



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DE LA FES CUAUTITLAN
TE

GENOTIPIFICACION DE CEPAS DE *Helicobacter*
pylori AISLADAS DE GRUPOS INDIGENAS
MEXICANOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

FELIPE SERRANO GALVEZ

ASESORES: M. en C. ANA LAURA VAZQUEZ MARTINEZ
DR. GERARDO GONZALEZ VALENCIA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

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.

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMEI y P) del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional s. XXI, IMSS. Del mes de Agosto del 2004 al mes de mayo del 2005; siendo María Teresa Álvarez y Muñoz responsable de la UIMEIP, Dra. Margarita Camorlinga Ponce, Jefe responsable del laboratorio de bacteriología, teniendo como asesor al Dr. Gerardo González Valencia y como asesor externo a la M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez.

Agradecimientos y Dedicatorias

Agradezco principalmente a la Dra. Margarita Camorlinga Ponce, al Dr. Gerardo González Valencia y a la M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo así como por su asesoramiento y amistad.

Así también agradezco a Sandra Campos, Carmina Fuentes, Carolina Romo, Adriana Reyes, Leopoldo Muñoz, Irma Mendoza por su compañerismo, humor y talento que compartieron conmigo en el Seguro Social.

Por otro lado agradezco a mis amigos y maestros dentro y fuera de la universidad que ante la imposibilidad de mencionarlos a todos, anexo la línea punteada para que pongan su nombre y así nadie se sienta excluido.

.....

Dedico este trabajo a mis padres y hermanas. Por todo. Y por ello, me debo a ustedes, a Dios, a mi universidad, a mi patria.

Gracias totales

ÍNDICE

	Pág.
Índice de imágenes	v
Glosario de términos y abreviaturas	vi
I Resumen	1
II Justificación	2
III Introducción	
3.1 Generalidades	3
3.2 Antecedentes Históricos	4
3.3 Características morfológicas de <i>Helicobacter pylori</i>	7
3.4 Taxonomía	8
3.5 Características bioquímicas	10
3.6 Características genéticas	11
3.7 Patogénesis	12
3.8 Respuesta Inmune	16
3.9 Epidemiología	17
3.10 Diagnostico	18
3.11 Tratamiento	19
IV Objetivos	21
V Hipótesis	22
VI Materiales y Métodos	
6.1 Tamaño y descripción de la muestra	23
6.2 Descripción general de los grupos indígenas	24
6.3 Materiales	27
6.4 Reactivos	27
6.5 Instrumentos	28
6.6 Procesamiento de muestras	28
6.7 Selección de clonas	29
6.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	31
6.9 Identificación de productos de PCR	37

VII Resultados	38
VIII Discusión	48
IX Conclusiones	53
X Anexo	54
XI Referencias	59

<u>Índice de figuras</u>	Pág.
Figura 1 Robin Warren y Barry Marshall	6
Figura 2 <i>Helicobacter pylori</i> al microscopio	7
Figura 3 Prueba de urea	10
Figura 4 Prueba de catalasa	11
Figura 5 Flagelos de <i>H. pylori</i>	13
Figura 6 Respuesta Inmune por <i>H. pylori</i>	16
Figura 7 Familia Huichol	24
Figura 8 Tarahumaras en traje tradicional	25
Figura 9 Niña nahua	26
Figura 10 Geles de agarosa donde se muestran los alélos s y m del gen <i>vacA</i>	39
Figura 11 Frecuencia de los tipos alélicos del gene <i>vacA</i>	40
Figura 12 Frecuencia de los tipos alélicos del gen <i>vacA</i> por grupo étnico	40
Figura 13 Frecuencia de los subtipos alélicos de s1 del gen <i>vacA</i>	41
Figura 14 Frecuencia de los subtipos alélicos de la región media de <i>vacA</i>	41
Figura 15 Frecuencia general de los subtipos alélicos de s1 del gen <i>vacA</i>	42
Figura 16 Frecuencia general de los subtipos alélicos de la región media de <i>vacA</i>	42
Figura 17 Muestras con la presencia del gen <i>cagA</i>	43
Figura 18 Frecuencia del gen <i>cagA</i>	44
Figura 19 Frecuencia del gen <i>cagA</i> por grupo étnico	44
Figura 20 Muestras positivas al gen <i>babA2</i>	45
Figura 21 Frecuencia del gen <i>babA2</i>	45
Figura 22 Frecuencia del gen <i>babA2</i> en los distintos grupos étnicos	46
Figura 23 Muestras clínicas procesadas por técnica PCR-RAPD	46
Figura 24 Patrón RAPD con variación en un mismo paciente.	47
Figura 25 Distribución geográfica de la secuencia señal y la región media del gen <i>vacA</i> y <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i>	48
Figura 26 Frecuencia de los subtipos alélicos de <i>vacA</i> de la secuencia señal y la región media del gen <i>vacA</i> y <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i> en México.	49

Glosario de términos y abreviaturas

Adenomas gástricos- Tumor epitelial benigno, generalmente de estructura semejante a una glándula. Generalmente se origina en mucosa con metaplasia intestinal.

babA- (Blood-group antigen-binding adhesión) gen que codifica a la proteína de adhesión a los antígenos de grupos sanguíneos

BabA-Adhesina que se une a los antígenos Lewis de los grupos sanguíneos

Biopsia- Es la extracción de una pequeña porción de tejido para ser examinada o evaluada.

cagA- *Gen* asociado a la citotoxina

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

cagPAI- Isla de patogenicidad

Endoscopia-Examen o inspección directa de una cavidad o conducto con instrumentos ópticos adecuados a la región a la que se explora.

Gastritis- Es la inflamación de la mucosa gástrica. Existen múltiples tipos, unos de aparición brusca y corta duración (agudas) y otras de larga evolución (crónicas).

Gastritis atrófica- Puede ser el paso final de una gastritis crónica se caracterizan por la desaparición de los pliegues, se observan los vasos sanguíneos de la submucosa y la pared de la mucosa se ha perdido en partes o en su totalidad. Se presume que la gastritis atrófica es precancerosa.

H. pylori- *Helicobacter pylori*

IL- Interleucina (citocinas)

Le- Antígeno de Lewis

Linfomas-Tumor formado por tejido linfoide con tendencia a la generalización.

MALT- Tejido linfoide asociado a la mucosa

Metaplasia intestinal- Se entiende por metaplasia la sustitución de un tipo diferenciado de células propio de un órgano por otro tipo celular, también diferenciado, impropio de él. La metaplasia intestinal de la mucosa gástrica se define como la presencia de epitelio similar a la de la mucosa intestinal en la mucosa gástrica.

PCR- Reacción en cadena de la polimerasa

PMN- Polimorfonucleares

SSF- Solución salina fisiológica

Úlcera- Lesión profunda de la mucosa gástrica y duodenal que llega hasta la capa denominada muscularis mucosae que protege al estómago de la acción del ácido y de las enzimas.

vacA- Gen que codifica para la citotoxina vacuolizante

VacA- Citotoxina vacuolizante

I Resumen

Helicobacter pylori es una de las bacterias genéticamente más diversas. En la actualidad a pesar de lo mucho que se sabe sobre *H. pylori* sigue siendo controvertida su relación con la edad, gravedad de la enfermedad o nicho en el estómago; incluso se ha descrito que la infección por *H. pylori* varía geográficamente. Sobre esto último se desarrolla la siguiente tesis.

Se ha documentado que en México la infección mixta por *H. pylori* (distintos tipos del gen *vacA*) es un evento común. Además se encontró la combinación alélica del gen *vacA* s2m1 antes que en otras partes del mundo. Este trabajo se enfocó en el estudio de *H. pylori* en poblaciones indígenas, a fin de comparar los resultados con lo descrito en poblaciones mestizas y con los resultados de otros estudios a nivel mundial. Para ello se estudiaron aislados de *H. pylori* de 3 poblaciones de origen indígena: Nahuas, Tarahumaras, y Huicholes, en total 37 voluntarios, de los cuales se obtuvieron muestras de jugo gástrico y además biopsias de la región antro y/o cuerpo en el caso de 3 pacientes nahuas para un total de 42 muestras. Los criterios de inclusión para los voluntarios fueron: que hablaran su lengua (Nahuatl, Huichol y Tarahumara) y que sus padres pertenecieran al grupo estudiado y los criterios de exclusión fueron: que los voluntarios no fueran indígenas y que estuvieran bajo tratamiento médico. La genotipificación de los aislados se hizo por PCR de genes específicos *vacA*, *cagA* y *babA* y de todo el DNA por RAPD. En cuanto a *vacA* hubo un predominio del subtipo alélico s1b, principalmente de las comunidades huicholes y tarahumaras. En tanto los genotipos de los 5 aislados de huicholes fueron enteramente homogéneos tanto a los genes específicos como a RAPD. En general los genotipos *vacA*, *cagA* y *babA* y patrones RAPD de *H. pylori* de los tres grupos de indígenas estudiados salvo una excepción fueron similares a los genotipos reportados en cepas aisladas de mestizos.

II Justificación

En México existe una alta prevalencia en infección gastrointestinales ocasionadas por *Helicobacter pylori*. Se sabe que es el principal agente etiológico de la gastritis, úlcera péptica y es un factor importante en el desarrollo del Cáncer Gástrico. Dichas enfermedades están asociadas a la presencia de ciertos genes como CagA, vacA y babA.

En México los hallazgos importantes sobre *H. Pylori* en población mestiza, incluyen la determinación de infección mixta y la presencia de genotipos que nunca se había nreportado en otras partes del mundo. Por lo tanto resulta necesrio realizar en Mexico por vez primera, estudios con pacientes indígenas para determinar si hay alguna relación con lo encontrado en pacientes de origen mestizo.

III Introducción

3.1 Generalidades

Helicobacter pylori es una bacteria en forma de un bacilo espiral. Gram-negativo, catalasa positiva que coloniza la mucosa gástrica de seres humanos. Esta bacteria es microaerofílica y capaz de neutralizar el ambiente ácido debido a la producción de ureasa. Extremadamente móvil, incluso en ambientes viscosos como el moco gástrico, esto en virtud a que posee de uno a seis flagelos. Se ha sugerido que cuando está expuesta a un ambiente hostil o a condiciones de alto estrés, la bacteria se transforma de su forma altamente móvil de espiral a una forma cocoide. *H. pylori* cultivada *in vitro* por primera vez en 1982 por Marshall y Warren mostró estar asociada a gastritis y a úlceras pépticas. Una vez establecida en el estómago del hospedero, permanece en el ambiente mucoide virtualmente de por vida.

La infección por *Helicobacter pylori* sigue siendo una de las infecciones bacterianas mundiales más comunes, afectando al 50% de seres humanos. El predominio de la infección por *H. pylori* alcanza el 90% o más en países en vías de desarrollo. La mayoría de infecciones persisten de por vida con la misma fuerza de colonización. La transmisión oral-oral, fecal-oral, y gástrico-oral explica la mayoría de las infecciones.

En México, el 20% de niños menores de 1 año, el 50% de niños de 10 años y el 85% a los 25 años son positivos a la infección por *H. pylori*(1). La infancia y el estado socioeconómico son los factores de mayor riesgo para la adquisición de la enfermedad. Las diferencias observadas en la prevalencia de la infección, están relacionadas con las condiciones de higiene y sanidad. La infección por *H. pylori* se asocia a gastritis crónica, úlcera péptica, gastritis atrófica, metaplasia intestinal, adenomas gástricos y linfomas. Estas enfermedades, en la mayoría de los casos se desarrollan muchos años después de la colonización del hospedero. El análisis de las secuencias completas de los genomas de dos cepas patógenas de *H. pylori* (J99 y 26695) muestran que aunque sus respectivos cromosomas se organizan de modo diferente en un número limitado de regiones discretas; el tamaño del genoma, contenido genético y orden de los genes de las dos cepas examinadas es muy similar.

Hasta la fecha, se han descrito y caracterizado distintos factores de virulencia responsables de la colonización, supervivencia, y del daño gástricos por *H. pylori*. La característica crítica de virulencia de *H. pylori* parece residir sin embargo, no en su capacidad de dañar tejidos del hospedero sino en su capacidad especial de persistir dentro del hospedero por un período prolongado. Gran parte de la patogenia durante la infección de *H. pylori* puede deberse a la alteración de la respuesta del hospedero por la bacteria. Esto explica por qué *H. pylori* prospera en el estómago humano a pesar de una respuesta inmune local y puede restaurar la colonización con solo algunas bacterias que sobreviven después de estar sometidas a tratamiento (2). Una de las características particulares que presenta esta bacteria es la gran diversidad genética. Esta diversidad se origina por la transferencia de genes entre cepas por recombinación (3). Dada la gran variación genética se han descrito cepas básicas de la bacteria; según investigaciones sobre el origen de la bacteria, estos patógenos aparecieron por primera vez en África, Centro y Este de Asia. Luego fueron distribuidos al resto del globo por causas tan diversas como los flujos migratorios humanos, realizados a lugares tan recónditos como Polinesia o América, la distribución de la agricultura en Europa durante el neolítico, la expansión del pueblo Bantú en África, el comercio de esclavos y el proceso colonizador. La diversidad de cepas de esta bacteria es cincuenta veces mayor de la que se da en humanos, razón principal por la que puede ser utilizada como un marcador mucho más preciso para intentar conocer con exactitud las características históricas de las migraciones (4). Se ha demostrado que los distintos tipos alélicos, como el caso del gen *vacA*, varían de acuerdo a la ubicación geográfica (5). En resumen, podemos establecer sobre el desarrollo de la investigación actual en *Helicobacter pylori* lo siguiente:

- *H. pylori* infecta produciendo inflamación en la mucosa gástrica pero los pacientes pueden permanecer asintomáticos o desarrollar diferentes enfermedades gástricas.
- Un pequeño porcentaje de personas que adquieren la infección van a desarrollar gastritis atrófica, metaplasia intestinal o displasia y van a tener alto riesgo de desarrollo de cáncer.
- La edad a la que se adquiere la infección es un factor importante para el desarrollo de enfermedades gastrointestinales.

- La prevalencia de la infección por *H. pylori* difiere en países desarrollados y en países en vías de desarrollo.
- La expresión de factores de virulencia y la respuesta inmune es diferente en niños y en adultos (6).

3.2 Antecedentes Históricos

- 1893 **Bizozero** refiere el hallazgo de bacterias espirilares en el estómago de perros y gatos.
- 1896 **Salomón** demuestra la presencia de estructuras similares a las espiroquetas en la capa de mucina de animales y de humanos.
- 1906 **Kreintz** publica sus trabajos sobre el hallazgo de microorganismos similares a los anteriormente descritos en individuos afectados con cáncer gástrico.
- 1938 **Doenges** cita la presencia de bacterias espirales en 42% de 242 muestras de estómago, describiéndolas como densas de dos o tres espirales.
- 1940 **Freedberg y Barron** detectan la presencia de bacterias curvadas en el 40% de las muestras obtenidas de gastrectomías subtotales, hallazgos que se asocian a úlceras gástricas.
- 1954 **Palmer** publica sus estudios realizados sobre 100 biopsias de estómago, pero no encuentran bacterias curvadas, teniendo explicación en el hecho de que las muestras gástricas elegidas fueron de la curvatura mayor del estómago y no del antro pilórico. Así como no utilizar tinciones de plata.
- 1975 **Steer y Colin-Jones** publican el hallazgo de microorganismos curvados Gram negativos, de forma espiral, en las muestras de biopsia de enfermos con úlcera gástrica, refiriendo que estas bacterias se encuentran en la propia mucosa gástrica y bajo la capa del moco gástrico.

No obstante, en ninguno de los trabajos anteriores se pudo demostrar que *H. pylori* estuviera realmente colonizando la mucosa gástrica y/o que estuviera involucrado directamente con la enfermedad. No fue sino hasta 1982, cuando un par de gastroenterólogos Australianos convencidos de su participación, logran su cultivo y demuestran que realmente es el agente causal de padecimientos gastroduodenales.

1980-83 **Warren y Marshall** (Figura 1) inician el cultivo de bacterias curvadas que se observaban en la mucosa gástrica de enfermos con gastritis y/o úlcera péptica. Por su parecido morfológico a bacterias del género *Campylobacter* decidieron llamarlas *Campylobacter pyloridis*

De Campylobacter a Helicobacter...

El cultivo se llevó a cabo siguiendo el método que se había empleado para cultivar bacterias del género *Campylobacter* (Martin Skirrow en 1977) el cual consiste en emplear medios de cultivo selectivos (por la adición de antibióticos) para su aislamiento y condiciones microaerofílicas de incubación. A estas condiciones dichas bacterias requieren para su crecimiento un tiempo de incubación de 48 horas. Pero este tiempo de incubación era insuficiente como pudieron constatarlo Warren y Marshall quienes lograron su cultivo por un hecho fortuito: Fue durante un periodo vacacional en el que sin proponérselo dejaron las placas de cultivo en la estufa por más tiempo del habitual. En el año 2005 recibieron el premio Nobel de medicina por sus hallazgos

Al inicio se le conoció con el nombre de *Campylobacter pyloridis*...

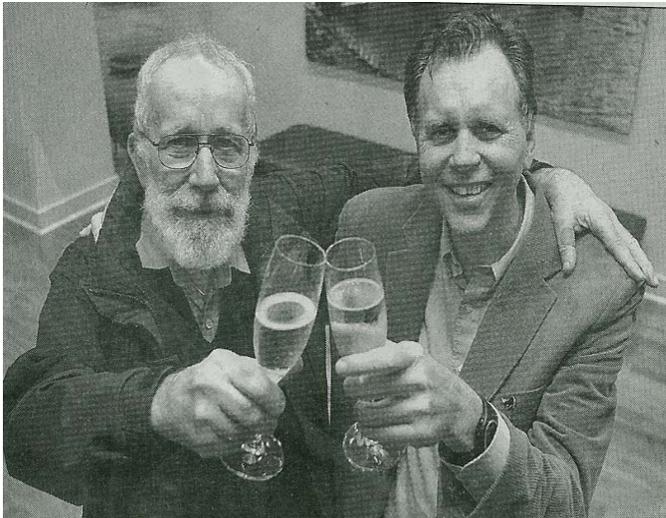


Figura 1 Robin Warren y Barry Marshall. El Dr. R. Warren (n. 1937) patólogo e investigador Australiano. B. Marshall (n. 1951) Dr. y profesor de microbiología clínica del University of Western Australia. En la imagen celebrando al ganar el nobel de medicina 2005 www.magenspezial.de

Hasta 1989 se le dio el nombre que tiene actualmente y durante el periodo previo se le llamó además *Campylobacter pylori*. El cambio al nuevo género *Helicobacter* fue necesario cuando se hizo evidente que este organismo tenía una estructura y bioquímica diferentes al tradicional *Campylobacter* características que incluyen composición de ácidos grasos, flagelares, morfología y capacidad enzimática y principalmente distinto contenido G+C en su DNA(7).

3.3 Características morfológicas de *Helicobacter pylori*

H. pylori *in vivo* y bajo condiciones óptimas *in vitro* es una bacteria de forma curvada, de 0.5 a 1.5 μm de largo, con un penacho unipolar de 5 a 7 flagelos envainados con una longitud cada uno de 2.5 μm y 30 nm. de grosor. La imagen típica curvada de estos microorganismos puede observarse a partir de muestras de biopsia gástrica, teñidas por tinción de Gram (Figura 2). Cuando la bacteria se mantiene en cultivo durante largos periodos de tiempo se adquiere la forma cocoide o redondeada.

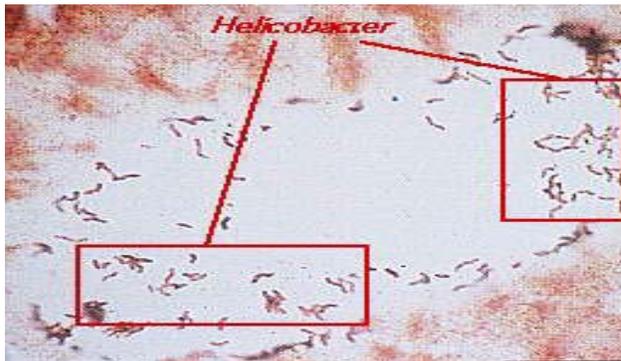
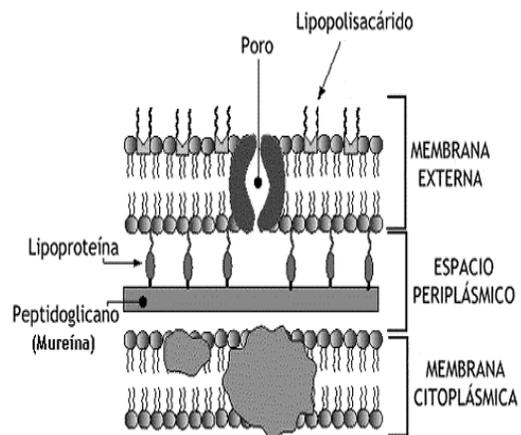


Figura 2 *Helicobacter pylori* vista al microscopio.

En esta tinción de Gram, se puede identificar claramente a las bacterias como bacilos Gram negativos. www.medic.edu⁸

Organización interna

La pared celular de *H. pylori* se muestra como una típica bacteria Gram negativa; Tiene una capa delgada de peptidoglicano unida a una membrana exterior por lipoproteínas, el espacio periplásmico entre la membrana citoplasmática y la pared celular es de aproximadamente 30 nm. de espesor, su citoplasma rico en nucleótidos y ribosomas. El peptidoglicano de *H. pylori* esta compuesto por un único muropéptido siendo su estructura menos compleja que otras bacterias Gram negativas. Junto a la membrana citoplásmica existe otra estructura denominada membrana polar, una banda electrodensa de 6 a 8 nm. de grosor que se ha descrito en diferentes géneros bacterianos como *Campylobacter*, *Spirillum*, *Rhodospirillum* y *Ectothiohodospira*. Se ha sugerido que puede ser una estructura especializada en generar energía, necesaria para su movilidad y para la síntesis de la pared celular bacteriana.



Los gránulos situados en el citoplasma miden de 0.05 a 0.2 μm amorfos y en forma de vacuolas principalmente considerados como una fuente de energía (9).

Superficie celular

Se han identificado una variedad de *proteínas de membrana externa* (OMPs) por sus siglas en inglés. Las masas moleculares de estas OMPs van de 31 a 80 kDa. La **Ureasa y HspB**, un homólogo de la proteína de GroEL de *Escherichia coli*, son abundantes en las preparaciones de OMP. La ureasa y HspB se localizan estrictamente dentro del citoplasma en la fase logarítmica inicial de los cultivos *H. pylori*. Sin embargo, en la fase logarítmica final de los cultivos se asocian a la ureasa y HspB con la superficie bacteriana con un nuevo mecanismo: Estas proteínas citoplásmicas se liberan por autólisis bacteriana y son adsorbidas a la superficie de las bacterias debido a las características únicas de la membrana exterior. Además se han identificado dos de los antígenos como lipopolisacáridos (LPS) que corresponden a la membrana exterior y a la vaina de los flagelos; éstas varían la especificidad antigénica de acuerdo a la cepa de *H. pylori* (10). Otros genes que codifican para proteínas de membrana (OMP's) son, HP0796, HP1501, *babA2* que genera la producción de una proteína de adhesión a los antígenos de Lewis como se explicará posteriormente y a HP0638; este último codifica para una proteína externa proinflamatoria (OipA) (11).

3.4 Taxonomía

Desde 1983 ha recibido diferentes denominaciones hasta adquirir el nombre definitivo:

- CLO (*Campylobacter like organism*).
- GCLO (*Gastric Campylobacter like organism*).
- *Campylobacter pyloridis*.
- *Campylobacter pyloric*.
- *Campylobacter pylori*.
- *Helicobacter pylori*: (1989) especie tipo de un nuevo género, Helicobacter.

Helicobacter, *Campylobacter*, *Arcobacter* y *Wolinella* pertenecen a un grupo distinto de bacterias (Superfamilia VI del ARNr) eubacterias.

Las especies del género *Helicobacter* se han dividido en las que viven en el estómago y las que viven en el intestino tanto del hombre como de animales (2).

Tabla 1 Especies del Género *Helicobacter*

<i>Especies</i>	<i>Flagelos</i>		<i>Huésped habitual</i>	<i>Asociación</i>
	Número	Tipo ^a		
<i>Gástricas</i>				
^b <i>H. pylori</i> (especie tipo)	4-8	Up/Bp	Hombre	Gastritis crónica activa; fuerte asociación con úlcera péptica y cáncer gástrico
<i>H. mustelae</i>	4-8	Bp,L	Hurones	No patología, a veces gastritis y ulceración
<i>H. nemestrinae</i>	4-8	Up/Bp	Macaco	No patología
<i>H. acinonyx</i>	4-8	Up/Bp	Leopardo	Gastritis
<i>H. felis</i>	14-20	Bp,F	Gato, perro	No patología/a veces gastritis
<i>H. bizzozeronii</i>	10-20	Bp	Perro	¿No patología?
<i>H. salomonis</i>	5-7	Bp	Perro	¿No patología?
^b <i>H. heilmannii</i>	≥ 9	Bp	¿Gato y perro?	Gastritis crónica activa (no común en hombre)
<i>Intestinales</i>				
^b <i>H. cinaedi</i>	1-2	Up/Bp	Hámster	No patología en hámster; proctocolitis en homosexuales
^b <i>H. fennelliae</i>	1-2	Up/BP	?	?
^b <i>H. canis</i>	2	Bp	Perro	Proctocolitis en hombres homosexuales
^b <i>H. westmeadii</i>	1	Up	?	Bacteriemia en hombres con SIDA
^b <i>H. pullorum</i>	1	Up (noE)	Pollo, cerdo	¿Hepatitis vibriónica?
<i>H. pametensis</i>	2	Bp	Gaviotas	
<i>H. cholecystus</i>	1	Up	Hámster	Colangiofibrosis, pancreatitis
<i>H. hepaticus</i>	2	Bp	Ratones	Hepatitis; coloniza en ciego y colon
<i>H. bilis</i>	3-14	Bp,F	Ratones	Hepatitis; coloniza en ciego y colon
<i>H. rodentium</i>	2	Bp (noE)	Ratones	?
<i>H. muridarum</i>	10-14	Bp,F	Roedores	No patología, puede colonizar en estómago y causar gastritis en roedores viejos
<i>H. trogontum</i>	5-7	Bp,F	Rata	
^b " <i>Flexispira rappini</i> "	10-20	Bp,F	Ovejas, ratones	No patología conocida Abortos ovinos;

LEYENDA:

^a Up: unipolar, Bp: bipolar, L: lateral, F: fibrillas periplásmicas, (noE): no envainados

^b infecciones en el hombre

3.5 Características bioquímicas

Helicobacter pylori es bastante inactivo bioquímicamente, pero es un potente productor de catalasa y ureasa. Esta última enzima, es una proteína que contiene níquel y que es de crucial importancia para el organismo. La ureasa es una de las enzimas clave en la patogénesis de *Helicobacter pylori*. Tiene un peso molecular de 550 KDa y consiste en tres subunidades: (Ure A) con 26.5 KDa, (Ure B) con 61 KDa y (Ure C) de 13 KDa.



Figura 3

Prueba de urea positiva en el pozo no.7. Se puede notar claramente el cambio de color a rosa al comparar con una prueba de urea negativa en el pozo no. 8

Foto cortesía de UIMEI y P. Hospital de Pediatría, CMN S. XXI. IMSS.

La ureasa es necesaria por *H. pylori* para mantener el pH neutral alrededor del microambiente de la bacteria, necesario para la sobrevivencia en el ácido estomacal. Esta enzima es fuertemente inmunogénica y produce quimiotaxis a fagocitos (3). La enzima superóxido dismutasa ha sido aislada de *H. pylori* la cual disminuye la producción del superóxido producido en polimorfonucleares, leucocitos. La catalasa (figura 4) protege a *H. pylori* contra los daños producidos por el peróxido de hidrógeno liberado por fagocitos. La ureasa y catalasa pueden ser excretadas por *H. pylori* alrededor del ambiente en el que se encuentran y protegen a este patógeno contra la respuesta inmune de tipo humoral (3).

Respiración y metabolismo

Algunos aislados de *H. pylori* exhibieron actividad de glucosa cinasa que está asociada a la membrana celular bacteriana. Además, se ha identificado actividad enzimática de la vía de las pentosas. Así, *H. pylori* parece ser capaz de catabolizar D-glucosa. Esta bacteria posee transportadores de D-glucosa específicos; algunas características del sistema de transporte de la glucosa parecen ser únicos. *H. pylori* exhibe actividad del ciclo de la urea que puede servir como un mecanismo eficaz para liberar el exceso de nitrógeno de las células

bacterianas. La fumarato reductasa es un componente esencial del metabolismo de *H. pylori* y como tal constituye un posible blanco para la intervención terapéutica. *H. pylori* puede metabolizar los aminoácidos por vías fermentativas similar en bacterias anaerobias. También se ha involucrado al citocromo en la finalización de la cadena respiratoria de *H. pylori*. El nivel elevado de CO₂ requerido para el crecimiento de *H. pylori* in vitro puede ser debido en parte, a la actividad de la enzima acetil coenzima carboxilasa (12).



Figura 4 Prueba de catalasa

Se puede diferenciar claramente una prueba positiva en el pozo 6 de una prueba negativa como es el caso del pozo 5. Foto tomada en el laboratorio de bacteriología de la UIMEI y P Hospital de Pediatría, CMN S. XXI. IMSS

6.6 Características genéticas

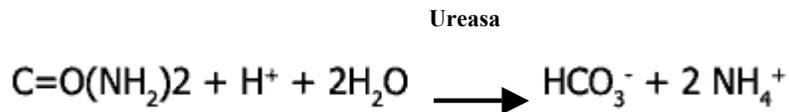
En agosto de 1997 el Instituto para la Investigación Genómica publicó la secuencia completa del genoma de la cepa 26695 de *H. pylori*. La secuencia está disponible en su página en: <http://www.tigr.org> (13) de forma que ahora es posible la búsqueda de un gen de interés de la cepa 26695 (al igual que la cepa J-99) y compararlo con la secuencia del gen de otra cepa de *H. pylori*.² El genoma de *H. pylori* oscila entre los 1.6 y los 1.73 Mb con un promedio de 1.67 Mb. La composición G + C tiene en promedio 1.67 mol%. Aproximadamente 40% de las cepas de *H. pylori* tienen plásmidos con rango de 1.5 a 2.3 Kb. (4). Aunque se sabe que dichos plásmidos no poseen factores de virulencia (14). *H. pylori* es una de las especies bacterianas más diversas reportadas hasta ahora, A esta diversidad contribuyen: mutaciones, sustituciones, inserciones o deleciones que pueden involucrar uno o varios genes. También se han encontrado rearrreglos cromosómicos, principalmente inversiones de una gran variedad de segmentos de DNA que incluyen varias secuencias de inserción y plásmidos (15). La variación en la ubicación de ciertos genes en el mapa geonómico hablan de la extensa reestructuración intraespecífica de *H. pylori*. Esta exhibe significativa diversidad en múltiples genes que incluyen genes estructurales y accesorios que codifican para ureasa, flagelos, toxina vacuolizante y CagA (16,17) En general la diversidad genética puede manifestarse como micro o macrodiversidad. La

primera causada por mutaciones puntuales dentro de genes individuales, que pueden ser silenciosas/sinónimas o no sinónimas, mediante mutaciones sinónimas puntuales pueden aparecer sitios adicionales o desaparecer algunos ya existentes. La macrodiversidad se altera el orden de los genes en el cromosoma; otros eventos son su duplicación y/o transferencia horizontal de genes y recombinación homóloga **(10)**.

3.7 Patogénesis

Virtualmente todas las personas portadoras de *H. pylori* tienen inflamación gástrica, sin embargo un porcentaje muy pequeño de individuos desarrollan cuadros clínicos. La inflamación gástrica casi siempre precede al desarrollo de ulceración y es un componente inicial de una serie de pasos hacia el desarrollo de cáncer gástrico. El ácido clorhídrico secretado por las células parietales del cuerpo gástrico es un factor patogénico fundamental en la enfermedad ulcerosa péptica. En la mayoría de los pacientes que padecen úlcera duodenal se observa un aumento en la secreción ácida basal y estimulada. Esta hipersecreción ácida se ha atribuido recientemente más a alteraciones funcionales de las células parietales que a un aumento de su masa. El papel que ejerce el *H. pylori* en la secreción ácida es objeto de debate; Se acepta que la bacteria actúa disminuyendo la somatostatina y por tanto interrumpiendo el mecanismo inhibitorio sobre las células G, responsable de la hipergastrinemia de los pacientes con infección por *H. pylori*, sean ulcerosos duodenales o no. Se han descrito tanto aumentos como descensos en la secreción ácida después del tratamiento de la úlcera duodenal asociada a la infección por *H. pylori*. Por otro lado, se sabe que mientras los pacientes están sometidos a tratamiento con inhibidores de la bomba de protones (IBP) desarrollan una hipergastrinemia, y que la secreción de ácido se normaliza a los 7 días de suspender el fármaco. Aunque la mayor parte de los estudios realizados en humanos hasta ahora indican que los IBP *per se* no influyen en la secreción ácida a largo plazo **(18)**. El proceso de patogénesis inicia al colonizar a la mucosa gástrica así como la superficie celular del epitelio gástrico. Los mecanismos de neutralización del pH y movilidad son los primeros mecanismos de defensa para resistir al medio ácido y al mecanismo normal de peristalsis **(10)**. El estómago es protegido de su propio jugo gástrico por una densa capa de mucosa que cubre las paredes

del estómago. *H. pylori* toma ventaja de esta protección para vivir en la mucosa de la pared. Una vez instalado en la mucosa le es posible luchar contra el pH ácido mediante la enzima ureasa. La ureasa convierte la urea (la cual es muy abundante en el estómago y jugos gástricos) en dióxido de carbono y amoníaco los cuales son bases fuertes, permitiendo sobrevivir a *H. pylori* en el medio ácido del estómago.



Hay en total 7 genes que codifican a la proteína ureasa: *ureA* y *ureB* que constituyen las subunidades estructurales de la enzima, mientras que *ureE*, *ureF*, *ureG* y *ureH* codifican a proteínas accesorias para el ensamblaje y para la inserción de Ni_2^+ necesario para la activación de la ureasa. La mayoría de la enzima es citoplasmática y se presenta en la superficie de la bacteria durante su crecimiento. La activación al ambiente ácido se da por la actividad del gen *ureI* el cual codifica para la proteína UreI, esta genera la apertura de un canal de H^+ que incrementa la permeabilidad de la membrana para la producción de urea (19). Para catalizar la actividad, esta enzima requiere del ion níquel, La proteína *NixA* transporta y enlaza estos iones dentro de la célula.(20) La constitución de los flagelos, que van de 5 a 6 (ver figura 5) consiste en 2 subunidades estructurales *FlaA* de 53 kDa y *FlaB* de 54 kDa.

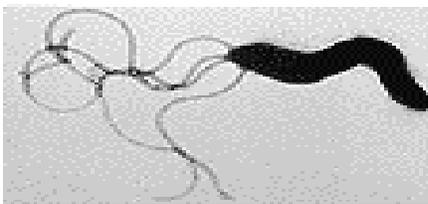


Figura 5 *H. pylori*

Esta imagen en microscopía electrónica, muestra los flagelos de *H. pylori*. www.aliperti.net-hpylori

La movilidad permite a *H. pylori* a alcanzar sitios con un pH menos ácido en capas inferiores de la mucosa gástrica y una vez allí puede adherirse a las células epiteliales.

Se ha observado que el grado de motilidad de cepas de *H. pylori* es proporcional al grado de infección. La mayoría las cepas con gran movilidad tienen más éxito en su grado de infección (100%), mientras que cepas con menor movilidad, tienen un grado de infección del 17%. Además, se piensa que existe una relación entre el grado de motilidad con los niveles de citocinas y la severidad de la enfermedad (21). La adhesión de *H. pylori* al epitelio gástrico es altamente específica *in vivo*. El principal componente del moco gástrico

es una proteína altamente glicosilada, la mucina, de alto peso molecular que cubre y protege la mucosa subyacente. *H. pylori* se une a las células epiteliales gástricas usando como receptores estructuras de superficie principalmente fosfatidiletanolamida, N-acetilneuraminil-lactosaantígenos H tipo 2 y antígenos de Lewis^b (22). La adhesina más caracterizada es BabA (Blood-group antigen-binding adhesión) de 78-kD. Esta adhesina de superficie se une los antígenos de Lewis de grupos sanguíneos presentes en las membrana de las células epiteliales (23). *H. pylori* posee dos genes asociados a proteínas de membrana: *babA* y *babB*, éstos tienen similitud en sus productos en el N-terminal. *babA* y *babB* son casi idénticos en sus extremos 3' y 5' salvo que tienen ciertas diferencias en su región media. Aunque se sabe que el gen *babA* es necesario para la actividad de adhesión (24). No todas las cepas de *H. pylori* tienen el gen que codifica a la proteína BabA. El gen *babA* está dividido en el gen *babA1* que es idéntico a *babA2* excepto por la falta de 10 pares de bases en su secuencia las cuales son indispensables para la expresión de la proteína BabA por tanto *babA2* es quien codifica a la proteína de adherencia (11). El ataque en células epiteliales, así como experimentos *in vitro*, dan evidencia de que el gen *babA* está asociado al desarrollo de gastritis crónica y atrofia gástrica (25 26). La diferencia entre la infección y su respuesta, está determinada por factores bacterianos y la respuesta del hospedero. Entre los factores bacterianos, está la isla de patogenicidad de *cag*, también llamada *cag* PAI (PAI, por sus siglas en inglés) debido a que es en la isla donde se codifica dicho gen (27). La isla de patogenicidad (PAI) se describió por primera vez en *H. pylori* por Censini y cols. Como una inserción de DNA de 40 Kb en el gen cromosómico de la glutamato racemasa (28). La región PAI se encuentra flanqueada por dos secuencias directas repetidas de 31 pares de bases (y en algunas cepas está separada en dos segmentos por una secuencia de inserción) que codifican para proteínas *glr* (gen de glutamato Racemasa) y una secuencia de lectura abierta. Las cepas sin PAI contienen un único sitio vacío que puede haberse generado por la escisión de la PAI o que podría haber existido previo a la inserción de PAI. Esta contiene el gen *cagA* que frecuentemente es empleado como marcador de virulencia ya que se encuentra con más frecuencia en cepas de pacientes con úlcera y cáncer gástrico que en aquellos con gastritis moderada o individuos asintomáticos (29). Dicha afirmación responde a que las cepas de *H. pylori* *cagA* positivas están asociadas con inflamación gástrica severa, que las cepas *cagA* negativas.^{30 31} El gen

cagA esta presente entre el 60 al 70% de los pacientes infectados con *H. pylori* a nivel mundial. Además del gen *cagA*, en la isla de patogenicidad se encuentran otros genes *cagC*, *D*, y *E* también referidos como operón *picAB* donde *picA* comprende a *cagC* y *D* y *picB* comprende a *cagE* este último relacionado a la liberación de interleucina 8 (32). La proteína CagA (Cytotoxin associated gene A) de 120 a 140 KDa por si sola no induce la inflamación; en experimentos *in vitro* y se sabe que es transportada directamente a las células epiteliales por un sistema de secreción tipo IV (33). La región *cag* PAI contiene 31 genes asociados, algunos de los cuales codifican para el sistema de secreción tipo IV antes mencionado (25). Este último es responsable de la translocación de CagA a la célula huésped que provoca la activación de rutas de transducción y plasticidad del citoesqueleto. Estas señales se ven reflejadas por la aparición de la formación de *pedestales* en la superficie de la célula infectada que dependen a su vez, de la polimerización de actina en la membrana de la célula (8). Se han observado cambios fenotípicos *in vivo* con cepas *cag* PAI positivas como son los altos niveles de interleucina 8 (IL-8), y se sugiere que la secreción de IL-8 depende de los genes presentes en PAI entre los que destaca *picB* (34). El gen *vacA* de 93 kDa codifica a una citotoxina vacuolizante: VacA (Vacuolization toxin A) ésta proteína, induce vacuolización citoplasmática y ocasiona daños en células epiteliales y ulceración (17 35). El gen está presente en todas las cepas de *H. pylori*, pero la actividad de la toxina sólo se expresa en 50% de estas (36). *vacA* contienen 2 regiones variables; una en la región *s* o secuencia señal y la otra en *m* en la región media. La región *s* presenta dos tipos de alelos: *s1* o *s2*, el primero se subdivide a su vez en *s1a*, *s1b* y *s1c*, este último es característico de cepas aisladas principalmente en Asia del este. En la región *m* (media) se pueden encontrar 2 alelos distintos: *m1* y *m2* (37). Se han encontrado todas las combinaciones entre los de la secuencia señal y la región media incluyendo la combinación *s2m1* que es muy rara y no se ha encontrado en aislados de E.U.(18 38). Las cepas *s1* regularmente están mas asociadas con el desarrollo de úlcera péptica que las que son *s2*. Por otro lado las cepas con el alelo tipo *m1* producen altos niveles de citotoxina *in vitro* y mayor daño epitelial en el estómago *in vivo* que aquellas cepas cuyo alelo es *m2* (39). La toxina codificada por *vacA* se inserta a si misma dentro de la membrana de las células epiteliales y forma un canal hexámero dependiente del voltaje, a través del cual se liberan aniones orgánicos y bicarbonato posiblemente proveyendo a la bacteria de nutrientes. VacA

tiene como blanco la membrana mitocondrial donde causa la liberación de citocromo c e induce apoptosis (8). A pesar del grado de virulencia de los distintos genes, se sabe que para producir el abanico de la enfermedad que va desde gastritis hasta cáncer gástrico, se requiere del sinergismo de varios genes. Se ha propuesto que la combinación *cagA*⁺, *vacA*⁺ s1ml y *babA2*⁺ trabaja sinérgicamente para causar metaplasma (40).

3.8 Respuesta inmune

La persistencia del *H. pylori* en la mucosa gástrica es un fenómeno que se asocia con la perpetuación de los cambios histopatológicos y la presencia de infiltrado inflamatorio de tipo crónico. En la infección por *H. pylori* se produce una importante respuesta, local y general. Un efecto llamativo de la infección por *H. pylori* (figura 6) es la activación de polimorfonucleares (PMN), que se traduce en un profuso infiltrado inflamatorio de las áreas superficiales de la mucosas. Este efecto está mediado por la interleucina- 8 (IL-8). La activación da lugar a la producción de citocinas, aumento de los fenómenos oxidativos locales y de la expresión de moléculas de adhesión intercelular tipo 1 (ICAM-1). Las células mucosas gástricas también expresan ICAM-1, lo que, junto a la producción de IL-8, puede constituir el núcleo de los fenómenos inflamatorios inducidos por la infección de *H. pylori*. Aproximadamente la tercera parte de las cepas inducen fuerte actividad oxidativa mediada por PMN. Las cepas que tienen esta capacidad son significativamente mas frecuentes en pacientes con Ulcera Péptica, que en aquellos con gastritis crónica activa solamente (41 42).



Figura 6 *H. pylori* causante de la reacción de neutrofilos (activos en gastritis crónica) en la pared (mucosa) del estómago. En la imagen se observan neutrofilos segmentados (P) además de eosinofilos (E), Las flechas indican bacterias de *H. pylori* Imagen obtenida de “The *Helicobacter* Foundation” www.helico.com

Otro factor de importancia en la respuesta inmune por la infección con *H. pylori*. Es la participación de linfocitos T. Se ha comprobado que, asociado a la infección por *H. pylori*, produce un incremento pronunciado de la población de linfocitos T CD4+, una importante fracción de las cuales expresan en su superficie receptores para IL-2, acompañado de un aumento de expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II. Las proteínas bacterianas pueden estimular también, directa o indirectamente, la proliferación y diferenciación de la población CD4+, dando lugar a la producción de un exceso de citoquinas y sustancias con toxicidad directa como el factor de necrosis tumoral (TNF).

3.9 Epidemiología

H. pylori se ha encontrado en prácticamente los 5 continentes. En países en desarrollo, del 70 al 90% de la población es portadora y casi todos los pacientes de este rubro adquirieron la infección antes de los 10 años. En países en desarrollo la prevalencia de la infección es baja; se ubica en un rango de entre 25 al 30%. Esto sugiere que la infección se adquiere en la infancia. Se sugiere que los niveles de la infección son similares en hombres y en mujeres **(4)**. En México, antes de los 10 años se encuentran infectados 50% de los niños y globalmente 66% de la población está infectada **(1)**.

Transmisión

La mucosa del estómago es el nicho principal de *H. pylori*. Además de los humanos se ha encontrado *H. pylori* en algunos otros mamíferos (primates y gatos). A pesar de que es probablemente la infección bacteriana más prevalente en el mundo entero, se desconoce como adquieren los lactantes la infección, aunque se cree que es por vía oral-oral o fecal-oral. Se desconocen los factores de riesgo o de protección para adquirir la infección; sin embargo, hay estudios que sugieren que la leche materna puede tener un papel preventivo. En un estudio en Perú, una alta prevalencia de infección en los primeros meses de vida; sin embargo, ésta disminuyó significativamente en los siguientes meses a años; sugiriendo que la colonización de los infantes por *H. pylori* puede ser un proceso reversible en esta edad **(43)**. Por otro lado en algunas partes del mundo se ha encontrado *H. pylori* en agua potable, esto indica que la bacteria puede sobrevivir en el medio ambiente. Y por tanto puede

aislarse de una fuente medioambiental (44). Es por ello que los mecanismos de transmisión no se conocen con precisión.

Enfermedades asociadas.

Aunque mucha gente esta infectada con *H. pylori* solo una pequeña proporción presenta algún tipo de manifestación clínica. Todos los pacientes infectados por *H. pylori*, desarrollan inflamación gástrica pero esta condición es usualmente asintomática. La ulcera péptica ha sido considerada una enfermedad idiopática o bien puede deberse a agentes como aspirina, enfermedades crónicas, diversos desordenes inflamatorios, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y en algunos casos extraordinarios se adjudican al síndrome Zollinger-Ellison. El 60 a 95% de las enfermedades gástricas se han asociado como una enfermedad como se ha dicho idiopática; se cree que este porcentaje pueda ser adjudicado a *H. pylori* (4). El patrón y distribución de la gastritis que provoca, correlaciona fuertemente con el riesgo de secuelas clínicas, principalmente úlceras gástricas o duodenales, atrofia de mucosa, carcinoma gástrico o linfoma gástrico (8).

3.10 Diagnóstico

Existen diferentes métodos para diagnosticar la infección producida por *H. pylori*. Los métodos “invasivos”, como la endoscopia para la toma de biopsias gástricas y los no invasivos como la detección serológica de anticuerpos contra la bacteria.

	Invasivos	No invasivos
Directos	Biopsia gástrica para cultivo Histología	Técnicas moleculares como PCR de jugo gástrico, saliva o heces.
Indirectos	Ureasa directamente en biopsia	Prueba de aliento (UBT) Serología

El diagnóstico por la infección de *Helicobacter pylori* ha sido objeto del interés de muchos investigadores a pesar de que no se ha propuesto un nuevo método en el último año a excepción de una prueba rápida de leucocitos (leucostix). Esta, es una prueba rápida para la

detección cuantitativa de polimorfonucleares en la mucosa gástrica. La endoscopia es ya posible para diferenciar lesiones histológicas y puede ser usado para confirmar la erradicación de *H. pylori* con buena precisión (45).

3.11 Tratamiento

Se ha descrito que *H. pylori* presenta distinta sensibilidad a los diferentes antibióticos que se utilizan, entre los mas utilizado están las amoxicilina, claritromicina y metronidazol. La resistencia a los antimicrobianos se relaciona con falla en la erradicación de la bacteria. Por otro lado *H. pylori* es sensible a un gran número de antibióticos *in vitro* aunque algunas condiciones ocasionan que no sean siempre útiles como:

- 1.-El antibiótico no llega a zonas profundas de la mucosa gástrica donde se encuentra *H. pylori*.
- 2.- El antibiótico es inactivado por el pH ácido del estómago.
- 3.-Las condiciones en las que la bacteria se encuentra en el estómago, no son fácilmente reproducibles en el laboratorio.
- 4.-Se pueden desarrollar resistencias durante el tratamiento.

Opciones de tratamiento

Se utilizan tratamientos combinados ya que la monoterapia no ha demostrado utilidad clínica. Pueden emplearse pautas dobles, triples o incluso cuádruples. Los esquemas dobles alcanzan porcentajes de erradicación más bajos y generalmente se recomienda pauta triple. Los esquemas dobles incluyen un antibiótico y un agente antiulceroso. Las triples asocian dos antibióticos y un agente antiulceroso. En las cuádruples se administran dos antibióticos y dos agentes antiulcerosos. Entre los esquemas más utilizadas para el tratamiento de la infección producida por *H. pylori* se pueden citar:

- Inhibidor de la bomba de protones + Macrólido (Azitromicina, Claritromicina, Roxitromicina)
- Ranitidina citrato de bismuto + Macrólido
- Inhibidor de la bomba de protones + Amoxicilina + Macrólido

- Subsalicilato de bismuto + Metronidazol + Tetraciclina + Antagonista de los receptores H₂
- Subcitrato de bismuto + Amoxicilina + Metronidazol

Estas pautas se recomiendan a las dosis habituales y durante un periodo de 7 a 10 días de tratamiento.

Tipos de compuestos.

Compuestos no antibióticos:

- Sales de bismuto.
- Inhibidores de la bomba de protones de las células parietales gástricas (Omeprazol, Lansoprazol, Pantoprazol, Rabeprazol).
- Antagonistas de los receptores H₂ (Ranitidina, Famotidina, Cimetidina).
- Ranitidina citrato de bismuto (RBC).

Antibióticos:

- Betalactámicos: Amoxicilina.
- Macrólidos: Azitromicina, Claritromicina y Roxitromicina.
- Nitroimidazoles: Metronidazol, Tinidazol.
- Tetraciclina.

Atención Primaria

La terapia erradicadora debería ser considerada en:

- a. Pacientes con dispepsia recurrente
- b. Pacientes diagnosticados de úlcera péptica recientemente
- c. Pacientes con diagnóstico previo de enfermedad ulcerosa cuya sintomatología se ha reactivado o que requieran terapia continua de supresión de ácido.

La terapia de erradicación recomendada está basada en la administración de una dosis estándar con un inhibidor de la bomba de protones junto con 1 gramo de amoxicilina y 500 mg. de claritromicina, dos veces al día durante una semana. El conocimiento de las tasas de resistencia de claritromicina y metronidazol es esencial para la efectividad del tratamiento (46).

IV Objetivos

Determinar y comparar los genotipos *vacA*, *cagA* y *babA* y patrón RAPD de cepas *Helicobacter pylori* aisladas de poblaciones indígenas mexicanas, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Determinar y comparar los patrones RAPD de cepas de *H. pylori* aisladas de estos grupos.

Comparar los genotipos de cepas de *H. pylori* aisladas de grupos indígenas mexicanos con lo reportado en mestizos mexicanos.

V Hipótesis

Los genotipos de las cepas de *H. pylori* aisladas de los distintos grupos indígenas estudiados serán similares.

Los genotipos de las cepas de *H. pylori* aisladas de poblaciones indígenas diferirán de los reportados con poblaciones mestizas.

Los patrones RAPD de las cepas de *H. pylori* aisladas de los distintos grupos indígenas estudiados serán diferentes.

VI Materiales y Métodos

6.1 Tamaño y descripción de la muestra

Se muestrearon tres comunidades indígenas de la Republica Mexicana. Dichas comunidades corresponden a 3 grupos étnicos distintos (Náhuatl, Hicholes y Tarahumaras)

Se tomaron muestras principalmente de adultos siendo la edad promedio de 33 años.

Criterios de inclusión

Que los voluntarios hablaran su lengua (Nahuatl, Huichol y Tarahumara) que sus padres pertenecieran al grupo estudiado.

Criterios de exclusión

Que los voluntarios no fueran indígenas

Que estuvieran bajo tratamiento médico (principalmente antibióticos o inhibidores de bomba de protones) o que estuvieran sanos.

Tabla 2 Grupos y número de pacientes

Comunidad	Grupo indígena	No. Pacientes
Milpa Alta	Náhuatl	20
Jalisco	Huichol	5
Chihuahua	Tarahumara	12
Total		37

Los voluntarios fueron sometidos a la prueba de aliento para determinar la infección por la bacteria y a la prueba del hilo para tratar de recuperarla en el cultivo.

A los pacientes huicholes, y tarahumaras solo se les tomaron muestras de jugo gástrico, En tanto que a algunos voluntarios de origen náhuatl, se les tomaron por endoscopia muestras del estómago de las regiones del antro y cuerpo. En 2 de los pacientes (muestras 6.32, y 21.3) se logro el aislamiento de *Helicobacter pylori* de jugo gástrico, antro y cuerpo. De otro de los voluntarios (10.6) solo se logro el aislamiento de las muestras de antro y cuerpo. En total se procesaron 42 muestras.

6.2 Descripción general de los grupos indígenas.

Los pueblos indígenas de México

La nación mexicana, presenta un panorama social altamente diversificado. Los pueblos indígenas son quienes más contribuyen con su patrimonio a la riqueza de la nación. Estos pueblos están integrados por más de 12 millones de personas, que constituyen más de la décima parte de la población mexicana, distribuidos en cerca de 20 mil localidades, representan la mayor riqueza de la nación y son los que más aportan en recursos humanos, naturales, territoriales y culturales, a pesar de ser los más pobres de los mexicanos.

Huicholes.

El pueblo huichol se llama a sí mismo Wirrárika o Wirraritari (en plural) Es probable que los huicholes descendan de distintos grupos que, en algún tiempo, se fueron asentando en la sierra. Los huicholes habitan en los municipios de Mezquitic y Bolaños, al norte del estado de Jalisco, así como en La Yesca y el Nayar, en el estado de Nayarit,



Figura 8 Familia Tarahumara

náhuatl, así como con el pima, el yaqui, el pueblo, el cora y

y hay grupos minoritarios en los estados de Zacatecas y Durango. La población huichola se asienta de manera dispersa en el territorio. Mientras que en Jalisco los huicholes han logrado impedir el asentamiento de mestizos al interior de sus comunidades, en Nayarit es frecuente la convivencia en el mismo territorio con Coras. El huichol está emparentado con el

el tepehuano, que forman parte de la familia

yuto-azteca. Tanto el cora como el huichol forman un subgrupo dentro del grupo sonorenses de la rama meridional. Los huicholes utilizan la expresión *tewi niukiyari*, que significa "palabras de la gente", para designar a su propia lengua. El huichol contiene préstamos importantes del náhuatl. Las relaciones con los mestizos tienen distintas facetas; durante sus viajes al exterior, el huichol estrecha sus relaciones al entablar

amistad y compadrazgo con ellos. Sin embargo, a nivel grupal, los huicholes desconfían de los mestizos por los abusos y despojos que éstos han cometido.

Tarahumaras

Los tarahumaras se llaman a sí mismos rarámuri que significa corredores a pie; proviene de las raíces: rara (pie) y muri (correr). Para ellos es sinónimo de las personas o los humanos. A los mestizos en general se les designa con el término chabochi que significa los que tienen barbas, y a los que conviven con ellos y comparten su cultura les llaman napurega rarámuri. Habitan la parte de la Sierra Madre Occidental que atraviesa el estado de Chihuahua y el suroeste de Durango y

Sonora. Comparten este territorio con los tepehuanes, pimas, guarojíos y mestizos. De los grupos originarios de la región es el más

numeroso y habita un espacio más amplio que los demás por lo que a su territorio también se le denomina sierra Tarahumara. La sierra Tarahumara (está formada por elevadas montañas que alcanzan de 2 000 a 3 000 m y profundas barrancas. Se le ha dividido geográficamente en Alta y Baja Tarahumara. Este grupo vive de manera dispersa en rancherías y pueblos en los municipios de Guadalupe y Calvo, Morelos, Balleza, Guachochi, Batopilas, Urique, Guazaparez, Moris, Uruachi, Chínipas, Maguarichi, Bocoyna, Nonoava, Carichí, Ocampo, Guerrero y Temósachi. La lengua tarahumara forma parte de la familia yuto-azteca, que se extiende desde Utah en los Estados Unidos hasta Centroamérica y está considerada junto con el concho y el guarojío dentro del subgrupo cahíta-ópata-tarahumara, emparentado con el subgrupo pima-tepehuano y el cora-huichol. La diversidad de lenguas yuto-aztecas que se hablan en el noroeste de México puede ser indicativa de que los hablantes de estas lenguas han ocupado el territorio por miles de años.



Figura 8 Tarahumaras con traje tradicional

Nahuas

El vocablo nahua hace referencia a una serie de tribus que poblaron el valle de México. Su lengua, el náhuatl que significa "hombre verdadero", es el nombre con que

históricamente se conoce al grupo. Habitado por pueblos de habla náhuatl y de las lenguas derivadas de la familia otopame, la



población indígena de esta región es la que mayor influencia ha sufrido de la población mestiza y de las transformaciones que ha tenido lugar durante el periodo colonial y republicano. Es también en esta

área donde se ha producido mayor desarrollo industrial y urbano del siglo XX, y donde los indígenas se han asimilado más rápidamente a la población mestiza. Milpa Alta es asiento de uno de

estos pueblos nahuas. Aunque políticamente pertenece al Distrito Federal, forma parte, junto con Xochimilco, de la zona más rural de la capital de la República. Milpa Alta fue un antiguo

asentamiento nahua. Actualmente es una de las 16 delegaciones políticas que conforman el Distrito Federal. Con una extensión de 27 828 ha, es una de las delegaciones rurales más extensas del valle de México. Los nahuas de Milpa Alta habitan en doce pueblos:

Villa Milpa Alta, que es la cabecera delegacional; San Antonio Tecomitl; San Francisco Tecoxpa; San Jerónimo Miacatlán; San Agustín Ohtenco, todos éstos situados al oriente de la delegación; San Pedro Atocpan, San Pablo Oztotepec, San Bartolomé Xicomulco y San Salvador Cuauhtenco localizados al sureste y, por último, al sur se encuentran

San Lorenzo Tlacoyucan, Santa Ana. Tlacotenco y San Juan Tepenahuac. La lengua náhuatl de Milpa Alta pertenece a la familia lingüística yuto-azteca, que es considerada como la más extensa del país. De acuerdo con la clasificación de W.R. Miller, el náhuatl, grupo azteca o nahua, pertenece a la rama meridional. Los pueblos que

registran un número mayor de hablantes de náhuatl son Santa Ana Tlacotenco, San Lorenzo Tlacoyucan y San Pablo Oztotepec.

6.3 Material

- Placas Petri desechables (100 x 15 mm de dm.)
- Asas bacteriológicas
- Hisopos de algodón grueso y delgado
- Portaobjetos
- Gradillas
- Tubos Ependorff
- Puntas estériles con y sin filtro de 10 μ m 200 μ m y 1000 μ m
- Micropipetas 0.5-10 μ L 5-40 μ L 20-200 μ L y de 100-1000 μ L
- Balanza analítica
- Microplacas de 96 pozos (ELKAY)
- Crioviales estériles de 2mL
- Tubos de PCR de 0.2mL

6.4 Reactivos

- Solución salina fisiológica estéril al 0.9%
- Glicerol (SIGMA)
- Base agar sangre
- Sangre de carnero desfibrinada
- Colorante para tinción de Gram.
- Reactivo de ureasa
- Peroxido de hidrogeno al 3%
- Caldo Brucella
- Buffer Tris 100mM –EDTA 1mM (TE)
- Agua destilada
- Cloroformo al 99%
- Acetato de sodio
- Etanol absoluto
- Etanol al 70%
- Agua inyectable estéril
- Buffer de PCR 10X
- Cloruro de magnesio 50mM
- dNTP's: dGTP, dATP, dCTP, dTTP (10mM 25 μ Mol)
- Iniciadores o primers 25 μ L
- *Taq* DNA polimerasa 5U/ μ m
- Acetato de amonio
- Buffer Tris-Ácido acético-EDTA 0.5M pH 8 (TAE)
- Agarosa
- Buffer de corrimiento (loading búfer)
- Marcadores moleculares de 123pb y 1Kb 1 μ g/ μ l
- Bromuro de etidio (10mg/mL)

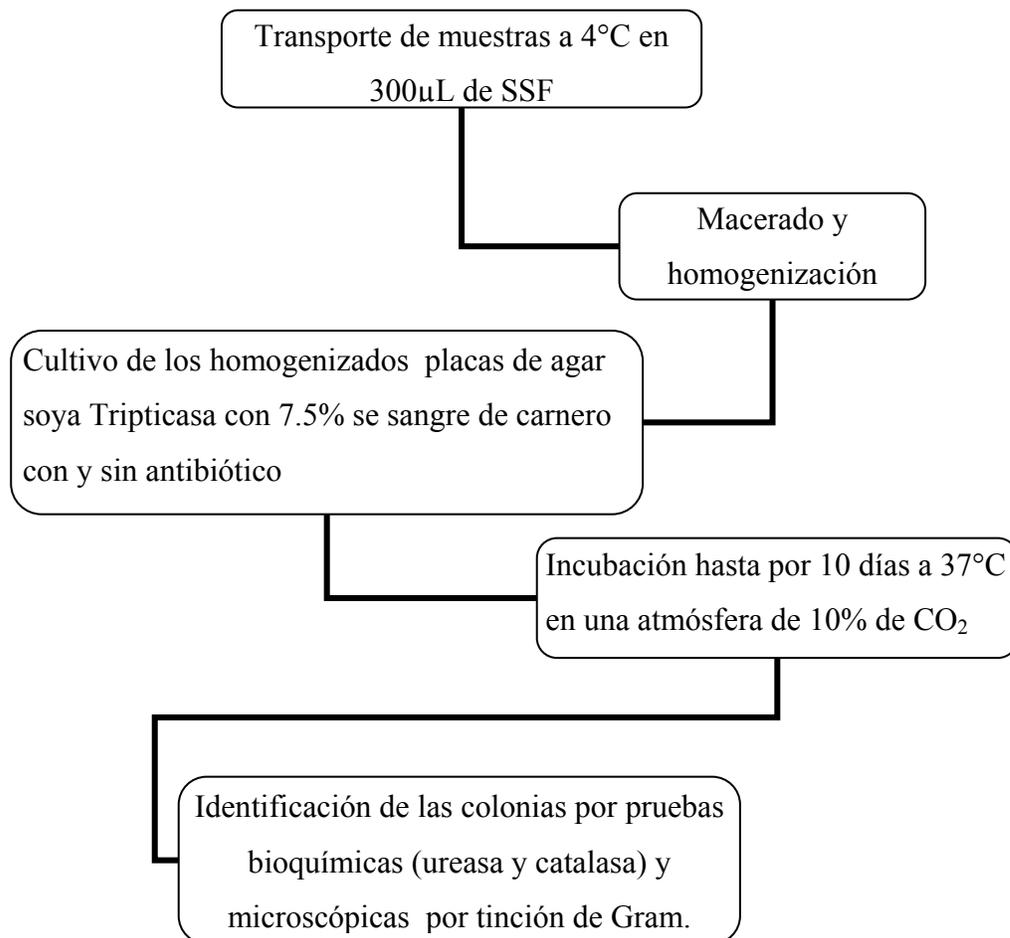
6.5 Instrumentos

- Estufa de CO₂
- Microscopio
- Refrigerador -20 °C
- Refrigerador -70°C
- Microcentrifuga refrigerada
- Campana de flujo laminar
- Termociclador
- Cámara de electroforesis Horizontal
- Fuente de poder
- Procesador de imágenes para observar geles

6.6 Procesamiento de muestras

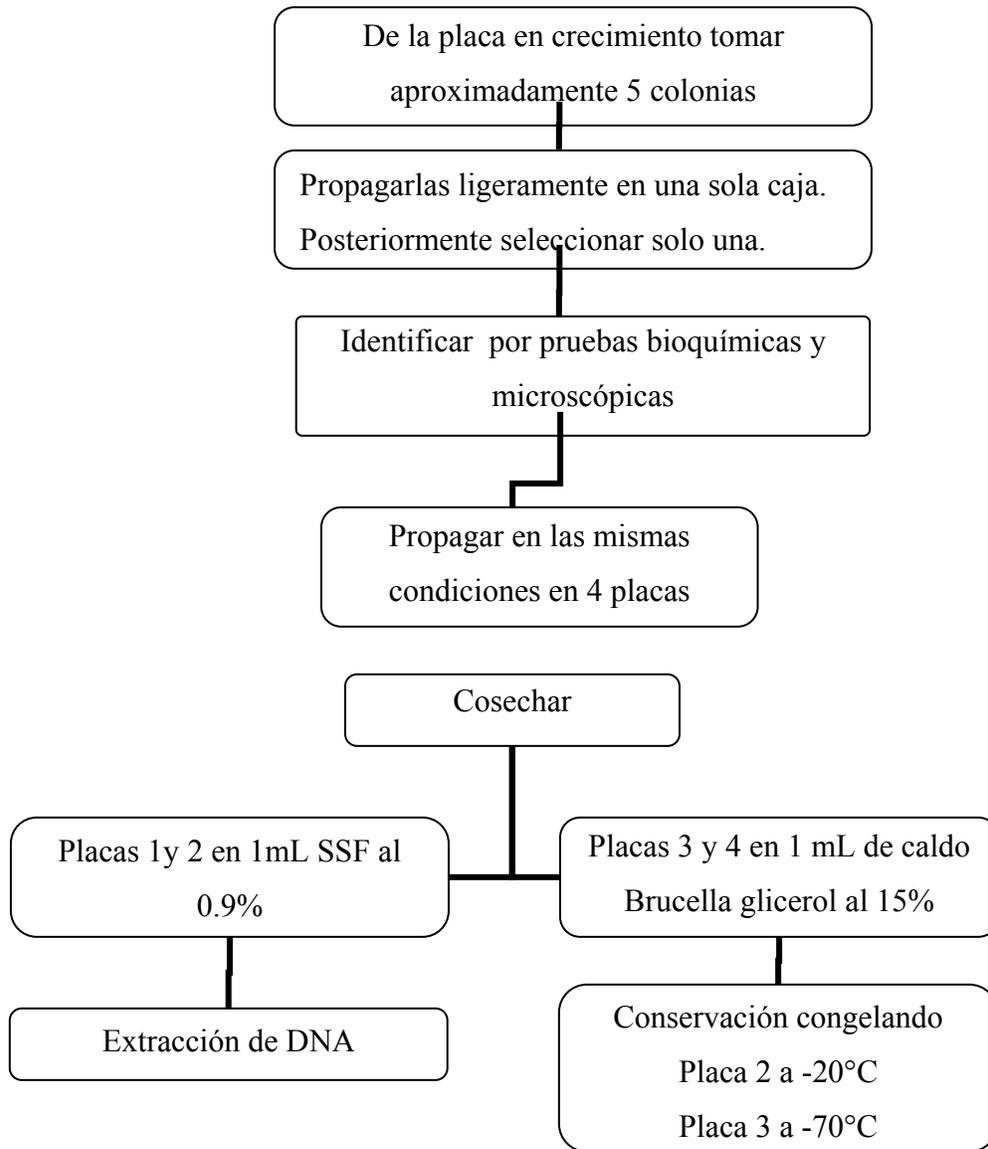
- Todas las muestras fueron procesadas en campana de flujo laminar, usando asas e hisopos estériles.
- Se utilizó como medio de cultivo agar soya tripticasa con 7.5% de sangre de carnero en placas con y sin antibiótico. (Ver Anexo cuadro 1 lista de antibióticos)
- Las muestras se incubaron en estufa bacteriológica, en un ambiente microaerofílico reducido en O₂ y rico en CO₂ (8 al 10%)
- Para las pruebas bioquímicas (catalasa y ureasa) se utilizaron microplacas de 96 pozos colocando 2 gotas de reactivo de ureasa líquida en cada pozo, diluyendo con un poco de muestra; el procedimiento es el mismo para la prueba de catalasa

Diagrama de flujo



6.7 Selección de clones

La generación de clones garantiza que al trabajar con una sola colonia los resultados serán reproducibles. Para la selección de las colonias, debe evitarse el sembrado masivo, pues ello dificulta la toma de la colonia. Se recomienda que de la placa en crecimiento solo se estríe ligeramente para que su crecimiento sea aislado y permita seleccionar fácilmente la(s) colonia(s). Una vez seleccionada la colonia esta se propaga en cantidad suficiente tanto para la extracción de DNA en solución salina fisiológica, como para su conservación en caldo Brucella glicerol. (Ver anexo tabla 2 de reactivos). Para propagar los cultivos se utilizaron hisopos gruesos estériles y para la cosecha de la bacteria se usaron hisopos delgados estériles.



6.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) diseñada en 1983 por Kary Mullis, es un método *in vitro* de síntesis de ADN; en la cual un pequeño fragmento de ADN se clona o duplica varias veces para obtener copias múltiples.

Su copiado se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa.

La reacción consta, por lo regular, de una treintena de ciclos repetitivos conformados cada uno de tres pasos:

Primero consiste en la ruptura de los puentes de hidrógeno del ADN para desnaturalizarlo, para lo que se incuba a una temperatura de alrededor de 95°C, por un minuto. Este paso expone las bases nitrogenadas del ADN blanco. Segundo ocurre la hibridación de las cadenas desnaturalizadas del ADN blanco con los denominados cebadores o primers (ADN sintético de hebra sencilla), a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias de ambas clases de ADN. Esta temperatura depende de la temperatura de fusión de los iniciadores que oscila entre 50 y 60°C. El tercer paso se efectúa a 72°C, temperatura a la que la polimerasa extiende la longitud de los primers, añadiendo los diferentes nucleótidos libres en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena que actúa como molde.

Para realizar una PCR se necesita mezclar en un tubo el ADN que contiene la secuencia a amplificar, solución amortiguadora, magnesio como catalizador, un juego de 2 “primers” que se alinearán a las cadenas simples del ADN, la mezcla de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfatados (dNTPs) en cantidades suficientes, la solución amortiguadora (buffer), agua destilada para completar el volumen final de reacción y como ingrediente fina, crucial para la reacción, la enzima Taq (ADN polimerasa termoestable). El ADN molde puede ser de tan sólo 1 ng en el caso de material genético clonado (en virus o plásmidos), o de un mínimo de 20 ng, cuando se utiliza ADN genómico proveniente de células eucariotas. La preparación de la mezcla maestra de PCR para la genotipificación de los genes *cagA*, *vacA* y *BabA* en un volumen de preparación de 25µL es la siguiente:

Tabla 3 Mezcla maestra en la preparación de PCR

Componentes	Volumen por Tubo/ μ L	Concentración final
	1X	
Agua desionizada estéril	19.85 μ L	
Búfer 10X // MgCl ₂ 15mM	2.5 μ L	1X // 1.5 mM
Mezcla dNTP 10mM	0.5 μ L	0.2 mM c/u
Mezcla de primers (25 μ M c/u)	0.5 + 0.5 μ L	0.5 μ M
<i>Taq</i> DNA polimerasa (5U/ μ L)	0.15 μ L	0.75 U/25 μ L
Subtotal	24 μ L	
Templete de DNA	1 μ L	
Total	25 μL	

El volumen de cada reactivo se multiplicó por el número de tubos totales para el número de muestras adicionando un tubo extra.

Lista de “Primers.”

Tabla 4 “Primers” usados en la tipificación de *H. pylori*

Gen	Genotipo identificado	Nombre del Primer	Tamaño del producto (pb)
<i>cag</i> PAI	<i>cag</i> PAI neg.	2	360
		25	
<i>babA</i>	<i>babA2</i>	<i>babA</i> 2f	832
		<i>babA</i> 2r	
<i>vacA</i> región media	m1		290
	m2		352
<i>vacA</i> secuencia señal	s1		259
	s2	VA1-R	286
<i>vacA</i> secuencia señal específicos	s1a	SS1-F	190
	s1b	SS3-F	187

Además del número de muestras se incluyeron controles, positivos, negativos y un blanco (agua desionizada) para cada ensayo.

Tabla 5 Controles usados en la tipificación de *H. pylori*

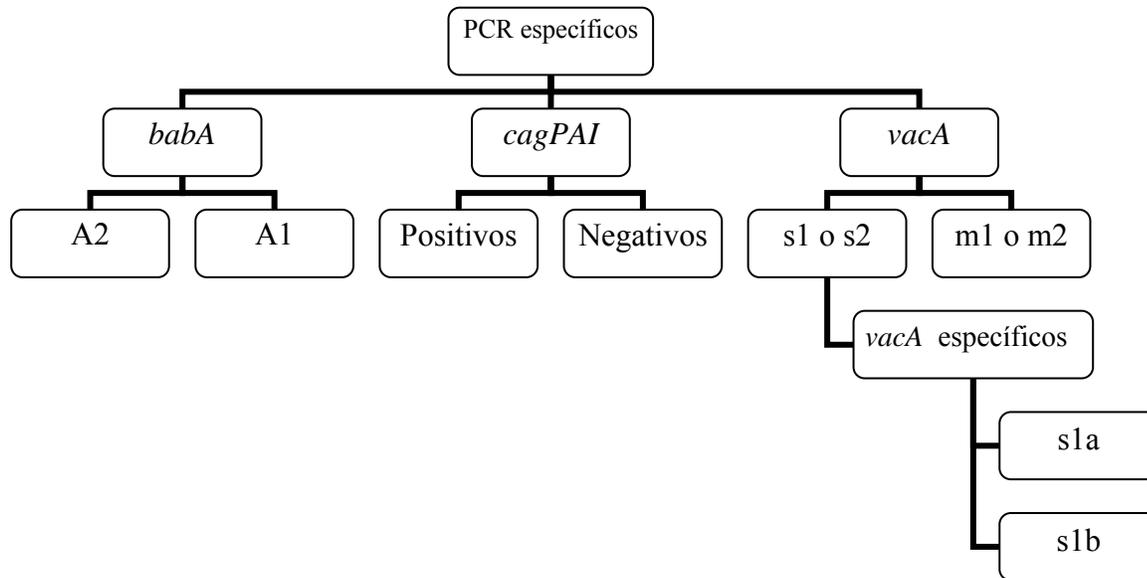
Cepa	<i>cagA</i>	<i>s1a</i>	<i>s1b</i>	<i>m1</i>	<i>m2</i>	<i>babA</i>
8822	-	-	-	-	+	
8823	+	+	-	+	-	
84183			+			
J99						+
26695						-

El programa en el termociclador para la detección de los genes fue el siguiente:

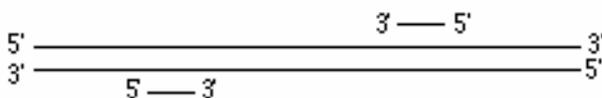
Tabla 6 Programación para la identificación de los genes *babA*, *cagA*, *vacA*

	30 ciclos de amplificación	35 ciclos de amplificación	35 ciclos de amplificación	35 ciclos de amplificación
	<i>babA</i>	<i>cagA</i>	<i>vacA</i>	<i>vacA</i> específicos
Desnaturalizar (0)				94°C por 1 min.
Desnaturalizar	94°C por 5 min.	94°C por 1 min.	94°C por 1 min.	94°C por 0.5 min.
Alinear	55°C por 1 min.	52°C por 1 min.	52°C por 1 min.	52°C por 1 min.
Extender	72°C por 1 min.	72°C por 2 min.	72°C por 1 min.	72°C por 1.5 min.
Extensión (2)	72° 10 min.	72°C por 6 min.	72 °C por 6 min.	72 °C por 5 min.
Enfriar	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞	4°C ∞

Diagrama de flujo para PCR específicos

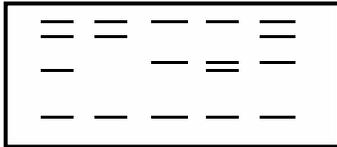


Los “primers” usados para determinar la presencia del gen *babA*, como se indica en el diagrama detectan dos subtipos A1 y A2 de los cuales A2 es el importante ya que es el que se asocia con virulencia principalmente. En el caso del gen *cagA* este se determino basándose en la presencia de la isla de patogenicidad de *cag* (*cag PAI*). Los “primers” usados para tal propósito detectan el espacio vacío (donde debería estar la isla), e indirectamente hacen posible determinar la presencia de *cagA*. En cuanto a *vacA* se utilizaron “primers” que detectan variaciones alelicas de 2 regiones del gen, s (por secuencia señal) y m (por región media) Los alelos de s pueden ser: s1 (s1a, s1b o s1c) o s2 y los de m m1 o m2. La especificidad en las regiones se determino utilizando primers específicos. **PCR-RAPD** (Random Amplified Polymorphic DNA-PCR) por sus siglas en ingles es una técnica de *fingerprinting* (“huella digital”) utilizada comúnmente para determinar variaciones genéticas en ADNs de un mismo origen. El principio básico de esta técnica es el uso de un solo “primer” con una secuencia corta de oligonucleotidos el cual, se une a diferentes sitios al azar y se utiliza para amplificar secuencias aleatorias de un templete complejo de ADN. Esto significa que los fragmentos amplificados generados por el PCR dependen de la longitud y tamaño del cebador y el genoma designado.



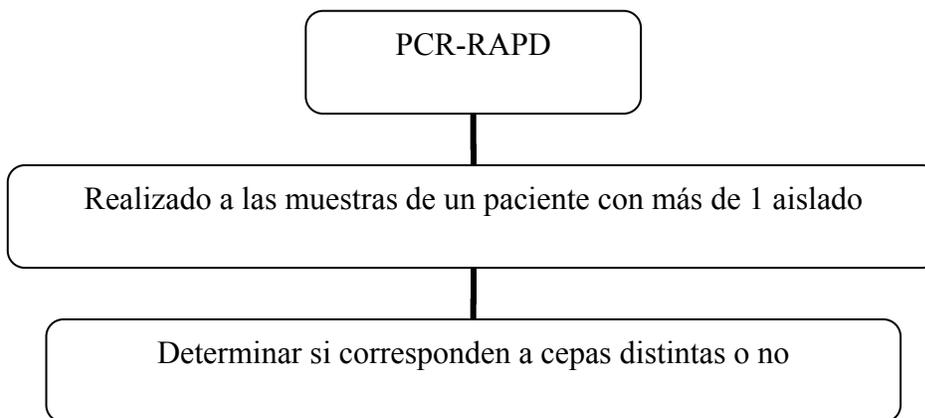
El primer ubica las secuencias complementarias

El resultado de anexar dicho fragmento es la amplificación de productos del genoma (al complementarse con las hebras de la cadena de ADN opuestas) dentro de una distancia que es amplificable por PCR. El uso de solo 10 oligonucleotidos promueve la generación de varios productos de ADN discretos y éstos, se considera, originan sitios genéticos diferentes. En otras palabras, observaremos distintas bandas referentes a los sitios en los que el “primer” se unió.



Representación de posibles productos de RAPD

Diagrama de flujo para PCR inespecíficos.



La técnica de PCR-RAPD se aplica solo a aquellas muestras de cuyo paciente se obtuvieron más de un aislado, esto es, si se poseen muestras de jugo gástrico, antro y/o cuerpo. Esto con la finalidad como se ha comentado, de determinar si existe variación genética de la bacteria en un mismo paciente. Las cantidades de la mezcla maestra para la elaboración de PCR-RAPD cambian en comparación a la mezcla elaborada para la genotipificación de los genes específicos.

Tabla 7 Mezcla maestra en la preparación del patrón RAPD-PCR

Componentes	Volumen por Tubo/ μ L	Concentración final
	1X	
Agua desionizada estéril	15 μ L	
Búfer 10X	2.5 μ L	1X // 1.5 mM
MgCl ₂ (50mM)	2.5 μ L	5.0 mM
Mezcla dNTP 10mM	2.5 μ L	1.0 mM c/u
Mezcla de primers (25 μ M c/u)	1.0 μ L	20 pMol
<i>Taq</i> DNA polimerasa (5U/ μ L)	0.5 μ L	0.75 U/25 μ L
Subtotal		
Templete de DNA	1 μ L	
Total	25 μL	

Se utilizaron 2 tipos de “primers”, unos de secuencia corta de 10 oligonucleótidos, y otros de secuencias largas con 20 y 23 oligonucleótidos (ver Tabla).

Tabla 8 Tipos de “primers”

Primer	Secuencia	Longitud	% G+C
1254	CCG CAG CCA A	10	70
1281	AAC GCG CAA C	10	60
D11344	AGT GAA TTC GCG GTGAGA TGC CA	23	52
D14307	GGT TGG GTG AGA ATT GCA CG	20	55

6.9 Identificación de productos de PCR

- Los productos de PCR se identificaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% en Buffer-ácido acético-EDTA 1x (TAE) (Ver anexo preparación)
- Se mezclaron 1.0µL de Buffer de corrimiento (Loading Búfer) con 5 µL del producto de PCR, y se coloca esta mezcla en cada poso del gel además de marcador de peso molecular de 1Kb (ver anexo preparación)
- El orden de colocación de las muestras en los geles de agarosa fue la siguiente:

Marcador 1kb	Muestra 1	Muestra 2	Control positivo	Control negativo	Blanco
-----------------	-----------	-----------	---------------------	---------------------	--------

- La electroforesis horizontal se corrió a 100 voltios por 30 min. (Ver Anexo procedimiento)
- Los geles de agarosa se tiñeron en una solución de bromuro de etidio (100µL de bromuro de etidio a 10mg/mL en 500 mL de búfer TAE 1x) durante 10 min.
- Los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio se observaron en luz ultravioleta en un procesador de imágenes SYNGENE
- Se determinó como amplificación positiva cuando la muestra presenta una banda de tamaño igual a la banda de los controles positivos.
- En el caso del PCR inespecífico (RAPD) se comparan las bandas de las muestras de distintas regiones del estómago de un mismo paciente y se establece si las bandas son iguales o no; ello sería interpretado como la presencia de 2 cepas de *H. pylori* distintas.

VII. Resultados

A continuación se muestra una Tabla con los resultados globales de la genotipificación de las cepas aisladas de los 3 grupos indígenas estudiados.

Tabla 9 Genes tipificados para *H. pylori* en pacientes indígenas

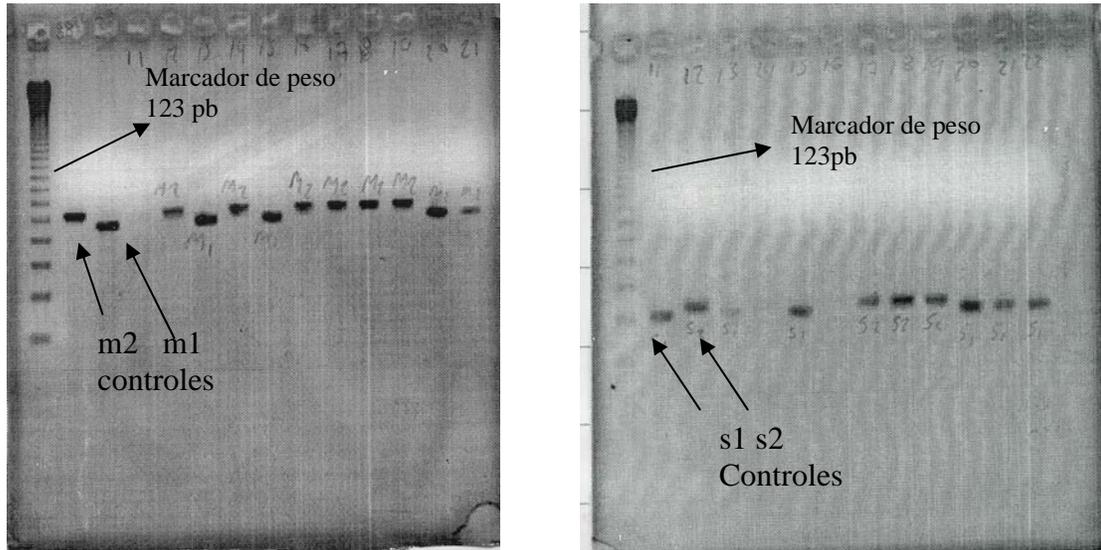
Id	Grupo indígena	Mta.	Región	<i>vacA</i>	<i>s1a</i>	<i>s1b</i>	<i>cagPAI</i>	<i>babA</i>	RAPD
1	N	1	JG	s1m1	-	+	+	2	1
2	N	1	A	s1m1	+	-	+	2	2
3	N	1	C	s1m1	-	+	+	2	1
	N	2	JG	s1m1	-	+	+	2	1
5	N	3	JG	s1m1	+	-	+	2	1
6	N	3	JG	s1m1	+	-	+	2	1
7	N	4	JG	s2m2	nd	nd	-	1	1
8	N	5	JG	s2m2	nd	nd	-	1	1
9	N	6	JG	s1m1	+	-	+	1	1
10	N	7	JG	s1m1	-	+	+	1	1
11	N	8	JG	s1m1	-	+	+	1	1
12	N	9	JG	s1m1	-	+	+	1	1
13	N	10	JG	s1m1	-	+	+	2	1
14	N	11	JG	s1m1	-	+	+	1	1
15	N	12	JG	s2m2	nd	nd	-	1	1
16	N	13	JG	s1m1	-	+	+	2	1
17	N	13	A	s1m1	-	+	+	2	1
18	N	13	C	s1m1	-	+	+	2	1
19	N	14	JG	s1m1	-	+	+	1	1
20	N	15	JG	s1m1	-	+	+	1	1
21	N	16	JG	s2m2	nd	nd	-	2	1
22	N	17	JG	s2m2	nd	nd	-	2	1
23	N	18	JG	s1m2	-	+	+	2	1
24	N	19	C	s1m1	+	-	+	2	1
25	N	20	JG	s1m1	+	-	+	1	1
26	H	21	JG	s1m2	-	+	+	2	1
27	H	22	JG	s1m2	-	+	-	2	1
28	H	23	JG	s1m2	-	+	-	2	1
29	H	24	JG	s1m2	-	+	-	2	1
30	H	25	JG	s1m2	-	+	+	2	1
31	T	26	JG	s1m1	+	-	+	2	1
32	T	27	JG	s1m1	+	-	+	1	1
33	T	28	JG	s2m2	nd	nd	-	1	1
34	T	29	JG	s1m1	-	+	+	2	1
35	T	30	JG	s2m2	nd	nd	-	1	1
36	T	31	JG	s1m1	-	+	+	1	1
37	T	32	JG	s1m1	-	+	+	1	1
38	T	33	JG	s1m1	-	+	+	1	1
39	T	34	JG	s1m2	-	+	+	1	1
40	T	35	JG	s1m1	-	+	+	1	1
41	T	36	JG	s2m2	nd	nd	-	2	1
42	T	37	JG	s2m2	nd	nd	-	1	1

T= Tarahumara, N= Nahuas H= Huichol JG= jugo gástrico A= antro C= cuerpo nd= No determinado

Gen *vacA*

Todas las muestras procesadas para la genotipificación del gen *vacA* por PCR amplificaron productos del gen, confirmando la presencia de al menos alguno de los alelos.

Figura 10. Geles de agarosa donde se muestran los alelos s y m del gen *vacA*



En el gel de la izquierda se observa el alelo s. Se nota claramente la diferencia de pesos entre los tipos s1 y s2.

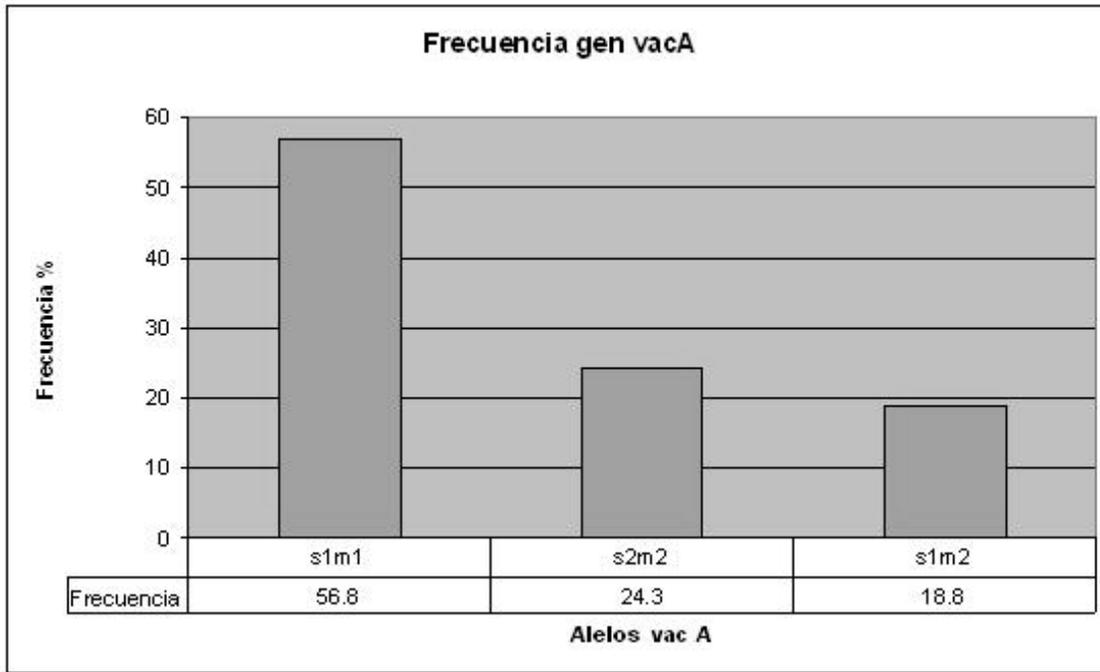
El primer pozo (de izquierda a derecha) corresponde al marcador de peso molecular de 123 pb. Los dos siguientes corresponden a los controles 8823 para s1 y 8822 para s2.

En el gel de la derecha se observan los productos de PCR amplificados para el alelo m en el mismo orden que para s. En el segundo y tercer pozo se señala la presencia de los controles. 8822 para m2 y 8823 para m1.

Frecuencias de *vacA*

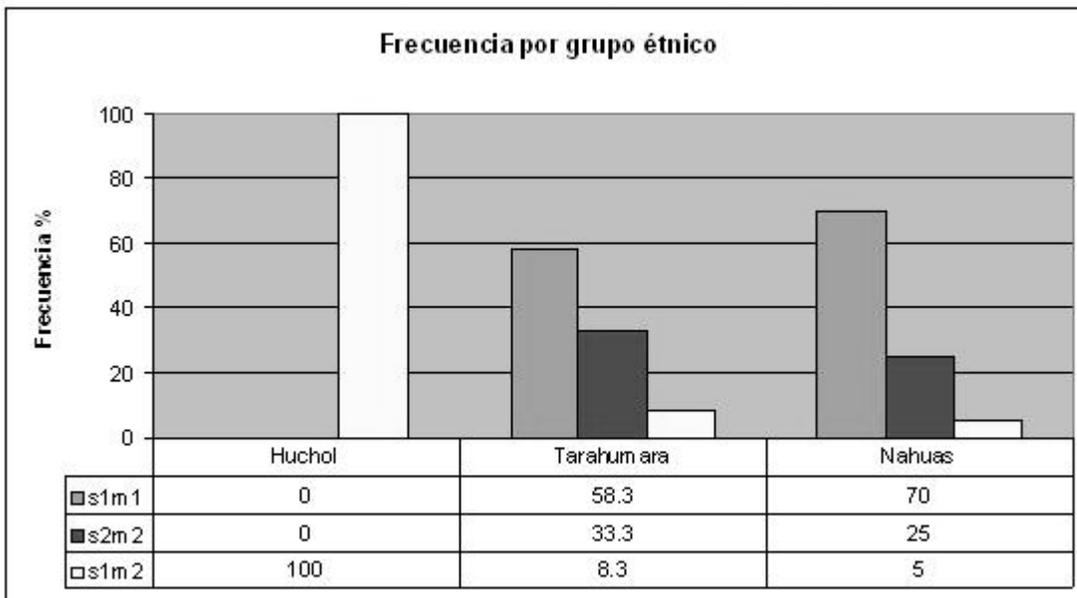
La combinación de los tipos alélicos s y m más frecuente fue s1m1 en más del 50% de las cepas, en tanto que la menos frecuente fue s1m2 como se muestra en la figura 11.

Figura 11. Frecuencia de los tipos alélicos del gen *vacA*



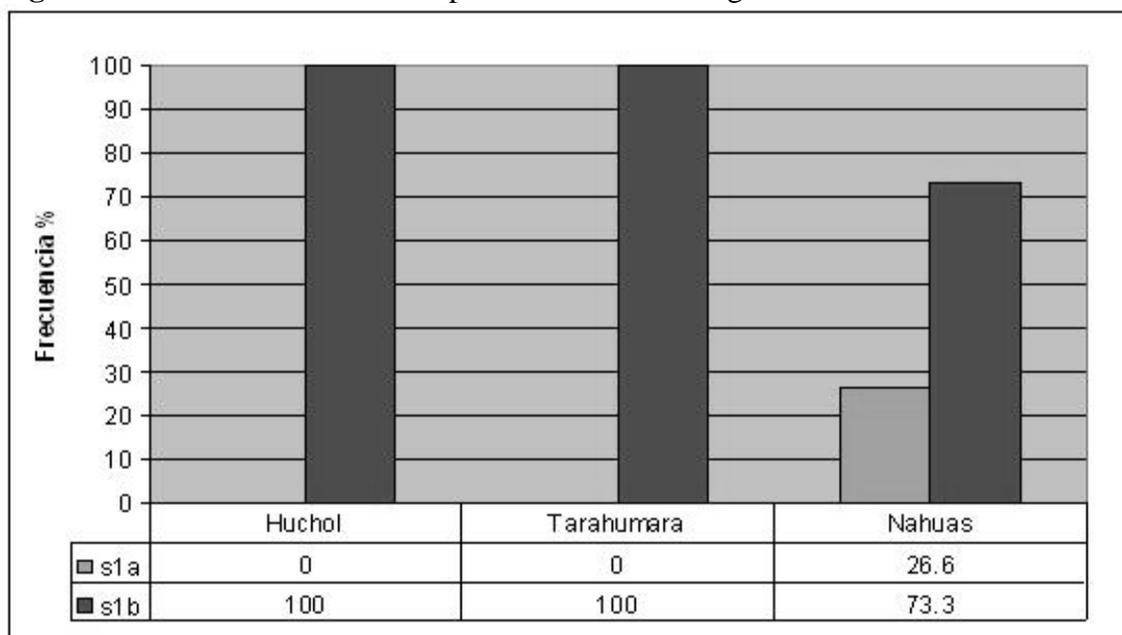
Es importante resaltar que el 100% de las muestras de los indígenas Huicholes corresponden al tipo s1m2. Mientras que los Nahuas y Tarahumaras mantienen una proporción entre sí, semejante siendo el tipo s1m2 el de menor frecuencia en ambos grupos étnicos.

Figura 12. Frecuencia de los tipos alélicos del gen *vacA* por grupo étnico



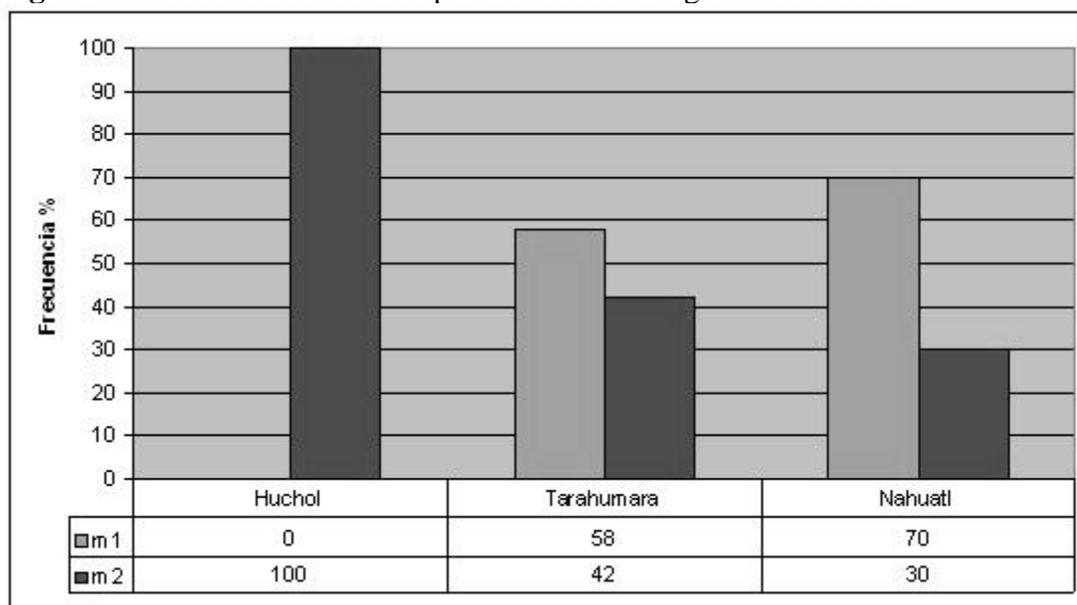
En cuanto a los subtipos alélicos de *vacA*, s1b es el de mayor frecuencia, solo con los nahuas se presentan algunas muestras con el subtipo s1a como puede apreciarse en la figura 13.

Figura 13. Frecuencia de los subtipos alélicos de s1 del gen *vacA*



Se observa claramente el predominio del alelo s1b. Por otro lado se muestran la frecuencia de los alelos de la región media.

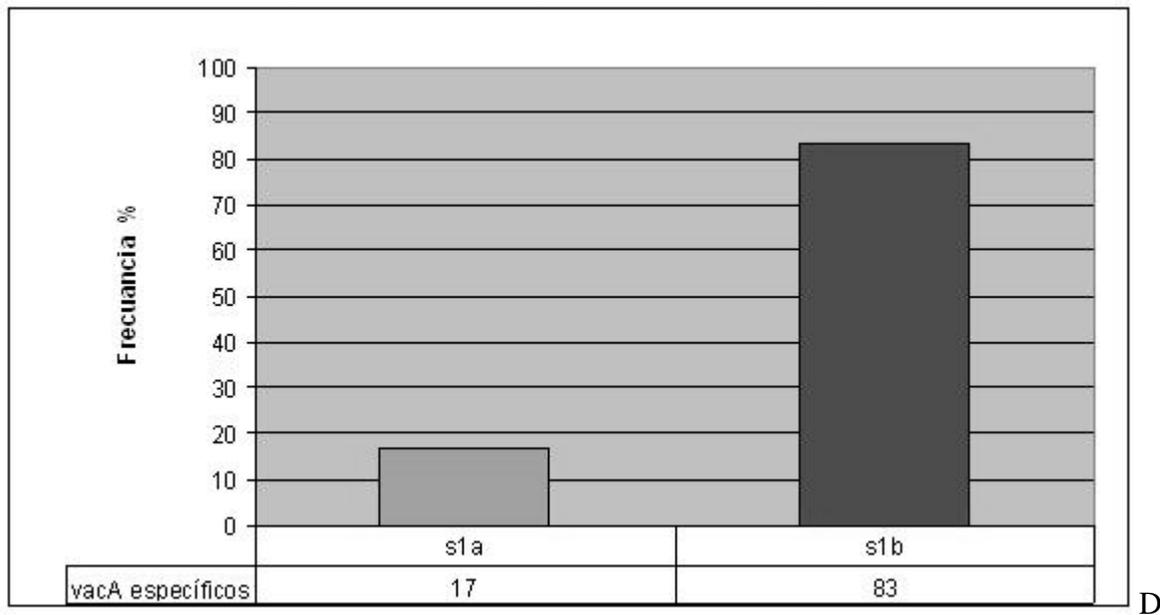
Figura 14 Frecuencia de los subtipos alélicos de la región media de *vacA*



Al igual que con la región de la secuencia señal los Huicholes presentan de manera absoluta al alelo m2 de la región media, y este a la vez se encuentra en menor proporción en Tarahumaras y Huicholes.

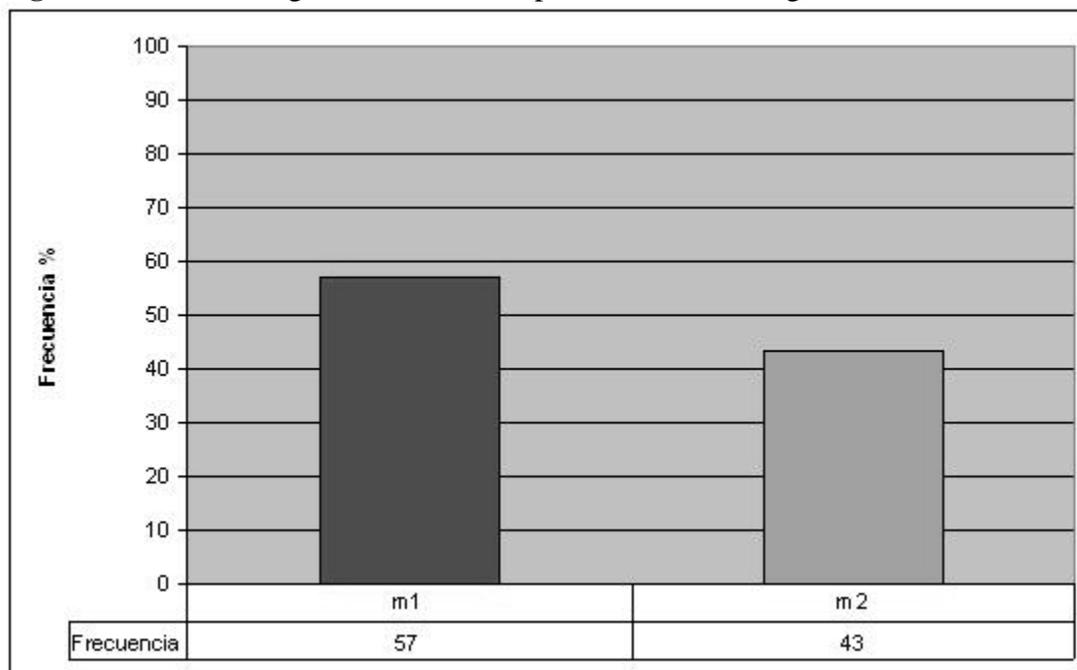
A continuación se presentan las frecuencias generales de los distintos alelos para observar como se manifiestan en los tres grupos.

Figura 15 Frecuencia general de los subtipos alélicos de s1 del gen *vacA*



e manera general, se observa contundentemente como el subtipo s1b rebasa más del 80% siendo dominante su presencia.

Figura 16 Frecuencia general de los subtipos alélicos de la región media de *vacA*

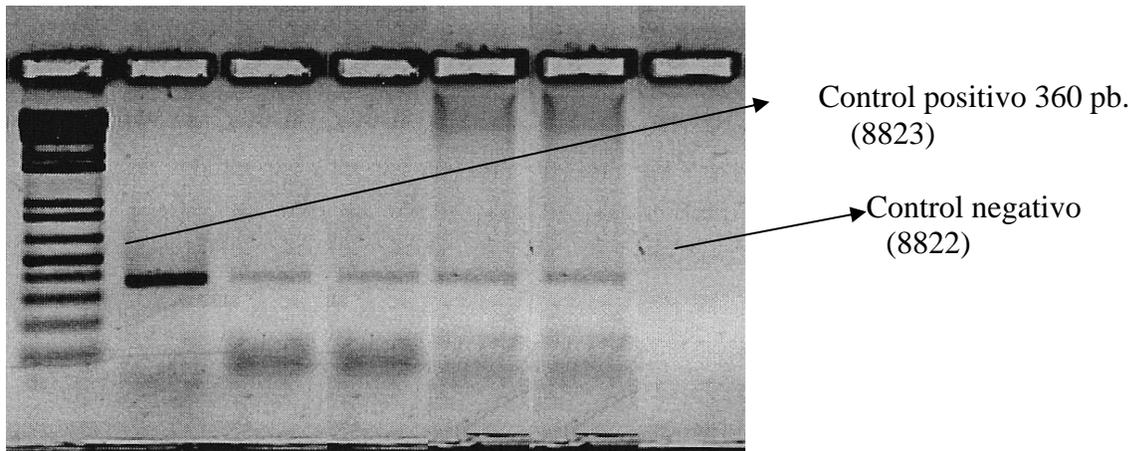


En este caso la proporción de m1 y m2 es similar aunque m1 tiene una frecuencia mayor, cercana al 60%.

Gen *cagA*

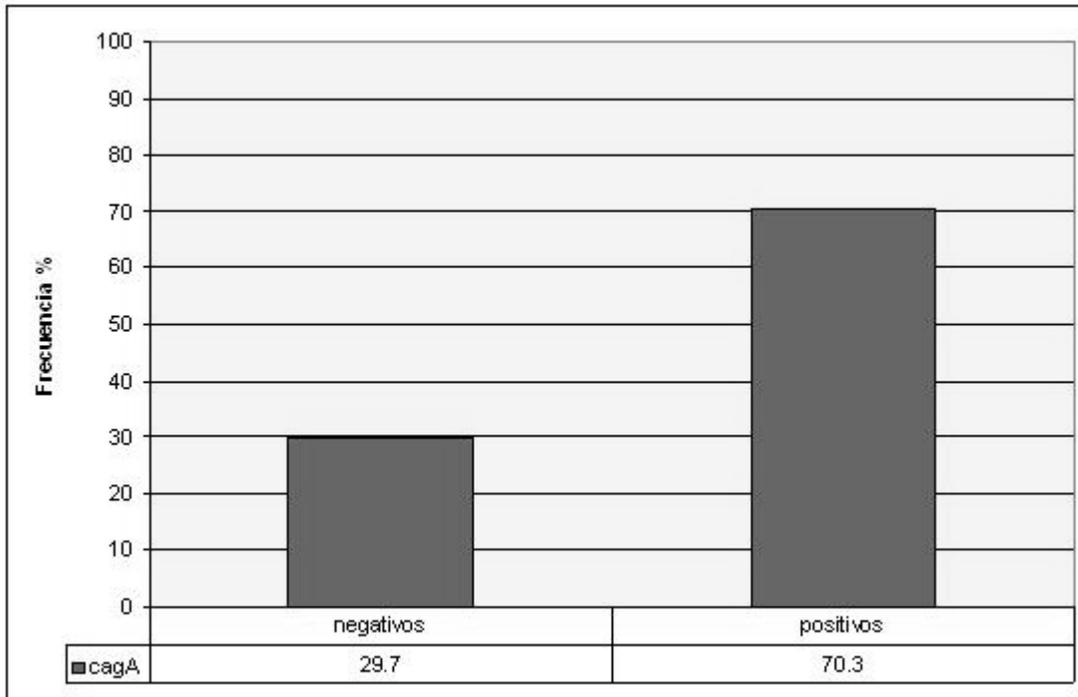
No todas las cepas amplificaron el producto de 360 pb que se obtiene cuando se utiliza el juego de primers usado en este trabajo. En la figura 5 se muestra el producto amplificado en varias de las muestras (carriles 3, 4 5 y 6). Se muestran también los controles positivo (carril 2) el control negativo (carril 7) el cual es la muestra (8822).

Figura 17. Muestras con la presencia del gen *cagA*



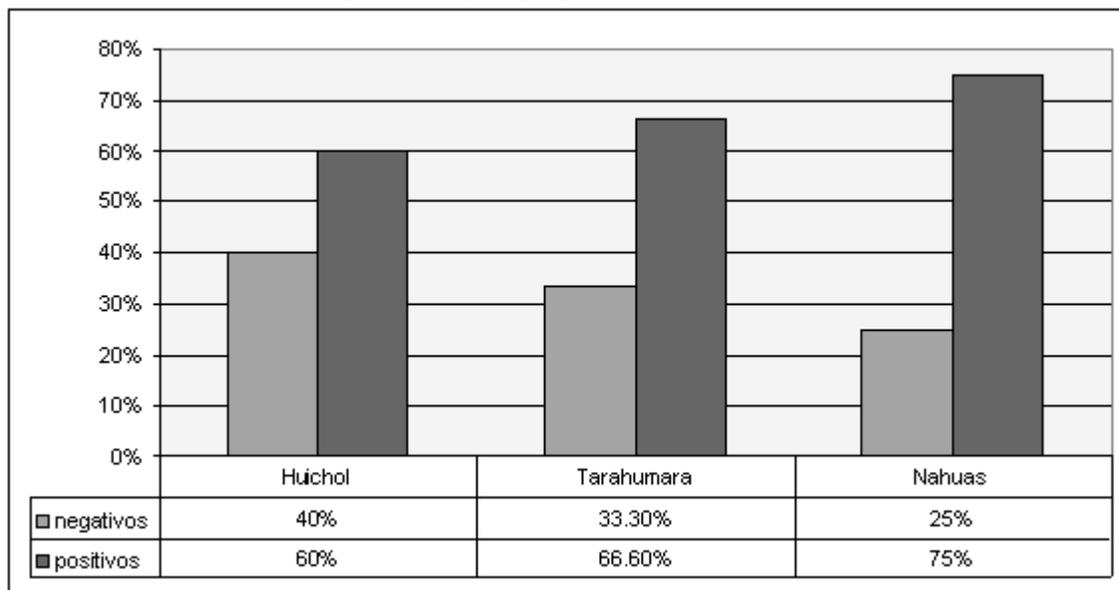
La gran mayoría de las muestras presentaron el gen como se muestra en la figura 17 con más del 70% de las muestras y por tanto se confirma la presencia de la isla de patogenicidad (PAI) en donde se ubica el gen. Recientemente se ha encontrado que algunas muestras de *H. pylori* que tienen en su genoma a la PAI no necesariamente presentan el gen *cagA*.

Figura 18. Frecuencia del gen *cagA*



La presencia de gen es muy similar en los tres grupos étnicos, ya que en estos tienen una frecuencia promedio de 67% y es en los tres casos muy superior a los que carecen del gen.

Figura 19 Frecuencia del gen *cagA* por grupo étnico



Gen *babA*

El producto de la amplificación de 832 pb del juego de primers para la determinación de la presencia del gen *babA* usado en este trabajo como puede verse en la figura 8 es uno de los de mayor tamaño cuando se compara con los productos de los otros genes. En la figura pueden apreciarse además de una muestra positiva y otra negativa el marcador de peso de 123pb (carril 1) y los controles positivo (cepa J99) y negativo (cepa 26695).

Figura 20. Muestras positivas al gen *babA2*



Control positivo 832 pb.
(Cepa J-99)

Control negativo
(cepa 26695)

Las frecuencias de *babA* determinadas con los primers usados en el trabajo fueron apenas del 46% y la mayoría fue *babA1*.

Figura 21. Frecuencia del gen *babA2*

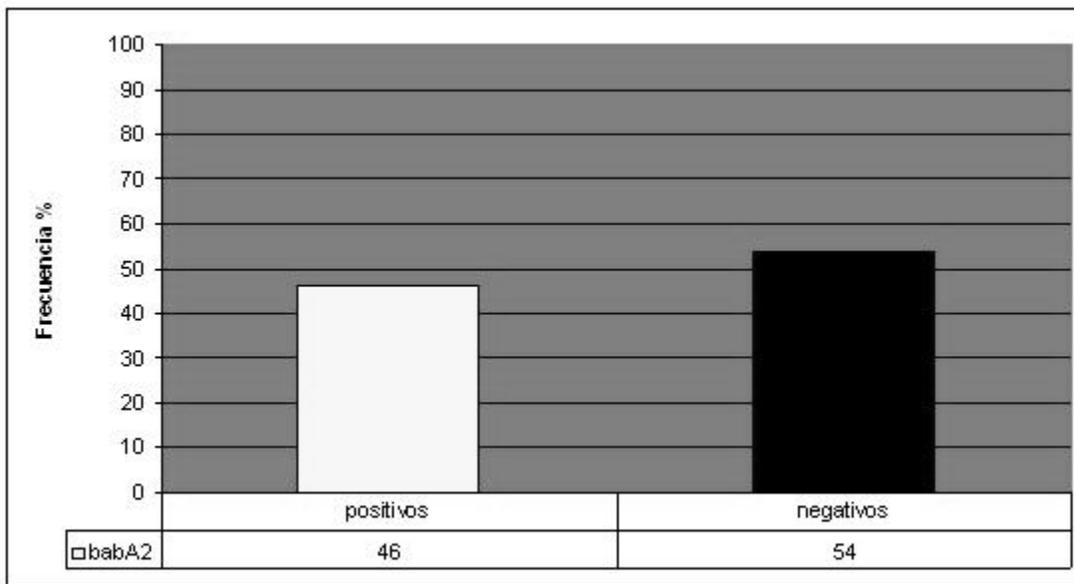
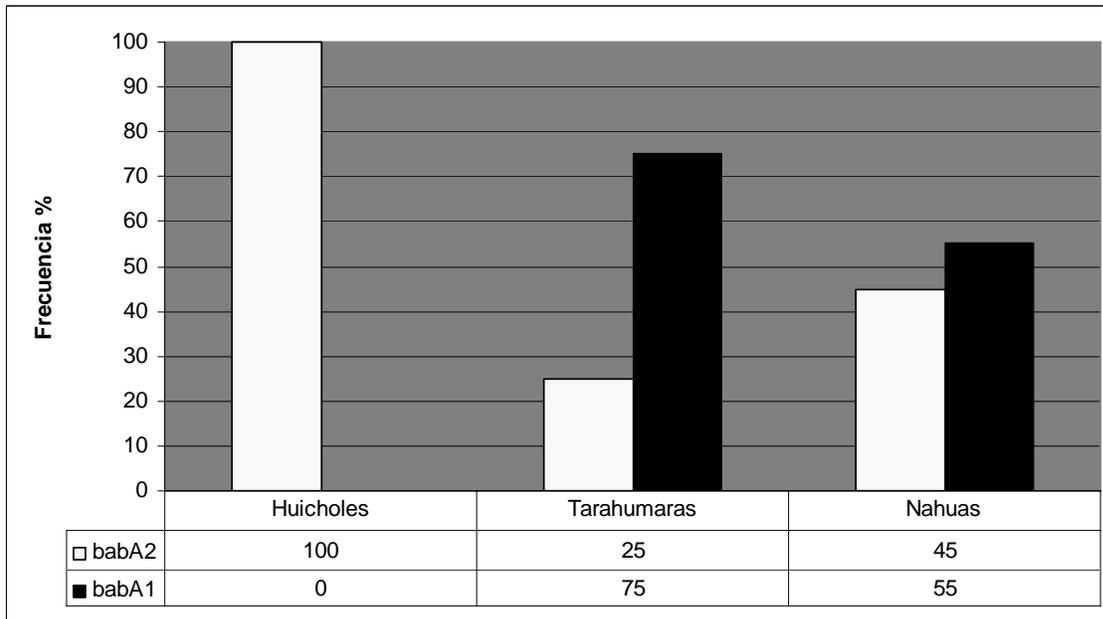


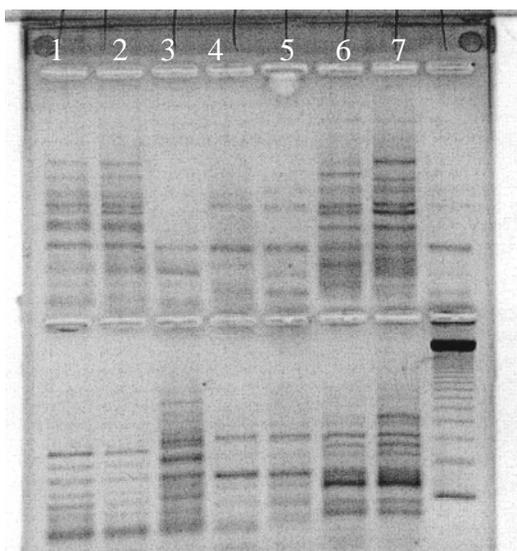
Figura 22 Frecuencia del gen *babA2* en los distintos grupos étnicos



El gen *babA2* se manifiesta de manera similar a como se presentó el gen *vacA* en donde los indígenas Huicholes tienen el 100% de sus muestras positivas para el gen *babA2* (como en el caso del gen *vacA*, donde el 100% de las muestras era del tipo s1m2) y por otro lado *babA2* se presenta en menor proporción en los grupos de Tarahumaras y Nahuas (Al igual que en el gen *vacA* donde el tipo s1m1 también fue el de menor proporción).

PCR-RAPD

Figura 23 Muestras clínicas procesadas por técnica PCR-RAPD



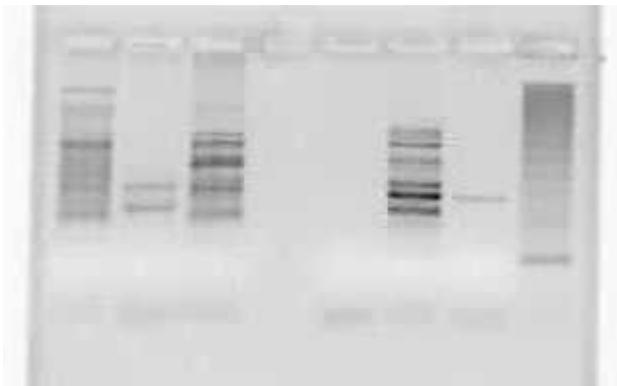
Esta es la imagen común del patrón RAPD. Observe como hay casos (como en los pozos 1 y 2) en donde el patrón de bandas es idéntico, ya que estas corresponden a colonias de *H. pylori* de un mismo paciente, y que este patrón de bandas varía con relación a los pozos 4 y 5 y estas a su vez de los pozos 6 y 7 que pertenecen a colonias de otros pacientes.

8 9 10 11 12 13 14

Es un hecho común que se encuentren distintos patrones RAPD en *H. pylori* aislados de distintos pacientes, aunque no resulta raro que un paciente presente aislado con más de un patrón (infección múltiple) o que 2 pacientes estén colonizados con *H. pylori* con un mismo patrón (infección intrafamiliar).

Las muestras de los pozos del 8 al 14 son las mismas pero utilizando otro primer; nótese que las bandas son distintas con relación a los pozos del 1 al 7 pero la similitud del bandeo entre colonias mantienen la misma relación con los pozos anteriores. El primer usado en los pozos 1 al 7 fue el 1254 y los pozos marcados del 8 al 14 fue el primer 1281.

Figura 24 Patrón RAPD con variación en un mismo paciente.



En este gel, por el contrario observamos que las muestras marcadas con el grupo **1** (colonias de un solo paciente), la muestra **1a** muestra un patrón distinto, es decir, que un mismo paciente está colonizado con más de una cepa de la bacteria.

VIII Discusión

Helicobacter pylori y su distribución mundial

De acuerdo a los estudios de Van Doorn y cols (47). (Ver figura 25) en Norteamérica, *s1a* y *s1b*, los subtipos alélicos de la región s de *vacA* predominantes en esta región, se presentan en porcentajes similares (cerca del 50%) Sin embargo, dichos estudios se realizaron solamente en pacientes infectados con *H. pylori* de nacionalidad Estadounidense y Canadiense sin contemplar a la población Mexicana.

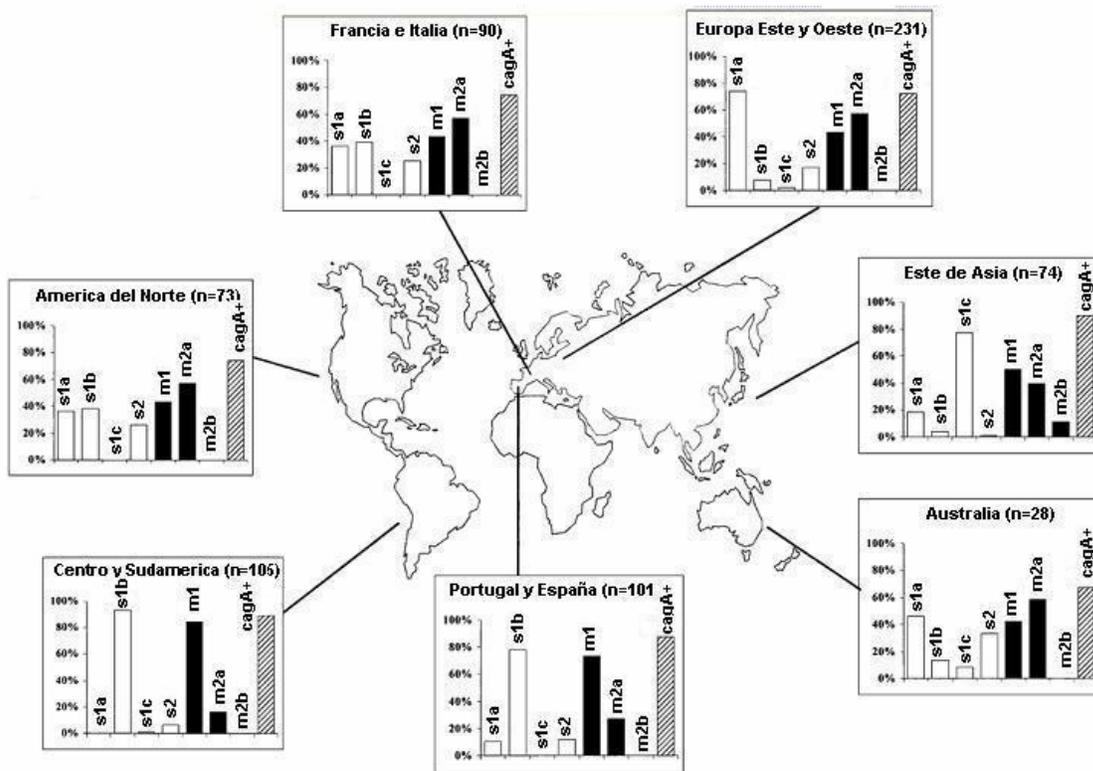
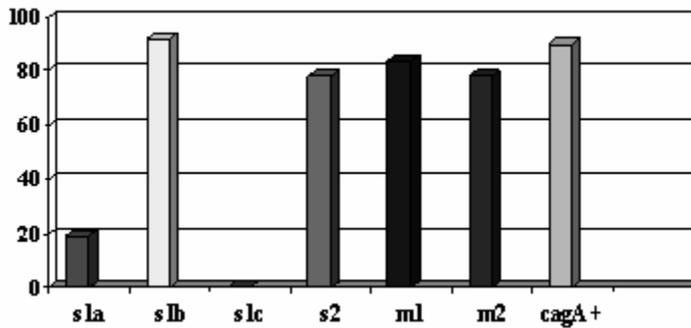


Figura 25 Distribución geográfica de la secuencia señal y la región media del gen *vacA* y *cagA* de *H. pylori*

Estudios en México por González-Valencia y cols (35) y Morales Espinosa y cols. (36) mostraron que el subtipo *s1b* se presenta en mayor proporción que el subtipo *s1a*. (Pacientes mestizos) Figura 26.

Figura 26 Frecuencia de los subtipos alélicos de *vacA* de la secuencia señal y la región media del gen *vacA* y *cagA* de *H. pylori* en México.



En nuestro estudio observamos que la frecuencia de los subtipos alélicos en pacientes indígenas (considerando a los tres grupos étnicos) es muy parecida; ya que la frecuencia de dichos subtipos es de 17% para el subtipo s1a por 83% del subtipo s1b. Esta proporción es similar a la que reporta Van Doorn pero en poblaciones europeas principalmente en España, Portugal y países de Europa occidental. Estos resultados muestran aparentemente una clara diferencia entre los tipos alélicos de *vacA* en México sobre todo comparado con la de países de esta zona como Canadá y Estados Unidos, pues en esta región como ya se ha comentado la presencia entre s1a y s1b es semejante. De allí la importancia de estudiar grupos indígenas de México ya que, si analizamos de manera independiente a cada grupo étnico observamos que tanto los Tarahumaras como los Huicholes presentan, únicamente el subtipo alelico s1b, y esto es comparable con lo encontrado por Van Doorn en Sudamérica, donde el subtipo s1a está ausente también. Reportes similares han sido realizados por otros grupos (48). Según datos del Instituto Nacional Indigenista (49), los Huicholes fueron una comunidad que tuvo muy poco contacto con el imperio Azteca y el sometimiento con la corona española fue limitado. Hoy en día, este grupo étnico conserva sus costumbres y tierras principalmente en la sierra de Nayarit. Misma situación viven hoy día los Tarahumaras que es hasta la llegada de los Jesuitas (un siglo después de la conquista) donde ésta comunidad tiene contacto con europeos y mestizos sin relacionarse completamente. En suma, la recombinación genética que pudiesen tener ambas grupos étnicos es limitada. Es probable que el subtipo s1b que se encuentra hoy en dichos pacientes se haya mantenido a través del tiempo; a diferencia de otros grupos como lo son los pacientes Nahuas, que como se sabe, desde la llegada de los españoles hasta nuestros días, dichas comunidades han tenido contacto con distintos grupos, por ende, la posibilidad de transmisión de *H. pylori* es mayor (considerando la hipótesis de que la transmisión sea

oral-oral u oral- fecal) y en consecuencia la recombinación genética de la bacteria. Revisando de nuevo el mapa de Van Doorn; la incidencia de los subtipos alélicos de *vacA* s1a y s1b que se presentan en la región de Iberica, son muy similares a los encontrados tanto en pacientes indígenas nahuas como en los encontrados en la investigación de González Valencia con pacientes mestizos. En las investigaciones de Falush y cols.(4) mediante el estudio de las secuencias del DNA de *H. pylori* sostienen la teoría de que la infección de la bacteria se produjo por primera vez en el este de Asia y África y de ahí se ha ido distribuyendo en la población a través de las distintas migraciones del hombre siendo la migración del estrecho de Bering una de las primeras hace 12,000 años. Sin embargo son estas cepas las que según dicha investigación sufrieron menos cambios en su proceso de migración. Aparentemente, hay diferencias entre la frecuencia de asociación con enfermedad gastroduodenal y características estructurales de los genes *vacA* y *cagA* entre cepas asiáticas y del resto del mundo, incluidas las Americanas, que son claramente ejemplificadas por la presencia en Asia del subtipo alélico s1c, no presente, aparentemente en otras partes del mundo.

Respecto a *vacA*, además de las diferencias de los alelos de la región s de *vacA*, también se han descrito diferencias con respecto a un subtipo alélico de la región media: m2b el cual, también solo se presenta en mencionada área geográfica. Otro gen importante que presenta diferencias en secuencias particulares entre las cepas asiáticas respecto a las de otras partes del mundo es *cagA*, sin embargo este estudio no contemplo su análisis, por lo que no se discutirá aquí. Estudios recientes han descrito la presencia del subtipo alelico de *vacA* en indígenas de Venezuela (50). En México dentro del grupo de Investigación en el que esta Tesis fue realizada se detectó por secuenciación la presencia del alelo s1c en una cepa aislada de un Huichol. Como parte de los resultados del presente trabajo esto es importante ya que con estos descubrimientos cabe mencionar que es muy probable que el subtipo s1c tuviera presencia en el continente y que este fue desplazado por el tipo s1b que es el que actualmente predomina. En el estudio de Morales y cols. se encontró que en México la infección mixta por *H. pylori* en un solo paciente es mayor que en otras poblaciones, esto demuestra no solo la diversidad genética de la bacteria, también de cierta forma ayuda a entender los distintos cambios que se presentan en la incidencia de los genes caso concreto de *vacA* en diferentes regiones del mundo.

Por otro lado analizando al gen *cagA* observamos que tanto las cepas de pacientes indígenas como en los pacientes mestizos indican que la frecuencia de *cagA* es muy similar en ambos casos (por encima del 70%), estos porcentajes son similares a los de otras distintas regiones del mundo, principalmente los países en desarrollo de occidente. A diferencia de *vacA* este gen no se presenta en todas las cepas no obstante se manifiesta en un porcentaje significativo (aproximadamente 60%) (51).

Ya se ha comentado la importancia de la asociación de distintos genes concretamente *cagA*, y *vacA* en el desarrollo de enfermedades gastrointestinales. Diversos estudios indican que la presencia de los genes *cagA* en combinación con los tipos alélicos *s* y *m* de *vacA* concretamente *s1m1* y *babA2*, es la combinación que tiene mayor asociación a padecimientos gastroduodenales como la úlcera duodenal y padecimientos mayores como metaplasia intestinal (33). No obstante en México esta relación no parece tan clara.

Según estudios de González y cols. Tanto pacientes con úlcera duodenal como individuos sin úlcera presentaban cepas *cagA*⁺ *vacA* *s1m1* al igual que los estudios de Morales y cols. En los cuales aparentemente como ya se ha comentado la infección mixta parece ser un factor más importante que la asociación particular de los alelos de *vacA* o los tipos *cagA* ya que, este tipo de infección fue más frecuente en pacientes con úlcera duodenal que en pacientes con gastritis. Incluso en ambos estudios se describió el tipo *s2m1* el cual no se había encontrado en Europa ni en Estados Unidos. En las comunidades indígenas estudiadas no fue posible establecer la asociación de estos genes de virulencia con severidad de enfermedad gastroduodenal ya que la gran mayoría de los individuos estudiados participaron voluntariamente en el estudio, únicamente bajo la condición de tener algún tipo de síntoma.

En relación con el subtipo *babA2* de *babA*, uno de los genes que codifica a la proteína de adherencia. La gran mayoría de los aislados (dos de los tres grupos étnicos) presentó el subtipo *babA1*. Se sabe que este gen es importante para la adhesión a los antígenos de Lewis que desencadenan en la producción de Interleucina-8 que es pro-inflamatoria. Hay que señalar que es en la isla de patogenicidad (PAI) además donde se encuentra el gen *babA* junto con otros genes. En un estudio de Salama y cols.(52) Determinaron que dentro del genoma de *H. pylori*, PAI es una de las 2 regiones donde hay mayor variabilidad genética, otros dos sitios con elevada variabilidad son los que llamó “zonas de plasticidad”

Z1 y Z2. Estos sitios podrían explicar en parte la diversidad genética de la bacteria y en este caso, de alguno de los genes asociados a virulencia y la generación de la respuesta inmune.

La prueba de RAPD es utilizada como un método para distinguir entre distintas colonias de *H. pylori* (53). Encontrar patrones RAPD distintos en aislados de un mismo paciente nos habla de la presencia de más de 2 colonias en un mismo paciente esto podría interpretarse de varias maneras entre las que destacan: Posibles casos de infecciones por más un hospedero, evaluar ya sea que ciertos genotipos de la bacteria estén asociados con estados específicos de la enfermedad además de ayudar a esclarecer mecanismos sobre los prolongados tiempos de residencia de la bacteria al presentar distintas etapas de la enfermedad. En nuestro estudio solo con los pacientes Nahuas se logró tener aislados de más de una región en un mismo paciente. De las tres muestras que se lograron aislar solo una presentó más de un patrón RAPD distinto. En las muestras de Huicholes y Tarahumaras solo se obtuvieron muestras de jugo gástrico por lo tanto no fue posible relacionar el patrón RAPD.

En conjunto, a pesar de encontrar diferencias marcadas entre sí, tanto grupos indígenas como grupos mestizos en México, no obedecen a los patrones de asociación genética en el desarrollo de enfermedades gastrointestinales que se han hallado en otras poblaciones del mundo. Incluso los Huicholes y Tarahumaras que presentaron frecuencias genotípicas distintas, por otro lado presentan genotipos poco comunes a los antes descritos. Estos hallazgos hablan de la importancia de no solo trabajar con el genoma de la bacteria pues como se ha visto la presencia de un gen o su asociación con otros no necesariamente da como resultado un estado de patogenicidad, el estudio de las proteínas que codifican dichos genes probablemente arrojen datos de mayor especificidad y patrones generales dentro de grupos poblacionales establecidos a nivel mundial.

IX Conclusiones

Se logró determinar la genotipificación de los genes de *vacA*, *cagA* y *babA* de *Helicobacter pylori* en poblaciones indígenas presentando similitud principalmente en el alelo de la secuencia señal del gen *vacA*.

Los patrones RAPD de las cepas de *H. pylori* de cada uno de los voluntarios pertenecientes a los tres grupos indígenas estudiados fueron diferentes.

Los genotipos *vacA*, *cagA*, *babA* y patrón RAPD de *H. pylori* de los tres grupos indígenas estudiados salvo una excepción fueron similares a los genotipos reportados en cepas aisladas de mestizos.

X Anexo

- Cuadro 1 Lista de antibióticos usados en medio agar soya tripticasa, para el cultivo de *H. pylori*.

Antibiotico	Cantidad
Ácido Nahdixico	10 mg
Trimetroprim	5 mg
Vancomicina	3 mg
Anfotericina	2 mg

- Base para preparar agar sangre para el crecimiento de *Helicobacter Pylori*.
- Pesar 40g de agar para disolver en 1 lt de agua destilada. (Preferentemente en un matraz Erlenmayer)
 - Mezclar ligeramente (no intentar disolver los grumos)
 - Esterilizar en autoclave 121°C, 15 lb. por 15 min.
 - Pasado el tiempo de esterilización enfriar
 - Una vez enfriado, agregar sangre de carnero (5 ml) deslizándola por la pared para evitar la coagulación.
 - Mezclar con agitador magnético
 - Verter sobre las placas de Petri en una cantidad tal que llene poco meno de la mitad de la caja.

Ingredientes del Agar

Músculo de corazón.....	2.0g
Caseína digerida por enzimas pancreáticas.....	13.0g
Extracto de lavadura.....	5.0g
NaCl.....	5.0g
Agar.....	15.0g

➤ Cuadro 2 Preparación de Caldo Brucella glicerol al 15%

- 2,8 g de caldo Brucella en 85mL H₂O
- 15 mL de glicerol estéril y mezclar
- Esterilizar
- Distribuir en alícuotas de 1000 µL en crioviales estériles

➤ Cuadro 3 Método GES modificado para extracción de DNA (54).

1. De una placa en cultivo de *H. pylori*, resuspenderla en 1000 µL de solución salina.
2. Centrifugar en una microcentrífuga a máxima velocidad por 1 min.
3. Desechar sobrenadante y resuspender paquete celular en 100 µL de TE.
4. Adicionar 400 µL de GES, mezclar suavemente a temperatura ambiente y colocar en hielo.
5. Adicionar 200 µL de la solución de acetato de amonio, previamente enfriada en hielo, mezclar y dejar en hielo por 5 min.
6. Adicionar 680 µL de cloroformo, mezclar y centrifugar en microcentrífuga a máxima velocidad por 5 min.
7. Remover fase acuosa (utilizar puntas para DNA).
8. Adicionar 320 µL isopropanol, mezclar, dejar precipitar 24 hrs. a -20°C.
9. Centrifugar en microcentrífuga a máxima velocidad por 1 min.
10. Lavar paquete celular con 800 µL de etanol al 80%. Centrifugar por 1 min.
11. Dejar secar 10 min. en una incubadora a 43°C.
12. Disolver con 100 µL de TE.
13. Verificar pureza de DNA mediante electroforesis. Mezclar 5 µL de 1a muestra con 1 µL de buffer de muestra (Loading buffer), cargar en un gel de agarosa al 1 % y correr a 100 v por un tiempo de 20 min.
14. Almacenar a -20°C,

➤ Cuadro 4 Preparación de Buffer para electroforesis (54).

Buffer	Solución de trabajo	Concentración solución Stock (por litro)
Tris-acetato (TAE)	1X: Tris-acetato 0.004M EDTA 0.001M	50X : Tris base 242 g Ácido acético glacial 57.1mL EDTA (pH 8.0)*100 mL 0.5M

*Preparación de EDTA (pH 8.0) (55)

EDTA 0.5M	Diluir: EDTA 186.1 g H ₂ O 800 mL Mezclar con barra magnética. Ajustar a pH de 8 con NaOH	<i>Nota</i> La solución de EDTA no se disolverá hasta que se ajuste a un pH de 8.0
-----------	--	---

➤ Cuadro 5 Preparación de marcador de peso molecular (54).

Marcador de 1Kb (1µg/µL)	10 µL
Loading buffer	10 µL
dH ₂ O	80 µL
Total	100 µL

Cargar en el gel entre 5 y 6 µL en gel de agarosa para su óptimo corrimiento.

➤ Cuadro 6 Electroforesis de DNA en geles de azarosa.(54)

1. Fundir solución de agarosa al 2% en TAE mantenida da 50 a 60°C.
2. Cuidadosamente vertir la solución de agarosa en la cámara de electroforesis.
3. Insertar el peine aproximadamente de 1 mm. por arriba del fondo de la cámara.
4. Dejar solidificar el gel {el proceso se puede acelerar colocando la cámara a 4°C), remover el peine, Agregar un volumen suficiente de buffer TAE para cubrir el gel.
5. Aplicar con: micropipeta 6 a 8.5 µl de las muestras y de los estándares + 1µl de Lodding Buffer, a pozos individuales del minigel *
6. Conectar electrodos y encender el voltaje (50 - 120 V en un aparato típico de minigeles. La electroforesis toma entre 30 mín. a 2 h dependiendo del tamaño de los fragmentos. El DNA migra del electrodo negativo al positivo.
7. Una vez completada la electroforesis, tomar una foto del gel utilizando un transiluminador UV para visualizar las bandas teñidas con bromuro de etidio.* El gel en esta etapa esta listo, para transferirse, purificar fragmentos o desecharse.

*Preparación de Bromuro de Etidio (1mg/mL)

Bromuro de Etidio 100µL

Agua desionizada 500 mL

Disolver el una charola donde pueda teñirse el gel.

El Bromuro de etidio debe almacenarse en un lugar protegido de la luz

XI Referencias

- 1 Torres J., Leal Y., Prez-Perez G., Gomez, A., Camorlinga, M., Cedillo, R. Tapia, R., Muñoz, O. 1998 A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in México. J Infect Dis.; 178(4): 1089-1094.
- 2 Dubreui D., Giudice G., and Rappuoli R. 2002 *Helicobacter pylori* Interactions with Host Serum and Extracellular Matrix Proteins: Potential Role in the Infectious Process. Microbiology and molecular biology reviews, Dec. No. 4, Vol. 66, p. 617–629.
- 3 Blaser M., and Berg D. 2001 *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. J. Clin Invest. April 1; 107(7): 767–773.
- 4 Falush D. Wirth T. Linz B. Pritchard K., Stephens M., Kidd M., Blaser M., Graham D., Vacher S., Perez-Perez G., Yamaoka Y., Megraud F., Otto K., Reichard U., Katzowitsch E., Wang X., Achtman M., Suerbaum S., 2003 Traces of Human Migrations in *Helicobacter pylori* Populations Science March 7, Vol. 299.
- 5 Van Doorn L., Figueiredo C., Me'Graud F., Peña S., Midolo P., Magalhaes D., Carneiro F., Vanderborght B., Pegado M., Sanna R., De Boer W., Schneeberger P., Correa P., Enders K., Atherton J., Blaser M., And Quint W., 1999 Geographic Distribution of *vacA* Allelic Types of *Helicobacter pylori* Gastroenterology;116:823–830.
- 6 Torres J, Perez-Perez G, Leal-Herrera Y, Munoz O., 1998 Infection with CagA+ *Helicobacter pylori* strains as a possible predictor of risk in the development of gastric adenocarcinoma in Mexico. Int J Cancer. Oct 29;78(3):298-300.
- 7 López-Brea M. 1999 *Helicobacter pylori*: retos para el siglo XXI. Microbiología, clínica y tratamiento. Ed. Proas science. Barcelona. pgs. 3-6.
- 8 www.medic.med.uth.tmc.edu

9 Mobley T.L. Harry, Mendz L. George, 2001. Helicobacter pylori physiology and genetics, ASM press, Washington, DC pg. .54-55

10 Dunn E., Hartley C. Blaser M. 1997 Helicobacter pylori. Clinical microbiology reviews, Oct., vol. 10, no. 4 p. 720–741.

11 Yamaoka Y., Kwon D., Graham D. Y. 2000 A Mr. 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of Helicobacter pylori, PNAS June 20, vol. 97 no. 13 7533–7538.

12 Armelle, M. George M. Stuart H., Megraud, F. 1999. Metabolism and Genetics of Helicobacter pylori: the Genome Era, Microbiology And Molecular Biology Reviews, Sept., P. 642–674 Vol. 63, No. 3.

13 <http://www.tigr.org/tdb/mdb/hpd/hpd.html>

14 Beji, A. Megraud, P. Vincent, F. Gavini, D. Izard, and H. Leclerc. GC content of DNA of Campylobacter pylori and other species belonging or related to the genus Campylobacter. Ann. Inst. Pasteur Microbiol. **139**:527–534.

15 González V. G. 2004 Diversidad de los genes cagA y vacA en cepas de Helicobacter pylori aisladas de niños y adultos. Tesis Doctoral en ciencias biomédicas, UNAM,

16 Fox P., Hu T. and H. L. Mobley. 1992. Use of polymerase chain reaction-amplified Helicobacter pylori urease structural genes for differentiation of isolates. J. Clin. Microbiol. 30:739–741.

17 Desai M., Linton R., Owen J, and Stanley J. 1994. Molecular typing of Helicobacter pylori isolates from asymptomatic, ulcer and gastritis patients by urease gene polymorphism. Epidemiol. Infect. 112:151–160.

- 18** Rodríguez Téllez M, Valenzuela Barranco M, Caballero Plasencia A, Martín Ruiz J, López-Andrade A, Carmona Soria I, Herrerías Gutiérrez JM. 1999. Estimación morfológica de la secreción ácida en la úlcera duodenal asociada a la infección por *Helicobacter pylori*. Rev Esp Enferm Dig; 91: 549-553.
- 19** Israel, D.A., Peek, R.M. 2001. Patogénesis of *Helicobacter pylori* induced gastric inflammation Alimentary Pharmacology & Therapeutics; 15: 1271-1290.
- 20** Moran, A.P., Wadströmm, T., 1998. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Gastroenterology, 14 (suppl 1), p. 9-14.
- 21** O'Toole P.W., Lane M.C., Porwollik S., 2000, *Helicobacter pylori* motility, Microbes and Infection, 2, , 1207–1214.
- 22** Muñoz P., L, 1999. Diversidad en la expresión de antígenos de Lewis^x y Lewis^y en cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de niños y adultos con enfermedades gastroduodenal, Tesis maestría en biología clínica, IPN.
- 23** Suerbaum S., Michetti P., 2002. *Helicobacter Pylori* Infection, New Engl J Med, Vol. 347, No. 15· October 10.
- 24** Pride, Meinersmann, Blaser, 2001. Allelic variation within *Helicobacter pylori* babA y babB, Infection and immunity, Feb., p.1160-1171.
- 25** Rad, Gerhard, Lang, Schöiger, Rösch, Schepp, Becker, Wagner, and Prinz 2002. The *Helicobacter pylori* Blood Group Antigen-Binding Adhesin Facilitates Bacterial Colonization and Augments a Nonspecific Immune Response The Journal of Immunology, 168: 3033–3041.

26 Gerard, M., Norbert, L., 1999. Clinical relevant of *Helicobacter pylori* gene for blood-grup antigen-binding adhesion, PNAS, vol. 96, no.22, 12778-12783.

27 Huan-Jian Lin, Jing Xue, Yang Bai, Ji-De Wang, Ya-Li Zhang, Dian-Yuan Zhou 2004. Pathogenicty and immune prophylaxis of cag pathogenicity island gene knockout homogenic mutants World J Gastroenterol;10(22):3289-3291.

28 Censini S. Lange C., Xiang Z. Crabtree J. Ghiara P. Borodovsky M. Rappuoli R. Covacci A. 1996., cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors, Proc. Natl. Acad. Sci. USA December. Vol. 93, pp. 14648–14653.

29 Akopyants N., Clifton S., 1998. Analyses of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. Mol. Microbiology.; 28: 37-53.

30 Higashi H., Nakaya A., Tsutsumi R., Yokoyama K., Fujii Y., Ishikawa S., Higuchi M., Takahashi A., Kurashima Y., Teishikata Y., Tanaka S., Azuma T., Hatakeyama M. 2004. *Helicobacter pylori* CagA Induces Ras-independent Morphogenetic Response through SHP-2 Recruitment and Activation J. Biol. Chem., April 23, Vol. 279, Issue 17, 17205-17216.

31 Owen, R. J., Sharp S. I., Chisholm, S. A., Rijpkema S. 2003. Identification of cagA Tyrosine Phosphorylation DNA Motifs in *Helicobacter pylori* Isolates from Peptic Ulcer Patients by Novel PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism and Real-Time Fluorescence PCR Assays, Journal of Clinical Microbiology, July, Vol. 41, No. 7 p. 3112-3118.

32 T M Peters, R J Owen, E Slater, R Varea, E L Teare, S Saverymuttu, 2001. Genetic diversity in the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island and effect on expression of anti-CagA serum antibody in UK patients with dyspepsia, J Clin Pathol; **54**:219–223.

33 Bravo L., van Doorn L.J., Realpe L, Correa P., 2002. Virulence-Associated Genotypes of *Helicobacter pylori*: Do They Explain the African Enigma?, The American Journal Of Gastroenterology Vol. 97, No. 11.

34 Backert S., Schwarz T., Miehle S., Kirsch C., Sommer C., Kwok T., Gerhard M., Goebel U. B., Lehn, Koenig N. W., Meyer T. F., 2004. Functional Analysis of the *cag* Pathogenicity Island in *Helicobacter pylori* Isolates from Patients with Gastritis, Peptic Ulcer, and Gastric Cancer, Infection And Immunity, Feb., p. 1043–1056 Vol. 72, No. 2.

35 M C Gunn, J C Stephens, J A D Stewart, B J Rathbone, K P West, 1998. The Significance Of CagA And VacA Subtypes Of *Helicobacter Pylori* In The Pathogenesis Of Inflammation And Peptic Ulceration, J. Clin. Pathol. **51**:761–764.

36 Atherton J., Cao P., Peek R., Murali K. Tummuru R., Blaser M., and Cover T., Mosaicism in Vacuolating Cytotoxin Alleles of *Helicobacter pylori*, J. Biol. Chem., Jul 1995; **270**: 17771 - 17777

37 Van Doorn L, Figueiredo C., Sanna R., Peña S., Midolo P., Enders K. W., Atherton J. C., Blaser J., Quint W., 1998. Expanding Allelic Diversity of *Helicobacter pylori vacA*, Journal of Clinical Microbiology, Sep., P. 2597–2603 Vol. 36, No. 9.

38 Morales R., Castillo G., González G., Ponce S., Cravioto A., Atherton J., Lopez Y., 1999 Colonization of Mexican Patients by Multiple *Helicobacter pylori* Strains with Different *vacA* and *cagA* Genotypes, Journal Of Clinical Microbiology, Sept., Vol. 37, No. 9 P. 3001–3004.

39 González-Valencia G., Atherton J. C., Muñoz O., Dehesa M., Madrazo-de la Garza A., Torres. J., 2000. *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* Genotypes in Mexican Adults and Children, The Journal of Infectious Diseases; **182**:1450–4.

40 Zambon, C.F., Navaglia, F., Basso D., Rugge, M., Plebani M., 2003. *Helicobacter pylori* babA2, cagA, and s1 vacA genes work synergistically in causing intestinal metaplasia, J. Clin. Pathol.; 56:287-291.

41 Crabtree JE, Peich P, Wyatt JJ, Stahl U, Lindley IJD. 1993. Gastric interleukin-8 and IgA IL-8 autoantibodies in *Helicobacter pylori* infection. Scand J Immunol; 37:65-70.

42 Rautelin H, Blomberg B, Fredlund H, Jarnerot G, Danielsson D. 1993. Incidence of *Helicobacter pylori* strains activating neutrophils in patients with peptic ulcer disease. Gut; 34:599-603.

43 Belkind J., Basurto G., Newton O., Ávila C., Del Río C., García E., Reyes A., Torres, J., 2001. Incidencia de infección por *Helicobacter pylori* en una cohorte de lactantes en el estado de Morelos, salud pública de México marzo-abril, Vol.43, no.2.

44 Bunn J., MacKay W., Thomas J.E., Ried D.C. Weaver, L.T., 2002. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water biofilms: implications for transmission in early life, Letters in applied Microbiology, 34; 450-454.

45 Makristathis A., Hirschl A., Lehours P., Mégraud F. 2004. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection, Helicobacter, Volume 9 Supplement 1.

46 GP Rubin, V Meineche-Schmidt, AP Roberts, SM Childs, NJ de Wit. 1999. The management of *Helicobacter pylori* infection in primary care. European Journal of General Practice, 5: 98-104.

47 Van Doorn L., Figueiredo C., Sanna R., Peña S., Midolo P., Enders K., Atherton J., Blaser M., And Wim G. V. Quint 1999. Geographic Distribution of *vacA* Allelic Types of *Helicobacter pylori* Gastroenterology, 116:823–830.

48 Ghose C, Perez-Perez GI, van Doorn LJ, Dominguez-Bello MG, Blaser MJ. 2005. High frequency of gastric colonization with multiple *Helicobacter pylori* strains in Venezuelan subjects. J Clin Microbiol. Jun, 43(6):2635-41.

49 <http://www.cdi.gob.mx/ini/monografias/>

50 Ghose C., Perez-Perez G., Dominguez M., Pride D., Bravi C., and Blaser M., 2002. East Asian genotypes of *Helicobacter pylori* strains in Amerindians provide evidence for its ancient human carriage. Proc Natl Acad Sci U S A. Nov 12; 99(23):15 107-11.

51 Vittorio R., Ricio C., Zarrilli R., y cols. 1996. Effect of *Helicobacter pylori* on Gastritis epithelial cell migration and proliferation in vitro: Role of *vacA* and *cagA*. Infection and Immunity, July, p. 2829-2833.

52 Salama N., Guillemin K., McDaniel T., Sherlock G., Tompkins L., and Falkow S., 2000. A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains PNAS. December vol. 97 no. 26 p.14668–14673.

53 Akopyanz N, Bukanov N, Westblom U., Kresovich S, Berg D. DNA diversity among clinica isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-bassed RAPD fingerprinting Nuclei acid research, Vol. 20, No. 19 5137-5142.

54 Maniatis T. Fritsch E., Sambrook J. 1989. “Molecular cloning: A laboratory manual.” Segunda edición. Ed. Cold spring Harbor Laboratory pres. Plainview, N.Y.