diagnosticados por cultivo o PCR. La prevalencia depende de factores como la ubicación geográfica y la situación socioeconómica del país. Por ejemplo, en países desarrollados como E.U.A o Inglaterra mantienen una prevalencia baja, países en vías de desarrollo como México, Brasil y Centroamérica reportan prevalencias altas, más del 50% pero normalmente son por métodos no invasivos. Lo relevante en este estudio son tres puntos, el primero es que la prevalencia obtenida fue por PCR y cultivo, considerado este último como el estándar de oro del diagnóstico de esta bacteria; otro punto es la identificación del sitio de infección, antro, cuerpo e incisura, normalmente se busca *H. pylori* solo en antro y cuerpo, sin embargo, pudimos observar que la región de incisura puede ser colonizada también por esta bacteria; y el tercer punto a destacar es que la población estudiada es sintomática a diferencia de la mayoría de estudios que reportan prevalencia en base a seroprevalencia principalmente en poblaciones asintomáticas.

Dentro de los factores de virulencia de *H. pylori* más importantes se encuentra la isla *cagA PAI*, en este estudio encontramos que todos los pacientes estudiados contienen la isla de patogenicidad *cagPAI* en al menos un aislado.

Comparando esta prevalencia con información pediátrica las prevalencias varían entre 30 y 80% aunque otros autores han encontrado valores más altos los cuales van del 76 al 82%. (Alarcón. 2000). Una prevalencia de 63.3% se ha encontrado en aislados de niños, sin embargo, este resultado corresponde a una región del estómago ya sea antro o cuerpo (Romo et al, 2015).

Por otro lado, la prevalencia del gen *cagA* fue del 68%. Un trabajo importante en México realizó un estudio comparando la frecuencia entre cepas *cagA* positivas en niños con dolor abdominal recurrente y adultos con y sin úlcera péptica, utilizando diferentes sets de *primers*, el set con mayor cantidad de niños positivos dio como resultado 16 de 34 (47%) en adultos 17 de 19 (89%) sin úlcera péptica y con úlcera péptica 30 de 37 (81%) (González et al. 2000) corroborando así su frecuencia alta en adultos con manifestaciones gastroduodenales. En comparación con otros estudios en población infantil podemos observar que más del 50% de los aislados en niños tienen este gen al igual que lo que se presenta en adultos. El comportamiento de *cagA* no es homogéneo entre los aislados de diferentes regiones geográficas, por ejemplo, un estudio reportó una prevalencia del 91% en México (Ortiz et al. 2016), en Polonia se encontró una prevalencia de 60.8% y más recientemente de 50%, en Brasil una prevalencia de 29.6%, en Gambia se reporta 61% y en Irán 46.5%. Por lo que se puede inferir que la prevalencia de *cagA* alrededor del mundo es dependiente tanto de la zona geográfica como de la situación socio económica. (Ortiz et al. 2016)

El genotipo predominante fue *cagPAI+/cagA+* presente en el 72.2% de los pacientes infectados, lo que indica que la mayoría de los pacientes presenta una infección con cepas de *Helicobacter pylori* que contienen estos importantes factores de virulencia, esto puede ser un factor de riesgo para el individuo, sin embargo, hay que considerar algunos factores importantes como la respuesta del hospedero a la infección y si la presencia de la isla de

patogenicidad es funcional, es decir si el identificar la presencia de la isla no es suficiente ya que no sabemos si contiene todos los genes que integran la maquinaria funcional de la isla que hace que la proteína *CagA* sea translocada a la célula epitelial, también se debe considerar dentro del gen *cagA* los motivos EPIYA que presenta, lo que haría en conjunto hablar de una cepa con potencial para causar daño o solo tiene estos factores de virulencia pero no la isla funcional o bien que la proteína CagA no se expresa, lo cual sería interesante explorar en esta población. Estos dos aspectos son los que podrían explicar porque la prevalencia de estos genes en niños es parecida a la de los adultos y porque en ellos no causa un daño mayor en la mucosa, aunque hay excepciones, ya que se puede encontrar en algunos casos lesiones epiteliales importantes aun en niños, pero no con la frecuencia que se presenta en adultos.

10. CONCLUSIÓN

La prevalencia de *H. pylori* en niños con sintomatología gastroduodenal fue de 46.4%, y el 68% de las cepas aisladas presentaron un genotipo *cagPAI+/cagA+*.

11. ANEXOS

Tabla 13 Descripción de oligonucleótidos utilizados en la PCR

GEN	NOMBRE DEL GEN	OLIGONUCLEOTIDO DE PCR	PRODUCTO (pb)	REFERENCIAS
<i>ureC</i>	GLMHP_F UreC GLMHP_R UreC	5' AGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT 3' 3' AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC 5'	294	(Lu, et al, 1999)
<i>16S RNAr</i>	16sHP522_F 16sHP118_R	5' TGGCAATCAGCGTCAGGTAATG 3' 3' GCTAAAGAGATCAGCCTATGTCC5'	522	(Peek, et al, 1995)
<i>cagPAI</i>	PAIF PAIR	5' ACATTTTGGCTAAATAAACGCTG 3' 3' TCATGCGAGCGGCGATGTG 5'	360	(Akopyants, et al, 1998)
<i>cagA</i>	cagA5F cagA5R	5' GATAACAGGCAAGCTTTTTGAGG 3' 3' CTGCAAAAGATTGTTTGGCAG 5'	349	(Tummuru, et al, 1993)

Identificación de la *cagPAI* mediante PCR empty site

Para la detección por métodos moleculares de la isla de patogenicidad de *H. pylori* se realiza por medio del método, PCR *empty site* (*sitio vacío*), la cual consiste en realizar la reacción de PCR con la utilización de oligonucleótidos diseñados a partir de genes que flanquean la secuencia de interés (Isla de patogenicidad) estos genes son Hp0519 al Hp0549, cuando la *cagPAI* no se encuentre en medio de estos dos genes la reacción se puede llevar a cabo dando un producto de amplificación de 550pb interpretándolo como ausencia de la isla de patogenicidad. Sin embargo, cuando la *cagPAI* se encuentra inserta entre estos genes la amplificación no se lleva a cabo y la interpretación es: ausencia del producto de amplificación significa presencia de la isla de patogenicidad. El tamaño del producto de amplificación dependerá del diseño de los primers.

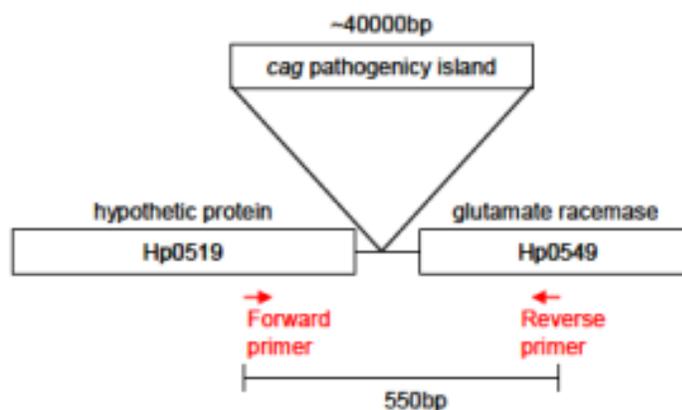


Figura 8. Esquema de PCR empty site (Perez-Perez et al. 2018)

Abreviaturas

1. BabA: Adhesina de unión a antígeno de grupo sanguíneo
2. BHI: Infusión cerebro corazón
3. CagA: Citotoxina asociada al gen *cagA*
4. *cagPAI*: isla de patogenicidad de genes asociados a citotoxinas
5. C.I.: Células inmunes
6. DAR: Dolor abdominal recurrente
7. Hp: *Helicobacter pylori*
8. HpaA: Adhesina *Helicobacter pylori* A
9. NAP: Proteína activadora de neutrófilos
10. OipA: Proteína inflamatoria externa A
11. pb: Pares de bases
12. SabA: Adhesina de unión al ácido siálico
13. VacA: Citotoxina vacuolizante

REFERENCIAS

- Akopyants NS, Clifton SW, Kersulyte D, Crabtree JE, Youree BE, Reece CA, Bukanov NO, Drazek ES, Roe BA, Berg DE. (1998). Analysis of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol*; 28:37–53.
- Alarcon. 2000. Prevalence of CagA and VacA Antibodies in Children with *Helicobacter pylori*-Associated Peptic Ulcer Compared to Prevalence in Pediatric Patients with Active or Nonactive Chronic Gastritis. *American society for microbiology*. Vol. 7. 842-844
- Alm RA, Ling CS, Moir DT, King BC, Brown ED, Jiang Q et al. 1999 Genomic sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. Vol. 397. 176-180
- Aspholm M, Olfat FO, Nordén J, Sondén B, Lundberg C, Sjöström R, Altraja S, Odenbreit S, Haas R, Wadström T, Engstrand L, Semino-Mora C, Liu H, Dubois A, Teneberg S, Arnqvist A, Borén T. 2006. SabA is the *Helicobacter pylori* hemagglutinin and is polymorphic in binding to sialylated glycans. *PLoS Pathog*. Vol 2. 989-1001
- Bauer. B y Meyer. F. 2011, The human gastric pathogen *Helicobacter pylori* and its association with gastric cancer and ulcer disease. *Ulcers*. Vol. 2011, 23 p.
- Boyanova L, Yordanov D, Gergova G, Markovska R, Mitov J. 2010. Association of *iceA* and *babA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains with patients and strain characteristics. *Antoine Van Leeuwenhoek*. Vol. 98. 343-350
- Calva, Luna, Lagunes, Rivera, Calva, Santos. 2006. Prevalencia del *Helicobacter pylori* en tres poblaciones de niños, de la ciudad de Puebla, México y sus factores de riesgo. *Gastroenterol Mex*. Vol. 71. 440-445
- Cervantes-García E. 2006. *Helicobacter pylori* e infecciones asociadas. *Rev Fac Med UNAM*. Vol 49. 163-168
- Cervantes García Estella, (2016), *Helicobacter pylori*: mecanismos de patogenicidad, *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*, Vol 63, 100-109

- Cover T. 2006. Role of *Helicobacter pylori* outer membrane proteins in gastroduodenal disease. *The Journal of infectious diseases*. Vol 194. 1343-1345
- Cover and Blaser, 2009, “*Helicobacter pylori* in health and disease”, *Gastroenterology*, Vol. 136, pp. 1863–1873.
- Dore, Sepulveda, and El-Zimaity, 2001, “Isolation of *Helicobacter pylori* from sheep-implications for transmission to humans,” *American Journal of Gastroenterology*, vol. 96, pp. 1396–1401.
- Feldman, Eccersley, and Hardie. 1998, Epidemiology of *Helicobacter pylori*: acquisition, transmission, population prevalence and disease-to-infection ratio, *British Medical Bulletin*, Vol54, 39-53
- Fiedorek, C., H. M. Malaty, D. L. Evans, C. L. Pumphrey, H. B. Casteel, D. J. Evans, Jr., and D. Y. Graham. 1991, Factors influencing the epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in children. *Pediatrics*, Vol.88, 578-582
- Figueiredo C, Quint W, Nouhan N, van den Munckhof H, Herbrink P, Schepernisse J et al. 2001. Assessment of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes and host serological response. *J Clin Microbiol*. Vol. 39. 1339-1344
- Geis G, Suerbaum S, Forsthoff B, Leying H, Opferkuck W. 1993. Ultrastructure and biochemical studies of flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol*. Vol. 38. 371-377
- Genta, R. M. 2002, Review article: after gastritis—an imaginary journey into a *Helicobacter*-free world. *Aliment Pharmacol*. Vol16, 89-94
- Gozález Valencia, Atherton, Muñoz, Dehesa, Madrazo De la Garza, Torres. 2000. *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes in Mexican adults and children. *The journal of infectious diseases*. Vol. 182. 1450-1454
- Herbert López González, Antonio Sánchez Márquez, Nuria Gispert Cruells, Isaiás Garduño Hernández. 1999. *Helicobacter pylori* en niños y su relación con dolor abdominal recurrente. *Revista mexicana de pediatría*. Vol. 66. 51-54
- Heuermann, D., and R. Haas. 1995. Genetic organization of a small cryptic plasmid of *Helicobacter pylori*. *Gene*. Vol. 7. 17-24

- Jiménez-Soto LF, Kutter S, Sewald X, Ertl C, Weiss E, Kapp U, Rohde M, Pirch T, Jung K, Retta SF, Terradot L, Fischer W, Haas R. 2009. Helicobacter pylori type IV secretion apparatus exploits beta1 integrin in a novel RGD-independent manner. PLoS Pathog. 5: e1000684
- Johannes G. Kuster, Arnoud H. M. van Vliet and Ernst J. Kuipers. 2006. Pathogenesis of Helicobacter pylori Infection. Clinical Microbiology Review. Vol. 19. 449-490
- Jung SW, Sugimoto M, Shiota S, Graham DY, Yamakoa Y. 2012. The intact *dupA* cluster is more reliable Helicobacter pylori virulence marker than DupA alone. Infect Immun. Vol. 80. 381-387
- Kuipers, E. J., D. A. Israel, J. G. Kusters, M. M. Gerrits, J. Weel, A. van Der Ende, R. W. van Der Hulst, H. P. Wirth, J. Hook-Nikanne, S. A. Thompson, and M. J. Blaser. 2000. Quasispecies development of Helicobacter pylori observed impaired isolates obtained years apart from the same host. J. Infect. Dis. Vol. 181. 273-282
- Kusters, J. G., M. M. Gerrits, J. A. Van Strijp, and C. M. VandenbrouckeGrauls. 1997. Coccoid forms of Helicobacter pylori are the morphologic manifestation of cell death. Infection and immunity. Vol 65, 3672-3679
- Leonardo H, Eusebi, Rocco M. Zagari y Bazzoli. 2014. Epidemiology of Helicobacter pylori infection. Helicobacter. Vol. 19. 1-5
- Linz, Balloux, and Moodley, 2007, "An African origin for the intimate association between humans and Helicobacter pylori," Nature, vol. 445, pp. 915–918.
- Lu JJ, Perng CL, Shyu RY, Chen CH, Lou Q, Chong SK, Lee CH. Comparison of five PCR methods for detection of Helicobacter pylori DNA in gastric tissues. J. Clin. Microbiol 1999; 37:772–774.
- Mobley HL. 1996. The role of urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. Aliment Pharmacol Ther. Vol 10. 57-64
- Noto Jennifer y Peek Richard. (2012). The Helicobacter pylori cag pathogenicity island. Methods Mol Biol. Vol. 921, 41-50

- Olbermann P, Josenhans C, Moodley Y, Uhr M, Stamer C. 2010. A global overview of the genetic and functional diversity in the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *PLoS Genet.* 6. E10011069
- Ortiz-Princz, Daoud, Salgado y Cavazza. 2016. *Helicobacter pylori* in children: should it be carefully assessed? *European Review for medical and pharmacological sciences.* Vol. 20. 1798-1813
- O'Toole, P. W., M. C. Lane, and S. Porwollik. 2000, *Helicobacter pylori* motility. *Microbes Infect.* Vol. 2, 1207-1214
- Paniagua GL, Monroy E, Rodríguez R, Arróniz S, Rodríguez C et al. 2009. Frequency of vacA, cagA and babA2 virulence markers in *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican patients with chronic gastritis. *Ann Clin*
- Peek RM Jr., Miller GG, Tham KT. Perez-Perez GI, Cover TL, Atherton JC, Dunn GD, Blaser MJ. Detection of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. *J. Clin. Microbiol* 1995; 33:28–32.
- Perez-Perez Guillermo, Andersson Malin y Olivares Asalia. 2018. Characterization of East Asian and African Genotypes among *Helicobacter pylori* strains isolated from different human population. *JSM Gastroenterology and Hepatology.* 6(1): 1091
- Reyes L, Atherton, Argent, Puente y Torres. 2007. Heterogeneity in the activity of Mexican *Helicobacter pylori* strains in gastric epithelial cells and its association with diversity in the cagA gen. *Infection and immunity.* Vol. 75. 3445-3454
- Reynolds, D. J., and C. W. Penn. 1994, Characteristics of *Helicobacter pylori* growth in a defined medium and determination of its amino acid requirements. *Microbiology.* Vol. 140, 2649-2656.
- Rhead JL, Lettey DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA et al. 2007. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology.* Vol. 133. 926-936
- Rivas T y Hernández. 2000, *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Rev Blomed.* Vol. 11, No. 3, 187-205

- Rohde M, Püls J, Buhrdorf R, Fischer W, Haas R. 2003. A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system. *Mol Microbiol.* 49:219–234.
- Romo. C, Consuelo. Camorlinga, Velázquez, García, Burgueño y Coria. 2015. Plasticity region genes jhp0940, jhp0945, jhp0947 and jhp0949 of *Helicobacter pylori* in isolates from Mexican children. *Helicobacter.* Vol 20. 231-237
- Romo-González Carolina and Coria-Jiménez Rafael (2018). *Helicobacter pylori* Genes jhp0940, jhp0945, jhp0947 and jhp0949 are Associated with Gastroduodenal Disease [Online First], IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.81290. Available from: <https://www.intechopen.com/online-first/helicobacter-pylori-genes-jhp0940-jhp0945-jhp0947-and-jhp0949-are-associated-with-gastroduodenal-dis>.
- Scott, D. R., E. A. Marcus, D. L. Weeks, and G. Sachs. 2002. Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* Vol 123, 187-195
- Skirrow, M. B. 1977, *Campylobacter enteritis: a “new” disease.* *British Medical Journal.* Vol. 2 9-11
- Stent A, Every AL, Sutton P. 2012. *Helicobacter pylori* against oxidative attack. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Vol. 302. 579-587
- Šterbenc A, Jarc E, Poljak M, Homan M. *Helicobacter pylori* virulence genes. *World J Gastroenterol* 2019; 25(33): 4870-4884
- Taneera, J., A. P. Moran, S. O. Hynes, H. O. Nilsson, W. Al-Soud, and T. Wadstrom. 2002. Influence of activated charcoal, porcine gastric mucin and beta-cyclodextrin on the morphology and growth of intestinal and gastric *Helicobacter* spp. *Microbiology,* Vol 148, 677-648
- Tergtmeyer Nicole, Wessler Silja, Backert Steffen. 2011, Role of the cag-pathogenicity island encoded type IV secretion system in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *FEBS J.* 278. 1190-1202

- Torres. 2000, Aspectos epidemiológicos y clínicos de la infección por *H. pylori* en niños. *Gastroenterol Mex.* Vol 65, 13-29
- Torres, Lopez, Lazcano, Camorlinga, Flores y Muños. 2005. Trends in *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in México. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* Vol 14. 1874-1877
- Tummuru, M., T. L. Cover, and M. J. Blaser. (1993). Cloning and expression of a high- molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect. Immun.* 61:1799–1809
- Yamaoka Y. 2008. Increasing evidence of *Helicobacter pylori* SabA in the pathogenesis of gastroduodenal disease. *J Infect Dev Ctries.* Vol 2. 174-181
- Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. 200. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (*oipA*) of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA.* Vol 93. 7533-7538
- Yamaoka Y, Kodama T, Kita M, Imanishi J, Kashima K, Graham DY. 1998. Relationship of *vacA* genotypes of *Helicobacter pylori* *cagA* status cytotoxin production, and clinical outcome. *Helicobacter.* Vol. 3. 241-253