



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“Genotipificación del gen *vapD* en cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de individuos mexicanos”

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

KARLA MARELY MARTÍNEZ CASTILLO

COMITÉ ASESOR:

DOCTOR GERARDO GONZÁLEZ VALENCIA
MAESTRA YOLANDA FLORES CABRERA
DOCTORA ROSARIO MORALES ESPINOSA



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.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bacteriología de la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Coordinación de Investigación Médica, Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto mexicano del seguro social, al igual que en el laboratorio de Geonómica Bacteriana del Edificio de Investigación en la Facultad de Medicina, en Ciudad Universitaria, UNAM.

JURADO

PRESIDENTE

DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA

VOCAL

DR. GERARDO GONZÁLEZ VALENCIA

SECRETARIO

MTRA. YOLANDA FLORES CABRERA

SUPLENTE

M. C. MAURILIO FLORES PIMENTEL

SUPLENTE

Q. F. B. JOSÉ OSCAR GONZÁLEZ MORENO

A mis papis Lupita, Vicente y mi hermanito Oscar:

Por amarme desde el primer día que nací, por darme fuerza en los momentos malos y en los buenos compartir mis alegrías, por no dejarme solita ni un segundo, por que siempre me acompañaron para que nadie me hiciera daño, por que ustedes como profesionistas me inspiraron para continuar cuando veía oscuridad en el camino y siempre me tendieron su mano para sostenerme con fuerza. Por hacer un hogar lleno de amor y confianza, me enseñaron a tener sueños y metas; ahora gracias a ustedes he conseguido el primer logro de mi vida.

A mi hermanito Oscar:

Gracias por tu confianza, amor, por que siempre me acompañaste para que nadie me hiciera daño, por que tú me inspiraste para continuar cuando veía oscuridad en el camino y siempre me tendiste tu mano para sostenerme con fuerza.

A mi abuelita Felipa:

Gracias mami porque siempre que me das un abrazo y un beso siento un calor de cariño inmenso.

A Gerardo:

Gracias por estar en esta etapa tan importante de mi vida, por tu amor, por tus sonrisas y hacerme saber que en cualquier momento puedo contar contigo.

Al Dr. Gerardo González Valencia:

Gracias por su confianza, por haberme guiado con sus enseñanzas y experiencia a lo largo de este trabajo, por que gracias a usted aprendí a ser independiente y a tener confianza en mí misma.

A la Dra. Rosario Morales Espinosa y equipo:

Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio, mostrando siempre una sonrisa sincera, haberme permitido colaborar y ser parte de ustedes.

A la Mtra. Yolanda Flores, el Dr. Rubén Marroquín, el M. C. Maurilio Flores y el Q. F. B. Oscar González:

Gracias por haberme impartido conocimientos tan importantes dentro de la carrera, por su apoyo, confianza, paciencia, amistad, porque gracias a ustedes puedo llevar mi carrera con orgullo y profesionalismo. Ustedes han sido los mejores profesores y personas que he conocido.

Pero sobre todas las cosas Gracias Diosito por que sin ti, nada de esto hubiera sido posible, gracias por poner en camino personas tan buenas, porque tengo mi familia a mi lado, a una persona que me ama y por darme la oportunidad de llegar hasta aquí.

INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	2
Antecedentes históricos	2
Microbiología	3
Epidemiología	5
Respuesta del huésped a la infección	6
Enfermedades asociadas	6
Diagnóstico	10
Tratamiento	11
Patogenicidad y virulencia	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
OBJETIVOS	26
HIPÓTESIS	26
DISEÑO EXPERIMENTAL	27
DIAGRAMA DE FLUJO	28
MATERIAL Y MÉTODOS	29
Obtención de cepas de <i>Helicobacter pylori</i>	29
Método GES para aislamiento de DNA	30
PCR para genotipificar <i>vapD</i>	31
Southern blot	32
RESULTADOS	33
PCR, Southern Blot para genotipificar <i>vapD</i>	33
Figuras de PCR y Southern Blot	40
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	47
REFERENCIAS	48

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori una bacteria patógena Gram-negativa que infecta el estómago fue descubierta en 1983 por los australianos Warren y Marshall. Es reconocida como el agente causal de la gastritis crónica, el principal factor de riesgo para el desarrollo de úlcera gástrica y está relacionada con el cáncer gástrico. Existen algunos marcadores de virulencia perfectamente identificados tales como los genes *vacA* y *cagA*, pero; en estudios recientes se ha encontrado que *H. pylori* contiene otro gen llamado *vapD*, éste ha sido encontrado y caracterizado en otras bacterias también patógenas como *Dichelobacter nodosus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, etc; en las que ha sido considerado como factor de virulencia.

Hallazgos preliminares en México han sugerido que este gen es polimórfico sin embargo se desconoce el significado de éste. Tampoco se conoce la frecuencia de dicho polimorfismo y si éste tiene asociación con marcadores de virulencia y enfermedad. De ahí la importancia de estudiar su frecuencia y determinar si en las cepas aisladas de individuos mexicanos dicho gen en sus formas normal y polimórfica se asocia a virulencia y así poder relacionarlo con los marcadores de virulencia previamente estudiados.

En este estudio se utilizaron aleatoriamente 123 cepas de *H.pylori*, provenientes del cepario del Centro Médico Nacional Siglo XXI de la Unidad de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Sección de Bacteriología. Dichas cepas fueron aisladas de individuos mexicanos a partir de biopsias de adultos con úlcera péptica (duodenal y gástrica), adultos con gastritis, niños con dolor abdominal recurrente (siglas en inglés RAP Recurrent Abdominal Pain), niños con gastritis y jugo gástrico de individuos mexicanos voluntarios, dentro de los cuales se encuentran: indígenas (taraumaras, náhuatl, huicholes) con sintomatología gástrica (agruras, dolor abdominal) y voluntarios de la sección de Bacteriología (todos asintomáticos); por último, cepas tipo (utilizadas como cepas de referencia).

De cada una de las muestras se realizó el cultivo, aislamiento e identificación para poder llevar a cabo la extracción de DNA por el método de GES y

posteriormente genotipificar a *vapD*, por medio de PCR. Por último se realizó Southern blot para corroborar la presencia del gen.

Este trabajo explora el potencial clínico de *vapD*, ya que en otras bacterias es un importante marcador de virulencia, sin embargo hasta ahora se desconoce su papel en la patogenia del *H. pylori*.

MARCO TEÓRICO

Antecedentes históricos. En 1892, el investigador italiano Bizzozero reportó bacterias espirales habitando glándulas gástricas y a nivel de canículas de las células parietales en el ambiente ácido del estómago de perros ^(1,2). Después 1899 el profesor Walery Jaworski investigó los sedimentos de los lavados gástricos obtenidos de seres humanos, encontrando bacterias en forma de espiral. El fue el primero en sugerir un papel posible de este organismo en la patología de enfermedades gástricas ⁽⁴⁾. Posteriormente entre 1950 y 1960, Susumo Ito, realizó una descripción anatómica detallada de la mucosa gástrica en microscopio electrónico y publicó fotografías de un microorganismo espiral con flagelos.

Mientras tanto en 1979, los australianos Warren Robin y Marshall Barry observaron en la mucosa gástrica de pacientes, un microorganismo de forma espiral, y empezaron un estudio en pacientes con varios síntomas gastrointestinales, no fue si no hasta 1983 que aislaron a la bacteria de la mucosa del estómago en humanos y fueron los primeros en cultivarla y relacionarla con gastritis crónica y enfermedad ulcerosa, gracias a que olvidaron los cultivos de biopsias gástricas en la incubadora en Semana Santa y los revisaron hasta el cuarto o quinto día de incubación, al revisar las cajas observaron colonias transparentes (1mm). Posteriormente el bacilo se cultivó en agar sangre en un ambiente microaerofílico ⁽³⁾. En 2005 los doctores Marshall y Warren ganaron el premio Nóbel de Medicina por este descubrimiento.

En un principio se le consideraba como parte de la familia de *Campylobacter*, ésta bacteria es parecida a *Helicobacter pylori* en varios aspectos: en la morfología curva, crecimiento en medio rico y en ambiente microaerofílico y sensibilidad a metronidazol. Por ello, en 1985 se conocía como *Campylobacter pyloridis*. En 1989 un Comité internacional, basado en diferencias ultra estructurales y genéticas decidió excluirla de este género, denominándolo finalmente por su nombre

actual. Desde ese año se le considera la especie tipo de un nuevo género, *Helicobacter* en el que existen al menos otras 19 especies (4).

Como un hecho sobresaliente cabe mencionar que en agosto de 1997 se publicó la secuencia completa del genoma de *H. pylori* 26695, sólo 15 años después de que se cultivara por primera vez. Era el sexto genoma de procariontes secuenciado. Posteriormente en Enero de 1999, se secuenció el genoma completo de J99, otra cepa de *H. pylori*, permitiendo la comparación de los genomas.

El conocimiento del genoma ha permitido estudiar entre muchas otras cosas, los genes específicos de *H. pylori*, que son esenciales para la colonización, la patogenicidad o la supervivencia de la bacteria (4).

Se conoce el tamaño exacto del genoma de ambas cepas, la cepa 26695 de 1.667,867pb y la cepa J99 de 1.643,831pb. El contenido promedio de G+C en ambas cepas es de 39% y la diferencia en el contenido de genes específicos de cepa es de un 6% (6).

Los genomas secuenciados, contienen dos copias de los genes 16S y dos juegos de los genes 5S-23S del rRNA, además la cepa 26695 contiene un gen extra del 5S rRNA. Ambos genomas codifican para 36 especies de RNAs de transferencia (5).

MICROBIOLOGIA

H. pylori es una bacteria Gram-negativa, curva, espirilada, que mide aproximadamente 3.5 por 0.5 micrómetros, posee múltiples flagelos en uno de sus polos (de 5 a 6), lo que lo hace altamente móvil (7). Es un microorganismo de crecimiento lento. Toma aproximadamente 5 a 7 días, para poder apreciar las colonias en medios sólidos, y para su crecimiento en el laboratorio se requiere de condiciones de microaerofilia (10% de CO₂) y medios artificiales ricos en nutrientes como: peptona, triptona, extracto de levadura, glucosa, y sales, como

cloruro de sodio y bisulfito de sodio, suplementados además con sangre de caballo, polienriquecimiento, suero fetal bovino (SFB) o combinaciones. Produce adhesinas que le permiten su adherencia a las células epiteliales (1, 8, 9).

Su característica bioquímica más sobresaliente es la abundante producción de la enzima ureasa, que cataliza la hidrólisis de la urea en amonio y bióxido de carbono. La liberación del amonio beneficia a la bacteria puesto que neutraliza parcialmente el ambiente ácido del estómago (el cual tiene como propósito matar bacterias) siendo éste un mecanismo importante para la sobrevivencia de la bacteria en un ambiente con pH muy ácido debido al jugo gástrico. Es además catalasa y oxidasa positiva (10, 11).

El amonio es, sin embargo, tóxico para las células epiteliales, junto con otros productos de *H. pylori*, entre los que se incluyen, proteasa, catalasa, y fosfolipasa.

Se ha sugerido que bajo condiciones de estrés ambiental, *H. pylori* puede convertirse de su forma espiral a una cocoide. Algunas investigaciones han sugerido que esta, es una forma de resistencia del organismo. Sin embargo otras sugieren lo contrario ya que no han podido cultivarla. La forma cocoide se ha encontrado en suministros de agua y al parecer está implicada en la epidemiología de la bacteria. Se ha encontrado también que la forma cocoide puede adherirse a las células epiteliales gástricas *in vitro* (9).

En la actualidad se conocen otras especies de *Helicobacter* asociados con la mucosa gástrica y mucosa intestinal de diferentes hospederos como *H. acinonyx* aislado de mucosa gástrica de chitas, *H. mustelae* de hurones, *H. nemestrinae* de monos, *H. suis* de cerdos etc., sin embargo, la única especie involucrada con el humano y su enfermedad es *H. pylori*.

EPIDEMIOLOGIA

Los humanos son el reservorio natural de *H. pylori* se infectan por lo regular a edades tempranas ⁽¹²⁾. Se estima que más de la mitad de la población mundial está infectada y que la prevalencia de la infección es mucho mayor en países en desarrollo (70-90%) que en desarrollados (25-30%) y se incrementa con la edad. En México a la edad de 10 años el 50% de los niños se encuentran ya infectados y globalmente el 66% de la población está infectada ⁽¹²⁾.

Se desconoce el mecanismo de transmisión sin embargo existen varias hipótesis al respecto. Una sugiere que la infección por *H. pylori* se adquiere en la infancia, y se relaciona al contacto cercano con individuos infectados, específicamente por la relación con la madre, el padre y otros niños infectados.

Se descarta la posible existencia de reservorios animales por tanto no existe una zoonosis. Sugiriendo que la forma de transmisión es de persona a persona (oral-oral, fecal-oral o iatrogénica) ⁽¹³⁾

La ruta de transmisión oral-oral se sustenta en que está identificado DNA de la bacteria en saliva, lengua, paladar, cavidad oral y placa dental, considerándose esta última un potencial reservorio. La vía iatrogénica es un problema solo si no existe una correcta desinfección de tubos de endoscopia que han tenido contacto con la mucosa gástrica ^(13, 14).

RESPUESTA DEL HUESPED A LA INFECCIÓN

La adherencia de la mucosa antral por *Helicobacter pylori* produce una reacción inflamatoria aguda con el consiguiente daño en las células epiteliales. Ciertos productos quimiotácticos se liberan desde la bacteria mientras las células epiteliales producen interleuquina-8 y se genera una activación local de polimorfonucleares. Esta respuesta se ve potenciada por otros factores del

huésped, como las citoquinas proinflamatorias, IL-1 y TNF alfa, con la posterior producción de enzimas proteolíticas y radicales libres de oxígeno por parte de los neutrófilos. La reacción inflamatoria daña, evidentemente, el epitelio y las células adoptan una forma cuboidea, con pérdida de la continuidad de las uniones estrechas intercelulares, y se conforman los cambios típicos de una gastritis aguda antral.

En la medida que la respuesta inflamatoria aguda se va atenuando, comienzan a llegar los linfocitos y monocitos, y se inicia en esta forma una reacción inflamatoria crónica, provocando cambios en la fisiología del estómago y duodeno ya sea por daño directo a las células o porque algunas de estas citocinas actúan sobre células que regulan la producción de ácido ⁽¹⁵⁾.

ENFERMEDADES ASOCIADAS

Dispepsia no ulcerosa. Se denomina también dispepsia funcional o no ulcerosa y se define como dolor en la parte alta del abdomen (“en la zona del estómago”) que no está causando por lesiones del aparato digestivo.

Este tipo de patología es totalmente BENIGNA (no se asocia con ningún tumor) y es muy frecuente en nuestro país.

Gastritis. La gastritis es un padecimiento que consiste en la inflamación o hinchazón del revestimiento del estómago. La mucosa gástrica está enrojecida, presentándose en diversas formas de imágenes rojizas en flama o hemorragias subepiteliales. Puede ser que solo una parte del estómago esté afectada o toda la esfera gástrica.

La gastritis tiene varias clasificaciones:

- **Gastritis aguda:** Es una enfermedad totalmente curable, sobre todo si es tratada por un médico experto en la materia.

- **Gastritis crónica:** En un estudio endoscópico e histológico, este tipo de gastritis presenta la mucosa pálida con segmentos descoloridos; en un examen histológico se observan las glándulas gástricas en menor cantidad de trastornos en su distribución y morfología. Los síntomas clínicos son inespecíficos o ninguno.
- **Gastritis erosiva:** Las erosiones son superficiales y múltiples, caso contrario a lo que sucede con una úlcera, la cual generalmente es más profunda y penetra a la capa muscular.
- **Gastritis atrófica:** Esta puede considerarse la última fase de una gastritis crónica, la cual ante una imagen endoscópica muestra la descripción de los pliegues, observándose los vasos sanguíneos de la submucosa y la pared de la mucosa se ha perdido en partes o en su totalidad ⁽¹⁵⁾.

Úlcera péptica. Uno de los trastornos que con más frecuencia afecta a la población de finales de siglo, es la enfermedad ácido péptica, definida como el conjunto de síntomas y signos débiles a la acción de los jugos digestivos, ácidos en su naturaleza, sobre estructuras que no están preparadas para entrar en contacto con ellos, como es el caso del esófago, o que han perdido la capacidad de protegerse de aquellos, como puede suceder con el estómago o el intestino.

El término de úlcera se aplica en el caso del tracto intestinal digestivo a lesiones tipo erosión que ocurren en el tejido que recubre las vísceras huecas del mismo como el estómago y el intestino delgado. Normalmente, aquellos tejidos están compuestas por células especializadas que pueden resistir la acción de los ácidos del jugo gástrico y revestidos por una capa de moco secretado por otro tipo de células, que evita el contacto directo entre el ácido y la pared de los órganos. La pérdida de esta protección, por medio de diferentes vías, hace que el tejido expuesto al fluido digestivo sufra cambios similares a los que produce una quemadura química.

Este es quizá el campo en el que han ocurrido la mayor parte de los cambios en cuanto al conocimiento de las úlceras por cuanto hoy en día se acepta que entre

el 80 y 95% de ellas son debidas a la infección por *Helicobacter pylori*. Se sabe en la actualidad que la bacteria penetra las células que recubren el estómago y duodeno y cambia las condiciones del entorno para protegerse a sí misma del ácido gástrico.

En este proceso daña las barreras de protección de las células y estas se ven afectadas por las secreciones digestivas, causando la lesión. **Fig. A**

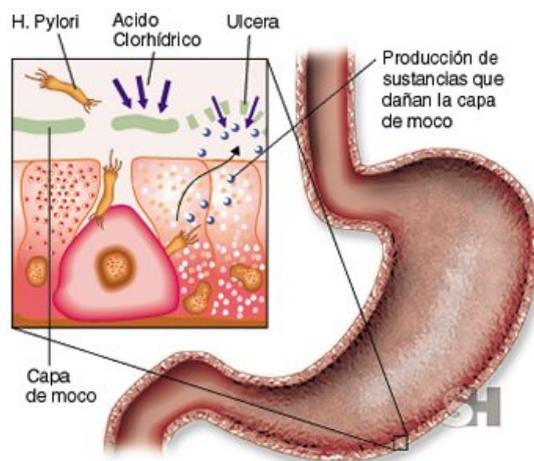


Fig. A Daño de las barreras de protección de las células gástricas

La clasificación que con más frecuencia se emplea para referirse a las úlceras está basada en la localización de las mismas dentro del tracto digestivo.

De esta manera, las úlceras pueden dividirse en dos grandes grupos: las gástricas y las intestinales. A las primeras puede agregarse subsecuentemente otro vocablo que determine su localización específica dentro del estómago. Por ejemplo, úlcera pilórica, fúndica o antral, son términos que describen la parte del estómago en donde el médico ha detectado la lesión (**Fig. B**). Entre las úlceras intestinales, las más frecuentes son las duodenales, es decir, aquellas que ocurren en la primera porción del intestino delgado.

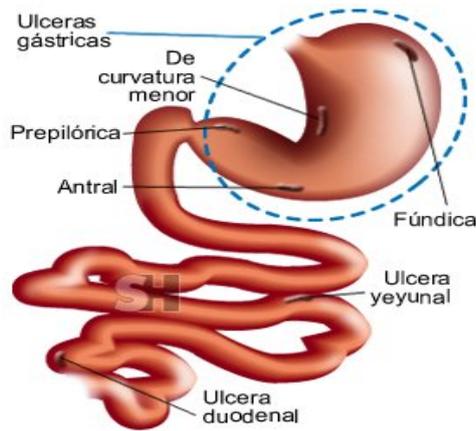


Fig B. Ubicación de las úlceras pépticas

Linfoma MALT. Es un linfoma tipo B extranodal del tejido linfoide asociado con la mucosa. Se define también como linfoma de células B de la zona marginal extranodal tipo MALT. Representa 7.6% de los linfomas no Hodgkin. El linfoma MALT gástrica representa entre 1 y 7% de las neoplasias gástricas, afecta más a hombres y la incidencia es de 1 caso/10.000 habitantes/año.

El mecanismo mas aceptado en la patogénesis del linfoma MALT es que los linfocitos B y T se reúnen en la mucosa como parte de la respuesta inmune contra *Helicobacter pylori* y la producción de citoquinas. Aún no esta claro si esta proliferación de los linfocitos B necesita la presencia constante de *H. pylori* como un factor antigénico.

El estímulo inmunológico que dan los linfocitos T de la mucosa explica la tendencia que muestra el linfoma MALT de bajo grado a permanecer localizado y regresar después de erradicar el *Helicobacter pylori*. Las alteraciones genéticas se mantienen hasta que se alcanza una etapa de crecimiento autónomo que culmina, finalmente, en la transformación de un linfoma de bajo grado en un linfoma de alto grado primario originado sin una etapa de transformación. Además, el hecho de que una minoría de los pacientes infectados por *Helicobacter pylori* lleguen a tener un linfoma MALT, permite plantear que ciertos factores, ya sean ambientales, genéticos: mutación, delección, t (11; 18) (q 21; q21) o bacteriológicos (CagA), puedan tener un papel en su patogenia ⁽¹⁵⁾.

Cáncer gástrico El cáncer gástrico es la segunda causa más frecuente de muerte relacionada con cáncer. Esta neoplasia, según su ubicación, se divide en gastroesofágica, proximal y distal. Los dos primeros tipos con un mecanismo patogénico diferente del distal. Más de 90 % de los tumores son adenocarcinomas, otros son linfoma, carcinoide y GIST. El adenocarcinoma gástrico puede ser de tipo intestinal o difuso. El primero presenta varias etapas: gastritis superficial, gastritis atrófica crónica, metaplasia intestinal, displasia y cáncer.

Hay fuerte evidencia de que el *Helicobacter pylori* incrementa el riesgo de adenocarcinoma gástrico y desde 1994 está clasificado como carcinógeno tipo I (definitivo), principalmente con base en los estudios seroepidemiológicos de casos -control.

DIAGNÓSTICO

Existen diferentes métodos para diagnosticar la infección producida por *H. pylori*. Los métodos pueden diferenciarse según el tipo de muestra que se utiliza, si requieren o no la endoscopia (agresivos o no agresivos) y a la forma de detectar el microorganismo (directamente la propia bacteria o de forma indirecta) **Tabla A.** ^(3,16).

Tabla A: Principales métodos de diagnóstico utilizados en la infección por *H. pylori*.

	AGRESIVOS (BIOPSIA GÁSTRICA)	NO AGRESIVOS
--	------------------------------	--------------

DIRECTOS	Cultivo Histología Técnicas moleculares (en investigación)	Técnicas moleculares: jugo gástrico, saliva o heces Antígeno en heces (en investigación)
INDIRECTOS	Ureasa rápida	Prueba del aliento con urea (UBT) Serología Anticuerpos en saliva (en investigación)

TRATAMIENTO

Es necesario conocer la sensibilidad *in vitro* a los diferentes antibióticos que se pueden utilizar en la erradicación de *H. pylori*, ya que la resistencia a los antimicrobianos se relaciona con un mayor fallo del tratamiento ⁽¹⁶⁾.

H. pylori es sensible a un gran número de antibióticos *in vitro* aunque no son siempre útiles *in vivo*, debido a diversos factores como:

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

Compuestos utilizados en el tratamiento

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.

Opciones de tratamiento ⁽¹⁶⁾ Se deben utilizar tratamientos combinados ya que la monoterapia no ha demostrado utilidad clínica. Se pueden emplear pautas dobles, triples o incluso cuádruples. Las pautas dobles alcanzan porcentajes de erradicación más bajos y generalmente se recomienda pauta triple. Las pautas 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 las pautas 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.

PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA

A pesar de la alta incidencia de la infección por *H. pylori* a nivel mundial, no todas las personas infectadas por esta bacteria desarrollan una enfermedad, al parecer el tipo de cepa bacteriana que se encuentra colonizando la mucosa gástrica tiene una función determinante en el desarrollo de la enfermedad. Se han propuesto varios mecanismos de virulencia para *H. pylori*, uno de ellos es la producción de ureasa [1,14]. Esta enzima se caracteriza por tener un peso molecular de 550 kDa y está formada por dos subunidades UreA y UreB; es una de las proteínas más abundantes, ya que constituye el 5% del total de proteínas del microorganismo. La ureasa hidroliza la urea y necesita que dos iones de nickel (Ni^{2+}) se fijen en su sitio activo reeditando amonio y bióxido de carbono. El amonio es un agente neutralizante del ácido clorhídrico del estómago, y ocasiona transitoriamente un pH gástrico neutro. Este proceso permite que *H. pylori* se mueva rápidamente y atraviese la capa de moco para llegar al epitelio gástrico [1,6].

El amonio como producto final del desdoblamiento, tiene una función importante en la inflamación induciendo la respuesta inmune, ya que el amonio actúa como factor quimiotáctico que activa a los monócitos y leucocitos polimorfonucleares para liberar citocinas y ocasiona una respuesta inflamatoria localizada con daño del tejido del epitelio gástrico. [19] **Fig. C**

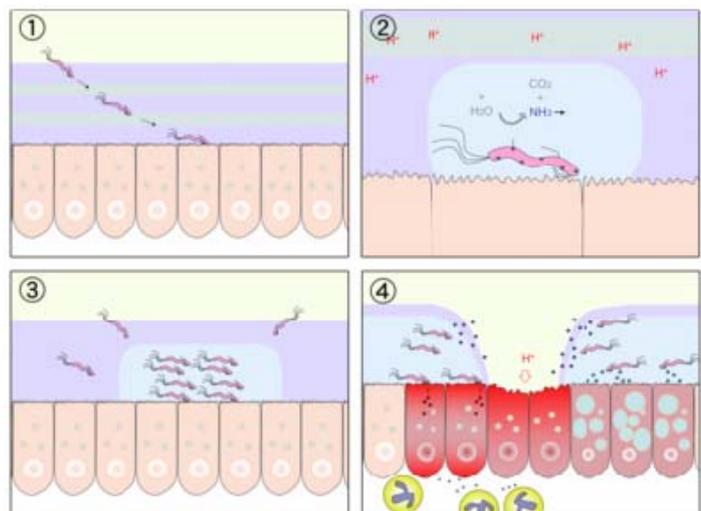


Fig. C. Factores de virulencia de *H. pylori*. Durante la infección bacteriana llega al lumen gástrico donde sobrevive al medio ácido gracias a la enzima ureasa. El flagelo de *H. pylori* sirve como motor para entrar en la capa mucosa. *H. pylori* inyecta por medio del sistema de secreción tipo IV la proteína CagA dentro de la célula epitelial liberando citocinas que activan neutrófilos o monocitos. VacA induce la formación de vacuolas citotóxicas. La liberación de proteínas activadoras de neutrófilos (HP-NAP) activan neutrófilos o monocitos que liberan intermediarios reactivos de oxígeno causando daño a las células epiteliales.

Otro marcador de virulencia es el lipopolisacárido (LPS) que posee en su antígeno "O" los carbohidratos de Lewis "x" (Lex) o Lewis "y" (Ley) o ambos. En un trabajo reciente se demostró que la estructura del LPS de la cepa NCTC 11637 es similar al antígeno Lewis "x", presente en el grupo sanguíneo tipo O 2 y en la superficie de las células epiteliales gástricas. La cepa MO19 tiene un LPS tipo Lewis "y" 1 y la cepa P 466, expresa tanto Lewis "x" y Lewis "y" 1. Los niveles de expresión de estos antígenos (Le) son diferentes entre cepas y muestran variación de fase estimulada por un pH ácido en el medio y el tipo de antígeno de Lewis que se exprese en la superficie de las células epiteliales y en la superficie de las células sanguíneas. Los genes involucrados en esta variación de fase son dos, glucosiltransferasa y un fucosiltransferasa ⁽¹⁹⁾.

La presencia de *cagA* (cytotoxin-associated gene A), y la expresión de la actividad de la toxina vacuolizante por el gen *vacA* son dos de los principales marcadores de virulencia descritos ^(21, 22, 23).

Cag PAI. Aproximadamente el 60% de las cepas de *H. pylori* producen proteínas codificadas por genes localizados en la denominada Isla de Patogenicidad de *cag* (*cagPAI*) ^(18, 20, 24). Esta Isla tiene un tamaño aproximado de 40 kb, con alrededor de 40 genes y *cagA* es uno de ellos. *cagPAI* presenta características similares a las de otras islas de patogenicidad encontradas en *E. coli*, *Salmonella* y *Yersinia*. Las características de *cagPAI* son las siguientes: (i) su contenido de G + C es de 35% comparado con 39% del cromosoma bacteriano; (ii) contiene genes putativos de virulencia; (iii) presenta una o dos secuencias de inserción (IS605 y IS606) en algunas cepas; (iv) en otras cepas, está flanqueada por secuencias repetidas directas, las cuales participan de manera importante en la integración de la isla dentro del genoma bacteriano. La *cagPAI* puede estar organizada de forma diferente dependiendo de la cepa que se estudie. La isla

puede ser continua en una misma región, o estar dividida en dos regiones *cag* I y *cag* II separada por una secuencia de inserción (IS605) o estar dividida en dos regiones *cag* I y *cag* II por secuencias del cromosoma bacteriano, flanqueado por una secuencia de inserción (IS605), y que una o ambas regiones (*cag*I y/o *cag*II) de la Isla presenten pérdidas parciales de nucleótidos. Estas variaciones en la estructura de *cag*PAI pudieran explicar la existencia de cepas *cag*PAI- y cepas *cag*PAI+.

Un factor de virulencia importante en la isla, es una proteína de membrana externa denominada CagA, codificada por el gen *cag* que se encuentra localizado en el extremo 3' de *cag*PAI. Esta proteína con un peso molecular entre 120 y 140 kDa, es altamente inmunogénica y su posible función desconocida por mucho tiempo, ha sido, recientemente descrita (20, 25).

CagA es transportada directamente a las células epiteliales por un sistema de secreción de tipo IV, codificada por *cag* PAI (27) donde induce que cinasas de las mismas células produzcan la fosforilación en sus residuos de tirosina, lo que a su vez activa rutas de transducción de señales y de plasticidad del citoesqueleto (28). Estas señales se ven reflejadas por la aparición de la formación de "pedestales" (protrusions) en la superficie de la célula infectada que dependen a su vez, de la polimerización de actina en la membrana de la célula. Tanto el sistema de secreción de tipo IV como CagA son codificados por *cag* PAI.

La detección de anticuerpos contra CagA de *H. pylori* está bien documentada. (28) los primeros estudios donde detectaron distintos niveles de anticuerpos IgG, por ELISA contra CagA, los cuales dependiendo de la severidad de la enfermedad gastroduodenal fueron como se describe a continuación: 87.5%, en úlcera duodenal, 76% en úlcera gástrica y 56.4%, en dispepsia no ulcerosa. Las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas ($p < 0.001$) para pacientes infectados con cepas CagA + y úlcera péptica. Por lo anterior se propuso la expresión del gen *cagA* como un marcador de virulencia. En pacientes infectados con cepas que tienen el gen *cagA* y expresan la proteína CagA, se aprecia además una asociación, con el desarrollo de gastritis activa

crónica, gastritis atrófica, úlcera péptica y un aumento en el riesgo de desarrollar adenocarcinoma o linfoma gástrico.

El análisis de nucleótidos del gen *cagA*, ha mostrado que la región 5' está altamente conservada, mientras que la región 3' del gen presenta un número variable de secuencias repetidas que, al transcribirse, determina el tamaño de la proteína CagA. El análisis del extremo 3' del gen *cagA* en 155 cepas *cagA*-positivas, con base en su secuencia y organización estructural, permitió identificar cuatro alelos de *cagA* designados como tipos A, B, C y D. Las cepas tipo C se han asociado con mayores niveles de anticuerpos anti-CagA en pacientes con gastritis atrófica severa o con cáncer gástrico.

vacA. En contraste a *cagA*, el gen *vacA* se encuentra presente en virtualmente todas las cepas de *H. pylori*. La producción de una citotoxina vacuolizante (VacA vacuolating toxin A) es, sin lugar a dudas, otro factor de virulencia importante de *H. pylori*. VacA es responsable de la formación *in vivo* de vacuolas en células del epitelio gástrico, así como en diferentes líneas celulares *in vitro*^(26, 29). La toxina se inserta así misma dentro de la membrana de las células epiteliales y forma un canal hexamérico dependiente de voltaje y anión selectivo, a través del cual aniones orgánicos y bicarbonato pueden ser liberados, posiblemente proveyendo a la bacteria con nutrientes. VacA tiene como blanco la membrana mitocondrial donde causa la liberación del citocromo c e induce apoptosis.

La citotoxina vacuolizante está codificada por el gen *vacA* que es constitutivo y se encuentra en una sola copia en el cromosoma de *H. pylori* fuera de la isla de patogenicidad de *cag*. El gen *vacA* tiene aproximadamente 3, 864 pb, 5 ORFs y, sólo uno de estos es el adecuado para codificar la citotoxina vacuolizante.

Desde 1994 se realizaron los primeros estudios en los que se reportó la secuencia completa del gen *vacA* en las cepas de *H. pylori* 60190 (tox+) y 87-203 (tox-). El análisis de un fragmento del gen *vacA* de 1, 541 pb mostró una homología del 64.8% entre las secuencias de nucleótidos de la cepa tox+ y la cepa tox-. Se identificó además una región de aproximadamente 567 pb,

localizada a la derecha del gen *vacA*, que correspondió al gen del RNAt de la cisteína-sintetasa, homóloga a la de *Escherichia coli*.

En 1995 se analizó ⁽²⁶⁾ una región de 0.73 kb de *vacA* en 10 cepas tipo de *H. pylori*, la cual correspondió a la región media del gen *vacA*. Esta región media (m) mostró una identidad nucleotídica del 70.4% entre las cepas tox+ y las cepas tox- y una identidad en aminoácidos del 58.7%. Con base en sus secuencias se determinaron dos familias de alelos; alelo tipo m1 (para cepas con actividad citotóxica) y alelo tipo m2 (para cepas sin actividad citotóxica). Se analizó también la secuencia de un fragmento de 0.5 kb, que correspondía a la región de la secuencia señal (s) del gen *vacA*, encontrándose diferencias importantes entre las cepas tox+ y tox-. Con estos resultados se determinaron tres familias de alelos para s; alelos tipos s1a, s1b y s2.

Basados en las determinaciones antes citadas, se realizaron la caracterización del gen *vacA* de 59 cepas de *H. pylori*, aisladas de pacientes con diferentes patologías (úlceras pépticas, gastritis y asintomáticos) en los Estados Unidos, empleando para ello iniciadores específicos (primers) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Amplificaron la región de la secuencia señal (s1a, s1b, s2) y la región media (m1 y m2) de cada una de las cepas de los pacientes estudiados y reportaron que los pacientes presentaron cepas con los genotipos s1a/m1, s1a/m2, s1b/m1, s1b/m2 y s2/m2, no encontrando pacientes con cepas con el genotipo s2/m1, esto es con 4 de las cinco posibles combinaciones de alelos de s y de m ⁽²³⁾.

Al estudiar la actividad citotóxica *in vitro* de los sobrenadantes, de cada una de las cepas aisladas de su población de estudio, sobre monocapas de células HeLa, observaron que presentaban diferente actividad citotóxica, alta, media, y nula. En este mismo estudio, los autores observaron una asociación significativa entre el genotipo de *vacA* y la actividad vacuolizante, así, las cepas con el genotipo s1a/m1 eran las de mayor actividad citotóxica; las cepas con los genotipos s1b/m1, s1a/m2 y s1b/m2 presentaron una actividad media; en tanto que las cepas con el genotipo s2/m2 no presentaron actividad citotóxica.

Reportaron además que las cepas s1a/m1 se aislaban con mayor frecuencia en pacientes con úlcera péptica, y que las cepas tipo s1b/m1 se encontraban fundamentalmente en muestras de pacientes con gastritis; mientras que las cepas s2/m2 se aislaban en mayor número de pacientes asintomáticos (25, 30).

Se señaló además que el tipo de secuencia señal del gen *vacA* es responsable del grado de inflamación (infiltración de neutrófilos y de linfocitos) en mucosa gástrica y el de la región media del gen es responsable del daño en tejido epitelial (degeneración epitelial, depleción de moco y erosiones microscópicas en el tejido) y que son las cepas tipo s1a, las que se asocian a mayor infiltrado celular en comparación de las cepas tipo s1b y s2 (23). Las cepas con región media tipo m1 se asocian con mayor daño a tejido que las cepas tipo m2.

Esta bien documentado, que los genotipos de *vacA* son buenos predictores de enfermedad ulcerosa; en un estudio realizado en Estados Unidos se encontró que el 90% de los pacientes con úlcera duodenal tuvieron cepas tipo s1, donde los pacientes infectados con cepas tipo s1a de *vacA* presentaron mayor probabilidad de desarrollar úlcera péptica que pacientes con cepas tipo s1b y mucho menos probable cuando presentaron cepas s2, las que se aíslan en mayor frecuencia de pacientes asintomáticos. La distinción entre cepas tipo s1a y tipo s1b puede ser principalmente académica, ya que en términos prácticos todas las cepas tipo s1 son potencialmente ulcerogénicas.

La citotoxina VacA que es codificada por el gen *vacA* se sintetiza como una protoxina de 140 kDa, la cual contiene tres dominios funcionales: una secuencia señal N-terminal de 33 aminoácidos (péptido líder de 3 kDa); la citotoxina madura de 87 kDa y; un dominio C-terminal de 50 kDa asociado a la membrana externa. Para ser excretada la protoxina presenta ruptura tanto en su porción amino terminal (péptido señal) como en su región carboxilo terminal quedando un monómero de aproximadamente 95 kDa para formar una toxina madura constituida por 6 ó 7 monómeros que, al unirse, forman un arreglo estructural que semeja una flor de 6 ó 7 pétalos con un centro (anillo) de 30 nm de diámetro. Cada monómero presenta un asa expuesta flexible, propensa a una

ruptura proteolítica que la divide en dos subunidades: una de 37 kDa y otra de 58 kDa ⁽²⁵⁾.

Se han reportado tres mecanismos de acción de la citotoxina vacuolizante. En el **primero**, ocurre la formación de grandes vacuolas en el citoplasma de las células epiteliales, originadas a nivel perinuclear, hasta llenar completamente el citosol de la célula y causar su muerte. El lumen de las grandes vacuolas inducidas por VacA, tanto en el citoplasma de células en cultivo, como en el de células epiteliales gástricas, se acidifica por la actividad de una bomba de protones, gracias a una ATP-asa de tipo vacuolar unida a la membrana de estas vacuolas ^[25]. La citotoxina VacA es capaz de alterar el tráfico de membranas a nivel endosoma-prelisosoma de manera tal que el tráfico de proteínas, de ligandos y el procesamiento de antígenos dependientes de ligandos se vean alterados y se cause deterioro, en la degradación proteolítica dentro de los lisosomas, ocasionando una disfunción letal para la célula. El **segundo** mecanismo de acción, independiente de la formación de vacuolas de VacA, es el aumento en la permeabilidad de células al paso de moléculas de bajo peso molecular, un fenómeno que, al parecer, aumenta el flujo de nutrientes del interior de la célula hacia la submucosa favoreciendo la sobrevivencia de *H. pylori*. La adherencia de VacA a las células de las monocapas da como resultado la disminución de la resistencia transepitelial a través de las células. El **tercer** mecanismo de acción de la citotoxina es la formación de canales a través de la capa de lípidos de la membrana celular. El aumento en la conductividad de iones en las membranas endosomales ocasiona cambios osmóticos que aumentan la entrada de agua y, por consiguiente, un hinchamiento del comportamiento endosomal.

Como ya se mencionó anteriormente *H. pylori* tiene dos genes asociados a virulencia bien definidos (*vacA*, *cagA*). Se han descrito muchos otros genes asociados a virulencia, sin embargo en pocos de ellos se ha podido confirmar una participación tan clara como la de *vacA* y *cagA*. En este trabajo en particular,

se estudio al gen llamado *vapD*, que se sabe tiene una participación importante en la virulencia de otras bacterias.

vapD. Recientemente se ha descubierto que algunas cepas de *H. pylori* presentan también este gen que codifica para una proteína conocida como VapD. Sin embargo, se desconoce la relevancia tanto del gen como de la proteína en la virulencia de la bacteria. De ahí el interés por estudiar ambos.

La caracterización en 1994 ⁽³¹⁾ de una región, asociada a virulencia, del genoma de *Dichelobacter nodosus*, una bacteria anaerobia estricta causante de reblandecer las pezuñas de ovejas, permitió identificar una serie de genes de virulencia. Uno de estos genes codificaba para la producción de una proteína asociada a virulencia, que a su vez presentaba una secuencia de aminoácidos similar, a una proteína codificada por un plásmido críptico de *Neisseria gonorrhoeae* (causante de la gonorrea).

En esta investigación se clonaron fragmentos del genoma de *D. nodosus*. En uno de esos fragmentos se encuentra el plásmido recombinante pJIR318, que fue encontrado en todas las cepas virulentas de *D. nodosus* pero ausente en el 67% de las cepas aisladas no virulentas de *D. nodosus*.

El 2.3-kb de DNA insertado de *D. nodosus* en pJIR318 se secuenció y demostró que tiene cuatro genes potenciales. Uno de esos genes era *vapD* que era similar al marco de lectura abierto 5 (ORF5) del plásmido críptico de *Neisseria gonorrhoeae*, y el ORF2 del plásmido pVT736-1 de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, además de que la secuencia de nucleótidos que encoda la región de *vapD* tiene el 69% de identidad con la región intergenética entre ORFA y ORFB del plásmido pTD1 de *Treponema denticola* ⁽³³⁾.

Los anticuerpos contra Vap D han sido usados para mostrar que el gene *vapD* esta expresado en *D. nodosus*. Los otros tres genes encontrados en pJIR318, fueron *vapB* y *vapC*. La similitud con estos tres plásmidos indujo a sugerir que la región asociada a virulencia presente en pJR318 fue adquirido por la integración de un plásmido conjugativo de otras especies de bacterias.

El genoma de referencia de la cepa virulenta de *D. nodosus* A198, contiene tres fragmentos *Hind*III que se hibridaron con el plásmido PJIR318. Estos fragmentos *Hind*III han sido designados a 1, 2 y 3 regiones de *vap* D. El Southern Blot indica que las regiones 1 y 2 contienen cada uno una copia de genes *vap* A, *vap* B, *vap* C y *vap*D, mientras que la región 3 solo contiene *vap*D. Demostrándose así un sistema interesante de la transferencia de material genético entre diferentes bacterias y la evolución de genes de virulencia dentro de especies bacterianas (Fig D).

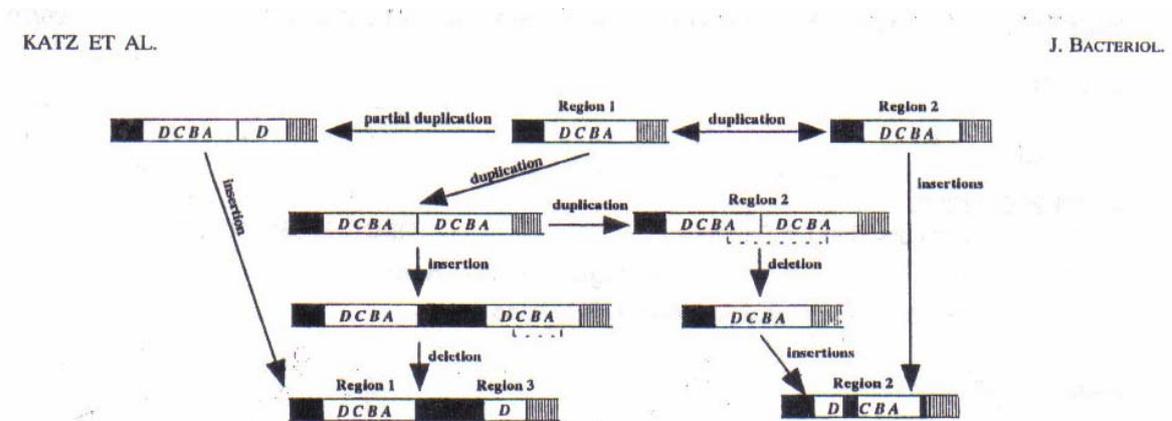


Fig B. Un modelo de la evolución de las tres regiones encontradas en la cepa virulenta A198 de *D. nodosus*. Las regiones de *vap* están indicadas por cajas abiertas. Los genes que van de *vap*A hasta *vap*D están representados por letras A a la D, respectivamente. Las ventanillas y cajas rayadas indican las secuencias asociadas a virulencia adyacentes de las regiones terminales de *vap* de izquierda a derecha. Las cajas cerradas representan secuencias insertadas en la región de *vap* después de la duplicación (Katz y cols., 1994).

Posteriormente en el año de 1997 se habla sobre el alto nivel de diversidad en la región cromosomal de *vap*D en *Helicobacter pylori* (32). Los aislados de *H. pylori* de diferentes pacientes fueron caracterizados por la diversidad en las secuencias de nucleótidos en genes individuales, variación en el tamaño del genoma y variación en el orden de los genes. La diversidad genética fue particularmente impresionante en los alelos de la citotoxina vacuolizante (*vacA*).

Helicobacter pylori es una especie caracterizada por tener una marcada diversidad genética y un número creciente de evidencias han asociado esto con las consecuencias clínicas de la infección.

Los aislados de *H. pylori* de diferentes individuos pueden ser distinguidos fácilmente por un análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos de la restricción del DNA (RFLP) o genes específicos. De este tipo de análisis se ha encontrado que:

1. Hay una marcada variación en los mapas cromosomales de diferentes aislados de *H. pylori*.
2. La Isla de Patogenicidad *cag* y los elementos de la secuencia de inserción están presentes en muchas cepas pero no en todas.
3. Los datos del electroforesis de la enzima del multilocus indica que hay una variación alélica en las especies

La diversidad genética entre aislados de *H. pylori* es particularmente evidente con los alelos de *vacA*. *vacA* tiene una estructura de mosaico, este consiste en varias regiones que son conservadas y otras regiones que son altamente divergentes. Los alelos de las dos familias de *vacA* (tipo m1 y m2) pueden ser diferenciados por un análisis de en medio de la región de *vacA* y los tres tipos de secuencia señal (s1a, s1b y s2) también pueden ser diferenciados, Dentro de una región de 0.73kb de la secuencia de nucleótidos de *vacA* de tipo m1 y m2 los alelos de éste son solo el 70% idénticos.

Dentro de este estudio se analizó un fragmento de 4.2kb de la región de 5' → 3' de *vacA* y se encontró que este contenía un ORF cercanamente relacionado con el gene *vapD* de *Dichelobacter nodosus*. Por otro lado se reportó que aunque los genes *vacA* y *vapD* están localizados a solo 3.5kb en el cromosoma de la cepa 60190 de *H. pylori*, se demostró que la presencia de las secuencias de hibridación de *vapD* no son específicas para ninguna familia específica de los alelos de *vacA*.

Otros resultados obtenidos fueron que en el mapa de 4.2kb que va de 5' → 3', en las clonas B113 y B114 se encontraron 5 ORFs, de los cuales 4 estaban en orientación opuesta a *vacA* (**Fig E**):

- El ORF de 780 pb (feC), es homólogo con la familia de transporte de proteínas ABC, y con *Haemophilus influenzae*

- El PRF heme homóloga con *Yersinia enterocolitica*, *H. influenzae*
- *vdIC* y *vdID* no fue encontrada alguna homología con otros genes bacterianos involucrados en el transporte de hierro

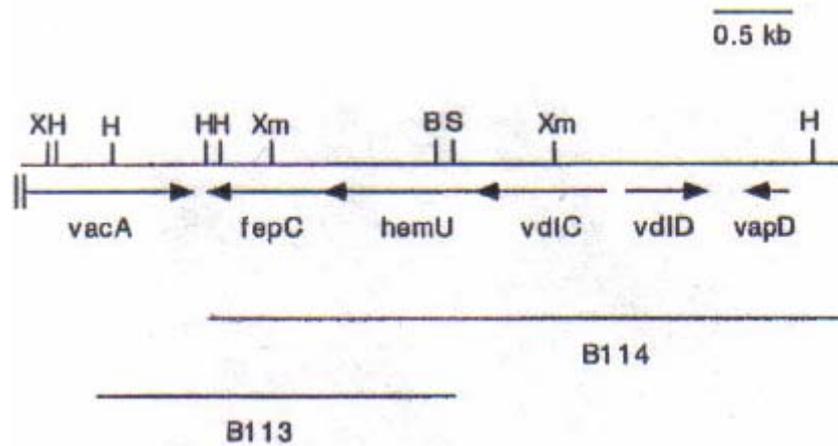


Fig E. Mapa de 4.2kb de la región cromosomal 5'→ 3' de *vacA* en la cepa 60190 de *H. pylori*. Las clonas B113 y B114 fueron aisladas de una librería genómica del DNA de la cepa 60190 de *H. pylori*. Los sitios de las divisiones de las endonucleasas de restricción están abreviadas como sigue: B, *Bam*HI; H, *Hind*III; S, *Sac*I; X, *Xba*I; y Xm, *Xmn*I. Las flechas indican las localizaciones de los ORFs (Cao y cols, 1997)

Se determinó que la secuencia de nucleótidos de 258 pb en el cromosoma de *H. pylori* fue idéntica en un 64.9% a la del gen *vapD* de *D. nodosus*, un 53.6% idéntico al fragmento cromosomal de *H. influenzae*, un 66.0% idéntico al ORF2 del plásmido pVT736-1 de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, y un 49.8% idéntico al ORF5 del plásmido críptico de *Neisseria gonorrhoeae*. En adición a la exhibición de estas homologías, la secuencia de nucleótidos de *H. pylori* tuvo un 70.9% de identidad a la porción del plásmido pTD1 de *Treponema denticola*.

Posteriormente para determinar si la presencia de *vapD* estaba asociada con genotipos específicos de *vacA*, 31 aislados diferentes de *H. pylori* fueron analizados por hibridación de colonias con una sonda de *vapD* bajo condiciones astringentes. Diecinueve (61.3%) de los 31 aislados produjeron señales fuertes. Mientras que las 12 restantes fallaron en la hibridación con la sonda de *vapD*.

Entre 20 aislados con tipos s1 y s2 el 75 y 36.3% respectivamente hibridaron con *vapD*. Mientras que 15 aislados con el tipo m1 y 16 aislados con m2, el 8y 43.8%

hibridaron con *vapD*. Así que, a pesar de la corta distancia entre *vapD* y *vapA* en la cepa 60190 de *H. pylori* no hay correlación con la presencia de ningún genotipo específico de *vacA*.

Se ha determinado que el gene *vapD* de *H. pylori* está relacionado estrechamente a los ORFs de tamaños similares de varias especies de bacterias. En *A. actinomycetemcomitans* y *N. gonorrhoeae*, *vapD* ha sido encontrado en plásmidos, mientras que en *H. influenzae* en cromosoma. *D. nodosus* lo puede presentar tanto en cromosoma como en plásmidos y se ha mostrado que codifica para un producto de función aún desconocida. El gene cromosomal *vapD* de *D. nodosus* constituye parte de una región más grande de *vapD* que se encuentra de manera significativa con mayor frecuencia en aislados virulentos que en no virulentos.

Las ocurrencias de las transferencias horizontales de ADN y las recombinaciones homólogas entre segmentos cromosomales de diferentes cepas de *H. pylori* son probablemente factores importantes que contribuyen a su diversidad genética.

La observación de la presencia de *vapD* no está estrictamente relacionada con ningún genotipo *vacA* específico que provea una evidencia adicional en apoyo a la estructura poblacional recombinante. Varias especies bacterianas con estructuras poblacionales recombinantes, incluyendo *N. gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus pneumoniae* son patógenos naturalmente transformables. *H. pylori* es también un patógeno naturalmente transformable. Preliminarmente los estudios sugerían que el intercambio de DNA entre las cepas de *H. pylori* pueden ocurrir por la transformación natural y también la conjugación bacteriana.

Cabe mencionar que las investigaciones sobre este gen continuaron ya que en el 2001 se publicó el artículo "Induction of *vap* genes encoded by the virulence plasmid of *Rhodococcus equi* during acid tolerance response", en el cual se menciona que esta bacteria patógena, pleomórfica, Gram-positiva que afecta a los potros jóvenes cerca de los 5 meses de edad; causando una crónica bronconeumonía supurativa asociada con un alto rango de mortalidad [29]. Por último en el año 2004 fue publicado otro artículo llamado "Cloning, expression,

and purification of the virulence-associated protein D from *Xylella fastidiosa*", la bacteria Gram-negativa aquí mencionada es la causante de severas enfermedades en cosechas de cítricos, uvas, duraznos, ciruelas, y en árboles como olmo, maple, cedro y también en café, lo cual nos sigue indicando que este gen efectivamente tiene relación con virulencia ⁽³³⁾.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La bacteria *Helicobacter pylori* es la causante de enfermedades como gastritis, úlcera gástrica e inclusive cáncer gástrico. Esta bacteria ha sido estudiada genéticamente y se tienen bien definidos algunos marcadores de virulencia como son *vacA* y *cagA*. En estudios recientes se ha encontrado que algunas cepas de *H. pylori* contienen otro gen llamado *vapD*, que ha sido encontrado y caracterizado en otras bacterias como *Dichelobacter nodosus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus influenzae*, etc; en las que ha sido considerado como factor de virulencia.

Hallazgos preliminares en México han sugerido que este gen es polimórfico sin embargo se desconoce el significado de éste. Tampoco se conoce la frecuencia de dicho polimorfismo y si éste tiene asociación con marcadores de virulencia y enfermedad. De ahí la importancia de estudiar su frecuencia y determinar si en las cepas aisladas de individuos mexicanos dicho gen en sus formas normal y polimórfica se asocia a virulencia y así poder relacionarlo con los marcadores de virulencia previamente estudiados.

OBJETIVOS

- Determinar la presencia del gen *vapD* en cepas de *Helicobacter pylori* aislados de individuos mexicanos.
- Determinar la frecuencia de *vapD* y su polimorfismo en dichas cepas.
- Relacionar la presencia *vapD* y su polimorfismo con otros marcadores de virulencia previamente estudiados.

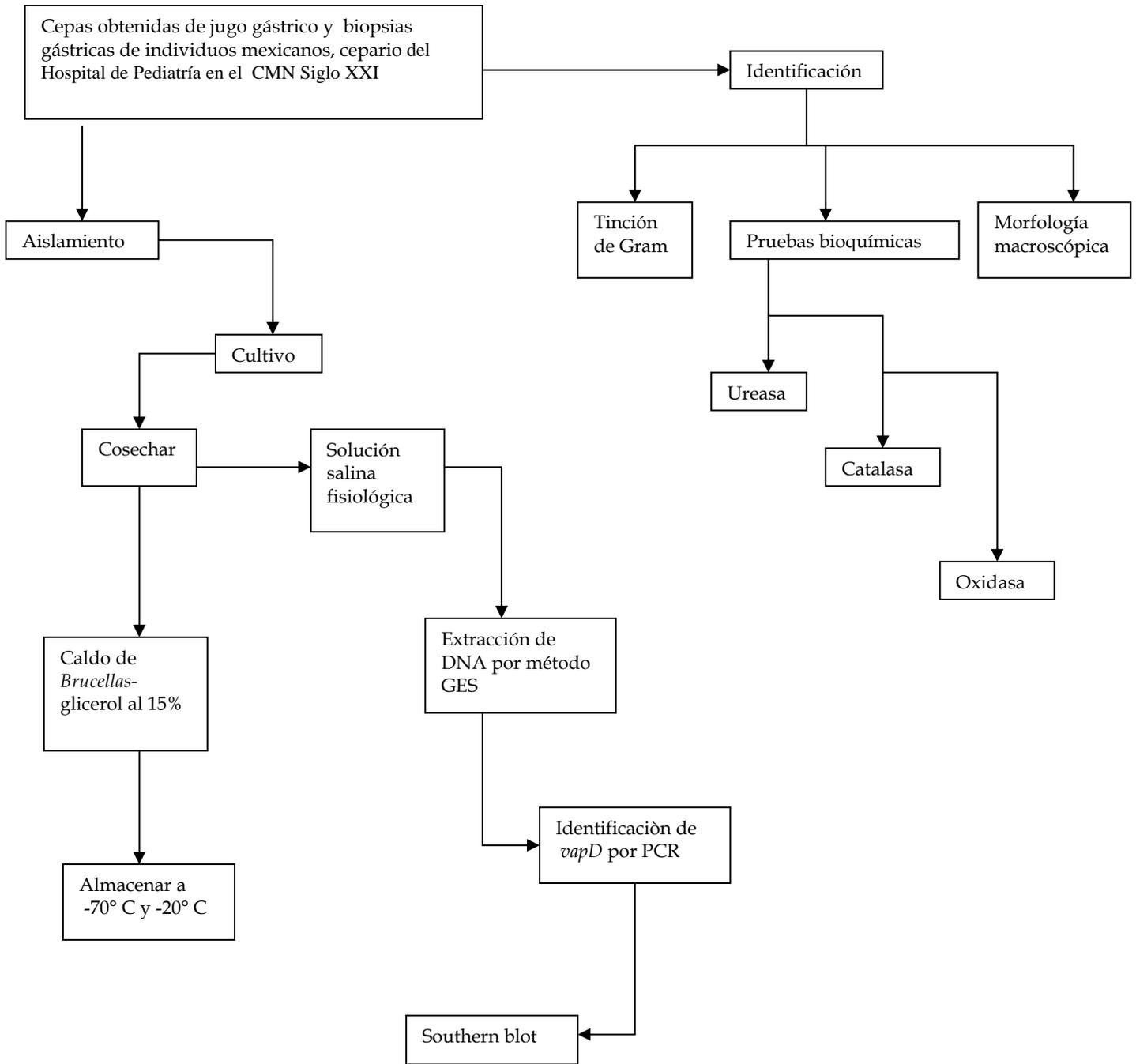
HIPÓTESIS

- Las cepas de *H. pylori* aisladas de individuos mexicanos que tienen el gen *vapD* tanto en su forma normal como polimórfica podrían tener relación con otros factores de virulencia previamente descritos en *H. pylori*.

DISEÑO EXPERIMENTAL

- Tipo de estudio: Observacional, Retrospectivo, Transversal exploratorio.
- Población de estudio: cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de jugo gástrico y biopsias de pacientes mexicanos.
- Criterios de inclusión:
 - 1 Biopsias tomadas de individuos que no tomaban algún medicamento inhibidor de la bomba de protones, y que además presentaban rastros de la presencia de la bacteria en tejido.
 - 2 Cepas que cumplieran con todas las pruebas para la identificación de *H. pylori* (tinción de Gram, morfología macroscópica y pruebas bioquímicas: ureasa, catalasa y oxidasa)
 - 3 Pacientes que mostraban histología asociada a infección por *H. pylori*.
- Criterios de exclusión:
 - 1 Cepas que no cumplieran con todas las pruebas de identificación.
 - 2 Personas que lleven algún tratamiento que contenga inhibidor de la bomba de protones.
- Criterios de eliminación:
 - 1 Aquellas cepas que durante el proceso de cultivo se contaminen y la contaminación se expandió totalmente.
- Variables: PCR, Southern blot

DIAGRAMA DE FLUJO



MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de cepas de *Helicobacter pylori*. Se utilizaron aleatoriamente 123 cepas de *H.pylori*, provenientes del cepario del Centro Médico Nacional Siglo XXI de la Unidad de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Sección de Bacteriología. Dichas cepas fueron aisladas de individuos mexicanos las cuales fueron obtenidas de biopsias de adultos con úlcera péptica (duodenal y gástrica), adultos con gastritis, niños con dolor abdominal recurrente (siglas en inglés RAP Recurrent Abdominal Pain), niños con gastritis y jugo gástrico de individuos mexicanos voluntarios, dentro de los cuales se encuentran: indígenas (taraumaras, náhuatl, huicholes) con sintomatología y voluntarios de la sección de Bacteriología (todos asintomáticos); por último, cepas tipo (utilizadas como cepas de referencia) **Tabla 1.**

Tabla 1. Número y procedencia de cepas.

Procedencia	No. cepas
Adultos con Gastritis	15
*Adultos con UD	33
*Niños con RAP	5
*Adultos con UG	14
Niños con Gastritis	6
Voluntarios Indígenas	34
*Voluntarios SN	10
*Cepas Tipo	6
TOTAL	123

Adultos con Úlcera Duodenal (UD), Niños con Dolor Abdominal Recurrente (RAP), Adultos con Úlcera Gástrica (UG), Voluntarios Sanos clínicamente, Cepas Tipo (cepas de referencia)

Posteriormente se tomó 100 µL de las cepas y éstas fueron cultivadas en placas de agar soya tripticasa (Aldrich) con 7.5% de sangre de carnero con y sin antibiótico. Las placas se incubaron con CampyPak (BD™ BBL™ CampyPak Plus Microaerophilic System Envelopes with Palladium Catalyst), para lograr tener un ambiente microaerofílico adecuado y se colocaron en una bolsa de

plástico cerrada a 37° C con 10% de CO₂ hasta por 10 días aproximadamente (en algunas ocasiones se esperaba más tiempo) dentro de la incubadora en condiciones especiales para la bacteria (Nuair Us Autoflow). Pasando ese tiempo se revisaron las placas. Una vez que se observó que la morfología colonial característica de *H. pylori* se procedió a confirmar por apariencia microscópica típica con tinción de Gram (Sigma) y por pruebas bioquímicas: ureasa, catalasa y oxidasa (kit para prueba de la urea. BBL, kit para prueba de la catalasa. Sigma, kit para prueba de la oxidasa. BBL) a las que *H. pylori* es positivo (47).

Una vez identificadas se escogieron colonias y se propagaron en placas de agar soya tripticasa con 7.5% de sangre de carnero sin antibiótico y se incubaron bajo las mismas condiciones en un tiempo aproximado de 48 horas, se recolectó con hisopos de algodón estériles en 2 viales con 980 µL de caldo *Brucella*-glicerol al 15% para su conservación a -70° C. Del mismo modo se recolectó con hisopos estériles en tubos eppendorf (2 de preferencia) con 980 µL de solución salina, un tubo se almacenó a -20° C y otro se utilizó para extracción de DNA por el método de GES.

Método GES para aislamiento de DNA. La extracción de DNA se realizó por el método de GES (Tiocianato de guanidina 59.1 g, 20 mL de solución stock de EDTA 0.5 M pH 8, 5 mL de N-Lauroyl-Sarcosine al 10%, aforado a 100 mL de agua desionizada), el cual consistió en centrifugar la muestra a máxima velocidad por 5 minutos para obtener el paquete celular. Se decantó y resuspendió el paquete en 100 µL de TE (0.2 mL solución stock de Tris 1 M pH 8, 98.8 mL de solución stock de EDTA 1 M pH 8) y se guardó a -20° C. Posteriormente se agregó 360 µL de GES para lisar la bacteria. Se mezcló suavemente, para colocarlos en hielo. Se agregó 180 µL de acetato de amonio (SIGMS) 7.5 M. Se mezcló con vortex (Fisher Vortex Genie 2. Fisher científico). Se colocó en hielo por 5 minutos y se agregó 600 µL de cloroformo (SIGMA) para separar la fase acuosa de fase orgánica. Se mezcló y centrifugó a máxima velocidad por 5 minutos. Después de remover cuidadosamente la fase acuosa y pasarla a un tubo nuevo usando puntas para de DNA* se agregó 300 µL de

isopropanol (J.T. Baker), para precipitar el DNA. Se lavó con 720 μ L de etanol (Aldrich) al 70%. Por último se centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto y dejó secar a 37° C-40° C toda la noche. Al otro día se resuspendió en 100 μ L de TE y cuando no se usó inmediatamente para el PCR se congeló a -20° C para su posterior uso. *Puntas de 1mL a las que previamente se les ha recortado 1-2 mm de la punta

PCR para genotipificar *vapD*. Se realizó PCR ^(44, 48) a DNA extraído de la bacteria utilizando primers específicos de para la secuencia completa de *vapD* y para el ORF (**Tabla 2**) de la siguiente manera: se colocó 1 μ L de muestra de DNA en un tubo eppendorf especial para PCR y se agregó 24 μ L de la mezcla maestra que consistió en: 19.85 μ L de agua desionizada estèril, 2.5 μ L de Buffer de PCR 10x - MgCl₂ 15mM. (Gibco BRL), 0.5 μ L de Mezcla de dNTPs (100 mM dNTP set. Gibco BRL), 0.5 μ L + 0.5 μ L de mezcla de primers (Gibco. BRL) y .015 μ L de *Taq* DNA Polimerase Recombinant (Invitrogen) para llegar a un volumen final de 25 μ L. Se colocaron los tubos en el termociclador (Eppendorf) con las siguientes condiciones: 94° C por 1 minuto, 49° C por 1 minuto, 72° C por un minuto y por último 72° C por 6 minutos para una extensión final durante 35 ciclos (**Determinado por la Dra.Morales-Espinosa R. en el Laboratorio de Genómica Bacteriana. Facultad de Medicina, UNAM**). Se utilizó la cepa 88.23 como control positivo y la cepa 88.22 como control negativo. Para la amplificación de los controles positivos y negativos se utilizó un marcador de peso molecular de 123 pares de bases (pb) par la secuencia completa del gen y uno de 100pb para el ORF (Gibco BRL). Para la detección de los productos de amplificación como previamente se ha descrito se realizó electroforesis en geles de agarosa (Invitrogen) al 2% a 100V y se visualizaron con luz ultravioleta en el aparato SYNGENE (procesador de imágenes para geles)

Tabla 2. Primers usados para la genotipificación de *vapD*

*Gene y región tipificada, nombre del primer	Secuencia del primer	Tamaño del producto en pares de bases (pb)
Secuencia completa de <i>vapD</i>		

D1-F	5'AGAGATGCGGTGAATGG3'	480 y 1300
D2-R	5'AAGCGTTATGAGTAGTGTG3'	-
ORF <i>vapD</i>		
<i>vapD</i> -F ORF	5'ATGTATGCTTTAGCGTTTG3'	300
<i>vapD</i> -R ORF	5'GGATTTCACAATCTCAGTAA3'	-

* Determinado por la Dra. Morales-Espinosa R. en el Laboratorio de Genómica Bacteriana. Facultad de Medicina, UNAM.

Southern blot. Se llevó a cabo ^(43, 44) para verificar que efectivamente estaba presente el gen. Se realizó electroforesis de los productos obtenidos en PCR. Se colocó el gel en solución de limpieza (83.5 mL de HCl 1 M aforar a 1 L de agua desionizada) por 15 minutos con agitación. Posteriormente se lavó con agua desionizada y se colocó 1 hora en solución desnaturizante (20 g NaOH 0.5 M, 87.66 g NaCl 1.5 M aforar a 1L con agua desionizada). Se dió un lavado rápido con agua desionizada y se colocó una hora en solución neutralizante (60.57g Tris, 87.66 g, aforar a 1 L, pH 8). Se procedió a montar el Southern Blot. Se dejó 24 hrs., posteriormente se retiró la membrana y ésta se colocó en un tubo para hibridación más 10 mL de solución de prehibridación (50 mL SSC 20x, 20 mL Reactivo de bloqueo 10%, 2 mL N-lauryl sarcosinato 10%, 400 µL SDS 10%, 20 mL Denhardt's 50x, 106.7 mL H₂O). Se colocó en el aparato de hibridación por 1 h. y 20 min. Se desechó la solución de prehibridación y se desnaturizó la sonda marcada (4µL buffer de reacción 5x, 4 µL CoCl₂, 1 µL DIG-DDUTP, 1 µL sonda *vapD*, 9 µL H₂O, 1 µL enzima-TdT) previamente realizada, en baño María durante 10 minutos, esta sonda se le agregó a la solución de prehibridación para posteriormente colocarla en el tubo que contenía la membrana. Se colocó en el aparato de prehibridación durante 24 hrs. aproximadamente. Se lavó 2 veces por 5 minutos en SSC 2x; SDS 0.1% a 15-25° C. Después se lavó 2 veces por 15 minutos en SSC 0.5x; SDS 0.1% a la temperatura de hibridación con agitación constante. Después de los lavados de hibridación y astringencia se lavó la membrana brevemente en Washing buffer (3 mL Tween 20, aforar a 1 L con agua desionizada). Posteriormente se incubó por 30 minutos en 100 mL de Bloking solution (10 mL de reactivo de bloqueo 10x, 99 mL buffer de ácido maléico). Se incubó por 30 minutos en 20mL de Antibody solution (5 µL de anticuerpos, 20 mL de Bloking solution) y se lavó 2 veces por 15 minutos con

100 mL de Washing buffer. Se equilibró 2-5 minutos con 20 mL de Detection buffer (50 mL Tris 1 M, 2.92 g NaCl, pH 9.5 aforar a 500 mL) y por último se incubó la membrana en 10 mL de Color Substrate Solution (200 μ L de NBT/BCIP stock, 10 mL Detection Buffer) en un contenedor apropiado en la oscuridad (no se movió durante el desarrollo de color). Se detuvo la reacción al otro día y se lavó con 50 mL de agua desionizada.

RESULTADOS

PCR y Southern Blot para genotipificar *vapD*. Se realizó la genotipificación del gen *vapD* en cepas de *H. pylori* aisladas de individuos mexicanos (**Tabla 1**), para observar la presencia del gen *vapD* en donde se encontraron productos de 480pb (**Fig 1**), 300pb (**Fig 2**), polimorfismos de 900pb y por último productos de 1300pb lo que muestra las diversidad genética de algunas cepas que fueron estudiadas de *H. pylori* (**Fig 3**). Posteriormente para confirmar la presencia del gen se realizó Southern Blot (**Fig 4**) realizado en el Laboratorio de Geonómica Bacteriana de la Facultad de Medicina, UNAM de los productos de PCR previamente obtenidos.

Se utilizaron datos de *vacA* y *cagA* obtenidos de estudios anteriormente realizados ⁽²⁴⁾ de las cepas estudiadas con el fin de poder hacer una comparación del gen *vapD* con estos marcadores de virulencia y su procedencia (**Tabla 3 y 4**), mediante porcentajes. Se trabajó con 123 cepas (**Tabla 1**) de las cuales 53 presentaron el gen *vapD* (43%), y 11 mostraron polimorfismo, tanto de 900pb como de 1500pb (21%).

Tabla 3. Sintomáticos. Procedencia, caracterización (*CagA*, *VacA*), y productos obtenidos de *vapD* en *Helicobacter pylori*.

No.	Cepas	Procedencia	Cag A	Vac A	Vap D ORF	Vap D			
						300pb	500pb	900pb	1300pb
						PCR South.B	PCR South.B	PCR South.B	PCR South. B
1	141 C	Adultos CG	+	S1m1		+	+		
2	124 A	Adultos CG	+	S1m1	+	+	+		
3	52 bis C	Adultos CG	+	S1m1					
4	57 C	Adultos CG	+	S1m1					
5	142 A	Adultos CG	+	S1m1					
6	91 A	Adultos CG	+	S1m1	+	+	+		
7	139 C	Adultos CG	+	S1m1	+	+	+		
8	83 A	Adultos CG	+	S1m1	+	+	+		
9	13 A	Adultos CG	-	S2m1					
10	252 A	Adultos CG	+	S1m1		+	+		
11	78 A	Adultos CG	+	S1m1	+	+	+		
12	101 C	Adultos CG	+	S1m1	+	+	+		
13	138 A	Adultos CG	+	S2m1		+	+		
14	112 C	Adultos CG	+	S1m1					
15	118 A	Adultos CG	-	S2m1				+	+

No.	Cepas	Procedencia	Cag A	Vac A	Vap D						
					300pb Vap D ORF	500pb PCR South.B		900pb PCR South.B		1300pb PCR South. B	
16	33 AE	Adultos UD	-	S2m1							
17	35 A	Adultos UD	+	S2m2							
18	19 AE	Adultos UD	-	S2m1							
19	13 A	Adultos UD	-	S2m1							
20	117 A	Adultos UD	+	S1m1	+	+	+				
21	68 Vo	Adultos UD	-	S1m1	+	+	+				
22	56 Vo	Adultos UD	+	S1m1		+	+				
23	61 Vo A	Adultos UD	+	S1m1	+	+	+				
24	63 C	Adultos UD	-	S2m2							
25	20 A	Adultos UD	+	S1m2							
26	37 Vo	Adultos UD	+	S2m2							
27	49 Vo	Adultos UD	+	S2m1							
28	20 EA	Adultos UD	+	S1m2	+	+	+				
29	24 EA	Adultos UD	+	S2m1							
30	63 EC	Adultos UD	-	S2m1							
31	70 Vo	Adultos UD	+	S1m1							
32	21 a	Adultos UD	+	S2m1							
33	56 Vo	Adultos UD	+	S1m1							
34	249cpool	Adultos UD	+	S1m2							
35	249apool	Adultos UD	+	S1m2							
36	249fpool	Adultos UD	+	S1m2							
37	249ipool	Adultos UD	+	S1m2	+	+	+				
38	256apool	Adultos UD	-	S1m1	+						
39	256cpool	Adultos UD	+	S1m1							
40	256fpool	Adultos UD	+	S1m1							
41	256ipool	Adultos UD	+	S1m1							
42	251apool	Adultos UD	+	S1m2							
43	251cpool	Adultos UD	+	S1m2		+	+				
44	251fpool	Adultos UD	-	S1m2							
45	251ipool	Adultos UD	+	S2m2	+	+	+				
46	259apool	Adultos UD	+	S1m1							
47	75 A	Niños RAP	-	S1m2							
48	69 a	Niños RAP	+	S1m1	+	+	+				
49	64 C	Niños RAP	-	S1m2	+	+	+				
50	72	Niños RAP	+	S1m1	+	+	+				
51	236 a	Niños RAP	-	S1m2							
52	248apool	Adultos UG	+	S2m2							
53	248cpool	Adultos UG	+	S2m2							
54	248ipool	Adultos UG	+	S2m2							
55	248fpool	Adultos UG	+	S2m2							
56	261apool	Adultos UG	+	S1m1							
57	261cpool	Adultos UG	+	S1m1							
58	261ipool	Adultos UG	+	S1m1							
59	261fpool	Adultos UG	+	S1m1							
60	252apool	Adultos UG	+	S1m1	+	+	+				
61	252cpool	Adultos UG	+	S2m2							
62	252fpool	Adultos UG	+	S1m1	+	+	+				
63	252ipool	Adultos UG	+	S1m1	+	+	+				

No.	Cepas	Procedencia	Cag A	Vac A	Vap D						
					300pb	500pb		900pb		1300pb	
					Vap D ORF	PCR South.B		PCR South.B		PCR South. B	
64	254apool	Adultos UG	-	S1m1		+	+				
65	254cpool	Adultos UG	-	S2m2	+	+	+				
66	254ipool	Adultos UD	-	S2m2	+	+	+				
67	254fpool	Adultos UD	-	S2m2	+	+	+				
68	64 c	Niños CG	-	S2m2							
69	92	Niños CG	+	S1m1							
70	128	Niños CG	+	S2m2		+	+				
71	249F2	Niños CG	+	S1m1		+	+				
72	270 pool	Niños CG	-	S1m1							
73	20.21	Ind n	-	S1m1		+	+				
74	20.21	Ind n	+	S1m1						+	+
75	10.6	Ind n	+	S1m1	+					+	+
76	21.3	Ind n	-	S2m2	+	+	+				
77	33.0	Ind n	-	S2m2							
78	21.23 a	Ind n	+	S1m1						+	+
79	582	Ind t	+	S1m1							
80	20.3	Ind n	-	S1m1							
81	584	Ind t	+	S2m1							
82	19.3	Ind n	+	S1m1							
83	23.0	Ind n	+	S1m2							
84	21.61	Ind n	+	S2m2		+	+				
85	21.34	Ind n	-	S2m2							
86	22.0	Ind t	-	S2m2							
87	35.0	Ind t	-	S2m2							
88	8.6	Ind t	-	S2m2							
89	6.32	Ind n	+	S1m1							
90	11.1	Ind n	-	S2m2							
91	369	Ind n	+	S1m2		+	+				
92	18.31	Ind n	+	S1m1							
93	6.2	Ind n	+	S1m1							
94	3.6	Ind t	+	S1m1	+	+	+				
95	373	Ind n	+	S1m1							
96	580	Ind h	+	S1m1						+	+
97	2003-72	Ind h	+	S1m1	+	+	+				
98	2002-91	Ind n	-	S1m2							
99	2003-372	Ind n	+	S1m1						+	+
100	2002-54	Ind h	+	S1m1						+	+
101	2004-163	Ind n	+	S1m1		+	+				
102	2002-42	Ind n	+	S1m1	+					+	+
103	2002-90	Ind n	+	S1m1						+	+
104	2002-105	Ind n	+	S2m2							
105	2002-154	Ind t	+	S1m2							
106	2004-84	Ind n	+	S1m1						+	+
107	2 E	Niños CG	+	S2m2							

* Adultos con gastritis (CG), Adultos con Úlcera Duodenal (UD), Niños con RAP (Dolor Abdominal Recurrente), Adultos con Úlcera Gástrica (UG), Niños con Gastritis (CG), Indígenas (ind), náhuatl (n), taraumara (t), huichol (h).

Tabla 4. Asintomáticos y Cepas Tipo. Procedencia, caracterización (CagA, VacA), y productos obtenidos de *vapD* en *Helicobacter pylori*.

No.	Cepas	Procedencia	Cag A	Vac A	Vap D						
					300pb Vap D ORF	500pb PCR South. B		900pb PCR South.B		1300pb PCR South. B	
1	ED	Voluntarios SC	ND	ND							
2	EJG	Voluntarios SC	ND	ND	+			+	+		
3	GGV	Voluntarios SC	+	S1m1	+	+	+				
4	LMP	Voluntarios SC	+	S1m1							
5	ESD	Voluntarios SC	ND	ND	+	+	+				
6	RO pool	Voluntarios SC	ND	ND							
7	ACR	Voluntarios SC	ND	ND							
8	ME	Voluntarios SC	ND	ND							
9	As pool	Voluntarios SC	ND	ND							
10	ATC	Voluntarios SC	ND	ND							
11	MO19	Cepas Tipo	-	S2m2		+	+				
12	43504	Cepas Tipo	+	S1m1	+	+	+				
13	84183	Cepas Tipo	+	S1m1							
14	86313	Cepas Tipo	-	S2m2							
15	26695	Cepas Tipo	+	S1m1		+	+				
16	J99	Cepas Tipo	+	S1m1		+	+				

Primero se realizó la obtención del porcentaje de *vapD* dentro de los individuos con sintomatología y patología, de las 107 cepas 46 presentaron el gen, es decir, un 42.9%; siendo los adultos con gastritis (66.6%) el porcentaje más elevados, siguiendo los niños con RAP (dolor abdominal recurrente) (60%) posteriormente los indígenas con agruras y dolor abdominal con un 47% siguiéndole los adultos con úlcera gástrica (35.7%), niños con gastritis (33.3%), y por último adultos con úlcera duodenal (30.3%) (**Tabla 5**). Posteriormente se obtuvo el porcentaje con respecto a los otros dos factores de virulencia previamente mencionados. Primero se obtuvo el porcentaje de *cagA* de las 107 cepas estudiadas, en el cual se encontró que 79 cepas fueron *cagA*+ (73.8%). Con esto se procedió a obtener el porcentaje de *vapD* con respecto a las *cagA*+; 36 de las 79 cepas *cagA*+ presentan *vapD*, es decir; un 45.5%.

Tabla 5. Sintomáticos. Porcentaje de *vapD* en cepas de *H. pylori* con respecto al origen de la muestra.

*Procedencia	No. cepas	Cepas <i>vapD</i>+	%
A. con Gastritis	15	10	66.6
A. con UD	33	10	30.3
Niños con RAP	5	3	60
A. con UG	14	5	35.7
Niños con Gastritis	6	2	33.3
Indígenas	34	16	47
TOTALES	107	46	42.9

*Adultos con gastritis, Adultos con úlcera duodenal (UD), Niños con dolor abdominal recurrente (RAP), Adultos con úlcera gástrica (UG), Indígenas (ind), náhuatl (n), taramara (t), huichol (h),

Por último se realizó la determinación del porcentaje de las cepas *vapD*+ vs *cagA* con respecto a la procedencia de las muestras, los resultados obtenidos fueron satisfactorios ya que todas presentan un porcentaje mayor del 50% (Tabla 6).

Tabla 6. Sintomáticos. Porcentaje de *vapD* vs *cagA* en cepas de *H. pylori* con respecto a la procedencia de las muestras.

*Procedencia	No. cepas	Cepas <i>vapD</i>+	<i>CagA</i>+	%
A. con Gastritis	15	10	9	90
A. con UD	33	10	7	70
Niños con RAP	5	3	2	66.6
A. con UG	14	5	3	60
Niños con Gastritis	6	2	2	100
Indígenas	34	16	13	81.2

*Adultos con gastritis, Adultos con úlcera duodenal (UD), Niños con dolor abdominal recurrente (RAP), Adultos con úlcera gástrica (UG), Indígenas (ind), náhuatl (n), taramara (t), huichol (h).

Se hizo lo mismo para el otro marcador de virulencia *vacA* con lo cual se encontró que de las 103 cepas estudiadas 56 fueron s1m1 (52.3%), 25 s2m2 (23.3%), 16 s1m2 (14.9%), 11 s2m1 (10.3%) **Tabla 7.** Después con estos resultados se obtuvo que 32 cepas de 56 s1m1 (57.1%) fueron *vapD* positivas, 7 cepas de 25

s2m2 (28%) presentaron el gen, 6 cepas de 16 s1m2 (37.5%), 1 cepas de 11 s2m1 (9.1%) (Tabla 8)

Tabla 7. Sintomáticos. Porcentaje de *vacA* en cepas de *H. pylori*

No. cepas	<i>vacA</i> S1/m1	%	<i>vacA</i> S2/m2	%	<i>vacA</i> S1/m2	%	<i>vacA</i> S2/m1	%
107	56	52.3	25	23.3	16	14.9	11	10.3

Tabla 8. Sintomáticos. Porcentaje de *vapD* en cepas de *H. pylori* vs *vacA*

<i>vacA</i> S1m1	<i>vapD</i> +	%	<i>vacA</i> S2m2	<i>vapD</i> +	%	<i>vacA</i> S1m2	<i>vapD</i> +	%	<i>vacA</i> S2m1	<i>vapD</i> +	%
56	32	57.1	25	7	28	16	6	37.5	11	1	9.1

Por último y de igual forma se llevó a cabo una tabla con respecto a las procedencias de las muestras, obteniendo que como era de esperarse todos los porcentajes más elevados fueron del genotipo s1m1 (el porcentaje menor fue del 50%) en todas las cepas en la que los individuos presentaban sintomatología o alguna patología (Tabla 9).

Tabla 9. Sintomáticos. Porcentaje de *vapD* vs *vacA* en cepas de *H. pylori* con respecto a la procedencia de las muestras

*Procedencia	No. cepas <i>vapD</i> +	<i>vacA</i> S1/m1	%	<i>vacA</i> S2/m2	%	<i>vacA</i> S1/m2	%	<i>vacA</i> S2/m1	%
A. con Gastritis	10	8	88.8	-	-	-	-	2	20
A. con UD	10	4	50	3	30	3	37.5	-	-
Niños con RAP	3	2	66.6	-	-	1	33.3	-	-
A. con UG	5	4	80	1	20	-	-	-	-
Niños con Gastritis	2	1	50	1	50	-	-	-	-
Indígenas	16	12	75	2	12.5	2	12.5	-	-

*Adultos con gastritis, Adultos con úlcera duodenal (UD), Niños con dolor abdominal recurrente (RAP), Adultos con úlcera gástrica (UG) Indígenas (ind), náhuatl (n), taramara (t), huichol (h)

Para continuar se realizó la obtención del porcentaje de *vapD* dentro de los individuos asintomáticos, así como de las cepas tipo **Tabla 10**. En esta ocasión no se logró obtener la caracterización en cuanto a los voluntarios sanos clínicamente ya que sólo se tiene los datos de dos de ellos (uno de ellos negativo para *vapD*). De las 10 cepas de los voluntarios sanos clínicamente, 3 presentaron el gen *vapD*, es decir, un 30%. La única cepa y positiva para *vapD* ya caracterizada fue *cagA+* y también *s1m1*.

Tabla 10. Asintomáticos y Cepas Tipo. Porcentaje de *vapD* en cepas de *H. pylori* con respecto a la procedencia de las muestras.

*Procedencia	No. cepas	Cepas <i>vapD</i> +	%
Voluntarios SC	10	3	30
Cepas tipo	6	4	67

*Voluntarios Sanos Clínicamente (SC), cepas tipo (usadas como cepas de referencia).

El porcentaje de *vapD* en las cepas tipo fue de un 67% ya que de las 6 cepas, 4 lo presentaron **Tabla 10**. En cuanto a *cagA* se obtuvo que de las 6, 4 fueron *cagA+* (66.6%), y que de estas 4, 3 fueron positivas para *vapD* (74%), se obtuvo igualmente que 4 de ellas fueron *s1m1* (66.6%) y 2 *s1m2* (33.3), demostrando nuevamente que *vapD* se encuentra mayormente en el genotipo *s1m1* y que además esta presente en las cepas con *cagA+* aunque estos no tuvieran sintomatología o patología gástrica **Tabla 11**.

Tabla 11. Asintomáticos y Cepas Tipo. Porcentaje de *vapD* vs *cagA* en cepas de *H. pylori* con respecto a la procedencia de las muestras.

*Procedencia	Cepas <i>vapD</i>+	<i>CagA</i>+	%
Voluntarios SC	3	3	100
Cepas tipo	4	3	75

* Voluntarios Sanos Clínicamente (SC), cepas tipo (usadas como cepas de referencia)

FIGURAS DE PCR Y SOUTHERN BLOT

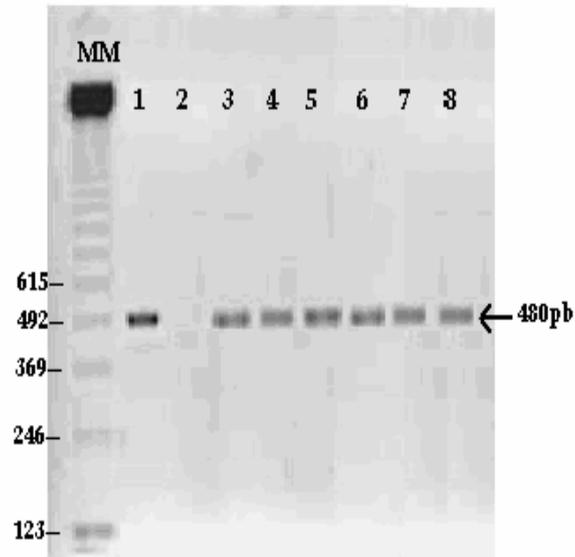


Fig 1. PCR de *H. pylori* para observar presencia del gen *vapD*. Línea 1 control positivo (cepa 88.23), línea 2 (cepa 88.22) control negativo, líneas 3 - 8 cepas positivas para el gen *vapD* con un producto de 500pb aproximadamente utilizando un marcador de peso molecular (M) de 123pb.

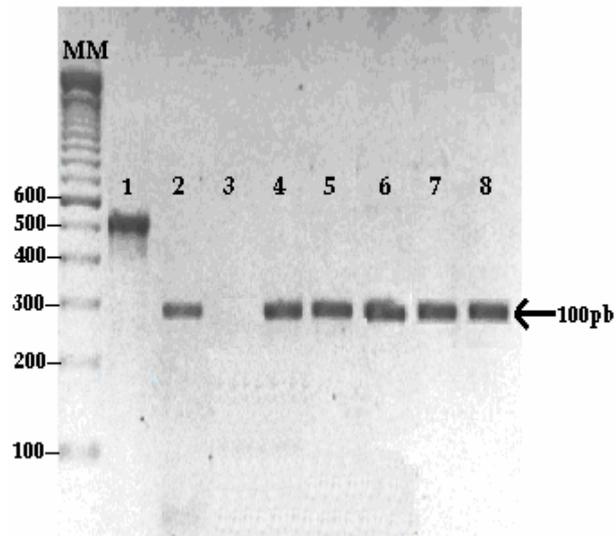


Fig 2.PCR. Línea 1 control positivo (cepa 88.23) utilizando primers para toda la secuencia de *vapD*, línea 2 - 8 cepas positiva (excepto línea 3, control negativo; cepa 88.22) para *vapD* utilizando primers para ORF de *vapD*. Esta vez el marcador de peso molecular es de 100pb.

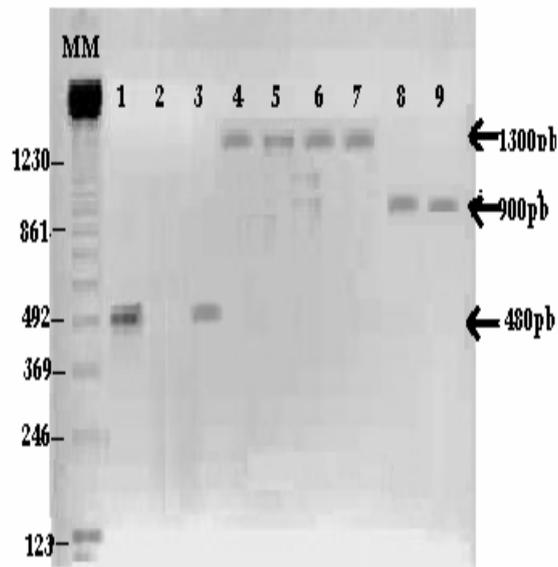


Fig 3. PCR. Línea 1 control positivo (cepa 88.23), línea 2 control negativo (cepa 88.22), línea 3 cepa positiva al producto de 500pb aproximadamente, líneas 4-7 cepas positivas a *vapD* pero esta vez mostrando el polimorfismo del gen con un producto de 1300pb aproximadamente y por último líneas 8 y 9 mostrando otro polimorfismo de 900pb del gen. Marcador de peso molecular (M) de 123 pb.

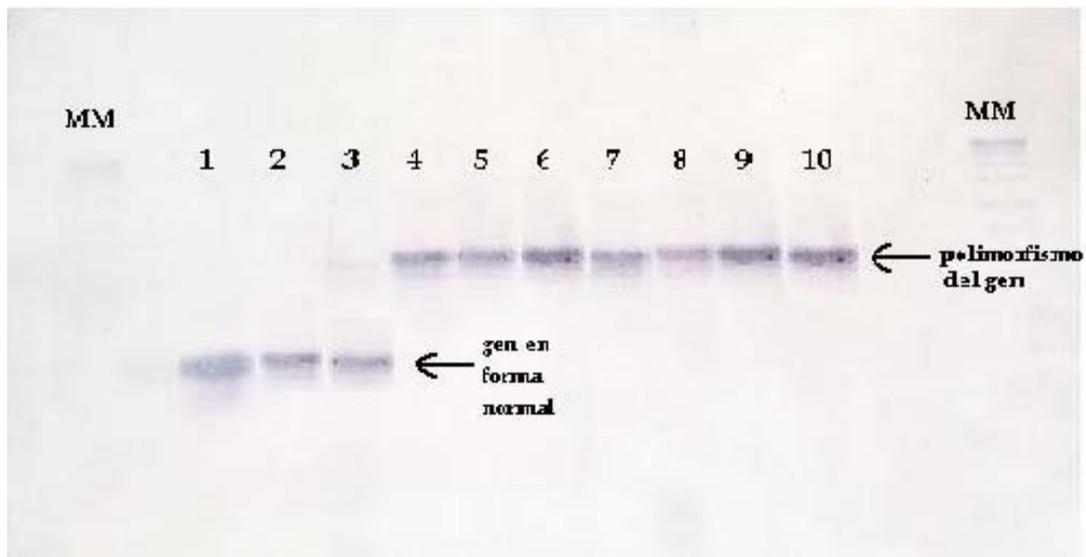


Fig 4. Southern Blot. Línea 1-3 gen *vapD* normal, líneas de 4-10 polimorfismo del gen. El marcador de peso molecular es el del número VII, del kit (Bayer) utilizado en el Southern blot.

DISCUSIÓN

Helicobacter pylori es considerada la bacteria causante de enfermedades como la gastritis, úlcera gástrica e inclusive cáncer gástrico, por lo cual es muy importante conocer a fondo su genoma. Sabemos que se ha descrito el genoma completo de dos cepas (J99 y 26695) y sabemos también que se han encontrado diferentes factores de virulencia en ellas, entre las más características *cagA* y *vacA*, con esto los investigadores continuaron estudios en otras cepas de *H. pylori* para saber si existen otros marcadores de virulencia en ellas para poder saber la expresión y el funcionamiento en la bacteria para con las enfermedades referentes a *H. pylori*.

En el presente trabajo se habla de otro gen llamado *vapD*, mencionado en el año de 1997^[26], éste se encontró en *H. pylori* e inmediatamente se comenzaron a hacer más estudios, en dichos estudios se mencionaban a diferentes bacterias consideradas patógenas en las cuales se encontraba presente el gen, esto comenzó a traer preguntas como ¿Por qué se encuentra en otras especies de bacterias que además son patógenas? ¿Tiene algo que ver entonces con la patogenicidad de *H. pylori*?

En este trabajo se utilizaron 123 cepas de las cuales el 43% presentan el gen *vapD*, este porcentaje no es para nada despreciable ya que nos está diciendo que es una parte del genoma de la bacteria que está siendo conservada. Para esto los siguientes hechos deben de tomarse en cuenta: a) la mayor parte del genoma consiste en DNA localizado entre los genes y representa el DNA intergénico y b) cada uno de los 30 000 genes que codifican proteínas posee sobre todo secuencias no codificantes (DNA intrónico). Tomando en conjunto todos estos hechos, indican que la porción del genoma que codifica a proteínas representa un pequeño porcentaje del DNA total (aproximadamente de 1.5%). Gran parte del DNA intergénico e intrónico del genoma contribuye a las capacidades óptimas reproductivas de un organismo individual y por tanto no está sujeto de

manera significativa a la selección natural. Como resultado, las secuencias intergénicas e intrónicas tienden a cambiar con rapidez a medida que los organismos evolucionan. En otras palabras, estas secuencias tienden a no conservarse. En contraste, las porciones del genoma que codifican proteínas y las secuencias reguladoras que controlan la expresión de genes se someten a selección natural para poder mantener la función. Como resultado, estas secuencias se conservan; como ejemplo el resultado de *vapD*.

Algo muy importante es que las cepas utilizadas fueron tomadas al azar; es decir, no solo se utilizaron muestras de individuos con alguna enfermedad relacionada a la bacteria si no que también se tomaron cepas de individuos que no presentaban ningún tipo de sintomatología y hasta cepas tipo, cabe mencionar que cuando se tomaron las cepas no se sabía de que tipo de población provenían, esto con el fin de demostrar que el gen además de poder estar presente en los individuos en general, puede estar relacionado con las diferentes enfermedades y así poder considerarlo como un factor más de virulencia.

Primeramente mencionaremos a las cepas de individuos sintomáticos, el porcentaje de *vapD* fue de 42.2%, este porcentaje nos dice que casi la mitad de las bacterias aisladas de estos individuos lo presentan. Desglosando este porcentaje entre cada una de las enfermedades procedentes encontramos que encabeza la lista los adultos con gastritis con un 67%. El porcentaje que le sigue es de 60% y éste pertenece a los niños con RAP (dolor abdominal recurrente), en cuanto a estos niños, no se sabe la edad de ellos, pero es sabido que cuando la bacteria se adquiere a edades tempranas pueden pasar dos cosas: 1) el niño no desarrolla ningún síntoma, eso dependerá del tipo de vida que lleve más adelante y 2) el niño desarrolla algún tipo de síntoma, desde dolor, hasta alguna patología, esto puede ser por el tipo de bacteria que adquirió (recordemos que *H. pylori* tiene mucha diversidad genética y eso marca su virulencia) y hasta la edad en que fue infectado. Los indígenas presentaron un 47%, estos individuos presentaban sintomatología como dolor abdominal y

agruras, dentro de estos la mayoría era población náhuatl, ellos presentaron en un 50% el gen *vapD* siguiéndole la taraumara, y por último huichol. Lo interesante de esta población es que las condiciones de vida son un factor importante para la adquisición y desarrollo de la bacteria, ya que los indígenas están más en contacto directo con los animales, las plantas y la tierra; puede ser que la bacteria antes de ser adquirida por la persona haya estado en contacto con otras bacterias y así hayan adquirido mayor patogenicidad, no se está diciendo que hubo zoonosis si no que siendo *H. pylori* una bacteria promiscua haya obtenido el gen por transferencia horizontal o conjugación bacteriana como se sugiere en algunos artículos (29, 31). Por último con un 33.7 y un 30.3% los adultos con úlcera péptica y niños con gastritis; referente a estos individuos la cifra es muy parecida entre los adultos con úlcera gástrica y con úlcera péptica dejando ver que la bacteria se encuentra casi por igual en esas dos partes del estómago pues como podemos recordar la bacteria tiene la facultad de cambiar el entorno ácido del estómago, lo cual es favorable para ella.

Aproximadamente de un 60 a un 70% de las especies de *H. pylori* contienen el gen *cagA*. Es importante señalar que este gen es reconocido como un importante marcador de virulencia, que confiere a la bacteria un incremento de patogenicidad y con esto el desarrollo de gastritis, úlcera péptica y hasta riesgo de desarrollar cáncer gástrico, por ello es importante conocer el porcentaje de *vapD* en comparación con este marcador en las cepas. De las 107 cepas estudiadas un 73.8% fueron *cagA+*, demostrando que los resultados encontrados en este estudio concuerdan con otros reportes publicados (10, 18). También se obtuvo que dentro de las cepas *cagA+* el 46% de ellas presentaron *vapD*, es decir, casi la mitad y para soporte se obtuvieron porcentajes con respecto a la procedencia de las cepas, esto con el fin de poder proponer que *vapD* podría ser un factor de virulencia; en este caso se encontró que el porcentaje de *vapD* con *cagA+* es casi del 100% en adultos con gastritis, 100% en niños con gastritis, 81% en indígenas, 70% en adultos con úlcera duodenal, 66.6% en niños con gastritis y un 60% en adultos con úlcera gástrica. Con estos

porcentajes por el momento nos han dejado ver que efectivamente el gen *vapD* esta presente en las todas las cepas provenientes de individuos con alguna enfermedad o síntoma, además de que en todas esta por encima del 50%, pudiéndolo tomar hasta ahora como un posible factor más de virulencia.

Por último igualmente se obtuvo el porcentaje de *vacA*, como ya habíamos mencionado este gen es sin lugar a dudas otro factor de virulencia importante de *H. pylori* ya que es responsable de la formación *in vivo* de las vacuolas en células del epitelio gástrico. Referente a las regiones de este gen s y m, estas parecen tener diferente relevancia clínica ya que ha reportado que las cepas con s1m1 presentan mayor actividad citotóxica que las cepas con el genotipo s1m2, esto es que presentan una actividad media y que las cepas s2m2 no presentan actividad citotóxica. Las cepas s2m1 aunque están presentes no hay datos que hablen de su citotoxicidad. Esto lo podremos observar en los resultados, en las 107 cepas *vapD*+ el 52% fueron s1m1, el 14.9% fue s1m2, el 23% fue s2m2 y por último el 10.3% fue s2m1, tal vez estos porcentajes no nos digan mucho pero al obtener los porcentajes en donde *vacA* y *vapD* se comparan vimos que el mayor porcentaje fue de s1m1 con un 57%, estos resultados nos favorecen pues s1m1 es un poco mayor al 50% junto con *vapD* y nos dice que tal vez ayude a la virulencia junto con *vacA*. Para terminar se realizó el porcentaje de los genotipos de *vacA*, se obtuvo satisfactoriamente que el mayor porcentaje obtenido de cepas tipo s1m1 fue de 89% correspondiente a los adultos con gastritis, lo cual concuerda perfectamente con la literatura ya que menciona que este genotipo se aísla con mayor frecuencia de pacientes con gastritis, pero también los adultos con úlcera gástrica mostraron un porcentaje elevado (80%), siguiendo con los indígenas que tuvieron un 75% y esto nos vuelve a decir que tal vez esas cepas hayan estado en contacto con otras bacterias, además del tipo de vida de los individuos y su genética humana, continuando con un 66.6% de los niños con dolor abdominal recurrente y por último con un mismo porcentaje (50%) adultos con úlcera duodenal y niños con gastritis. Podemos seguir con el genotipo s1m2 el porcentaje mas alto lo obtuvo adultos con úlcera duodenal con

un 38%; las demás cepas mostraron un porcentaje más bajo al mencionado. Recordemos que este genotipo es de actividad media. El genotipo s2m2 tuvo el mayor porcentaje las cepas de niños con gastritis (50%), las demás cepas presentaron un porcentaje más bajo, pero lo que se puede resaltar de esto es que aunque haya sido el genotipo en donde se dice por la literatura no hay actividad citotóxica por lo que ha sido aislada de pacientes sin patología en este estudio siempre estuvo presente este genotipo y aparte con *vapD*. En el caso de s2m1 como lo han mencionado en otros estudios ha sido muy poco encontrado y esta no fue la excepción ya que solo dos de las cepas de adultos con gastritis lo presentaron.

Para los individuos asintomáticos como se esperaba se encontró un porcentaje bajo (30%), pero aún así se demuestra que el gen está presente no solo en cepas virulentas. El porcentaje de las cepas que fueron *cagA+* todas presentaron el gen *vapD* y s1m1. Para terminar, el 67% de las cepas tipo fueron *vapD+* y hubo un 67% para el genotipo s1m1 y un (33%) de s1m2. Revisando algunos datos de estas cepas se supo que habían sido aisladas de personas con gastritis (26695), úlcera duodenal (J99) y un asintomático (m019) pero esta cepa es una importante referencia para trabajar con LPS en *H. pylori*.

Como pudimos observar las cepas que contiene el mayor porcentaje de *vapD* con respecto a *cagA* y *vacA* son las de los individuos que desafortunadamente presentan algún tipo de enfermedad o sintomatología con respecto a los asintomáticos. Estudios de genotipificación de cepas de *H. pylori* han demostrado que la presencia del gen *cagA* o de la variante alélica de *vacA1* no tendrían valor predictivo de riesgo de patologías gástricas severas. Sin embargo cuando la cepa presenta el genotipo *cagA+/vacA* s1m1 habrá mayor riesgo de desarrollo. Por último, es importante mencionar que como se ha mencionado en muchos artículos *H. pylori* es caracterizada por ser una de las bacterias más diversas genéticamente, ya que tiene un alto nivel de diversidad genética en la región cromosomal y muchos factores contribuyen a la conservación que de un nivel elevado de variación alélica (polimorfismo) en la bacteria como lo

pudimos observar ya que no solo hubo productos de 1300pb si no también de 900pb.

Lo que nos queda claro es que al igual que *cagA* y *vacA*, *vapD* estuvo presente en todas las cepas d los individuos que presentaron algún tipo de enfermedad relacionada con *H. pylori*; aún se desconoce la actividad a nivel celular que podría tener éste, pero, si en todas las bacterias patógenas está presente el gen y además este ha sido expresado ⁽²⁶⁾

Con estos datos se podría tomar a *vapD* como otro posible factor de virulencia, ya que como se menciona en la bibliografía “Si está conservado entonces debe ser importante”, dejando así la posibilidad de estudiar a fondo la posible actividad *in Vitro* del gen *vapD* y su proteína en *H. pylori*.

CONCLUSIONES

- El gen *vapD* se encuentra presente en cepas de *H. pylori* en individuos mexicanos sintomáticos (43%) y asintomáticos (30%).
- El gen *vapD* fue encontrado por debajo del 50% de las cepas estudiadas y dentro de este porcentaje solo algunas (21%) de las cepas presentaron polimorfismos.
- Existe relación ente los marcadores de virulencia descritos anteriormente (*vacA* y *cagA*) con el gen *vapD* y sus polimorfismos.

REFERENCIAS

1. Morales-Espinosa R, Castillo-Rojas G, González-Valencia G, Ponce de León S, Cravioto A, Atherton J, et al. Colonization of Mexican Patients by Multiple *Helicobacter pylori* Strains with Different *vacA* and *cagA* Genotypes. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37(9): 3001-3004.
2. Bik EM, Eckburg PB, GillSR, Nelson KE, Purdom EA, Francois F. Molecular Analysis of the Bacterial Microbiota in the Human Stomach. *PNAS* 2006; 103 (3): 732-737.
3. Blaser MJ. *Helicobacter pylori*: Microbiology of a 'slow' bacterial infection. *Trends in Microbiology* 1993; 1 (7): 255-260.
4. Versalovic J, Fox JG. Taxonomy and Phylogeny of *Helicobacter*. En: *Helicobacter pylori: molecular and Cellular Biology*. 2001. Atachman y Suerbaum (ed.) 2001. pp 15-28.
5. Tob JF, White O, Keilavage AR, Clayton RA, Sutton GG. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1991; 388: 515-516.
6. Israel DA, Salama N, Arnold CN. *Helicobacter pylori* strain-specific differences in genetic content, identified by microarray, influence host inflammatory responses. *J Clin Invest* 2001; 107: 611-20.
7. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Diagnóstico Microbiológico*. 5^a ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1999: 317-331.

8. Cava F, Cobas G. Décadas de *Helicobacter pylori*. *Vacci Monitor* 2003 Enero; 12 (1): 1-10.
9. Torres J, Leal Y, Pérez G, Gómez A, Camorlinga M, Cedillo R. A Community-Based Seroepidemiologic Study of *Helicobacter pylori* Infection in Mexico. *JID* 1998; 178: 1089-1094.
10. Blaser MJ, Atherton JC *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *The Journal of Clinical Investigation* 2004 February; 113 (3):321-333.
11. Ganusov VV. Evolution of virulence: adaptive or not? *Trends in Microbiology* 2003; 11 (3): 112-113.
12. Torres J, Pérez-Pérez G, Goodman KJ, Atherton JC, Gold BD, Harris PR, De la Garza AM. A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. *Arch Med Res.* 2000. 31: 431-469.
13. Suerbaum S, Smith JM, Bapumia K, Morellis G, Smith NH, Kunstmann E, et al. Free recombination within *Helicobacter pylori* (nucleotide sequencing and horizontal genetic exchange and evolutionary linkage equilibrium) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 9: 12619-12624.
14. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Microbiol Rev* 1997; 10: 720-741.
15. Orellana I, Poniachik J. Infección por *Helicobacter pylori*. *Medwave* 2003; 4: 456-459.
16. Perez-Perez G, Rothenbacher D, Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Infection Blackwell Publishing Ltd, Helicobacter* 2004; 9 (1): 1-6.

17. Morales-Espinosa R., Castillo G, López Y, Cravioto A. *Helicobacter pylori*.
En: Martínez Romero E, Martínez Romero J. Microbios. Capítulo 15.
Coordinación de la Investigación Científica. Universidad Nacional
Autónoma de México: UNAM; 2001: 199-219.
18. Cerezo S, Gutiérrez GR. Diagnóstico microbiológico, serológico,
genotipificación de *Helicobacteri pylori* aislado de biopsias de niños y
adultos. Detección molecular de la isla de patogenicidad *cag* de *Helicobacter
pylori*. Revista Latinoamericana de Microbiología 2006; 48(2): 99-104.
19. Salgado S, Darach M. Martínez F, Solar A, Kawaguchi P, Oñate A. Estudio
de algunas propiedades inmunológicas de Lipopolisacáridos extraídos de
cepas de *Helicobacter pylori*. Gastroenterología Latinoamericana 2000; 11
(1): 11-6.
20. Blaser MJ, Berg DE. *Helicobacter pylori*. Genetic Diversity and Risk of
Human Disease. The Journal of Clinical Investigation 2001; 107 (7): 767-
773.
21. Tummuru MKR, Cover TL and Blaser MJ. Cloning and expression of high-
molecular-mass major antigen of *Helicobacter*. Evidence of linkage to
cytotoxin production. Infect Immun. 1993. 61: 1799-1809.
22. Atherton, J. C, R. M. Peek, K. t. Tham, T. I. Cover, and M, J. Blaser. Clinical
and Pathological Importance of Heterogeneity in *vacA*, the Vacuolating
Cytotoxin Gene of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology. 1997. 112: 92-99.
23. Ito A, Fujioka T, Kodama K, Nishizono A, Nasu M. Virulence-associated
genes as markers of strain diversity in *Helicobacter pylori* infection. J.
Gastroenterol Hepatol. 1997. 12: 666-669.

24. González-Valencia G, Atherton JC, Muñoz O, Dehesa M, Madrazo-de la Garza, Torres J. *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* Genotypes in Mexican Adults and Children. *The Journal of Infectious Diseases* 2000; 182: 1450-1454.
25. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MK, Blazer M, Cover T. Mosaicism in Vacuolating Cytotoxin Alleles of *Helicobacter pylori*. *The Journal of Biological Chemistry* 1995; 270(30): 17771-17777.
26. Segal ED, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins LS. Altered states: Involvement of phosphotyrosylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci*. 1999. 96: 1459-1464.
27. Owen RJ, Sharp SI, Chisholm SA, Rijpkema S. 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. *J Clin Microbiol*. 2003. 41:3112-3318.
28. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Mégraud F, Pena S, Midolo P, Quiroz MM, Carneiro F, et al. Geographic Distribution of *vac A* allelic types of *Helicobacter pylori*. *American Gastroenterology Association* 1999; 116: 823-830.
29. Castillo-Rojas G, Mazarí-Hiriart M, López Vidal, Y. *Helicobacter pylori*: Focus on CagA and VacA major virulence factors. *Salud Pública de México* 2004; 46(6): 538-546.
30. Katz ME, Wright CL, Gartside TS, Cheetham BF, Doidge CV, Moses EK, et al. Genetic Organization of the Duplicated *vap* Region of the *Dichelobacter nodosus* Genome. *Journal of Bacteriology* 1994; 176(9): 2663-2669.

31. Cao Ping, Timothy L. High-Level Genetic in the *vap D* Chromosomal Region of *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology* 1997; 179(9): 2852-2856.
32. Catani CF, Azzoni AR, Paula DP, Tada SF, Rosselli LK, Souza AP, et al. Cloning, expression, and purification of the virulence-associated protein D from *Xylella fastidiosa*. *Protein Expression & Purification* 2004; 37: 320-326.
33. Hooper KE, Wilkie BN, Prescott JF. Immunoglobulin G Subisotype Responses of Pneumonic and Healthy, Exposed Foals and Adult Horses to *Rhodococcus equi* Virulence-Associated Proteins 2003; 10: 345-351.
34. Aarais M, Mendz G, Hazell S, Me'graud F. Metabolism and Genetics of *Helicobacter pylori*: The Genome Era. *American Society for Microbiology* 1999; 63 (3): 642-674.
35. Benoit S, Bnechour A, Taouji S, Auffray Y, Hartke A, et al. Induction of *vap* genes encoded by the virulence plasmid of *Rhodococcus equi* during acid tolerance response. *Res. Microbiol* 2001; 152: 439-449.
36. Clayton C, Mobley H, editors. *Helicobacter pylori* Protocols. Totowa (New Jersey): New press; 1997.
37. Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J. Genomic Islands in Pathogenic and Environmental Microorganisms. *Nature Review* 2004; 2: 414-424.
38. González-Valencia G, Atherton JC, Muñoz O, Dehesa M, Madrazo-de la Garza, Torres J. *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* Genotypes in Mexican

Adults and Children. *The Journal of Infectious Diseases* 2000; 182: 1450-1454.

39. Fernández F, Alonso G, Toro E. Estructura de mosaico del cromosoma bacteriano: Islas patogénicas. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel INHRR* 2004; 35(2): 20-31.
40. G. F. Webb and M. J. Blaser. Dynamics of bacterial phenotype selection in a colonized host. *PNAS* 2002; 99 (5): 3135-3140.
41. Israel, D.A., Peek, R.M. Patogénesis of *Helicobacte pylori* Induced Gastric Inflammation *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2001; 15: 1271-1290.
42. López E, López M, Robles G, Ramírez A, Mohar A, Meneses A, et al. Capsaicin Consumption, *Helicobacter pylori* Positivity and Gastric Cancer in Mexico. *Int. J. Cancer* 2003; 106: 277-282.
43. Karp G. *Biología Celular y Molecular*, editores. 1 ed. México: MacGraw-Hill Interamericana; 1996. p. 717-746.
44. Lodish, Berk, Ziporsky, Matsudaira, Baltimore, Darnell. *Biología Molecular*. 4 ed. España: médica Panamericana; 2003.
45. Malfertheiner P, Michetti FM, Price A. The year in *Helicobacter pylori* 2000 *Current Opinion in Gastroenterology*. Lippincott Williams & Wilkins 2000; 16(1): 1-37.
46. MacFaddin JF. *Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. 3ª ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2003: 73-87, 344-350 y 397-409.

47. Sánchez IP, Saldaña HA. La Reacción en Cadena de la Polimerasa a Dos Décadas De Su Invención. *Ciencia UANL* 2004 Septiembre; 7(3): 323-335
Cabrera J, Sánchez A. *Biología molecular e Ingeniería Genética*. 1 ed. Madrid (España): Harcourt; 2000.
48. O'Toole PW, Lane MC, Porwollik S. *Helicobacter pylori* motility. *Éditions scientifiques et médicales Elsevier* 2000; 2: 1207-1214.
49. Schmidt H, Hensel M. Pathogenicity Islands in Bacterial Patogénesis. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004; 17 (1): 14-56.
50. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J med*. 2000. 347: 1175-1186.
51. Torres J, Camorlinga M, González G. Validation of the String Test for the Recovery of *Helicobacter pylori* from Gastric Secretions and Correlation of Its Results with Urea Breath Test Results, Serology, and Gastric pH Levels. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39: 1650-1651.
52. Suerbaum S, Smith JM, Bapumia, Morelli G, Smith NH, Kunstmann E, et al. Free recombination within *Helicobacter pylori* (nucleotide sequencing horizontal genetic exchange evolution linkage equilibrium) *Microbiology Proc. Natl. Acad. Sci. US* 1998; 95: 12619-12624.
53. Courtney ET, Lisa Mm, Katharine CM, Ping C, Timothy LC, Mark HF, et al. Genomic Comparison of *cag* pathogenicity Island (PAI)- Positive and-Negative *Helicobacter pylori* Strains: Identification of Novel Markers for *cag* PAI -Positive Strains-. *Infect Immun*. 2005; 73(6): 3794-3798.

54. Apolinaria GC, Ricardo BT, Barra TR, Kawaguchi PF, Trabal N, Montenegro S, et al. Genotipificación de aislados clínicos de *Helicobacter pylori* en base a genes asociados a virulencia de una cepa *babA2* positiva en pacientes chilenos. Rev. Med. Chile. 2006; 134: 981-988.
55. Letley DP, Lastovica A, Louw JA, hawrey CJ and Atherton JC. Allelic Diversity of the *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin Gene in South Africa: Rarity of the *vacA* s1a Genotype and natural Ocurrence of an s2m1 Allele J. Clin. Microbiol 1999; 37(4): 1203-1205.