



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**“PRESENCIA DE LOS GENES *cagA* Y *babA* EN CEPAS DE
Helicobacter pylori AISLADAS DE PACIENTES
MEXICANOS CON ENFERMEDAD
GASTRODUODENAL”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MIRIAM MENDOZA TELLEZ

ASESORES: M. en C. ANDREA A. BECERRIL OSNAYA
M. en C. MARGARITA CAMORLINGA PONCE

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Presencia de los genes cagA y babA en cepas de Helicobacter pylori

aisladas de pacientes mexicanos con enfermedad gastroduodenal.

que presenta la pasante: Miriam Mendoza Téllez

con número de cuenta: 09741171-0 para obtener el título de :

Química Farmacéutica Bióloga

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 13 de Enero de 2006

PRESIDENTE QFI. Andrea A. Becerril Osnaya

Andrea A. Becerril Osnaya

VOCAL Dra. Susana E. Mendoza Elvira

Susana E. Mendoza Elvira

SECRETARIO QFB. Rosalba Bonilla Sánchez

Rosalba Bonilla Sánchez

PRIMER SUPLENTE Dr. Andres Romero Rojas

Andrés Romero Rojas

SEGUNDO SUPLENTE QFB. Olimpia R. Ponce Crippa

Olimpia R. Ponce Crippa

AGRADECIMIENTOS

A mis abuelos Pedro y Cuquis, a quienes nunca podré pagar todos sus desvelos, sacrificios y esfuerzos. Gracias por darme la herencia más valiosa que pudiera recibir: mi carrera profesional.

A mi mamá por que gracias a tu confianza, a tu paciencia y a tu gran esfuerzo por sacarnos adelante he logrado alcanzar una de mis metas.

A mi hijo José Antonio por impulsarme y darme día con día la fuerza necesaria para salir adelante, esperando que esto te sirva de incentivo para la realización de tus metas.

A mi esposo José Cruz por darme el apoyo y la confianza para seguir adelante con mis estudios.

A **Norma, Alicia, Luis y Gabriel** por su apoyo brindado a lo largo de mi carrera y por que siempre podré contar con ustedes.

A mis tíos: Ana, Angélica, Lupe, Armando, Chuy, Nacho, Pepe, Román por que gracias a su apoyo y a la confianza que han depositado en mi he logrado alcanzar una de mis metas.

A la familia **Cruz Fuentes** gracias por la estimación, el apoyo y la confianza que han depositado en mi.

A la **M en C Margarita Camorlinga** por la darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por la confianza y los conocimientos brindados.

A la **M en C Andrea A. Becerril** por sus atenciones, su valiosa asesoría y conocimientos brindados para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA.

Por que gracias a tu total e incondicional apoyo, tus desvelos, tus preocupaciones, por tu infinita paciencia y por todo el sacrificio y esfuerzo por sacarnos adelante he logrado realizar una de mis metas.

Como muestra de mi eterno e infinito agradecimiento te dedico el presente estudio, el cual es el fruto de lo que has cultivado en mí.

Gracias por creer en mí y por caminar conmigo a lo largo de mi carrera profesional.

“Mamá Cuquis.”

INDICE

	PAGINAS
RESUMEN	IV
1. INTRODUCCION	1
1. 1 Antecedentes Históricos	1
1. 2 Características Generales de la Bacteria	2
1. 3 Taxonomía	6
1. 4 Genoma de la bacteria	7
1. 5 Factores de Patogenicidad	9
1) Estructura espiral	9
2) Flagelos	9
3) Adhesinas	9
4) Ureasa	9
5) Otras enzimas	10
6) Lipopolisacarido	11
7) Alcohol deshidrogenasa	11
8) Proteínas de choque térmico	11
9) Toxina vacuolizante (<i>VacA</i>)	11
10) <i>CagA</i>	12
11) Isla de Patogenicidad <i>cagA</i>	13
12) <i>babA2</i>	15
1. 6 Epidemiología	16
a) Factores Predisponentes a la infección por <i>H. pylori</i>	16
b) Transmisión	17
b.1) Vía oral-oral	17
b.2) Vía fecal-oral	17
b.3) Vía iatrogénica	18
1. 7 Manifestaciones clínico patológicas	18
a) Gastritis superficial	18
b) Gastritis crónica atrófica	18
c) Úlcera duodenal	19
d) Cáncer gástrico	20
1. 8 Diagnóstico	20
a) Invasivas	20
a.1) Histología	20
a.2) Cultivo	20

	PAGINAS
a.3) Prueba Rápida de la Urea	21
a.4) Reacción en Cadena de la Polimerasa	21
b) No invasivas	21
b.1) Ensayo Inmunoenzimático para la Detección de Antígenos en Heces	21
b.2) Prueba de Aliento de la Ureasa	22
b.3) Serología	22
1. 9 Tratamiento	23
2. JUSTIFICACION	24
3. HIPOTESIS	25
4. OBJETIVOS	26
4.1) Objetivo general	26
4.2) Objetivos particulares	26
5. MATERIAL Y METODOS	27
5. 1 Descripción de la muestra	27
5. 2 Material	28
5. 3 Equipos	28
5. 4 Reactivos	29
5. 5 Metodología	31
5.5.1 Procesamiento de muestras biológicas (Cultivo e identificación)	33
5.5.2 Descongelación de muestras	34
5.5.3 Extracción de DNA	34
5.5.4 Cuantificación de DNA	35
5.5.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa	36
5.5.6 Electroforesis	38
6. RESULTADOS	39
7. DISCUSION	51
8. CONCLUSIONES	59
9. GLOSARIO	60
10. ANEXO	62
11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	65

INDICE DE FIGURAS

	PAGINAS
Figura 1.- Colonias de <i>H. pylori</i> en cultivo de agar sangre de carnero al 5%	4
Figura 2.- Tinción de Gram de <i>H. pylori</i> a partir de cultivos frescos	5
Figura 3.- Morfología de <i>H. pylori</i> observado por microscopia electrónica	5
Figura 4.- Representación del primer genoma (26695) secuenciado de <i>H. pylori</i>	8
Figura 5.- Hidrólisis de la urea	10
Figura 6.- Estructura general de la Isla de Patogenicidad	14
Figura 7.- Localización del estómago en el cuerpo humano	27
Figura 8.- Aislamiento, identificación y conservación de muestras biológicas	31
Figura 9.- Cuantificación y determinación de genes por PCR	32
Figura 10.- Número de pacientes con enfermedad gastroduodenal	40
Figura 11.- Número de cepas de <i>H. pylori</i> aisladas de pacientes con EG	40
Figura 12.- Gel de agarosa al 1%. Amplificación del gen <i>UreC</i>	41
Figura 13.- Gel de agarosa al 1%. Cepas <i>cagA</i> (+) y ausencia del gen <i>cagPAI</i>	42
Figura 14.- Gel de agarosa al 1%. Amplificación del gen <i>babA2</i>	43
Figura 15.- Frecuencia de <i>cagA</i> , <i>cagPAI</i> y <i>babA2</i> en cepas de pacientes con EG	47
Figura 16.- Asociación de <i>cagA</i> y <i>babA2</i> en pacientes con EG	50

INDICE DE TABLAS

	PAGINAS
Tabla 1.- Especies de <i>Helicobacter</i>	6
Tabla 2.- Sensibilidad y Especificidad de Pruebas Diagnósticas	22
Tabla 3.- Secuencia de los <i>primers</i> utilizados para la genotipificación de genes	30
Tabla 4.- Mezcla maestra para <i>cagA</i> y <i>cagPAI</i>	36
Tabla 5.- Mezcla maestra para <i>babA2</i>	36
Tabla 6.- Controles para los diferentes PCR's	37
Tabla 7.- Condiciones del termociclador para la amplificación de genes	37
Tabla 8.- Número de cepas de <i>H. pylori</i> obtenidas de Pacientes con Enfermedades Gastroduodenales	39
Tabla 9.- Frecuencia del gen <i>cagA</i> (+) en Pacientes con EG	44
Tabla 10.- Frecuencia del gen <i>cagA</i> (-) en Pacientes con EG	45
Tabla 11.- Frecuencia del gen <i>cagPAI</i> (+) en Pacientes con EG	45
Tabla 12.- Frecuencia del gen <i>cagPAI</i> (-) en Pacientes con EG	46
Tabla 13.- Frecuencia del gen <i>babA2</i> (+) en Pacientes con EG	46
Tabla 14.- Frecuencia del gen <i>babA2</i> (-) en Pacientes con EG	47
Tabla 15.- Frecuencia de cepas <i>cagA</i> (+) / <i>babA2</i> (+)	48
Tabla 16.- Frecuencia de cepas <i>cagA</i> (+) / <i>babA2</i> (-)	49
Tabla 17.- Frecuencia de cepas <i>cagA</i> (-) / <i>babA2</i> (+)	49
Tabla 18.- Frecuencia de cepas <i>cagA</i> (-) / <i>babA2</i> (-)	50

ABREVIATURAS

babA2.- Gen funcionalmente activo que permite la adhesión a las células hospederas.

BabA.- Antígeno de tipo sanguíneo ligado a adhesina

Bco.- Blanco de reacción

cag I.- Región derecha de *cag PAI*.

cag II.- Región izquierda de *cag PAI*.

cag PAI.- Isla de Patogenicidad

cagA.- Gen asociado a la citotoxina A

CagA.- Proteína inmunogénica de *H. pylori* codificada por el gen *cagA*

CG.- Cáncer gástrico

Ctrol.- Control

DG.- Displasia gástrica

DNA.- Ácido Desoxiribonucleico

EG.- Enfermedad gastroduodenal

ELISA.- Ensayo inmunoenzimático

G (-).- Gram negativo

g.- Gramos

GA.- Gastritis atrófica

GS.- Gastritis superficial

H .pylori.- Helicobacter pylori

Hps.- Proteínas de choque térmico

IgA.- Inmunoglobulina A

IgG.- Inmunoglobulina G

Kb.- Kilobases.

KD.- Kilodaltons

LPS.- Lipopolisacarido

Mb.- Megabases

mcl.- Microlitros

mg.- Miligramos

MI.- Metaplasia intestinal

min.- Minutos

ml.- Mililitros

mm.- Milímetros

MP.- Marcador de peso molecular

Mtras.- Muestras problema

µl.- Microlitros

µm.- Micrómetros

ng.- Nanogramos

nm. – Nanómetros

NSAID.- Drogas anti-inflamatorias no esteroides

OMS.- Organización Mundial de la Salud

PCR.- Reacción en cadena de la polimerasa

RNA.- Ácido Ribonucleico

seg.- Segundos

SSF.- Solución Salina Fisiológica

TAE.- Buffer Tris-Ácido Acético-EDTA

TE.- Buffer Tris-EDTA

UD.- Ulcera duodenal

UreC.- Gen estructural, conservado y específico de la enzima ureasa de *H. pylori*

VacA.- Citotoxina vacuolizante

vacA.- Gen que codifica para la citotoxina vacuolizante

RESUMEN

Aproximadamente del 70 al 90% de la población mundial esta infectada por *Helicobacter pylori*. Aunque la mayoría cursa la infección de manera asintomática, una pequeña fracción desarrolla enfermedades gastroduodenales como gastritis superficial, gastritis atrófica, metaplasia intestinal, displasia gástrica, cáncer gástrico y úlcera duodenal. Esto es debido a que la bacteria posee ciertos factores que incrementan su virulencia.

Por tal motivo, en este estudio se determinó por PCR, la presencia de los genes *cagA* y *babA2* asociados a virulencia en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes mexicanos con enfermedades gastroduodenales, así como también, se relacionó la presencia de estos genes con las diferentes manifestaciones clínico patológicas.

Se demostró que la presencia de los genes *cagA* y *babA2* en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes mexicanos se encuentran asociadas a úlcera duodenal y cáncer gástrico, siendo la presencia de *cagA* más frecuente en pacientes con gastritis atrófica, displasia gástrica metaplasia intestinal y úlcera duodenal; y *babA2* más frecuente en pacientes con úlcera duodenal y cáncer gástrico en comparación con pacientes que presentan gastritis superficial.

1. INTRODUCCION

1.1 Antecedentes Históricos.

La infección en el humano por *H. pylori* fue descrita hace más de un siglo, pero fue ignorada por la literatura médica hasta 1893 cuando Bizzozero la redescubre en el estómago de perros y gatos. En 1906 Balfour describió la presencia de espiroquetas en perros y monos con úlceras gástricas. Kreintz y col. el mismo año comunican los hallazgos de microorganismos similares en estómago de enfermos con cáncer gástrico.¹

Doenges (1938), encontró espiroquetas en 104 de 242 estómagos de pacientes muertos. Y en 1940 Freedberg y Barron detectaron la presencia de estas bacterias en el 40% de las muestras de gastrectomías.

En 1983, Robin Warren y Barry Marshall de manera accidental, lograron aislar y cultivar (en agar chocolate bajo atmósfera anaerobia) una bacteria espiral de la mucosa gástrica de pacientes con gastritis crónica, comunicaron sus observaciones al realizar tinciones de plata y propusieron el nombre de *Campylobacter* (Campilobacter Like Organisms CLO),^{1, 46} por lo que el estudio al microscopio puso en evidencia que:

- 1.- La bacteria presentaba de 4 a 6 flagelos, que la diferenciaban de *Campylobacter*
- 2.- Carecía de filamentos axiales, por lo tanto no era una espiroqueta
- 3.- Morfológicamente era similar a *Vibrio* pero era microaerofílico

Por todo este estudio se decidió clasificarlo dentro del género *Spirillum*.^{1,2}

El mismo año, Marshall y Skirrow, acuerdan el nombre de *Campylobacter pyloridis* ya que el porcentaje de G+C en su DNA fue de 34% y correspondía al rango normal de *Campylobacter* y era excluyente del género *Spirillum*.³

A partir de esta fecha, estudios más detallados comprobaron diferencias en la composición de ácidos grasos, en la secuencia de RNAr, en la presencia de flagelos, en la producción de ureasa y en la ausencia de una quinona.⁴

Posteriormente, en 1987 se le denominó *Campylobacter pylori* para adaptarse a la nomenclatura de la época. Finalmente, en 1989 Goodwin lo incluye en el género *Helicobacter*, desde entonces se le denominó *Helicobacter pylori* y se han aislado distintas especies, de origen gástrico, y no gástrico del hombre y animales.³

1.2 Características Generales de la Bacteria.

Helicobacter pylori es un bacilo Gram negativo, curvo o ligeramente espiral, mide 2.5-5 µm de largo y 0.5-1 µm de ancho, tiene de 4 a 6 flagelos unipolares de aproximadamente 2.5 µm de largo y 30 nm de espesor lo que le da la propiedad de ser muy móvil (Ver Figura 2 y 3). *H. pylori* es una bacteria fastidiosa, solo crece en agar sangre o skirrow, y en medios suplementados con suero, hemina, almidón y sangre de caballo, además crece en una atmósfera microaerofílica, con aproximadamente 10% de CO₂ y a temperaturas de 30 a 37 °C, aunque su temperatura óptima de

crecimiento es de 37 ° C. No crece a 25 ni a 42 ° C y en medios sólidos forma colonias pequeñas, lisas, translúcidas y húmedas como “gotitas de rocío”, midiendo de 1-2 mm de diámetro (Ver Figura 1).

Es incapaz de crecer en presencia de ácidos biliares. Produce enzimas que ayudan a su identificación bioquímica como son: ureasa, catalasa y oxidasa; con resistencia al ácido nalidíxico. Es fermentador de la D-glucosa y posee enzimas activas características del ciclo

de la urea y puede metabolizar algunos aminoácidos por fermentación muy similar a las bacterias anaerobias.⁵

Cuando se cultiva en medio sólido, las formas espirales son pocas o nulas. Cuenta con un glicocálix distintivo que mide alrededor de 40 nm de espesor. La pared celular se encuentra cubierta con subunidades anulares de 12 a 15 nm de diámetro.

Los cultivos prolongados de *H. pylori* de más de 12 días dan origen a la presencia de formas cocoides, que también aparecen después de exposición a oxígeno, son metabólicamente activas pero no son cultivables *in vitro*.⁶ Estas formas cocoides al compararlas con las formas helicoidales tienen menor cantidad de DNA y RNA.⁷ Incluso se ha reportado que pueden ser un mecanismo de defensa bacteriano, mediante el cual puede llegar a persistir durante periodos prolongados en el tejido gástrico.⁸ Por otro lado se asume que estas formas son indicativas de un estado de latencia que le permite sobrevivir en el ambiente, donde las condiciones no son favorables para el crecimiento. Para el aislamiento primario o subcultivo de cepas frescas es necesario dióxido de carbono extra, sin embargo en medio sólido esta dependencia disminuye con pases repetidos.

La tinción de Gram de las colonias muestra formas curvas o en forma de bastón (Ver figura 2). Si las pruebas bioquímicas primarias dan como resultado catalasa positivo, oxidasa positivo y ureasa positivo, muy probablemente las colonias son de *H. pylori*.⁹ La habilidad de *H. pylori* para causar la diversidad de enfermedades depende de factores del hospedero, la bacteria y del ambiente.

Helicobacter pylori ha sido considerado el agente etiopatogénico de la gastritis crónica, ulcera péptica y del cáncer gástrico.

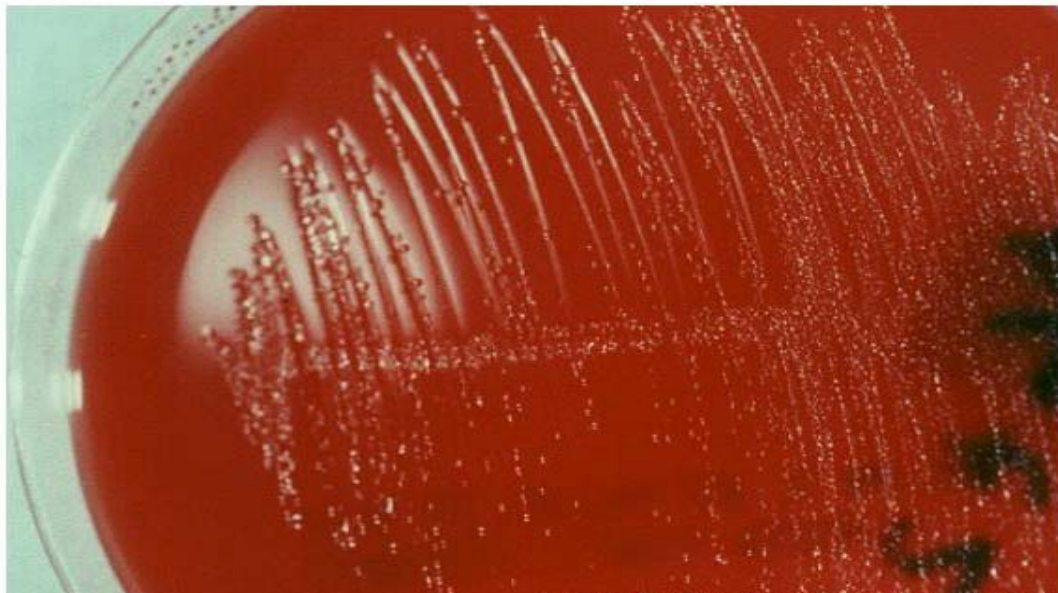


Figura 1. Colonias de *H. pylori* en cultivo de agar sangre de carnero al 5%. Las colonias de *H. pylori* presentan una morfología característica con aspecto brillante y transparente de 1 a 2mm de diámetro.



Figura 2. Tinción de Gram de *H. pylori* a partir de cultivos frescos. *H. pylori* se observa en forma de bacilo curvo Gram negativo.



Figura 3. Morfología de *H. pylori* al ser observado por microscopía electrónica. *H. pylori* es un bacilo curvo que mide de 2.5-5 μm de largo y 0.5-1 μm de ancho, tiene de 4 a 6 flagelos unipolares lo que le da la propiedad de ser muy móvil.

1.3 Taxonomía.

La familia Helicobacteriaceae (del grupo helicobacterias espirales y bacilos helicobacterias), desde la descripción del género el número de especies incluidas ha aumentado espectacularmente, comprende 23 especies, de las cuales 4 son patógenas para el hombre y 2 para animales (gatos, perros y monos).¹⁰

Tabla 1. Especies de *Helicobacter*. Al menos 23 especies de *Helicobacter* han sido descritas de una forma válida, 35 o más cuya clasificación no es clara esperan ser formalmente nombrados.^{11, 46, 54}

Especie	Hospedero	Sitio de infección
<i>H. pylori</i> ^p	Humano	Estómago
<i>H. nemestrinae</i>	Macaco, hurones	Estómago
<i>H. bizzozeronii</i>	Perro, humano	Estómago
<i>H. heilmannii</i> ^p	Algunos mamíferos	Estómago
<i>H. felis</i> ^p	Gato, perro	Estómago
<i>H. mustelae</i> ^p	Hurones, macaco	Estómago
<i>H. salomonis</i>	Perro, gato	Estómago
<i>H. nemestrina</i>	Monos	Estómago
<i>H. acinonychis</i>	Leopardo	Estómago
<i>H. rappini</i>	Algunos mamíferos	Intestino, estómago
<i>H. hepaticus</i>	Ratón	Intestino, hígado
<i>H. bilis</i>	Ratón, perro, humano	Intestino, hígado
<i>H. muridarum</i>	Ratón	Estómago, intestino
<i>H. rodentum</i>	Ratones y ratas	Intestino
<i>H. canis</i>	Perro	Intestino
<i>H. fennelliae</i> ^p	Humano	Intestino
<i>H. pollorum</i>	Pollo	Intestino
<i>H. pemetensis</i>	Aves	Intestino
<i>H. cinaedi</i> ^p	Humano	Intestino
<i>H. canadensis</i>	Humanos, pollos	Intestino
<i>H. cholecystus</i>	Hamster	Intestino
<i>H. trogontum</i>	Ratas	Intestino
<i>H. westmeadii</i>	Humanos	Intestino

p= patógeno

1.4 Genoma de la bacteria.

Helicobacter pylori se ha encontrado en momias egipcias y peruanas, lo que hace pensar que probablemente se ha hospedado en el estómago del humano desde hace 10 millones de años, cuando el tronco común del hombre africano aún no se había escindido en sus dos ramas (occidental y oriental). Esto indica, la bacteria exhibe una gran diversidad genética y una evolución diferente del genoma del *H. pylori* en cada una de estas dos ramas y por tanto una patogenicidad diferente de las cepas actuales.¹²

El genoma de *H. pylori* está constituido por un solo cromosoma circular de 1.6-1.7 Mb. El 40% de los aislados tienen plásmidos de 1.5-40 Kb que no han sido reconocidos como factores de virulencia.¹³ Los aislados de *H. pylori* generalmente muestran secuencias genómicas muy conservadas pero llegan a presentar un cierto rango de variabilidad genética (3-7%) en el que existen cambios en las secuencias de nucleótidos; la variabilidad en el orden de los genes es una característica única de *H. pylori* dentro del grupo de bacterias G (-).¹⁴

Se desconoce el mecanismo que provoca alteraciones en la organización de los genes, pero se sospecha que se pueden dar por transformación, ya que se realizan reacomodos genéticos rápidos dentro de la bacteria, por recombinación entre las mismas cepas de *H. pylori*.

Una característica importante es la presencia de dos secuencias diferentes de inserción o transposones (IS605 y IS606), una de ellas (IS605) se ha relacionado a genes de virulencia encontrándose en cepas de referencia.^{14, 13}

Actualmente investigadores han podido secuenciar el genoma completo de dos cepas de *H. pylori*: la cepa 26695 que fue aislada en el Reino Unido en 1987 de un paciente con gastritis y la cepa J99 aislada en Estados Unidos en 1994 de un paciente con úlcera duodenal.⁴⁸ (Ver Figura 4)

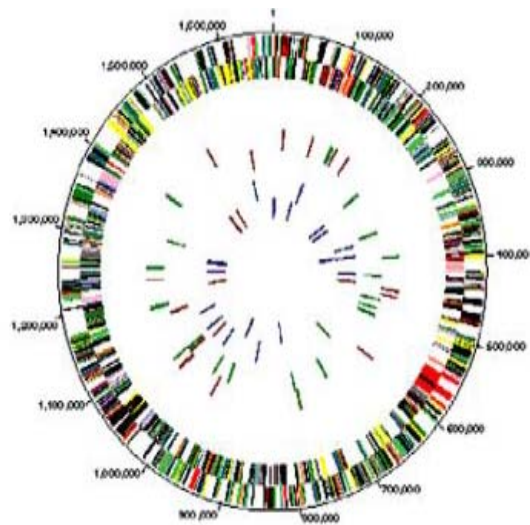


Figura 4. Representación gráfica del primer genoma (26695) secuenciado de *H. pylori*.⁵⁰ Tanto la cepa 26695 como la J99 son usadas como controles para la técnica de PCR.

1.5 Factores de Patogenicidad.

Se han descrito varios factores patogénicos de *H. pylori*, algunos de los cuales son característicos de la especie y otros de presencia variable.

Factores característicos de la especie:

1) Estructura espiral. La propia estructura de la bacteria le permite introducirse a través de la capa de moco gástrico actuando de forma similar a un sacacorchos y favoreciendo el acercamiento a las células epiteliales gástricas.¹⁵

2) Flagelos. *H. pylori* posee de 4 a 6 flagelos unipolares confiriéndole una gran movilidad, que le permiten llegar a la mucosa y no ser eliminados por los mecanismos de defensa del huésped.¹⁶

3) Adhesinas. Son proteínas de membrana externa, reconocen de forma específica a los receptores sobre la superficie de la mucosa gástrica y se unen a ellos comenzando la colonización bacteriana. Las adhesinas de *H. pylori* están constituidas por una hemaglutinina, con una estructura de tipo afrimbial y un diámetro de 2 nm. En general, la adhesión es ventajosa para la supervivencia del patógeno y para favorecer la liberación de las toxinas directamente sobre las células epiteliales.⁵²

4) Ureasa. La ureasa es una enzima producida en grandes cantidades por *H. pylori*, es esencial para la colonización de la mucosa gástrica, esta formada por dos subunidades UreA y UreB (de 27 y 60 KD respectivamente); la enzima transforma la

urea en amonio y CO₂ (Ver figura 5). Este amonio produce un microambiente alcalino alrededor de la bacteria que le permite neutralizar la acidez gástrica. Además, el amonio puede ser precursor de la síntesis proteica de algunas adhesinas de la propia bacteria.

La ureasa puede encontrarse dentro de su citoplasma como en su superficie. Esta doble localización se asocia a las múltiples funciones de la enzima, como proteger a la bacteria de la acidez, funcionar como factor de adhesión, activar fagocitos para producir citocinas inflamatorias, inducir efectos tóxicos en las células epiteliales gástricas y dañar DNA celular. La hidrólisis de la urea tiene efectos en las células de la mucosa gástrica que pueden llevar a la formación de úlceras. El daño inducido a la mucosa por la ureasa puede estar ligado a la habilidad del amoniaco a inducir la formación de vacuolas en el citoplasma de células *in vitro*.⁸

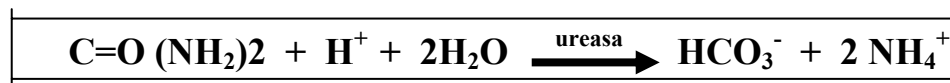


Figura 5. Hidrólisis de la urea: la enzima ureasa transforma la urea en amonio y dióxido de carbono.

5) Otras enzimas. *H. pylori* segrega además mucinas, proteasas, fosfolipasa A, citotoxinas como interleucinas (IL) y hemolisinas, que permiten producir daño a la mucosa gástrica, propiciar la perdida de hidrofobicidad en la mucosa y posiblemente disminuir la capacidad de las células para secretar moco. También *H. pylori* produce

catalasa y superóxido dismutasa (SOD), que constituyen una línea de defensa de la bacteria ante la acción de los leucocitos y polimorfonucleares activados.⁵¹

6) Lipopolisacarido (LPS). Es el principal componente de membrana externa, tiene poca actividad inmunológica. Permite prolongar la infección, contribuye a la inflamación crónica y tiene un papel importante en las respuestas autoinmunes en la mucosa gástrica. La estructura del antígeno O específico en diferentes cepas es similar a los antígenos de grupo sanguíneo Lewis y que se expresan en la mucosa gástrica humana normal. Este parecido molecular puede ser causa de la formación de algunos autoanticuerpos inducidos por *H. pylori*, que llevan al desarrollo de gastritis atrófica. Los antígenos Lewis se expresan más frecuentemente en las cepas *cagA* positivas que en las *cagA* negativas.¹⁷

7) Alcohol deshidrogenasa (ADH). Permite producir energía bajo condiciones anaeróbicas. También participa en la transformación de etanol a acetaldehído; de esta forma el acetaldehído puede acumularse en el tejido gástrico y causar daño, promoviendo la erosión y ulceración de la mucosa.⁵¹

8) Proteínas de Choque Térmico (Hps). Actúan como proteínas acompañantes aumentando la actividad de la ureasa.⁸

9) Toxina Vacuolizante (VacA). Es una proteína que induce la formación de vacuolas ácidas en el citoplasma de las células, por lo que también se le conoce como citotoxina.

Codificada por el gen *vacA* que esta presente en todas las cepas de *H. pylori*, pero solo el 50% expresa la forma activa.

Es sintetizada como una protoxina asociada a la membrana externa. Esta toxina de aproximadamente 87 KDa es antigénica y se han detectado anticuerpos neutralizantes en los individuos infectados.¹⁹ El gen *vacA* presenta variación alélica en dos regiones del gen: en la región señal (s) y en la región media (m). En cepas estudiadas en Estados Unidos se encontró que en la región señal de *vacA* presenta 3 alelos: s1a, s1b y s2 y posibles alelos en la región media: m1 y m2. Las posibles combinaciones del genotipo son: (1) s2m2, codifica una forma no vacuolizante de VacA; (2) s1m2 codifica una forma de toxina que induce vacuolización de manera limitada; y (3) s1m1 codifican la forma más tóxica de VacA.²⁰

Los alelos s1 y m1 de *vacA* se han asociado a úlcera péptica y a atrofia de la mucosa gástrica, así como a una mayor actividad inflamatoria. Mientras que los alelos s2 y m2 no presentan esta asociación.¹⁷

En todas partes del mundo, los genotipos *vacA/cagA* positivos se asocian a úlceras pépticas.¹⁸

10) CagA. *CagA* es una proteína de membrana externa, así como un importante antígeno inmunodominante que al parecer se expresa en función de las condiciones de pH del medio.

Tiene un peso molecular de aproximadamente 120 a 140 KDa. Esta proteína es inyectada en las células epiteliales y translocada al citosol, mediada por el sistema de secreción tipo IV, en el citosol es fosforilada por una cinasa del hospedero, posteriormente ocurre la polimerización de actina ocasionando la formación de pedestales y favoreciendo la unión de la bacteria con la célula hospedera. La presencia de esta proteína influye en la respuesta inflamatoria y aumenta la secreción de IL-8 por células epiteliales.

La proteína *CagA* es codificada por el gen *cagA*, localizado en una Isla de Patogenicidad (*cag PAI*). La estructura del gen *cagA* contiene una región altamente conservada que se encuentra en el extremo 5' y una región variable en el extremo 3'. Este gen ha tomado importancia debido a que se ha utilizado para la tipificación de cepas de *H. pylori*, sobre todo por tratarse de un marcador de riesgo de úlcera gástrica.

Diversos estudios muestran que cepas que expresan este subgrupo de factores de virulencia están más asociadas con enfermedades gastroduodenales. En la actualidad se sabe que cepas *cagA* + tienen mayor densidad bacteriana en el antro, son más patógenas e incrementan el riesgo a desarrollar gastritis atrófica, úlcera duodenal, metaplasia y cáncer gástrico, comparadas con las cepas *cagA* -.²¹

El 60% de las cepas de *Helicobacter pylori* producen esta proteína y su presencia se correlaciona con la expresión de la toxina vacuolizante.²² La respuesta serológica a *CagA* ha sido detectada en el 80 al 100% de los adultos con úlcera duodenal infectados con *H. pylori*, comparado con 60 a 63% de personas con gastritis e infectados asintomático.²³

En niños se desconoce la frecuencia de respuesta a esta proteína.

11) Isla de patogenicidad *cagA* (*cag PAI*). Se conoce como Isla de Patogenicidad a los segmentos discretos e inestables de DNA presentes en especies patógenas, estos segmentos a su vez codifican para proteínas que pueden contribuir a la colonización y desarrollo de enfermedad.²⁴ Estos fragmentos de DNA solo se presentan en bacterias Gram (-) adquiriéndose por transmisión horizontal.

Censini y cols.²⁵ sugieren que *H. pylori* contiene un fragmento de DNA extraño de alrededor de 40 KB derivado posiblemente de un plásmido o un fago al cual se le ha denominado Isla de Patogenicidad (*cag PAI*), único en cepas *cagA* + (cepas tipo I)

que probablemente fue adquirido horizontalmente e integrado al cromosoma .^{25, 24}

En algunas cepas *cag PAI* se ha clasificado en dos regiones por un segmento de inserción o transposon llamado IS605 (Ver figura 6):

- a) Región *cag I* (región derecha)
- b) Región *cag II* (región izquierda)²⁵

Dentro de la región *cag I* se localizan aproximadamente 15 genes llamados: *cagA*, *cagB*, *cagC*, *cagD*, *cagE* (*picB*), *cagF*, *cagG*, *cagH*, *cagI*, *cagL*, *cagM*, *cagN*, *cagO*, *cagP*, *cagQ*. Dentro de la región *cagA II* se localizan por lo menos 16 genes llamados: *cagS*, *cagT*, *cag18*, *cag17*, *cag16*, *cag15*, *cag14*, *cag13*, *cag12*, *cag11*, *cag10*, *cag9*, *cag8*, *cag7*, *cag6*, y *cagA5*.²⁶

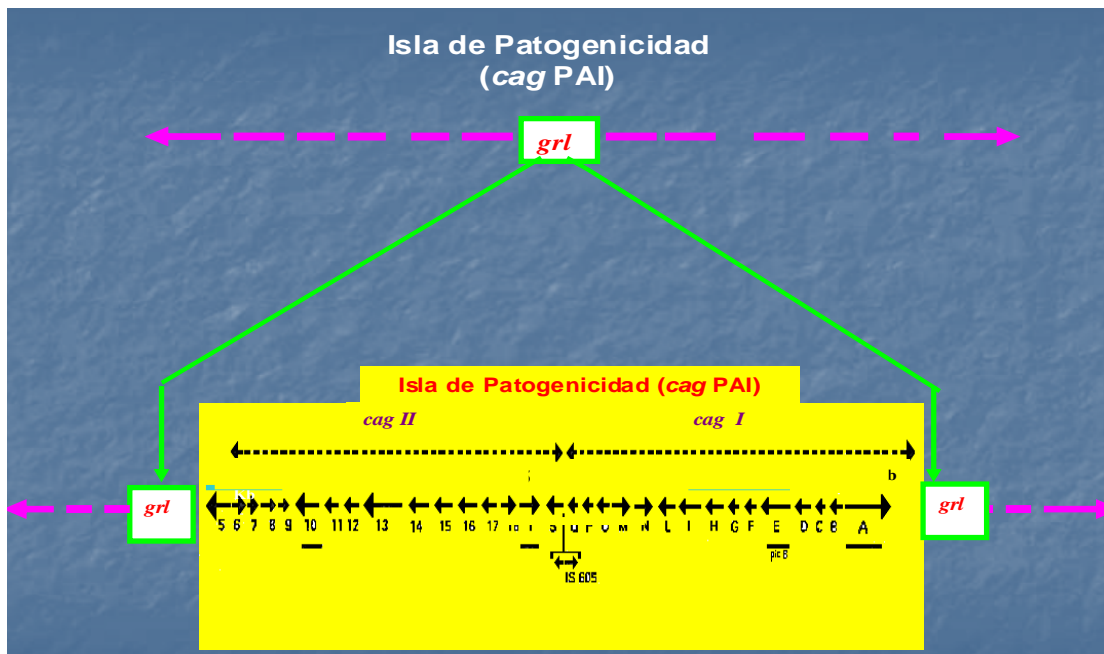


Figura 6. Estructura general de la Isla de Patogenicidad (*cag PAI*) dentro del genoma bacteriano.

El tamaño de *cagA II* es de aproximadamente 21 Kb.

12) BabA2 (Blood group Antigen Binding Adhesin). Estudios recientes han mostrado evidencia que factores de adherencia pueden contribuir a la patogenicidad de *H. pylori*, el antígeno de tipo sanguíneo ligado a adhesina (*BabA*) ha mostrado ser el mediador de adherencia de la bacteria a antígenos de grupo sanguíneo humano en células gástricas epiteliales. Es un factor de adherencia que no se encuentra en todas las cepas, se asocia a cepas de mayor virulencia sugiriendo ser esenciales para la colonización.²⁷

Este gen existe en tres formas alélicas (*babA1*, *babA2* y *babB*). Solo el gen *babA2* ha sido funcionalmente activo permitiendo la adhesión a las células hospederas. Por otro lado, el alelo *babA2*, además parece guardar una fuerte correlación con *vacA* s1 y *cagA* + y a su vez con casos de úlcera péptica, cáncer gástrico y adenocarcinoma.⁵ Sin embargo, la importancia de *H. pylori* y sus factores de adherencia para la transformación de células gástricas epiteliales, grado de inflamación, metaplasia intestinal esta pobremente entendido.²⁷

1.6 Epidemiología.

La infección por *H. pylori*, es un problema de salud mundial, el 70-90% de la población mundial esta infectada, pero la mayoría cursa la enfermedad de manera asintomática. *Helicobacter* presenta un peculiar modelo de infección de bajo ruido y prolongado, que suele extenderse durante toda la vida. La infección bacteriana es endémica y de carácter cosmopolita. La infección se adquiere la mayoría de las veces durante la infancia alrededor de la edad de 10 años.

En los países en vías de desarrollo la infección se adquiere tempranamente; a los cinco años, más de 20 % de los niños están infectados (pudiendo incrementarse hasta un 30-40% en los grupos de bajo nivel socioeconómico) y a los 20 años cerca de 80 %. El patrón es diferente en los países desarrollados, la infección es rara durante la niñez y aumentando con la edad el número de infecciones.⁵

En un estudio epidemiológico realizado en México (1998) se encontró que el 20% de los niños menores de 1 año están infectados; a los 10 años el 50% y a los 25 el 80% de la población mexicana esta infectada.⁴⁷

a) Factores Predisponentes a la Infección por *H. pylori*.⁵

- 1) Edad.
- 2) Bajo nivel socioeconómico.
- 3) Hacinamiento.
- 4) Falta de higiene.
- 5) Malos hábitos alimenticios (fumar, estrés, alcohol).

- 6) Factores genéticos que determinan la interacción huésped-bacteria.
- 7) Enfermedades que disminuyen la secreción ácida.
- 8) Región geográfica.

b) Transmisión.

El mecanismo de transmisión de la infección por *H. Pylori* no ha sido del todo entendido. Se ha establecido que la adquisición de la bacteria, ocurre por un contacto cerrado con individuos infectados durante la niñez temprana. Por tal motivo las rutas de infección han sido ampliamente hipotetizadas y actualmente se acepta que la infección se transmite de tres maneras:⁵

b.1) Vía oral-oral. Debido a que *H. pylori* es removida de la mucosa gástrica se pueden reencontrar en jugo gástrico y alcanzar la cavidad oral. La bacteria ha sido aislada de saliva, lengua, paladar, cavidad oral y placa dental; considerándose esta última como un potencial reservorio.

b.2) Vía fecal-oral. . Esta vía es la más importante debido a que se ha podido identificar en heces de niños y de pacientes adultos infectados. La bacteria es removida de la mucosa gástrica y eliminada por intestino sobreviviendo en heces y contaminando el ambiente.

Estudios en aguas de ríos y lagos han propuesto que es la principal fuente de infección por contaminación de las heces.

b.3) Vía iatrogénica. Es poco frecuente la transmisión por medio de los tubos de endoscopia y sondas contaminadas que han estado en contacto con vómito o contenido gástrico de pacientes infectados, introduciéndolos en una persona sana. Este problema es ocupacional por mala desinfección del material.

Se ha desechado la posibilidad de reservorios animales para la bacteria lo que lleva a decir que no existe una zoonosis.^{5, 8, 28}

1.7 Manifestaciones Clínico Patológicas.

a) Gastritis Superficial. Todos los individuos infectados por *H. pylori* desarrollan un proceso de inflamación. La gastritis es la inflamación de la mucosa gástrica con alteraciones en la estructura glandular; asociada al 90-95% de los pacientes infectados por *H. pylori*.²⁹

Una vez que la bacteria coloniza el epitelio produce diferentes factores que inducen la liberación de IL-8 por células epiteliales. El incremento de la secreción de IL-8 y la respuesta de IgM contra *H. pylori* son las primeras señales de una respuesta inflamatoria. Esta respuesta inflamatoria provoca cambios importantes en la fisiología del estómago y duodeno, por daño directo a células.

b) Gastritis Crónica Atrófica. La gastritis aguda puede evolucionar a gastritis crónica atrófica; en el caso de una inflamación crónica de la mucosa gástrica se despierta una respuesta inmune celular de tipo CD4 y CD8, también se despierta una respuesta de IgA específica contra *H. pylori* que impide la adherencia bacteriana y una respuesta IgG sistémica.

Pacientes con gastritis predominantemente antral tienden a tener una secreción alta de ácido y presentan un mayor riesgo de desarrollar úlcera duodenal.

Tanto gastrina como histamina activan a células parietales para que produzcan más ácido. El exceso de ácido llega al duodeno donde neutraliza las sales biliares que normalmente inhiben a *H. pylori*; la elevada cantidad de ácido induce metaplasia gástrica en duodeno.

H. pylori coloniza este tejido metaplásico e induce inflamación en el duodeno. La inflamación y exceso de ácido dañan la integridad de la mucosa duodenal y favorecen el desarrollo de úlcera duodenal.⁵

c) Úlcera duodenal. La úlcera es la formación de hoyos en la mucosa gástrica, ocasionada por el uso de NSAID y por la infección con *H. pylori*.^{29, 30,49} Es una enfermedad de origen multifactorial, caracterizada por la pérdida de mucus en regiones de la mucosa del tracto digestivo expuestas a la acción del ácido clorhídrico. Algunos estudios muestran que en pacientes con úlcera duodenal causada por *H. pylori* un tratamiento adecuado lleva a la cicatrización de úlcera, incremento de células D y de somatostatina, resolución de la inflamación, niveles normales de gastrina y reducción de recaídas. Por el contrario pacientes con gastritis en el cuerpo tienden a tener concentraciones bajas de ácido tienden a desarrollar atrofia gástrica, progresar a úlcera gástrica o a cáncer gástrico.

Una baja concentración de ácido originado por una gastritis crónica prolongada y el daño ocasionado por una constante inflamación favorecen la **metaplasia intestinal** y esta a su vez la **displasia**; una vez que se desarrolla la displasia, el desarrollo de cáncer gástrico es muy probable.

d) Cáncer Gástrico. El cáncer gástrico esta asociado al desarrollo de tejido metaplasico y a displasia causados por *H. pylori*, este ya no es capaz de colonizar tejidos cancerosos debido a que la estructura del epitelio ya no es ideal para la colonización de la bacteria. En 1994 la OMS clasificó a *H. pylori* como carcinógeno de categoría 1.^{29, 30}

1.8 Diagnóstico.

Las pruebas de diagnóstico para la detección de *H. pylori* se clasifican en:

a) Invasivas. Verifican directamente la presencia de la bacteria, empleando biopsias gástricas tomadas por endoscopia

a.1) **Histología.** Se hace cortes histológicos de la biopsia, se observa con tinción de Hematoxilina-Eosina, Warthin Starry, Giemsa y Genta.

Ventaja: ofrece información en cuanto a la inflamación, presencia de atrofia, metaplasia, displasia. Bajo costo, método fácil de realizar

Desventajas: obtención de resultados falsos negativos por la mala toma de muestra, la distribución de *H. pylori* y falsos positivos por la presencia de precipitados de colorante.^{5, 8, 53}

a.2) **Cultivo.** Inocular biopsia en menos de dos horas, homogenizar y sembrar en un medio gelosa agar sangre con y sin antibiótico e incubar (5-10 % de CO₂ 37° C). Identificar por tinción de Gram y pruebas bioquímicas. Es considerado como el “estándar de oro”.

Ventajas: altamente específica, determina su susceptibilidad antimicrobiana.

Desventajas: costoso, difícil de realizar, resultados falsos negativos por el medio transporte inadecuado y por una mala toma de muestra.⁵³

a.3) **Test Rápido de la Ureasa.** Se basa en la actividad de la urea producida por *H. pylori* en el estómago la cual hidroliza la urea en amonio y CO₂, el amonio eleva el pH dando el vire del reactivo indicador.

Ventajas: la prueba es rápida, sensible y específica, la prueba esta disponible en varias marcas comerciales o se puede preparar en el laboratorio.

Desventajas: se requiere de endoscopia, además de un gran número de bacterias.^{5,8}

a.4) **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).** Se basa en el análisis de una secuencia específica de DNA de *H. pylori*, utilizando oligonucleótidos iniciadores de genes que son conservados en todas las cepas. Se ha transformado en el método estándar para la detección de material genético

Ventajas: rápida, sensible y específica

Desventaja: precio elevado.⁸

b) No invasivas. No se requiere de endoscopia, son más económicos. Evidencian directamente la infección (a excepción de detección de antígenos en heces).⁵

b.1) **Ensayo Inmunoenzimático para Detección de Antígenos en Heces (EIA).** Se basa en la detección directa de antígenos de *H. pylori* en heces de pacientes pediátricos con infección activa.

Ventajas: método simple, no requiere personal ni equipo especializado.³²

b.2) **Prueba de Aliento de la Ureasa (PAU).** Se basa en la presencia de grandes cantidades de ureasa producida por *H. pylori*. Se toman dos muestras de aliento la primera antes de ingerir urea marcada con C¹³ o C¹⁴ y la segunda después de la ingestión. Se monitorea la liberación de CO₂ marcado con C¹³ durante la expiración.

Ventaja: rápida y sensible

Desventaja: falsos positivos si el paciente tomo algún antibiótico.³¹

b.3) **Serología.** Detección de anticuerpos específico mediante un ensayo inmunoenzimático en placa (ELISA). La prueba indica títulos elevados de IgM e IgA infección inicial o activa por *H. pylori*, mientras que niveles elevados de IgG pueden indicar infección activa o resuelta.

Ventaja: sensible, específica, rápida, fácil de realizar, no requiere de endoscopia.

Desventaja: funciona mejor en adultos que en niños.^{8, 53}

Tabla 2. Sensibilidad y Especificidad de Pruebas Diagnósticas para la detección de infección por *H. pylori*

Prueba	Sensibilidad	Especificidad
• Histología	93-98 %	95-98 %
• Cultivo	77-95%	100 %
• Prueba Rápida de la Ureasa	89-98%	93-98 %
• Prueba de Aliento de la Ureasa	90-95%	90-95 %
• Serología	88-95%	86-95 %
• PCR	85-96%	90-100 %

1.9 Tratamiento.

El tratamiento de elección para la infección por *H. pylori* es la terapia triple que consiste en la combinación de dos antibióticos efectivos como amoxicilina, tetraciclina, metronidazol, o claritromicina, con ranitidina-bismuto, subsalicilato de bismuto o un inhibidor de la bomba de protones como omeprazol, lansoprazol, pantoprazol o rabeprazol, durante 10 a 14 días.⁵

Las tasas de erradicación están entre el 64% y el 94%, debido a las diferentes sensibilidades de las regiones que hacen que el tratamiento de elección pueda variar de una parte del mundo a otra. Además se ha reportado que las tasas de erradicación han venido disminuyendo en la combinación con metronidazol, debido a la aparición de cepas de *H. pylori* resistentes a dicho fármaco, llegando a cifras de más del 70% en algunos países como China.^{5, 56}

En cuanto a la claritromicina, la resistencia reportada ha sido muy variada en el mundo, lo cual está asociado, al amplio uso de este antibiótico en el tratamiento de infecciones respiratorias en algunas ciudades. Sin embargo, se ha alcanzado elevadas tasas de erradicación con el esquema: claritromicina, amoxicilina y omeprazol.⁵⁶

Por otro lado, la resistencia del microorganismo y el no cumplimiento del tratamiento por parte de los pacientes, suelen ser las dos causas más frecuentes de fracaso terapéutico. En general, las pautas con tres fármacos presentan mejores tasas de erradicación que aquellas con dos, además, tratamientos más prolongados (14 días) muestran mejores tasas de erradicación.⁵⁵

2. JUSTIFICACION

La creciente prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en países en vías de desarrollo como México, en donde la infección se adquiere en la mayoría de los casos en la infancia, ha estimulado el esfuerzo de investigadores por determinar la presencia de genes tales como *cagA* y *babA2* relacionados con la virulencia de la bacteria, asociada con enfermedades gastroduodenales.

Sin embargo, la importancia de la presencia de los genes *cagA* y *babA2* en cepas de *H. pylori* en pacientes con enfermedades gastroduodenales aún no se conoce en México y no se sabe si dichos genes están presentes en cepas de pacientes con enfermedades gastroduodenales o con que frecuencia se relacionan a las patologías.

Por tal motivo este estudio pretende relacionar los factores de patogenicidad (*cagA* y *babA2*) con la gastritis, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia gástrica, cáncer gástrico y úlcera duodenal en pacientes mexicanos, lo que permitirá un entendimiento más claro del comportamiento de la bacteria en el humano.

3. HIPOTESIS

Si la frecuencia de los genes *cagA* y *babA2* aumenta el grado de virulencia entonces la frecuencia de los genes será mayor en pacientes con metaplasia, displasia, cáncer gástrico y úlcera duodenal que en los pacientes con gastritis.

4. OBJETIVOS

4.1) Objetivo General.

Genotipificar los genes *cagA* y *babA2* asociados a virulencia en cepas de *Helicobacter pylori* de pacientes con diferentes enfermedades gastroduodenales.

4.2) Objetivos particulares.

- 1.- Determinar la presencia del gen *cagA* en cepas de *H. pylori* de pacientes con gastritis, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia gástrica, cáncer gástrico y úlcera duodenal.
- 2.- Determinar la presencia del gen *babA2* en cepas de *H. pylori* de pacientes con diferentes enfermedades gastroduodenales mencionadas en el objetivo anterior.
- 3.- Relacionar la presencia de los genes *cagA* y *babA2* con la presencia de enfermedad gastroduodenal.

5. MATERIAL Y METODOS.

5.1 Muestras Biológicas.

Se tomaron muestras de biopsia de pacientes con enfermedad gastroduodenal en el Hospital General de México del Seguro Social y en el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Se incluyeron pacientes mayores de 30 años de edad, con diagnóstico clínico inicial de enfermedad gastroduodenal; en un período comprendido entre el 1° de octubre de 1999 a julio del 2002.

Un número de 100 sujetos por cada categoría de diagnóstico, fueron reclutados en las clínicas, para la obtención de biopsias gástricas de antro (s3) y cuerpo (s4) (Ver figura 7). Realizándose un cultivo de las mismas, para el aislamiento e identificación de cepas de *H. pylori*.

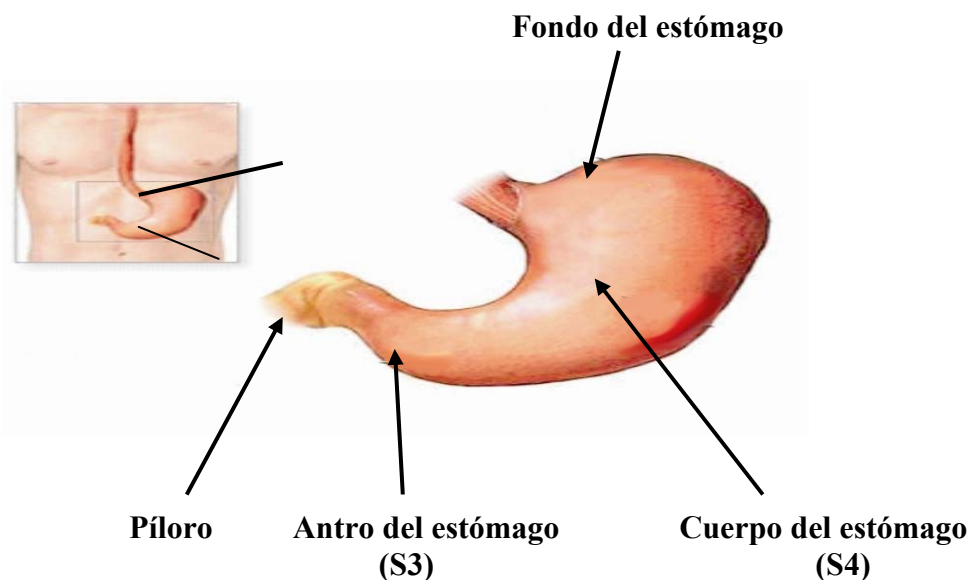


Figura 7. Localización del estómago en el cuerpo humano. Se observa cada una de las partes en las que se divide el estómago para fines de estudio.

5.2 Material

- Tubos eppendorf de 1.9 y 0.5 ml (ELKAY Products, Inc.)
- Homogenizadores de vidrio con pistilo de vidrio esmerilado.
- Cajas petri de plástico desechables (100 x 15 mm de dm.)
- Puntas estériles con y sin filtro de 10, 200 y 1000 µl (Labsystems).
- Micropipetas de 0.5–10µl, 5–40µl, 20–200µl y de 200–1000 µl). (Finnpipette)
- Asas bacteriológicas estériles desechables.
- Palillos de madera estériles.
- Crioviales estériles de 2 ml con tapón de rosca.
- Celdas de cuarzo.
- Gradillas.
- Tubos estériles para PCR de 0.2 ml (PCR-OsD-Y, Axygen Scientific).
- Guantes de Nitrilo (GENSKIN)
- Hielo seco
- Placa para ELISA
- Probeta 50 ml. Y 100 ml.

5.3 Equipos

- Estufa de CO₂ (CO₂ Water – Jacketed Incubator, AIRE tm US Autoflow, NUAIRE).
- Refrigerador de –20° C (Isotemp, Fisher Scientific).
- Refrigerador de –70° C (Freezer, Forma Scientific).
- Microcentrifuga (biofuge Heraeus)
- Campana de Flujo Laminar (Biological Safety Cabinets, NUAIRE).
- Espectrofotómetro. (Jenway Genova)
- Procesador de imágenes para observar los geles (Documentador de Geles Genegenius, Syngene. Syngene, Synoptics. LTD).
- Termociclador (GeneAmp* PCR Systems 9700, PE Applied Biosystems)
- Termociclador (flexigene)
- Cámara de Electroforesis Horizontal (DNA sub Cell, BIO-RAD)

5. 4 Reactivos

- Solución Salina Fisiológica estéril
- Glicerol (SIGMA).
- Agar gelosa sangre de carnero 5% (BBL Becton Dickinson).
- Agar gelosa sangre de carnero 5% con antibióticos. (ver anexo)
- Colorantes para la tinción de Gram (SIGMA): Cristal violeta, Safranina, Alcohol- Acetona, Yodo.
- Reactivo de Ureasa. (ver anexo)
- Test oxidasa (BBLD, Slide, Becton Dickinson)
- Caldo brucella (DIFCO).
- Buffer Tris 100 mM – EDTA 1mM (TE).
- Cloroformo al 99.9% (SIGMA-ALDRICH).
- Isopropanol (MERCK)
- Acetato de Sodio 3 M (SIGMA).
- Buffer de PCR 10x sin Cloruro de Magnesio (Invitrogen).
- Cloruro de Magnesio 50 mM (Invitrogen)
- Bromuro de Etidio 10 mg/ml (SIGMA). (Ver anexo)
- Solución de Lisis Nucleótidos
- Buffer TAE 1X (Ver anexo)
- Buffer Tris – Acido Acético – EDTA 0.5 M pH 8 (TAE)
- dNTP's (GIBCO BRL, Life Technologies). (Ver anexo)
- Taq DNA polimerasa recombinante (Invitrogen).
- Marcador molecular de 1 Kb (GIBCO BRL, Life Technologies). (Ver anexo)
- Buffer de corrimiento (Loading buffer 6x). (Ver anexo)
- Solución de Precipitación de Proteínas
- RNAasas (20mg/ml)
- Iniciadores o *primers* específicos (Invitrogen). (Ver tabla 3)
- TE 1X

Tabla 3. Secuencia de los *primers* utilizados para la genotipificación de genes.^{58, 59}

Gen	Primers	Secuencia de nucleótidos	Tamaño del producto
<i>UreC</i>			296
	F	5'GGATAAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGG3'	
	R	5'GCTTACTTTCTAACACTAACGCGC3'	
<i>cagA</i>			349
	F1	5'GATAACAGGCAAGCTTTTTGAGG3'	
	B1	5'CTGCAAAAGATTGTTTGGCAG3'	
<i>cagPAI</i>			360
	2	5'ACATTTTGGCTAAATAAACGCTG3'	
	25	5'TCATGCGAGCGGCGATGTG3'	
<i>babA2</i>			811
	babA2F	5'AATCCAAAAAGGAGAAAAAGTATGAAA3'	
	babA2R	5'TGTTAGTGATTTCGGTGTAGGACA3'	

5. 5 Metodología

Figura 8.- El diagrama muestra el procedimiento para el aislamiento, identificación y conservación de *H. pylori*, en muestras biológicas de pacientes con enfermedad gastroduodenal.

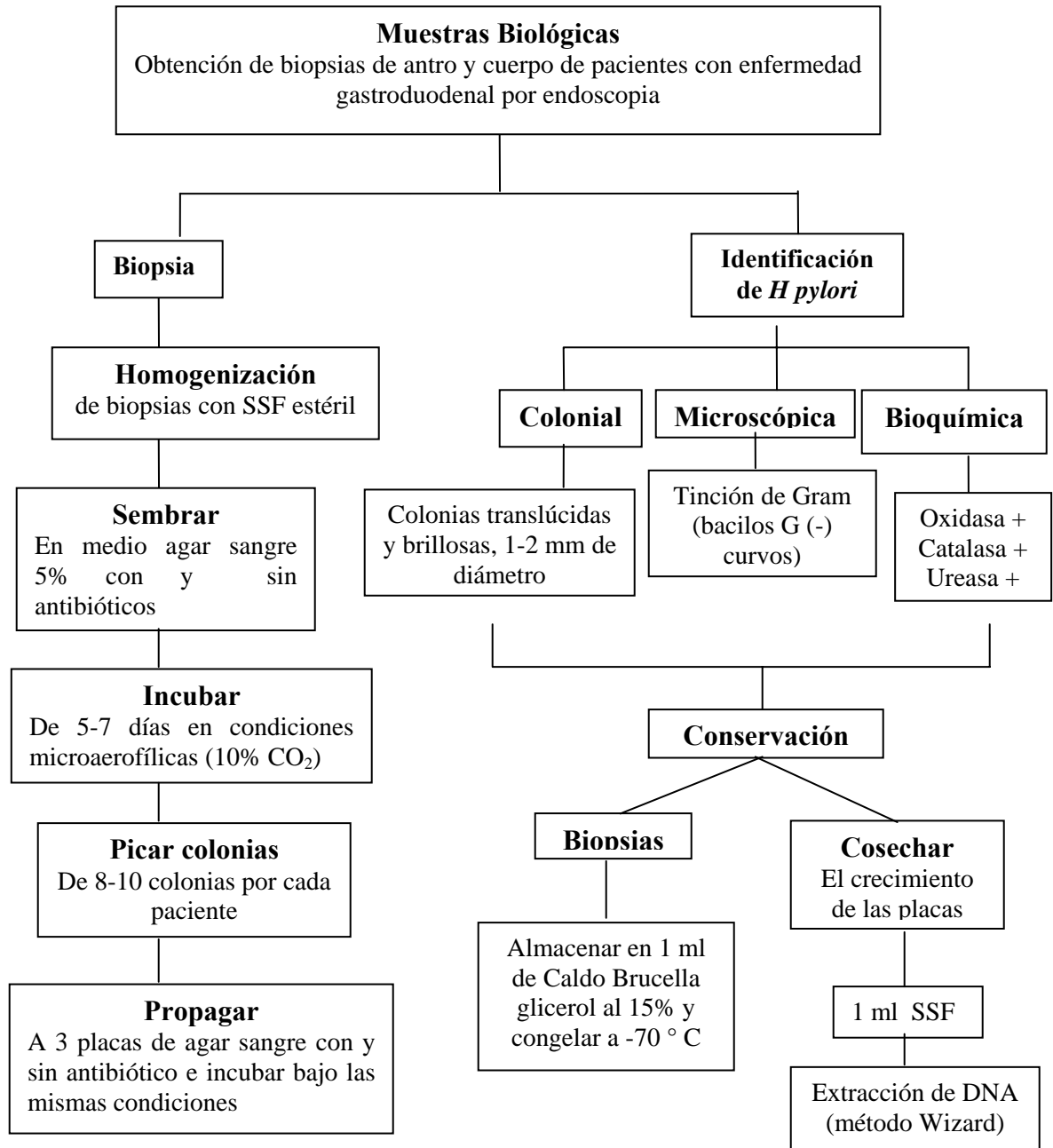
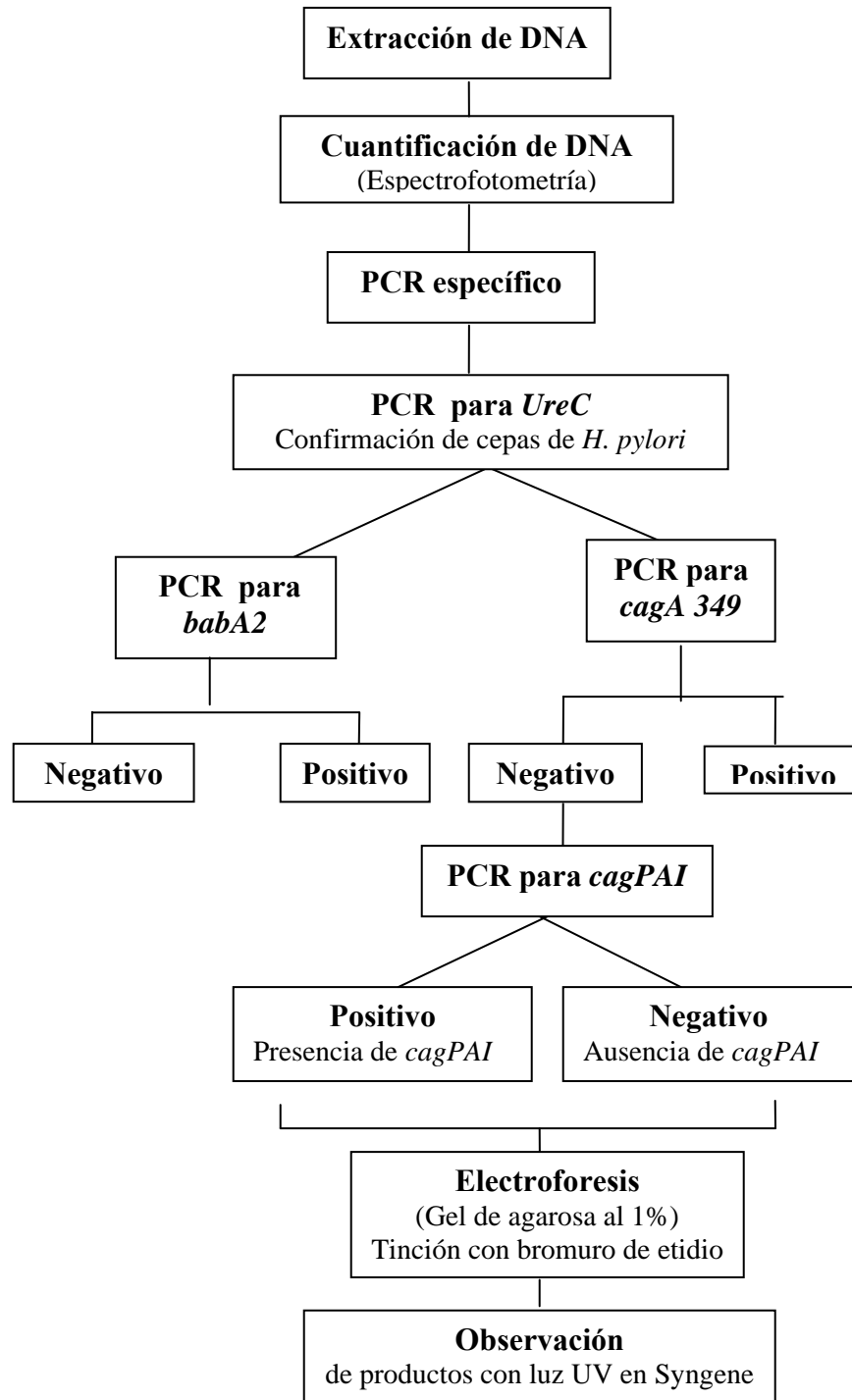


Figura 9.- Cuantificación y Determinación de los genes *UreC*, *cagA*, *babA2* y *cagPAI* de *H. pylori*, asociados a patogenicidad mediante la técnica de PCR.



5.5.1) Procesamiento de Muestras Biológicas (cultivo e identificación).⁵⁹

1. Las biopsias se transportaron en 1 ml de S.S. estéril. al 0.9% en hielo para ser procesadas.
2. Dos biopsias (1 de antro y 1 de cuerpo) se congelaron a -70°C en 500 μl de S.S.F. con glicerol para su conservación.
3. Una biopsia de antro y una de cuerpo se homogeneizaron con 200 μl de S.S.F. Se homogenizó el tiempo necesario para disgregar el tejido y no dañar a la bacteria.
4. Se sembraron 50 μl del homogeneizado en dos placas de agar sangre de carnero al 5% (con y sin antibiótico), dispersando el homogeneizado por rotación de la placa. NOTA: este paso se llevo a cabo en campana de flujo laminar.
5. Las placas se incubaron en atmósfera microaerofílica con Campy pack a 37°C en una incubadora de 9% de CO_2 durante 5- 7 días.
6. Se picaron alrededor de 8 colonias y se sembraron en placas de agar sangre sin antibiótico. Las placas se incubaron bajo las mismas condiciones.
7. Posteriormente se propagó el crecimiento de la placa a 3 placas de agar sangre sin antibiótico y se incubaron.
8. Los cultivos se identificaron por microscopía (tinción de Gram) y pruebas bioquímicas (ureasa, oxidasa y catalasa positivas)
9. Todo el crecimiento de las placas se recolectó con hisopos de algodón estériles:
10. PLACA 1.- El crecimiento se resuspendió en 1 ml de S.S.F.
11. PLACA 2 y 3.- El crecimiento se resuspendió en 1 ml de caldo brucella glicerol al 15% para congelarla a -70°C .

5.5.2) Descongelación de muestras.

- a) Mantener los criótubos en hielo seco
- b) Raspar con una punta estéril, depositando el inóculo en medio de gelosa agar sangre (con y sin antibiótico).
- c) Incubar en estufa de CO₂ a 37° C de 3 a 5 días
- d) Regresar los criótubos al congelador de -70° C lo más pronto posible.

5.5.3) Extracción de DNA⁵⁹

A partir del crecimiento cosechado se realiza la extracción de DNA *H. pylori* por el método Wizard Genomic prep.

- 1) Centrifugar la muestra en solución Salina Fisiológica estéril a 13,000-16,000g / 3min a temperatura de 17° C. Para la obtención de células
- 2) Decantar, retirando con una micropipeta lo más que se pueda hasta quedar solamente la pastilla.
- 3) Agregar 600 µl de Solución de Lisis de Ácidos Nucleótidos. Mezclar por inmersión, homogeneizando lo mejor posible.
- 4) Incubar a 80° C/5min para lisar las células.
- 5) Agregar 1.2µl de RNAasas (10mg/ml), mezclar por inversión aproximadamente 25 veces. Es importante que esta enzima siempre este en el congelador de -20 ° C o en hielo al usarla.
- 6) Incubar a 37° /40min.
- 7) Agregar 200 µl de solución precipitación de proteínas.
- 8) Homogeneizar vigorosamente utilizando el vortex por 20 seg.

- 9) Colocar en hielo por 20 min., mientras se etiquetan nuevos tubos.
- 10) Centrifugar a 13,000-16,000g / 6min a temperatura de 17° C
- 11) Agregar 600 µl de Isopropanol a cada tubo etiquetado anteriormente
- 12) Una vez que se terminaron de centrifugar las muestras, se toma con una micropipeta el sobrenadante teniendo cuidado de no tocar la pastilla y se coloca en los tubos con Isopropanol.
- 13) Invertir hasta observar hebras blancas que indican la presencia de DNA
- 14) Incubar a -20° C por 1 día
- 15) Centrifugar a 13,000-16,000g / 10min para que se precipite el DNA
- 16) Retirar el sobrenadante.
- 17) Lavar: Agregar 600mcl de etanol al 70% y centrifugar a 13,000-16,000g / 3min, decantar y repetir 3 veces este procedimiento.
- 18) Incubar 37° C / 90min, los tubos deben permanecer abiertos. Para evitar contaminación cubrir los tubos con aluminio.
- 19) Agregar 150 µl de solución TE a cada tubo para rehidratar, dejándolos reposar hasta el día siguiente a una temperatura de 4° C.

5.5.4) Cuantificación de DNA.⁵⁹

- a) Diluir el DNA 1/10 con TE o con agua desionizada.
- b) Leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 (DNA).
- c) De acuerdo a la concentración de DNA stock, se debe ajustar la concentración a 50ng/ml – 100ng/ml.

5.5.5) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).^{58, 59}

Se prepararon alícuotas de trabajo a una concentración de 80 - 100ng/ml de DNA para el desarrollo de la técnica.

- Se seleccionaron por grupo los DNA's de cada paciente para realizar PCR's específicos
- Se identificaron cada uno de los tubos de reacción para el PCR incluyendo controles positivo, negativo y blanco de reacción para cada ensayo.
- Se preparó la mezcla de reacción para los PCR's en frío (hielo) (Tablas 4 y 5). El volumen de cada reactivo se multiplicó por el número de tubos totales adicionando un tubo extra.

Tabla 4. Mezcla maestra para *cagA* y *cagPAI*^{58,59}

REACTIVOS	VOLUMEN POR TUBO
Agua inyectable estéril	18.0 µl
Buffer de PCR 10x s/MgCl ₂	2.5 µl
Mezcla de dNTP's 10 mM	2.5 µl
Cloruro de Magnesio 50 mM	.75µl
Mezcla de <i>primers</i> c/u	1.0 µl
Taq DNA polimerasa (5U/mcl)	.25 µl

Tabla 5. Mezcla maestra para *babA2*⁵⁸

REACTIVOS	VOLUMEN POR TUBO
Agua inyectable estéril	18.0 µl
Buffer de PCR 10x s/MgCl ₂	2.5 µl
Mezcla de dNTP's 10 mM	0.5 µl
Cloruro de Magnesio 50 mM	.75 µl
Mezcla de <i>praimers</i> c/u	0.5 µl
Taq DNA polimerasa	.25 µl

- d) Se colocaron 24 µl de la mezcla de reacción a cada tubo previamente marcado, adicionando 1µl de DNA por tubos de reacción.
- e) Para cada ensayo se prepararon tubos de reacción con DNA de controles positivo y negativo de acuerdo al gen amplificado (Tabla 6).
- f) Los tubos de reacción se colocaron en el termociclador para la amplificación de los productos de acuerdo a los protocolos establecidos para cada gen (Tabla 7).
- g) Los productos de PCR se almacenaron a -20° C hasta su uso.
- h) Los productos de PCR se identificaron mediante electroforesis horizontal

Tabla 6. Controles para los diferentes PCR's. Cepas utilizadas como controles para la determinación de genes asociados a virulencia de *H. pylori*.

Controles	<i>cagA</i>	<i>cag PAI</i>	<i>babA2</i>
Positivo	J99 / 26695	8822	J99
Negativo	8822	J99 / 26695	26695

Tabla 7. Condiciones del termociclador para la amplificación de *cagA*, *cag PAI* y *babA2*^{58, 59}

Condiciones	<i>Ure C</i>	<i>cagA</i>	<i>cag PAI</i>	<i>babA2</i>
Hold	94° C / 5 min.	95° C / 5 min.	94° C / 5 min.	95° C / 5 min.
Desnaturalizar	94° C / 1 min	94° C / 30 seg	94° C / 1 min	94° C / 1 min
Alinear	58° C / 1 min	55° C / 30 seg	57° C / 1 min	58° C / 1 min.
Extender	72° C / 1 min	72° C / 30 seg	72° C / 1 min	72° C / 1 min.
Hold (2)				
Extender (2)	72° C / 7 min.	72° C / 7 min.	72° C / 7 min.	72° C / 10 min.
Enfriar	4° C / ∞	4° C / ∞	4° C / ∞	4° C / ∞
No. de ciclos	35 ciclos	25 ciclos	35 ciclos	35 ciclos

5.5.6) Electroforesis.⁵⁹

- 1.- Preparar solución de agarosa al 1% en buffer Tris-Ácido Acético-EDTA 1x (TAE).
- 2.- Calentar hasta observar una solución homogénea y cristalina, sin la presencia de grumos.
- 3.- Preparar la cámara de electroforesis horizontal, es decir, colocarla en una mesa equilibrada y colocarle los peines aproximadamente 1 mm por arriba del fondo de la cámara.
- 4.- Vaciar la agarosa en la cámara de electroforesis.
- 5.- Dejar gelificar.
- 6.- Agregar el volumen suficiente de buffer TAE, quitar los peines.
- 7.- En una placa de 96 pozos colocar 1µl de Loading Buffer más 6 µl de producto de PCR.
- 8.- Introducir con una micropipeta la mezcla anterior en cada uno de los pozos del gel.
- 9.- Agregar 3 µl del marcador de peso molecular de 1 Kb en uno de los pozos.
- 10.- Conectar los electrodos de la cámara de electroforesis a una fuente de poder, programar a 100 volts por 30 a 40 min.
- 11.- Pasado el tiempo de corrimiento, teñir el gel con Bromuro de Etidio durante 5-15 min.
- 12.- Lavar el gel con agua destilada para retirar el exceso de Bromuro de Etidio.
- 13.- Observar el gel con luz ultravioleta en el procesador de imágenes SYNGENE., tomar la foto e imprimirla para su correcta interpretación. Se determinó como amplificación positiva cuando las muestras presentaron una banda de tamaño molecular igual a la banda del control positivo y sin amplificación alguna del control negativo y del blanco.

6. RESULTADOS

De los 62 pacientes con enfermedad gastroduodenal se obtuvieron para el estudio un total de 313 colonias de *H. pylori*, de las cuales 141 colonias fueron de pacientes con gastritis superficial, 25 colonias con gastritis atrófica, 12 con metaplasia intestinal, 4 con displasia gástrica, 55 con cáncer gástrico y 76 colonias de pacientes con úlcera duodenal (Ver Tabla 8 y Figura 10 y 11).

TABLA 8. Número de cepas de *H. pylori* obtenidas de pacientes con Enfermedades Gastroduodenales

Enfermedad	No. de pacientes	No. de cepas de <i>H. pylori</i>	Edad promedio (rango)
Gastritis Superficial	31	141	48.2 (30-92)
Gastritis Atrófica	10	25	50.3 (30-75)
Metaplasia Intestinal	4	12	56.6 (30-81)
Displasia Gástrica	2	4	62.8 (39-88)
Cáncer Gástrico	9	55	60.7 (28-86)
Úlcera Duodenal	6	76	51.0 (25-80)
Total	62	313	

Número de Pacientes por Enfermedad

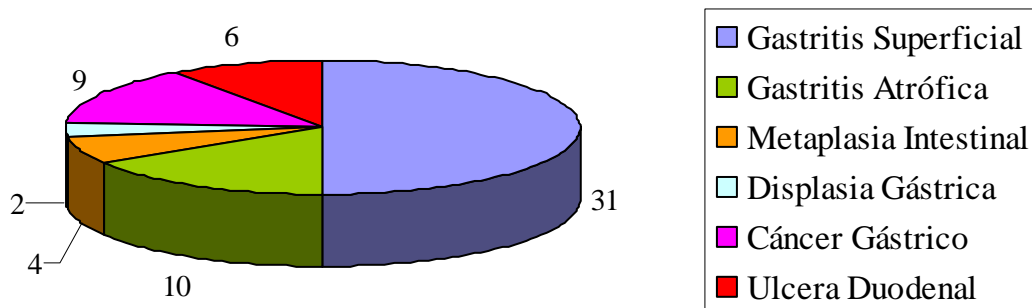


Figura 10. Número de Pacientes con Enfermedad Gastroduodenal asociada a *H. pylori*

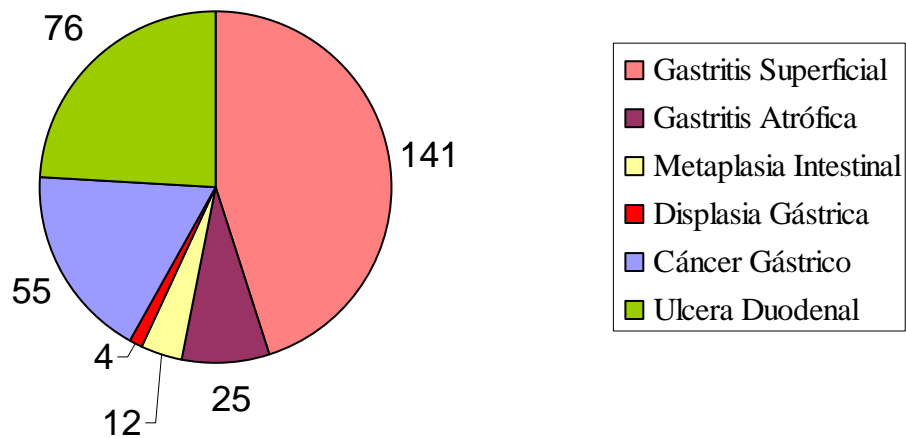


Figura 11. Número de cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con enfermedad gastroduodenal.

Se determinó la presencia de los genes *UreC* (Ver figura 12), *cagA* y *babA2* (Ver figura 13 a y 14), cada uno de ellos con sus correspondientes *primers*. Se corrieron en geles de agarosa al 1% las muestras problema junto con el marcador molecular de 1 Kb, los controles tanto positivo como negativo y el blanco de reacción.

Las muestras se consideraron como positivas cuando la banda del producto amplificado era del mismo peso molecular que la banda del producto amplificado por los controles positivos y no se observó amplificación alguna en los pozos donde se encontraban el control negativo y el blanco de reacción.

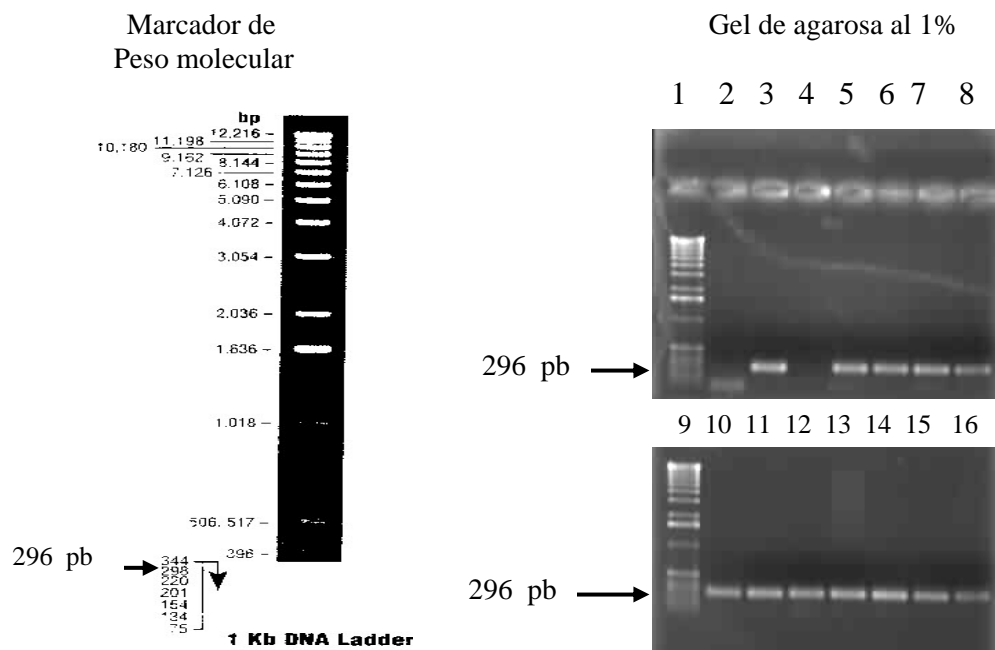


Figura 12 a.

Figura 12. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. (12 a) Amplificación del gen *UreC*, se observan bandas de peso molecular de 296 pb. De lado izquierdo escala del marcador de peso molecular de 1 Kb.

(Figura 12 a. Pozo: 1 y 9 Mp de 1 Kb, 2 Ctról -, 3 Ctról +, 4 Bco, 5 – 8 mtras y 10 – 16 mtras)

En el caso de las colonias que resultaron ser negativas para *cagA*, se confirmó la ausencia de *cagPAI* (Ver figura 13 b) utilizando un juego de iniciadores llamado *cagNeg*.

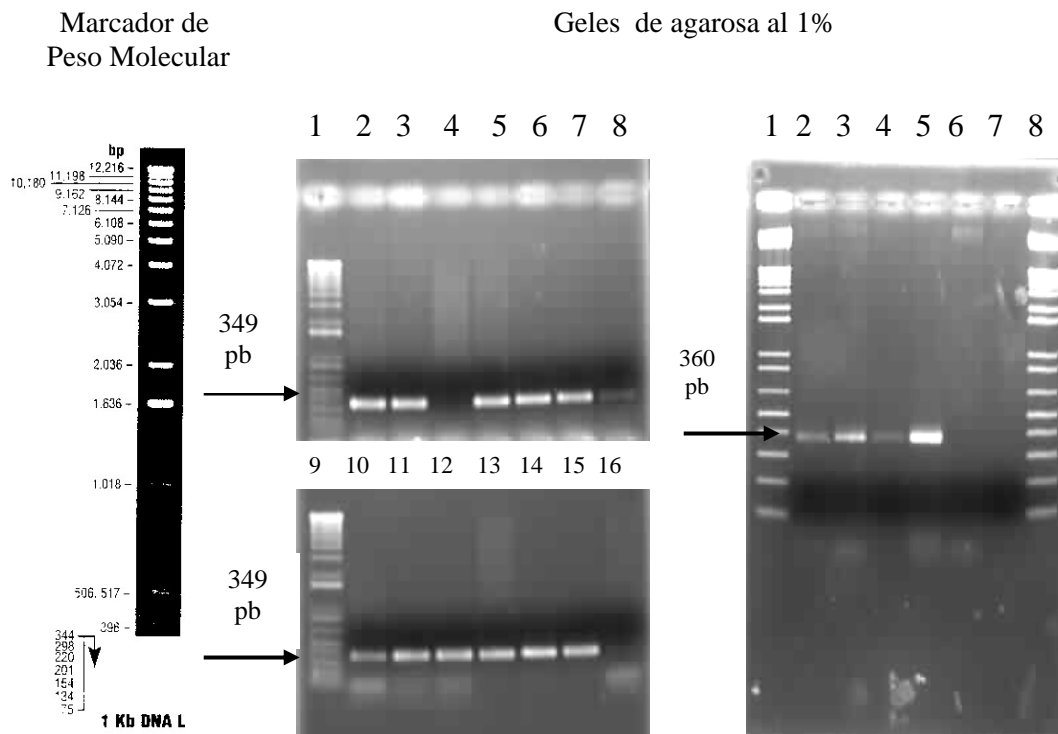


Figura 13 a.

Figura 13 b.

Figura 13. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. (13 a) Cepas de *H. pylori* *cagA* positivas. (13 b) Ausencia del gen *cagPAI* en cepas de pacientes con enfermedad gastroduodenal.

(Figura 13 a. Pozo: 1 y 9 MP de 1 Kb, 2 y 3 mtras, 4 Ctról -, 5 Ctról +, 6 - 8 mtras, 10-15 mtras y 16 bco. Figura 13 b. Pozo: 1 y 8 MP de 1Kb, 2 -4 mtras, 5 Ctról +, 6 Ctról - y 7 Bco).

Marcador de
Peso molecular

Geles de agarosa al 1%

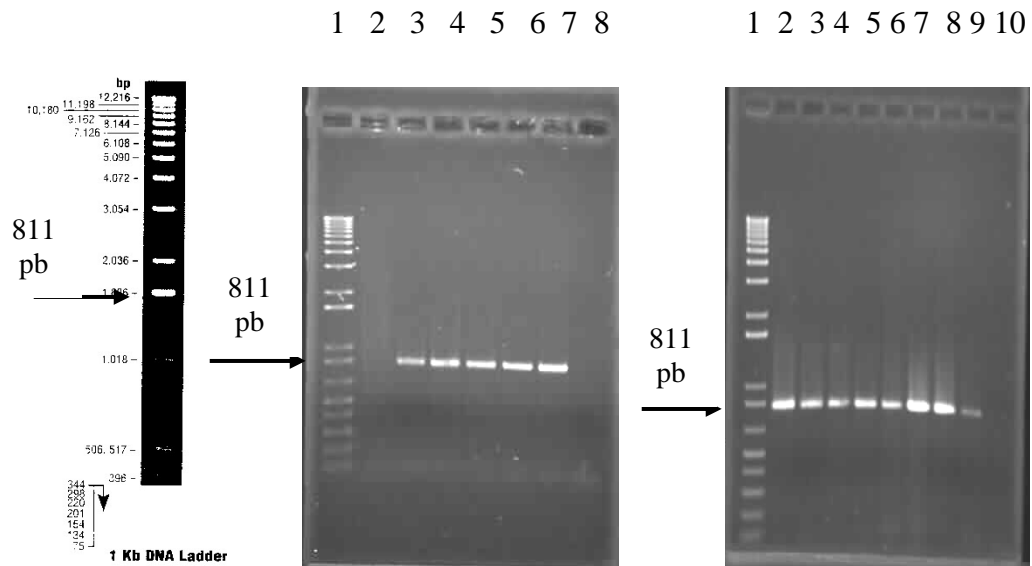


Figura 14 a

Figura 14 b

Figura 14. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. En las figuras 14 a y 14 b se observa la amplificación de bandas del gen *babA2* con un peso molecular de 811 pb. (Figura 14a. Pozo: 1 MP de 1kb, 2 Ctról -, 3 Ctról +, 4 -7 mtras y 8 Bco. Figura 14 b. Pozo: 1 MP de 1Kb, 2 Ctról +, 3 -10 mtras.)

Resultados de la presencia de los genes *cagA*, *cagPAI* y *babA2*, mediante PCR específico en pacientes infectados con *H. pylori*.

De las 141 cepas de pacientes con gastritis superficial, 117 fueron *cagA* positivas, por lo que el resto (24 cepas) resultaron ser *cagA* negativas. En cuanto a los pacientes que presentaban metaplasia intestinal, gastritis atrófica y displasia gástrica el 100 % de las cepas estudiadas se confirmaron *cagA* positivas.

Por otro lado el número de cepas *cagA* positivas en individuos con cáncer gástrico resulto ser mayor, es decir, 42 cepas de 55 son *cagA* positivas, por el contrario solo 13 de 55 son *cagA* negativas.

En individuos con úlcera duodenal el número de cepas *cagA* positivas es de 71 de 76 cepas estudiadas. Las restantes fueron *cagA* negativas (5 cepas). (Ver figuras 11 y 15)

En las cepas analizadas de los pacientes con GS, CG, y UD se observa que existe diversidad con respecto a la presencia del gen *cagA*, debido a que en un mismo paciente existen cepas *cagA* positivas y *cagA* negativas. (Ver tablas 9 y 10)

Tabla 9. Frecuencia del gen *cagA* + en Pacientes con Enfermedad Gastroduodenal

Enfermedad	n=	No. Cepas <i>cagA</i> (+)	Frecuencia (%)
Gastritis Superficial	141	117	82.97
Gastritis Atrófica	25	25	100
Metaplasia Intestinal	12	12	100
Displasia Gástrica	4	4	100
Cáncer Gástrico	55	42	76.36
Úlcera Duodenal	76	71	93.42

Tabla 10. Frecuencia del gen *cagA* - en Pacientes con Enfermedad Gastroduodenal

Enfermedad	n=	No. Cepas <i>cagA</i> (-)	Frecuencia (%)
Gastritis Superficial	141	24	17.02
Gastritis Atrófica	25	0	0
Metaplasia Intestinal	12	0	0
Displasia Gástrica	4	0	0
Cáncer Gástrico	55	13	23.63
Úlcera Duodenal	76	5	6.57

Se realizó un PCR específico para confirmar la ausencia de *cagPAI*, esto se realizó tomando en cuenta las cepas que resultaron *cagA* negativas. Los resultados obtenidos fueron (Ver figuras 11 y 15): de los individuos que presentaban un cuadro de gastritis superficial, la mitad de las cepas (12) presentaron ausencia de *cagPAI* y por lo tanto la otra mitad (12 cepas) demostró tener *cagPAI*.

Para los pacientes con cáncer gástrico 12 cepas del total que resultaron ser *cagA* negativas presentaron *cagPAI* y solo en una se encontró ausente *cagPAI*.

Y para los de úlcera duodenal fue mayor el número de cepas con ausencia de *cagPAI* (3 cepas) que cepas con presencia de *cagPAI* (2 cepas). (Ver tabla 11 y 12)

Tabla 11. Frecuencia de ausencia de *cagPAI* en Pacientes con Enfermedad Gastroduodenal

Enfermedad	n=	No. Cepas <i>cagPAI</i> (+)	Frecuencia (%)
Gastritis Superficial	141	12	8.51
Gastritis Atrófica	25	0	0
Metaplasia Intestinal	12	0	0
Displasia Gástrica	4	0	0
Cáncer Gástrico	55	1	1.81
Úlcera Duodenal	76	3	3.94

Tabla 12. Frecuencia de la presencia de *cagPAI* en Pacientes con Enfermedad Gastroduodenal

Enfermedad	n=	No. cepas <i>cagPAI</i> (-)	Frecuencia (%)
Gastritis Superficial	141	12	8.51
Gastritis Atrófica	25	0	0
Metaplasia Intestinal	12	0	0
Displasia Gástrica	4	0	0
Cáncer Gástrico	55	12	21.81
Ulcera Duodenal	76	2	2.63

Posteriormente se determinó la presencia de *babA2*, que es otro gen de *H. pylori* relacionado a virulencia. (Ver figuras 11 y 15)

Partiendo de las 141 cepas de pacientes con GS, sólo 40 de éste grupo fueron *babA2* positivas. En el caso de GA y MI el número de cepas que presento amplificación para el gen *babA2* fue mayor (8 de 25 y 4 de 12 respectivamente), comparado con las cepas de GS y DG. En pacientes con DG el número de cepas que presentaban el gen *babA2* fue nulo.

Por último los resultados en cuanto a la presencia de *babA2* en pacientes con cáncer gástrico es de 27 cepas *babA2* positivas de 55 cepas estudiadas; y para pacientes con UD por arriba de la mitad del total se encontró el alelo, es decir, 41 cepas de 76 amplificaron para el alelo *babA2*. (Ver tabla 13 y 14)

Tabla 13. Frecuencia del gen *babA2* + en Pacientes con Enfermedad Gastroduodenal

Enfermedad	n=	No. Cepas <i>babA2</i> (+)	Frecuencia (%)
Gastritis Superficial	141	40	28.36
Gastritis Atrófica	25	8	32
Metaplasia Intestinal	12	4	33.33
Displasia Gástrica	4	0	0
Cáncer Gástrico	55	27	49.09
Ulcera Duodenal	76	41	53.94

Tabla 14. Frecuencia del gen *babA2* – en Pacientes con Enfermedad Gastroduodenal

Enfermedad	n=	No. Cepas <i>babA2</i> (-)	Frecuencia (%)
Gastritis Superficial	141	101	71.63
Gastritis Atrófica	25	17	68
Metaplasia Intestinal	12	8	66.66
Displasia Gástrica	4	4	100
Cáncer Gástrico	55	28	50.9
Úlcera Duodenal	76	35	46.05

Cabe mencionar que la determinación del gen *UreC* se realizó con la finalidad de confirmar si las cepas trabajadas pertenecían a *H. pylori*.

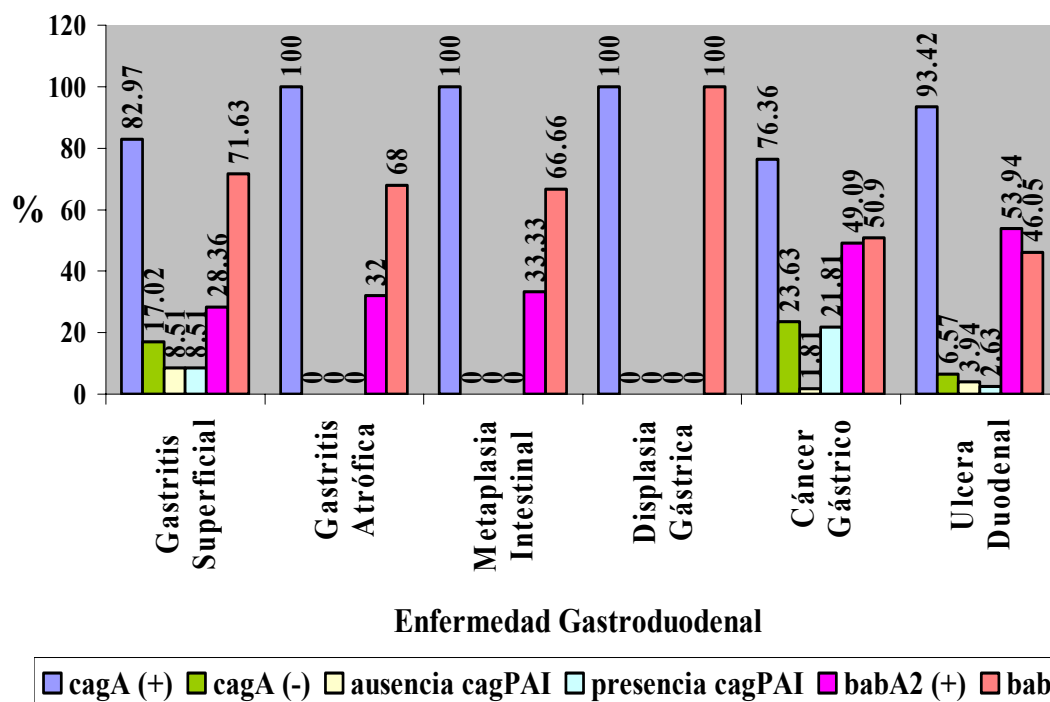


Figura 15. Frecuencia de *cagA*, *cagPAI* y *babA2* en cepas de pacientes con Enfermedad Gastroduodenal.

Debido a que se ha encontrado una estrecha asociación entre los genes *cagA* y *babA2* con patologías gastrointestinales, las siguientes tablas muestran la frecuencia en la que se encuentran estos dos genes en pacientes mexicanos. (Ver figura 16)

La presencia de *cagA* y *babA2* positivos en las 313 cepas estudiadas fue mayor en pacientes con cáncer gástrico y úlcera duodenal (45.45% y 47.36% respectivamente). En cuanto a las cepas provenientes de pacientes con GA y MI la frecuencia de dichos genes fue muy semejante. Por lo contrario de las 4 cepas de DG ninguna presentaba los dos genes. (Ver tabla 15)

TABLA 15. Frecuencia de cepas *cagA* (+) / *babA2* (+) de *H. pylori* en pacientes con enfermedad gastroduodenal

Enfermedad	n=	No. Cepas	Frecuencia %
Gastritis Superficial	141	37	26.24
Gastritis Atrófica	25	8	32
Metaplasia Intestinal	12	4	33.33
Displasia Gástrica	4	0	0
Cáncer Gástrico	55	25	45.45 *
Úlcera Duodenal	76	36	47.36 *

* Valor significativo de acuerdo a la prueba de chi-cuadrada ($p < 0.05$)

Sin embargo se encontró que existe una mayor frecuencia de cepas *cagA* positivas / *babA2* negativas, es decir, de las cepas estudiadas de GS, GA, MI y DG más de la mitad presentaban esta característica. Con respecto a las cepas con CG y UD aunque se encuentran en un porcentaje más bajo la frecuencia es bastante considerable. (Ver tabla 16)

TABLA 16. Frecuencia de cepas *cagA* (+) / *babA2* (-) de *H. pylori* en pacientes con enfermedad gastroduodenal

Enfermedad	n=	No. Cepas	Frecuencia %
Gastritis Superficial	141	80	56.73
Gastritis Atrófica	25	17	68 *
Metaplasia Intestinal	12	8	66.66
Displasia Gástrica	4	4	100 *
Cáncer Gástrico	55	17	30.9 *
Úlcera Duodenal	76	35	46.05 *

* Valor significativo de acuerdo a la prueba de chi-cuadrada ($p < 0.05$)

En cuanto a la frecuencia de cepas *cagA* negativa / *babA2* positiva el porcentaje es poco para las patologías de GS, CG y UD y nulo para GA, MI y DG. (Ver tabla 17)

TABLA 17. Frecuencia de cepas *cagA* (-) / *babA2* (+) de *H. pylori* en pacientes con enfermedad gastroduodenal

Enfermedad	n=	No. Cepas	Frecuencia %
Gastritis Superficial	141	3	2.12
Gastritis Atrófica	25	0	0
Metaplasia Intestinal	12	0	0
Displasia Gástrica	4	0	0
Cáncer Gástrico	55	2	3.63
Úlcera Duodenal	76	5	6.57 *

* Valor significativo de acuerdo a la prueba de chi-cuadrada ($p < 0.05$)

De las 313 cepas estudiadas solo 32 de ellas fueron negativas para *cagA* y *babA2*. (Ver tabla 18)

TABLA 18. Frecuencia de cepas *cagA* (-) / *babA2* (-) de *H. pylori* en pacientes con enfermedad gastroduodenal

Enfermedad	n=	No. Cepas	Frecuencia %
Gastritis Superficial	141	21	14.89
Gastritis Atrófica	25	0	0 *
Metaplasia Intestinal	12	0	0 *
Displasia Gástrica	4	0	0
Cáncer Gástrico	55	11	20
Úlcera Duodenal	76	0	0 *

* Valor significativo de acuerdo a la prueba de chi-cuadrada ($p < 0.05$)

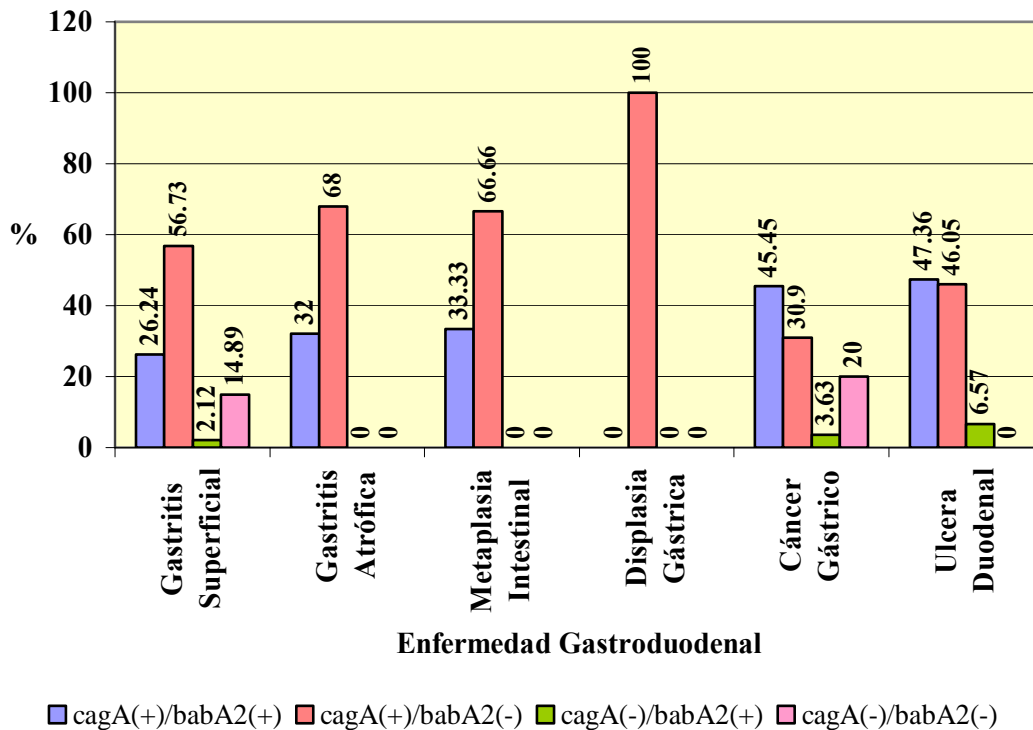


Figura 16. Asociación de *cagA* y *babA2* en pacientes con enfermedad Gastroduodenal.

7. DISCUSION

Se determinó la presencia de los genes *cagA* y *babA2* los cuales son considerados factores de virulencia de *H. pylori*, demostrando estar relacionados con manifestaciones clínicas y pronósticos más severos.³³

Dada la importante asociación de la infección por *H. pylori* con gastritis, cáncer gástrico y úlcera péptica sería deseable eliminar este organismo de todas las personas infectadas. Sin embargo debido a que pocos individuos desarrollan alguna sintomatología se hace necesario conocer los posibles marcadores de cepas que permitan definir la asociación con patologías severas.³⁴

cagA fue el primer gen en ser identificado y considerado como marcador de la isla de patogenicidad, cuya presencia esta asociada con un resultado clínico más severo.

El genotipo *cagA* positivo ha sido identificado en el 60 a 90 % de las cepas que colonizan personas de diferentes regiones del mundo, la frecuencia mas alta se ha visto en cepas de países asiáticos como Japón y algunas regiones de China, también fue encontrado en el norte de la población de Taiwán, detectado en una proporción más alta para pacientes con enfermedad de úlcera duodenal, gastritis atrófica y adenocarcinoma gástrico.^{27, 33, 39}

En este estudio observamos que de las muestras de pacientes mexicanos la proporción de cepas *cagA* positivas es más alta en individuos con gastritis atrófica, metaplasia intestinal, displasia gástrica (100% para las tres patologías) y ulcera duodenal (93.42%), en comparación con pacientes con gastritis superficial (82.87%).

A pesar de la proporción alta de cáncer gástrico asociado a la presencia de cepas *cagA* + en algunas poblaciones, la proporción de cáncer gástrico en pacientes mexicanos infectados con cepas *cagA* positivas es relativamente bajo (76.36%) comparado con otros estudios de cáncer gástrico como el de J. Parsonnet, (1997), quien reporto 94% de cepas *cagA* positivas.⁵⁷

La serología de *H. pylori* ha permitido caracterizar los factores de riesgo, la prevalencia, la incidencia y pérdida de la infección en pacientes donde la endoscopia y pruebas de aliento no han estado disponibles. La detección serológica de la proteína CagA de *H. pylori* aparentemente se correlaciona con aumento en el riesgo de padecer enfermedad úlcera péptica y cáncer gástrico. Ya que la proteína CagA es altamente inmunogénica y su presencia es detectada por anticuerpos.

En contraste siendo que la mayoría de individuos infectados con *H. pylori* en países asiáticos posee cepas *cagA* positivas, la asociación de *cagA* y enfermedades no han sido observadas en Asia,³⁷ esto puede deberse a que las pruebas serológicas de *H. pylori* desarrolladas en países occidentales son menos exactas cuando se usan en Asia y en niños de otros países o bien porque en Asia casi el 100% de las cepas de *H. pylori* que infectan a la población son *cagA* +.³⁵

En todas las poblaciones mundiales estudiadas existe evidencia de que las cepas *cagA* + tienen alta prevalencia, sin embargo, por ejemplo mientras que en varios países occidentales su presencia se asocia con un mayor riesgo de desarrollar enfermedad ulcero péptica, adenocarcinoma gástrico o sus lesiones precursoras, en poblaciones con altas tasas de infección por *H. pylori* es difícil encontrar tales asociaciones.⁴⁰

De las biopsias de pacientes mexicanos se encontró que el gen *cagA* positivo esta estrechamente asociado a patologías severas como gastritis atrófica, metaplasia

intestinal, displasia gástrica y ulcera duodenal, sin embargo en la mayor parte de estudios en Colombia, no se considera la gastritis atrófica y la metaplasia intestinal como patologías que representan estadios más avanzados de la enfermedad, sino que son incluidas dentro del grupo denominado gastritis.⁴⁰

Es interesante saber que en los países desarrollados el predominio de *H. pylori* es mucho menor, debido a la intensidad de exposición antibiótica durante la niñez que ha sido creciente en el mercado, incluso con el éxito mínimo de monoterapias antimicrobial contra los efectos de *H. pylori* o también por mejoras en las condiciones de vida que disminuyen la transmisión de la bacteria.³⁶ Sin embargo en múltiples estudios se ha demostrado que en países desarrollados la tipificación de *cagA* puede ser útil para definir cepas asociadas con ulcera péptica y cáncer gástrico, pero al parecer carece de validez en países en vías de desarrollo, con altas tasas de infección o en los cuales el componente medioambiental y factores del hospedero son condiciones importantes en la aparición de la enfermedad,⁴⁰ como es el caso de México.

Entre las poblaciones de países en vías de desarrollo en que casi todos los adultos son *H. pylori* positivos, la mayoría también son *cagA* positivos. Por el contrario, en países desarrollados en que la seroprevalencia de *H. pylori* es más baja las proporciones de cepas *cagA* negativas están más altas, por la evidencia aumentada que las cepas *cagA* + son más susceptibles que las cepas *cagA* - al tratamiento de erradicación.³⁶ Estos resultados coinciden con nuestro estudio, en donde el número de cepas *cagA* + de *H. pylori* resultó ser superior que el número de cepas *cagA* -, es decir, la frecuencia de cepas *cagA* - en pacientes con gastritis atrófica, metaplasia intestinal y displasia gástrica es nula y para pacientes con gastritis superficial es de 17%, con cáncer gástrico 23.63% y con ulcera duodenal 6.57%.

Cabe mencionar, que aunque normalmente se colonizan los individuos con cepas *cagA* + o *cagA* -, se identificaron pacientes mexicanos con infección mixta, es decir, con colonias *cagA* + y *cagA* -. Algunos autores mencionan que el paciente esta colonizado por la misma cepa pero en diferentes etapas de evolución además de ser característico particularmente de países en vías de desarrollo.^{36, 24}

Por lo tanto, la presencia de *cagPAI* solo se determino en cepas que fueron *cagA* negativas; en este trabajo se encontró que el 50% de las cepas *cagA* negativas de gastritis superficial tenían la isla de patogenicidad y el otro 50% se encuentra ausente *cagPAI*, para la cepas de cáncer gástrico 21.81% presentan *cagPAI* y en solo 1.81% se encuentra ausente y para ulcera duodenal 2.63% presentan *cagPAI* y 3.94% no presentan la isla, estos resultados concuerdan con lo encontrado en Costa Rica en donde se muestra que en este país la mayoría de las cepas de *H. pylori* presentan la isla de patogenicidad (74.4%).

Hay informes polémicos acerca de la asociación de la presencia de *cagPAI* de *H. pylori* y las enfermedades gástricas más severas como la enfermedad de la úlcera péptica y el carcinoma gástrico.^{38, 44}

Sin embargo no se puede asegurar si la ausencia de *cagPAI* se debe a una eliminación parcial como se ha reportado en otras poblaciones,²⁶ debido a que sólo se utilizó un juego de iniciadores y no todos los juegos de iniciadores son capaces de reconocer las secuencias de los genes.

Esto se podría confirmar usando otros iniciadores específicos para cada uno de los 31 genes que integran la isla de patogenicidad y determinar la ausencia de alguno o algunos genes de *cagPAI* debida a reacomodos genéticos característicos en cada cepa.²⁵

Varios investigadores proponen que aún en cepas *cagA* +, la organización genética y la diversidad dentro de la isla de patogenicidad pueden tener un efecto modificador del potencial patogénico de la cepa infectante, de manera que las cepas con el *cagPAI* completo (sin deleciones ni modificaciones) son realmente virulentas.⁴⁰ A pesar del hecho que *cagPAI* esta presente en la mayoría de las cepas, puede ser que la composición de los genes de *cagPAI* o la regulación de su expresión varía e influyen en la patogenicidad asociada.³⁸

Interesantemente, el gen *cagA* puede estar ausente en una cepa, considerando que las otras regiones de *cagPAI* están presentes, indicando que el uso de este gen como el solo marcador para el descubrimiento de *cagPAI* a veces puede llevar a resultados erróneos.

La infección con cepas *cagA* positivas que contienen *cagPAI* participa en una importante respuesta inflamatoria con una densidad más alta de células polimorfonucleares en la mucosa gástrica que ha sido un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad.^{38,39}

El otro gen estudiado en este trabajo de tesis es el gen *babA2*, los estudios en países occidentales han demostrado asociación entre la presencia del gen *babA2* y úlcera duodenal y cáncer gástrico. Sin embargo en países occidentales la mayoría de las cepas de *H. pylori* son *babA2* positivas, donde han sido aislados de pacientes enfermos o asintomáticos. La prevalencia entre *babA2* positiva en cepas de *H. pylori* también parecen variar alrededor del mundo, siendo más bajo en pacientes mexicanos que en pacientes occidentales, de acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis.³⁷

En un estudio realizado en el norte de China, 80% de los pacientes estaban infectados con las cepas *babA2*.²⁷

En este trabajo cuando se evaluó a pacientes mexicanos, la frecuencia de cepas de *H. pylori babA2* positivas fue mayor en pacientes con úlcera duodenal (53.94%) y cáncer gástrico (49.09%) comparándola con pacientes mexicanos con gastritis superficial (28.36%).

La presencia de *cagA* en combinación con cepas *babA2* tiene una mayor frecuencia en pacientes mexicanos con úlcera duodenal (P=0.002), cáncer gástrico (P=0.015), metaplasia intestinal y gastritis atrófica comparándose con pacientes que presentan solamente gastritis superficial, estos resultados coinciden con aislados en el norte de China en donde cepas *cagA* + / *babA2* + son asociadas con la presencia de atrofia gástrica, metaplasia intestinal y al desarrollo de cáncer gástrico debido a una marcada proliferación del epitelio gástrico y niveles más altos de IL-8 subrayando la importancia de *babA2* para la colonización, comparadas con pacientes infectados con cepas tipo 1 *babA2* negativa.^{27, 43}

Además el fenotipo *cagA* + / *babA2* + fue detectado con mayor frecuencia en aislados de pacientes con úlceras y adenocarcinoma en Taiwán.³³

En este trabajo se observó una mayor asociación para las cepas *cagA* + / *babA2* – con enfermedades gastroduodenales, es decir, para gastritis atrófica en un 78% (P=0.404), para metaplasia intestinal 66.66%, displasia gástrica 100% (P=0.138), cáncer gástrico 30.9% (P=0.001) y para úlcera duodenal 46.05% (P=0.173), esto es contrario a lo esperado ya que en estas enfermedades es más frecuente la asociación *cagA* + / *babA2* positiva.

La edad es uno de los factores que pueden estar asociados con la presencia de gastritis atrófica y metaplasia intestinal, aparentemente la mayoría de los cambios gástricos relacionados con la infección crónica de *H. pylori* se han desarrollado a los 50 años de edad.²⁷

Para los aislados *cagA*- / *babA2*- podría parecer que no hay relación alguna con enfermedades gastroduodenales, sin embargo se observa una frecuencia de un 20% en pacientes con cáncer gástrico y un 14.89% en pacientes con gastritis superficial, lo que nos hace pensar en la posibilidad de que la presencia de *cagA* no es un buen marcador de la isla de patogenicidad, *cagPAI* puede llegar a sufrir reacomodos genéticos y como consecuencia eliminaciones parciales de ciertas regiones de *cagPAI* lo que significa que algunos genes no están presentes aunque la isla si lo este.^{14, 26} Además la presencia de *cagPAI* completa es un factor predisponente para que la bacteria cause daño potencial e inflamación a la mucosa gástrica.^{25, 41} Otro aspecto importante que hay que considerar es que el desarrollo de la enfermedad toma décadas, desde que un individuo se infecta siendo niño hasta que presenta cambios a nivel del epitelio gástrico, por lo tanto no podemos asegurar que la cepa que nosotros aislamos en los adultos enfermos es la misma que lo colonizó siendo niño.

En general, varios autores han sugerido que la existencia de cepas con diferentes genotipos en un mismo paciente, puede representar una ventaja a la bacteria para sobrevivir en los diferentes nichos ecológicos de la mucosa gástrica o que puede llevar a que se presente cierta competencia entre las cepas por mantenerse en el ambiente gástrico. Este hecho dificulta el análisis de las asociaciones entre los genotipos bacterianos y patología en esta población, dado que sí varios genotipos se encuentran en un mismo paciente es muy difícil determinar cuál de ellos es el responsable de la patología observada.⁴⁰

Es probable que la virulencia sea el resultado de una combinación de varios factores, como la presencia de la isla de patogenicidad junto con el gen asociado a citotoxina y la expresión del antígeno de tipo sanguíneo ligado a adhesina (*BabA*), en lugar de la presencia de un único factor de virulencia.³⁸

La variación en los resultados clínicos se ha atribuido a las diferencias en los factores medioambientales, cepas bacterianas, genética del paciente, etc.³⁹

El conocimiento de las características de *H. pylori* ya está permitiendo su control mediante antibióticos y las nuevas profundizaciones moleculares que comienzan a surgir permitirá su futura erradicación.⁴²

8. CONCLUSIONES

- La presencia de los genes *cagA* y *babA2* en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes mexicanos se encuentran asociadas a úlcera duodenal y cáncer gástrico.
- La presencia de *cagA* es más frecuente en pacientes con Gastritis Atrófica, Displasia Gástrica, Metaplasia Intestinal y Úlcera Duodenal que en pacientes con gastritis superficial
- La presencia de *babA2* se asocia con mayor frecuencia en pacientes con Úlcera Duodenal y Cáncer Gástrico en comparación con pacientes que presentan gastritis superficial

9. GLOSARIO

1. **Alelos.-** Forma alternativa de un gen.
2. **Anticuerpo.-** Proteínas producidas por células B tras estimulación por un antígeno, actúan específicamente contra él en respuesta inmune. Equivalente a inmunoglobulina.
3. **Antígeno.-** Sustancia extraña que introducida en un organismo, puede provocar la formación de anticuerpos.
4. **Atrofia.-** Disminución en el tamaño o número, de uno o varios tejidos de los que forman un órgano, con la consiguiente minoración del volumen, peso y actividad funcional, a causa de escasez o retardo en el proceso nutritivo.
5. **Biopsia.-** Examen que se hace de un trozo de tejido cortado de un ser vivo, generalmente para completar un diagnóstico.
6. **Cosmopolita.-** Especies animales y vegetales aclimatadas a todos los tipos de clima y que tienen una distribución muy amplia.
7. **Endémica.-** Enfermedad que se repite con frecuencia en algún país o región.
8. **Endoscopia.-** Exploración visual de cavidades o conductos internos del organismo.

9. **Epidemiología.-** Estudio de los factores que determinan la ocurrencia de una enfermedad en la población humana.
10. **Especificidad.-** Cualidad de una prueba diagnóstica que detecta solamente una determinada enfermedad o alteración.
11. **Frecuencia.-** Número de veces que ocurre un suceso en la unidad de tiempo
12. **Gen.-** Segmento de DNA cromosómico implicado en la producción de una cadena polipéptidica.
13. **Genoma.-** Conjunto de los cromosomas (que guardan las claves reproductivas) de una célula.
14. **Genotipo.-** Constitución genética de un individuo. Par de alelos que se encuentran en un determinado locus.
15. **Patogenicidad.-** Capacidad de un agente infeccioso de producir enfermedad en un hospedero susceptible.
16. **Plásmido.-** DNA celular extracromosómico autónomo y autoreplicativo.
17. **Prevalencia.-** Número total de casos de una enfermedad que existe en un momento dado o período determinado en relación con el número de personas del lugar.

18. **Reservorio.-** Cualquier ser vivo en los que el agente infeccioso vive y se multiplica, reproduciéndose de manera que pueda ser transmitido a un hospedero susceptible.
19. **Toxina.-** Sustancia elaborada por los seres vivos y que hace el efecto de veneno.
20. **Virulencia.-** Capacidad de la bacteria de producir casos leves, graves o fatales.
21. **Zoonosis.-** Enfermedad transmitida de un animal a un ser humano.

10. ANEXO ⁵⁸

- **Buffer TAE 50X:**

Para preparar 1 litro de TAE 50x: 242g Tris base, 57.1ml de ácido acético glacial, 100ml 0.5M EDTA pH 8.0 (18.61g EDTA .2H₂O, 80ml de H₂O), 842.9ml H₂O. Se almaceno a temperatura ambiente.

- **Marcador de 1Kb:**

Mezclar en un tubo eppendorf 10µl de marcador comercial de 1Kb plus DNA ladder, 10µl loading buffer 6X y 80µl H₂O destilada. Se almaceno a -20° C.

- **Loading buffer 6X :**

Para un volumen total de 10ml, se pesaron 3g. de Urea (5M), 0.05g de SDS (0.5%), 0.025g de azul de bromofenol, se adiciono 1ml de glicerol (10%), 0.2ml de TAE 50x y 8.8ml de agua destilada. Se prepararon alícuotas de 1ml para uso y se almaceno a -20° C.

- **Preparación de dNTP's para PCR:**

Mezclar en 360mcl de agua: 10mcl dATP 100mM, 10mcl dGTP 100mM, 10mcl dTTP 100mM y 10mcl dCTP 100mM. Se almaceno a -20° C.

- **Reactivo de ureasa:**

Mezclar 0.03g de urea, 50ml de PBS 1x Dulbecos + 2 gotas de rojo de fenol (pH 7.3-7.4)

- Solución de Bromuro de Etidio:

Mezclar en un frasco 100µl de Bromuro de Etidio a 10 mg/ml en 50ml de agua estéril.

Nota: El recipiente debe de ser exclusivo para la preparación de este reactivo además de usar guantes.

- Preparación de agar sangre de carnero al 5% con antibióticos:

Disolver en 10ml de agua inyectable: Acido nalidíxico 0.1mg, Trimetoprim 0.05mg, Vancomicina 0.03mg y Anfotericina B 0.02mg. De esta mezcla se adicionan 1.8ml a 1 litro de agar sangre de carnero al 5%.

- Buffer TE (Tris 10mM pH 8, EDTA 1mM pH 8):

Mezclar 1 ml de solución stock de Tris 1M pH 8 más 0.2 ml de solución stock de EDTA 1M pH 8 y 98.8 ml de agua desionizada.

- Solución stock de EDTA (EDTA 0.5 M pH 8):

Pesar 186.1 g de EDTA y 20 g aproximadamente de NaOH. Adicionar el EDTA a 800 ml de agua desionizada, agitar vigorosamente con un agitador magnético. Ajustar el pH agregando el NaOH.

- Solución stock de Tris (Tris 1 M, pH 8):

Para un volumen total de 1000 ml, pesar 121.1 g de Tris base y adicionar el agua desionizada necesaria. Ajustar el pH con HCl concentrado.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Yoshiyama H, Nakazawa T. **Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus.** Microb Inféct 2000; 2: 55-60.
- 2.- Warren J. R. And Marshall B J. 1983. **Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis.** Lancet; 1: 1273-1275.
- 3.- Marshall B J and C S Goodwin. 1987. **Revised nomenclature of *Campylobacter pylori*.** Int J Sist Bacteriol; 37: 68-71
- 4.- Dewhirst F E, Fox J G Sind S L W On. 2000. **Proposal of minimal standards for describing now species of the genus *Helicobacter*.** Int J Sist Evol Microbiol; 50: 2231-2237.
- 5.- Dr. Javier Torres, P_HD, M en C Margarita Camorlinga Ponce, Biol. Ma. Constanza Camargo Bohorquez, et. al. 2002. **PAC Infecto-2. Programa de Actualización Continua en Infectología.** Unidad 9: 488-522.
- 6.- Vasile Soltesz, Barbro Z., et al. 1992. **Of *Helicobacter pylori* under various transport conditions.** Journal of Clinical Microbiology; 30(6) : 1453-1456.
- 7.- Narikawa Shinichi, Shinichi Kawai, et al. 1997. **Comparison of the nucleic acids of helical and coccoid forms of *Helicobacter pylori*** Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology; 4(3): 285-290.
- 8.- Dunn Bruce E., Hartley Conen, et al. 1997. *Helicobacter pylori*. Clinical Microbiology Reviews; 10(4): 720-741.
- 9.- Goodwin CS, Worsley BW. 1993. **The *Helicobacter* genus: the history of *H. pylori* and taxonomy of current species.** *Helicobacter pylori* Biology and Clinical Practice. CRG Press. Ppl.
- 10.- Fox J G. 1995. **Non-human reservoirs of *Helicobacter pylori*.** Aliment. Pharmacol. Ther; 9 (suppl 2): 93-103.

- 11.- Timothy L. Cover, M. D. And Martin J. Blaser, M. D. 1996. ***Helicobacter pylori* Infection, a Paradigm for chronic mucosal inflammation: Pathogenesis and Implications for Eradication and Prevention** *Advances in Internal Medicine*; 41: 85-117
- 12.- Miguel González Carvajal Pascual. 2002. **El problema de la Erradicación del *Helicobacter pylori*, la Infección bacteriana más difundida en el mundo.** *Revista Cubana de Medicina General Integral*; 18 (3).
- 13.- Taylor Diane e., Michelle Eaton, et al. 1992. **Construction of a *Helicobacter pylori* genome map and demonstration of diversity at the genome level.** *Journal of Bacteriology.*; 174(21): 6800-6806.
- 14.- Covacci Antonello, John L. Telford, et al. 1999. ***Helicobacter pylori*, virulence, and genetic geography.** *Science*; 284: 1-6.
- 15.- Worku M L et al. 2000. **The relationship between *Helicobacter pylori* motility, morphology and phase of growth : implications for gastric colonization and pathology.** *Microbiology*; 145: 2803-2811.
- 16.- Jones D M, Curry A and A. J. Fox. 2000. **An ultr estructural study of the gastric *Campylobacter-like* organism. *Campylobacter pyloridis*** *J Gen Microbiol*; 131: 2335-2341.
- 17.- Shimoyama T, Crabtree J. 1998. **Bacterial factors and immune patogénesis in *Helicobacter pylori* infection.** *Gut*; 43:S2-S5.
- 18.- Van Doorn L, Figueiredo C, Megraud F, Carneiro F, Quint W. 1999. **Geogrphic distribution of vacA allelic types of *Helicobacter pylori*.** *Gastroenterology*; 116:823-830.
- 19.- Atherton J. C., P. Cao, R. M. Peek, M. K. R. Tummuru, M. J. Blaser, and T. L. Cover. 1995. **Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration.** *J. Biol. Chem.*; 270: 17771-17777.
- 20.- Atherton J. C, R M J Peek, Tham K T, Cover T L, and Blaser M J. 1997. **Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*.** *Gastroenterology*; 112: 92-99.

- 21.- Ching, C.K., Wong, B.C.Y., Kwok, E., Ong, L., Covacci, A., y Lam, S.K. 1996. **Prevalence of *CagA*-bearing *Helicobacter pylori* strains detected by the anti-*CagA* assay in patients with peptic ulcer disease and in controls.** Am. J. Gastroenterol; 91:949.
- 22.- Cover TL, CP Doodley y MJ Blaser. 1990. **Characterization of human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity.** Infect. Immun. 58: 603-610.
- 23.- Cover TL, Y Glupczynski, A Lange, A Burette, M Tummuru, G Perez y M Blaser. 1995. **Serologic detection of infection with *cagA* *Helicobacter pylori* strains.** J. Clin. Microbiol; 1496-1500.
- 24.- Akopyants S. Natalia, Sandra W. Clifton, et al. 1998. **Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*.** Mol. Microbiology; 28(1): 37-53.
- 25.- Censini Stefano, Christina Lage, et al. 1996. ***cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors.** Proc. Natl. Acad. Sci.; 93: 14648-14653.
- 26.- Maeda S., H. yoshida, et al. 1999. **Structure of *cag* pathogenicity island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates;** 44: 336-350.
- 27.- J Yu, W K Leeung, M Y Y Go, M C W Chan, K F To, E K W Ng, F K L Chan, T K W Ling, S C S Chung, J J Y Sung. 2002. **Relationship between *Helicobacter pylori* babA2 status with gastric epithelial cell turnover and premalignant gastric lesions.** HELICOBACTER PYLORI; 51: 480-484.
- 28.- Mégraud F. 1995. **Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route.** Aliment. Pharmacol; 9 (suppl 2): 85-91.
- 29.- Alcántara Vázquez Avissai, José Chanona Vilchis, et al. 1997. **Cáncer gástrico e infección por *Helicobacter pylori*.** Revista Médica del Hospital General; 60(2): 60-65.
- 30.- Blazer M. J. 1996. **Origen bacteriano de la úlcera de estómago.** Investigación y Ciencia; 54-59.
- 31.- Haruhiko Yoshida, et al. 1998. **Use of gastric juice-based PCR assays to detect *Helicobacter pylori* infection in culture-negative patients.** The J. Of Infectious Diseases; 81:527-535.

- 32.- Makristathis Athanasios, Eva Pasching, et al. 1998. **Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by PCR and Antigen Enzyme Immunoassay.** Journal of Clinical Microbiology; 36 (9): 2772-2774.
- 33.- Chih-Ho Lai, Chu-Hsien Kuo, Ya-Chi Chen, Fang-Yu Chao, Sek-Kwong Poon, et. al. 2002. **High Prevalence of cagA- and babA2 – Positive *Helicobacter pylori* Clinical isolates in Taiwan.** Journal of Clinical Microbiology; Oct,40 (10): 3860-3862.
- 34.- Leen-Jan van Doorn, Yvonne Henskens, Nathalie Nouhan, Anita Verschuuren, Rolf Vreede, et. al. 2000. **The Efficacy of Laboratory Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infections in Gastric Biopsy Specimens Is Related to Bacterial Density and vacA, cagA, and iceA Genotypes.** Journal of Clinical Microbiology; Jan, 38(1): 13-17.
- 35.- James E. Everhart, Deanna Kruszon-Moran, and Guillermo Perez-Perez. 2002. **Reliability of *Helicobacter pylori* and CagA Serological Assays.** Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology; Mar, 9(2): 412-416.
- 36.- G I Perez-Perez, A Salomaa, T U Kosunen, B Daverman, H Rautelin, A Aromaa, P Knekt, M J Blaser. 2002. **Evidence that cagA+ *Helicobacter pylori* strains are disappearing more rapidly than cagA- strains.** HELICOBACTER PYLOR; 50: 295-298.
- 37.- Adriana Goncalves Oliveira, Adriana Santos, Juliana Becattini Guerra, Gifone Aguiar Rocha, et. al. 2003. **babA2- and cagA- Positive *Helicobacter pylori* Strains Are Associated with Duodenal Ulcer and Gastric Carcinoma in Brazil.** Journal of Clinical Microbiology; Aug, 41(8): 3964-3966.
- 38.- Alessandra Occhialini, Armelle Marais, Maria Urdaci, Rafaela Sierra, Nubia Muñoz, Antonello Covacci, and Francis Mégraud. 2001. **Composition and Gene Expression of the cag Pathogenicity Island in *Helicobacter pylori* Strains Isolates from Gastric Carcinoma and Gastritis Patients in Costa Rica.** Infection and Immunity; Mar, 69(3): 1902-1908.
- 39.- Santos A, Queiroz DM, Menard A, Marais A, Rocha GA, Oliveira CA, Nogueira AM, Uzeda M, Megraud F. 2003. **New Pathogenicity Marker Found in the Plasticity Region of the *Helicobacter pylori* Genome.** Journal of Clinical Microbiology; April, 41(4): 1651-1655.

- 40.- Diana M Cittelly P, Mónica G Huertas, Julián D Martínez, Ricardo Oliveros, Héctor Posso, María Mercedes Bravo, Oscar Orozco D. 2002. **Los genotipos de *Helicobacter pylori* en gastritis no atrófica difieren de los encontrados en úlcera péptica, lesiones premalignas y cáncer gástrico en Colombia.** Revista Médica de Chile Santiago feb.; (2): 130-136.
- 41.- Kidd M, Lastovica AJ, Atherton JC, Louw JA. 2001 **Conservation of the *cag* pathogenicity island is associated with *vacA* alleles and gastroduodenal disease in South African *Helicobacter pylori* isolates.** GI Clinic and Department of Medicine, University of Cape Town and Groote Schuur Hospital, Cape Town, South Africa. Gut. Jul: 49 (1): 11-17.
- 42.- José Antonio Lozano T. 2002 **El cerco a *Helicobacter pylori*.** Ciencia y Salud (9) Medicina.
- 43.- Christian Prinz, Nadia Hafsi and Petra Voland. 2003. ***Helicobacter pylori* virulence factors and the host immune response: implications for therapeutic vaccination.** Review TRENDS in Microbiology. ELSEVIER; March. 11(3): 134-138.
- 44.- Joanne M. Cox, Christopher L. Clayton, Toshihiko Tomita, Don M. Wallace, Philip A. Robinson, and Jean E. Crabtree. 2001. **cDNA Array Analysis of *cag* Pathogenicity Island-Associated *Helicobacter pylori* Epithelial Cell Response Genes.** Infection and Immunity; Nov, 69 (11): 6970-6980.
- 45.- Barbara Orsini, Barbara Ottanelli, Amedeo Amedei, Elisabetta Surrenti, et. al. 2003. ***Helicobacter pylori cag* Pathogenicity Island Is Associated with Reduced expression of Interleukin-4 (IL-4) mRNA and Modulation of the IL-4 δ 2 mRNA Isoform in Human Gastric Mucosa.** Infection and Immunity; Nov, 71(11): 6664-6667.
- 46.- Thomas JE. 1995. **Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*.** *Helicobacter pylori*: microbiología, clínica y tratamiento. Ed. M. López-Brea. p. 175-194.
- 47.- Everhart, J. E. 2000. **Recent developments in the epidemiology of *Helicobacter pylori*.** Gastroenterol. Clin. North Am. 29: 559-578.

- 48.- Alm, R.A., J. Bina, B.M. Andrew. P. Doig, R.E.Hancock, and T.J. Trust. 2000. **Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: analysis of the outer membrane protein families.** Infect. Immun. 68: 4155-4168.
- 49.- Yamaoka, Y., J.Soucek, S. Odenbreit, R. Haas, A. Arnqvist, T. Boren, T.kodama, M. S. Osato, O. Gutierrez, J. G. Kim, and D. Y. Graham. 2002. **Discrimination between cases of duodenal ulcer and gastritis on the basis of putative virulence factors of *Helicobacter pylori*.** J. Clin. Microbiol. 40: 2244-2246.
- 50.- Tomb et al. 1997. Nature. 388: 539-554
- 51.- Olczak AA, et al. 2003. Association of ***Helicobacter pylori* antioxidant activities with host colonization proficiency.** Infect Immun; 71: 580-583.
- 52.- Tummuru MKR, Cover TL, Blaser MJ. 1993. **Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production.** Infect Immun; 61: 1799-809.
- 53.- Kolts BE, Joseph B, Achem SR et al. 1993. ***Helicobacter pylori* detection: A quality and cost analysis** Am. J. Gastroenterol 1993; 88: 650-5.
- 54.- Solsinick JV, Schauer DS. 2001. **Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases.** Clin Microbiol Rev; 14: 59-97.
- 55.- Qasim A, O'Morain CA. 2002. Review article: **Treatment of *Helicobacter pylori* infection and factors influencing eradication.** Aliment Pharmacol Ther; 16: 24-30.
- 56.- DeBor WA. 2001. **A novel therapeutic approach for *Helicobacter pylori* infection: The bismuth-based triple therapy monotherapy.** Expert Opin Investig Drugs; 10: 1559-1566.
- 57.- Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelstein H. 1997. **"Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection."** Gut; 40: 3: 297-301.
- 58.- Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press Plainview; 2: 5-89
- 59.- G. González-Valencia, J. C Atherton, O. Muñoz, M. Dehesa, A. Madrazo-de la Garza, and J. Torres. 2000. ***Helicobacter pylori vacA* and *cagA* Genotypes in Mexican Adults and children.** The Journal of Infectious Diseases; 182: 1450-1454.