



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades
Infecciosas y Parasitarias (UIMEIP) Centro Médico
Nacional Siglo XXI, IMSS

“Análisis de motivos EPIYA en cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes con gastritis, úlcera duodenal y cáncer gástrico”

TESINA QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

PRESENTA:

M en C. Rubén Gerardo Zamora Mendoza



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a la Dra. Margarita Camorlinga Ponce por abrirme las puertas de su laboratorio compartir y guiarme a través de su vasto conocimiento que me dio la luz hacia nuevos horizontes y expectativas en el campo de la investigación microbiológica.

A la Dra. Norma por brindarme su invaluable apoyo en el manejo de las técnicas empleadas, mismo que me brindo con especial interés y amable paciencia.

También agradezco a la Dra. Adriana Reyes por guiarme en la senda correcta al compartir su invaluable conocimiento y experiencia acerca del tema que me llevo a concretar este estudio con un matiz de veracidad y certeza.

A la química Nayelli que me brindo su apoyo en la enseñanza de las técnicas básicas que me abrió un panorama sobre el manejo integral en el procesamiento de las muestras que me servirían como materia prima para concretar mi tesina.

Y a todos los integrantes del laboratorio de bacteriología que me acogieron de forma amable y amistosa, a los doctores y doctoras, técnicos y estudiantes, de quienes aprendí invaluable lecciones y me ayudaron a incrementar mi conocimiento y a superarme en lo personal y profesional.

A todos mis maestros y maestras que me trajeron y compartieron la luz de sus conocimientos y que espero en un futuro poder retransmitirlos con la misma emoción y énfasis como lo hicieron conmigo

A mi padre el cual siempre creyó en mí y me dio su apoyo material y moral, mismo que me llevo a superarme y sé que cada logro que he alcanzado es uno también para él, espero no defraudarlo.

Resumen

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa que coloniza el epitelio gástrico y que puede producir enfermedades gastroduodenales, desde gastritis hasta cáncer. La presencia de la isla de patogenicidad *cagA* (*cag*-PAI) y los sitios de fosforilación de la proteína CagA en los motivos EPIYA son de los principales factores de virulencia que pueden vincular la infección con la progresión hacia la neoplasia gástrica. El objetivo del presente estudio fue determinar el patrón y número de motivos EPIYA en cepas de *H. pylori* aisladas de biopsias gástricas (cuerpo/antro) de pacientes mexicanos con diferentes lesiones gástricas. Se aislaron 48 cepas de *H. pylori* de pacientes con gastritis no atrófica (GNA), úlcera duodenal (UD) y cáncer gástrico (CG). Se purificó el DNA bacteriano y se amplificó por PCR usando secuencias iniciadores correspondientes al extremo 3' del gen *cagA*. Los productos amplificados se analizaron en geles de agarosa al 1.5%, y se secuenciaron para determinar el número y patrón de motivos EPIYA. Se obtuvieron 48 muestras de DNA de cepas *cagA* positivas, 18% correspondieron a GNA, 32% a GA, 6% a UD y 25% a CA. Se observó que el tamaño de los productos amplificados mostró diferencias, entre las muestras provenientes de diferentes padecimientos variando entre los 492 a 861pb. La región del extremo 3' de *cagA* secuenciada reveló un patrón de motivos EPIYA del tipo occidental (A-B-C) en 4 biopsias (GA, CA, UD y GNA), una de UD (ABCC) y de tipo ABCCC en biopsias de GNA y UD. Las secuencias analizadas revelaron tener un patrón de motivos EPIYA ABC en biopsias de GNA, sin embargo este patrón se encontró en una biopsia de CG, no así en biopsias de UD y GNA donde se encontró un patrón del tipo ABCC y ABCCC, lo que según otros estudios deberían de corresponder a lesiones asociadas a neoplasia o cáncer. Los patrones EPIYA encontrados en las cepas de *H. pylori* de este estudio, no mostraron relación con el padecimiento estudiado.

Palabras clave: *cagA* PAI, *cagA*, EPIYA, *H. pylori*, biopsia, Gastritis no atrófica (GNA), gastritis atrófica (GA), Úlcera duodenal (UD), Cáncer (CA).

Índice

Resumen

Introducción	1-20
Características microbiológicas de <i>Helicobacter pylori</i>	1
Morfología	1
Crecimiento	1
Metabolismo	2
Genoma	2
Importancia clínica de la infección con <i>H. pylori</i>	3
Enfermedades asociadas a la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	3
Gastritis	3
Gastritis aguda	4
Gastritis crónica	4
Úlcera péptica	4
Cascada pre-cancerosa	5
Gastritis crónica activa no atrófica	6
Gastritis atrófica multifocal	7
Metaplasia intestinal	8
Displasia	9
Epidemiología de la infección	10
Métodos de diagnóstico	11
Tratamiento de la infección	12
Factores de patogenicidad	13
Factores de virulencia	14
Citotoxina vacuolante VacA	14
Adhesinas y proteínas de membrana externa	15
Isla de patogenicidad Cag A (<i>cag</i> PAI)	15-16
Motivos EPIYA: Sitios de fosforilación de la proteína CagA	17
Motivos EPIYA de cepas del Este de Asia	18
SHP-2 como blanco celular de CagA tirosina fosforilada	19-20
Antecedentes	21
Justificación	22
Hipótesis	22
Objetivos	23
General	23
Particulares	23
Diseño del estudio	24-25

Metodología	26-32
Aislamiento de <i>Helicobacter pylori</i> a partir de biopsias	26
Cultivo y/o resiembra de las colonias de <i>H. pylori</i>	27
Tinción de Gram y pruebas bioquímicas para identificación de <i>H. pylori</i>	27-28
Método de GES modificado para la extracción de DNA cromosómico bacteriano	28-29
Reacción en cadena de polimerasa (PCR) del extremo 3´ del gen <i>cagA</i>	29
Reacción en cadena de polimerasa (PCR) de secuenciación	30
Purificación de los productos de PCR de secuenciación	31
Secuenciación de la región del extremo 3´ del gen <i>cagA</i>	31
Análisis de las secuencias del extremo 3´ del gen <i>cagA</i>	32
Resultados	33-38
Discusión	39-42
Conclusiones	43
ANEXO	
Material	44
Equipo	45
Referencias	46-57

Índice de figuras

Figura	Título	Página
1	Papel de <i>Helicobacter pylori</i> en la carcinogénesis gástrica	6
2	Gastritis atrófica multifocal	7
3	Gastritis atrófica multifocal con metaplasia intestinal completa	8
4	Displasia gástrica de bajo grado	9
5	Papel del sistema de secreción tipo IV para Cag en la modulación del sistema inmune	16
6	Anatomía molecular de las regiones conteniendo motivos EPIYA	18
7	Motivos EPIYA de la proteína CagA de aislados de <i>H. pylori</i> occidentales	19
8	Mecanismo de acción de CagA fosforilada	20
9	Frecuencia de <i>H. pylori</i> cagA positivas aisladas de pacientes con enfermedad gastroduodenal	33
10	Frecuencias de <i>H. pylori</i> cagPAI positivas y negativas	34
11	Frecuencia de <i>H. pylori</i> cagA positivas y negativas aisladas de antro y cuerpo gástricos	35
12	Electroforesis en gel de agarosa indicando ausencia de la isla de patogenicidad (cagPAI)	35
13	Frecuencia por tamaños (pb) de los productos amplificados por PCR para la región 3' del gen <i>cagA</i> provenientes de diferentes lesiones gastroduodenales	36
14	Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR del extremo 3' del gen <i>CagA</i>	37
15	Secuencias de aminoácidos de la región de repetidos C-terminal de cultivos aislados provenientes de biopsias de pacientes con diferentes lesiones gastroduodenales	38

Índice de tablas

Tabla	Título	Página
1	Métodos de diagnóstico de la infección con <i>H. pylori</i>	12
2	Iniciadores del extremo 3' del gen <i>cagA</i>	30
3	Número de total de DNA extraído de cultivos de biopsias con lesiones gastroduodenales	33
4	Frecuencia y porcentaje de cultivos cagPAI positivos y negativos	34
5	Número y porcentaje de los tamaños (pb) de los productos de PCR obtenidos por amplificación de la región 3' del gen <i>cagA</i>	26
6	Relación entre el DNA secuenciado procedente de diferentes lesiones gastroduodenales y el número y tipo de patrón de motivos EPIYA	38

Introducción

Características microbiológicas de *Helicobacter pylori*

Morfología

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa que mide de 2 a 4 μm de longitud y 0.5 a 1 μm de ancho. Usualmente presenta una forma helicoidal, pero puede aparecer también como bacilo, mientras que las formas de coco se aprecian en cultivos viejos ⁽⁵⁸⁾. En medios de cultivo suplementados con sangre de carnero se observan como colonias pequeñas brillantes y transparentes ⁽³²⁾.

Los organismos tienen de 2 a 6 flagelos unipolares de aproximadamente 3 μm de longitud. El flagelo le confiere movimiento y permite su desplazamiento rápido sobre la capa mucosa de las células epiteliales gástricas ⁽⁸⁴⁾. Esta característica, junto con su morfología helicoidal, ayudan a la colonización del estómago por *H. pylori*.

Crecimiento

H. pylori es una bacteria microaerófila, con crecimiento óptimo a niveles de 2-5% de O_2 y 5-10% de CO_2 y ambiente de alta humedad. Algunos laboratorios emplean condiciones microaeróbicas estándar de N_2 (85%), CO_2 (10%) y O_2 (5%) para el cultivo de *H. pylori*. El crecimiento puede darse de 34 a 40°C de temperatura con un óptimo a 37°C. Aunque su hábitat natural es la mucosa gástrica ácida, se considera que *H. pylori* es neutrofílica, sobreviviendo en un estrecho rango de pH (5.5 a 8.0) con un crecimiento óptimo a pH neutro. ^{(98) (108)}

Metabolismo

H. pylori carece de varias rutas biosintéticas que se encuentran en bacterias menos especializadas, como las bacterias entéricas ^{(5) (67) (109)}. Sólo puede crecer en medios químicamente definidos con la adición de los aminoácidos arginina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina y valina, algunas cepas también requieren alanina y/o serina ^{(77) (92)}.

H. pylori presenta positividad a la ureasa, catalasa y oxidasa, características que se emplean para su identificación. Esta bacteria solo metaboliza glucosa ^{(15) (31) (67) (79)}.

Genoma de *H. pylori*

Hasta ahora han sido secuenciadas cuatro cepas de *H. pylori*, las dos primeras fueron la 26695, aislada de un paciente británico y la J 99 aislada de un paciente americano. El tamaño de los genomas secuenciados de *H. pylori* es de aproximadamente 1.7 Mpb, con un contenido de G+C de 35-40%. La cepa de *H. pylori* 26695 contiene 1587 genes, mientras que la cepa J99 tiene 1491 genes ^{(5) (17) (109)}.

Ambos genomas contienen dos copias de los genes de RNAr 16S, 23S y 5S. *H. pylori* es altamente heterogénea genéticamente, posiblemente por las condiciones del ambiente gástrico del huésped, así como a varios factores de la respuesta inmune mediada por el huésped en respuesta a la infección ⁽⁵⁶⁾. La heterogeneidad genética ocurre por rearrreglos del DNA y la inserción o delección de secuencias externas ^{(1) (34)}.

Estas modificaciones contribuyen a un contenido aberrante de G+C que con frecuencia se presentan en genes involucrados en la virulencia un ejemplo, de esto es la isla de patogenicidad Cag (*cag* PAI) ^{(29) (60) (80) (97)}.

Importancia clínica de la infección por *Helicobacter pylori*

H. pylori es el agente causal de diversas enfermedades gastroduodenales tales como gastritis crónica atrófica y úlcera péptica. Además, la infección crónica de esta bacteria en el estómago es un importante factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico. Diversos estudios epidemiológicos han apoyado el riesgo de la infección con *H. pylori* y cáncer gástrico ⁽¹¹²⁾. Debido a esto la agencia internacional de investigación del cáncer (IARC), clasificó a *H. pylori* como un carcinógeno clase I en 1994 ^{(86) (51) (120) (50) (28) (112)}.

Enfermedades asociadas a la infección por *H. pylori*

La colonización con *H. pylori* invariablemente causa inflamación gástrica que en más del 80% de los casos es asintomática. Se calcula que pacientes positivos a la infección tienen de un 10 a 20% de probabilidades de desarrollar enfermedad ulcerante y de 1 a 2% de desarrollar cáncer gástrico distal ^{(33) (55) (57)}.

Gastritis

La colonización con *H. pylori* siempre lleva a la infiltración por neutrófilos y células mononucleares de la mucosa gástrica tanto en el cuerpo como del antro produciendo una gastritis crónica activa, siendo la primera evidencia asociada a la colonización y a partir de ésta se pueden desarrollar otro tipo de enfermedades asociadas a este proceso inflamatorio ⁽²⁴⁾.

Gastritis aguda

La infección inicia con una etapa aguda, datos sobre esta fase de la infección son escasos, sin embargo un experimento realizado con voluntarios a los cuales se les inoculó una cepa bien caracterizada de *H. pylori* presentaron una asociación temporal con síntomas dispépticos no específicos, tales como sensación de plenitud, náusea, vómito y considerable inflamación de la mucosa estomacal proximal o distal y pangastritis. Esta fase está frecuentemente asociada con hipoclorhidria que puede durar por meses ⁽⁴¹⁾.

Gastritis crónica

Cuando la colonización llega a ser persistente, se establece una estrecha relación entre el nivel de secreción de ácido clorhídrico y la distribución de la gastritis. Esta relación resulta en un efecto contrario del nivel del ácido sobre el crecimiento bacteriano y la inflamación de la mucosa gástrica, que regula la secreción de este ⁽⁴¹⁾.

Úlcera péptica

Las úlceras gástricas o duodenales (comúnmente referidas como úlceras pépticas) se definen como defectos en la mucosa gástrica con un diámetro de al menos 0.5 cm que penetran la mucosa muscularis, que es una delgada capa de fibras musculares que separan la mucosa.

Las úlceras gástricas principalmente se manifiestan en la curvatura menor del estómago, en particular en la transición del cuerpo a la mucosa del antro ⁽¹¹⁴⁾.

Las úlceras duodenales generalmente se presentan en el bulbo duodenal, el cual está más expuesto al ácido gástrico.

Aproximadamente el 95% de las úlceras duodenales y el 85% de las úlceras gástricas se manifiestan en presencia de *H. pylori*, usualmente en sitios donde la inflamación de la mucosa es más severa ⁽⁵⁷⁾.

En sujetos con decremento de la secreción de ácido la inflamación se presenta en la zona gástrica transicional entre el cuerpo y el antro dando origen a enfermedad de úlcera péptica. Si la producción de ácido es elevada y la colonización por *H. pylori* es preferentemente en el antro gástrico, se puede desarrollar úlcera duodenal y si los niveles de ácido son bajos y la colonización es mayor en cuerpo gástrico se desarrolla úlcera gástrica o cáncer gástrico ⁽¹¹⁴⁾.

Cascada pre-cancerosa

En 1975 Correa y cols ⁽²²⁾, antes del conocimiento de *H. pylori* como factor etiológico de carcinogénesis, propusieron un modelo que describía las etapas de progresión hacia la carcinogénesis gástrica como se describe en la figura 1. El seguimiento por un periodo largo de poblaciones con un alto riesgo de cáncer gástrico hizo posible documentar la dinámica del proceso pre-canceroso.

El proceso inicia desde la infección de la mucosa gástrica con *H. pylori* y evoluciona a lo largo de décadas de infección gástrica hasta cáncer gástrico: gastritis crónica activa no atrófica → gastritis atrófica multifocal → metaplasia intestinal (primero completa, luego incompleta) → displasia → carcinoma invasivo ^{(23) (104)}.

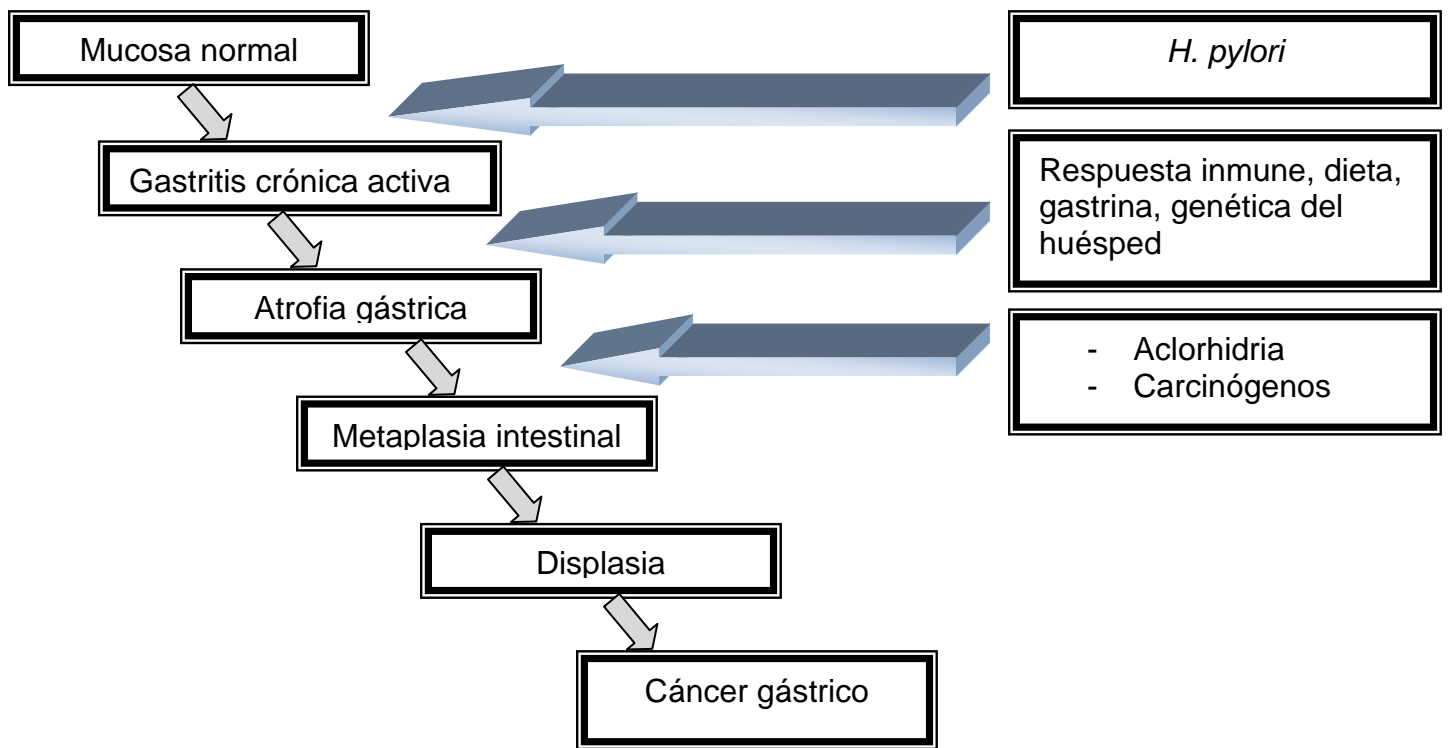


Figura.1

Modelo que representa el papel de *Helicobacter pylori* y otros factores en la carcinogénesis gástrica. Basado en la cascada propuesta por Correa y cols. 1975. Tomado de Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection ⁽⁵⁹⁾

Gastritis crónica activa no atrófica

La gastritis crónica activa no atrófica se caracteriza por infiltración difusa de la mucosa gástrica por leucocitos resultando en una inflamación crónica. Es llamada “activa” cuando los neutrófilos polimorfonucleares se encuentran presentes, lo que representa la fase aguda de la inflamación. Esta fase del proceso pre-canceroso no muestra pérdida de glándulas (atrofia), por lo que se le llama no atrófica. En muchos casos la gastritis no atrófica está localizada predominantemente o exclusivamente en el antro en pacientes con una secreción alta de ácido.

Este tipo de gastritis se encuentra regularmente en pacientes con úlcera duodenal y por alguna razón no incrementan el riesgo para desarrollar cáncer. Esta forma de gastritis usualmente no progresa a la atrofia o metaplasia ⁽⁴²⁾.

Sin embargo en pacientes con una secreción disminuida de ácido debido a medicación con inhibidores de la bomba de protones (PPI), la gastritis no atrófica activa llega a presentarse predominantemente en la mucosa del cuerpo (oxintica), llevando a una pangastritis del cuerpo gástrico ⁽⁵⁷⁾. La reducción de ácido debido a pérdida de células parietales da como resultado el desarrollo de gastritis atrófica.

Gastritis atrófica multifocal

La inflamación crónica inducida por *H. pylori* puede eventualmente llevar a pérdida de la arquitectura normal de la mucosa gástrica, con destrucción de las glándulas gástricas y reemplazo por fibrosis y epitelio de tipo intestinal ⁽⁵⁷⁾ (Fig.2)

La pérdida focal de glándulas (atrofia) toma lugar primero en la unión del cuerpo-antro, especialmente alrededor de la incisura angularis. Con el tiempo el tejido fibroso llena el vacío dejado por la pérdida de las glándulas ⁽²⁴⁾.

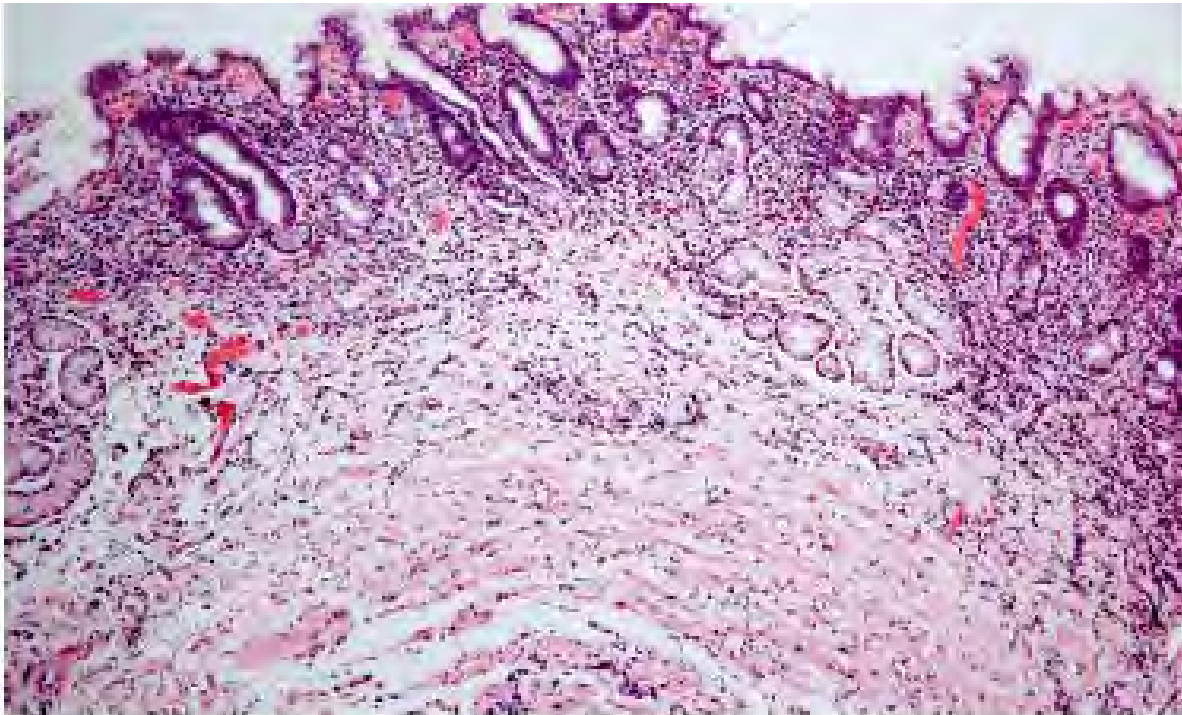


Figura.2

Gastritis atrófica multifocal.

Se observa la pérdida de glándulas del antro y su reemplazo por tejido fibroso. Tomado de Carcinogenesis of *Helicobacter pylori* ⁽²⁴⁾

Metaplasia intestinal

En este estadio hay un reemplazo de las glándulas por células de fenotipo intestinal. Las células intestinales metaplásicas en las primeras fases asemejan a la mucosa intestinal: eosinofilos presentes, enterocitos absorbentes con un “borde en cepillo” bien desarrollado y compuesto de múltiples micro vellosidades. (Fig.3) Alternando a intervalos regulares células llenas de mucina, ésta metaplasia recibe varios nombres: tipo intestino delgado, por su estructura morfológica; tipo I basado en la histoquímica por la presencia de mucina⁽³⁷⁾; o “completa” reflejando el hecho que secreta el conjunto normal de enzimas digestivas tales como sacarasa, trehalosa y fosfatasa alcalina⁽⁶⁹⁾.

En las últimas etapas, las células metaplasicas pierden su fenotipo de intestino delgado, adquiriendo características morfológicas de intestino grueso y están ocupadas solo por células cáliz de diferentes tamaños. Este tipo es llamado “incompleta” o metaplasia colónica, e incluye los tipos II y III⁽³⁰⁾.

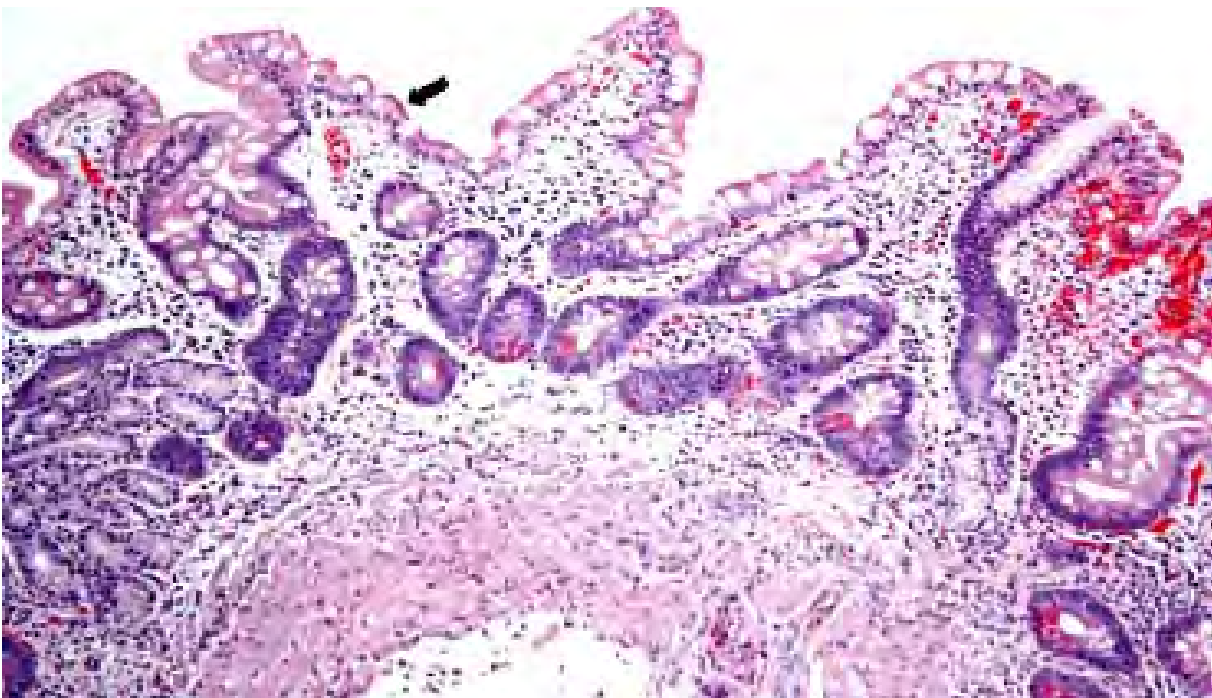


Figura.3

Gastritis atrófica multifocal con metaplasia intestinal completa

Se observan enterocitos absorbentes con borde de cepillo. Las glándulas originales han desaparecido y reemplazado por células metaplasicas. Tomado de Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*⁽²⁴⁾

Displasia

La displasia está caracterizada por cambios atípicos en la morfología nuclear y arquitectura celular. El núcleo del epitelio displásico está agrandado, hiper Cromático, irregular en su forma y desprovisto de polaridad. La arquitectura es irregular, formando frecuentemente estructuras tubulares en paquetes (adenomas) con lumen irregular (Fig.4) Las displasias son clasificadas como de bajo y alto grado, dependiendo del grado de atipia nuclear y distorsión de la arquitectura.

Todas las células atípicas están confinadas a estructuras tubulares, si estas cruzan la membrana basal se convierten en carcinomas invasivos. A las displasias también se les llama neoplasias intraepiteliales ⁽⁹⁵⁾.

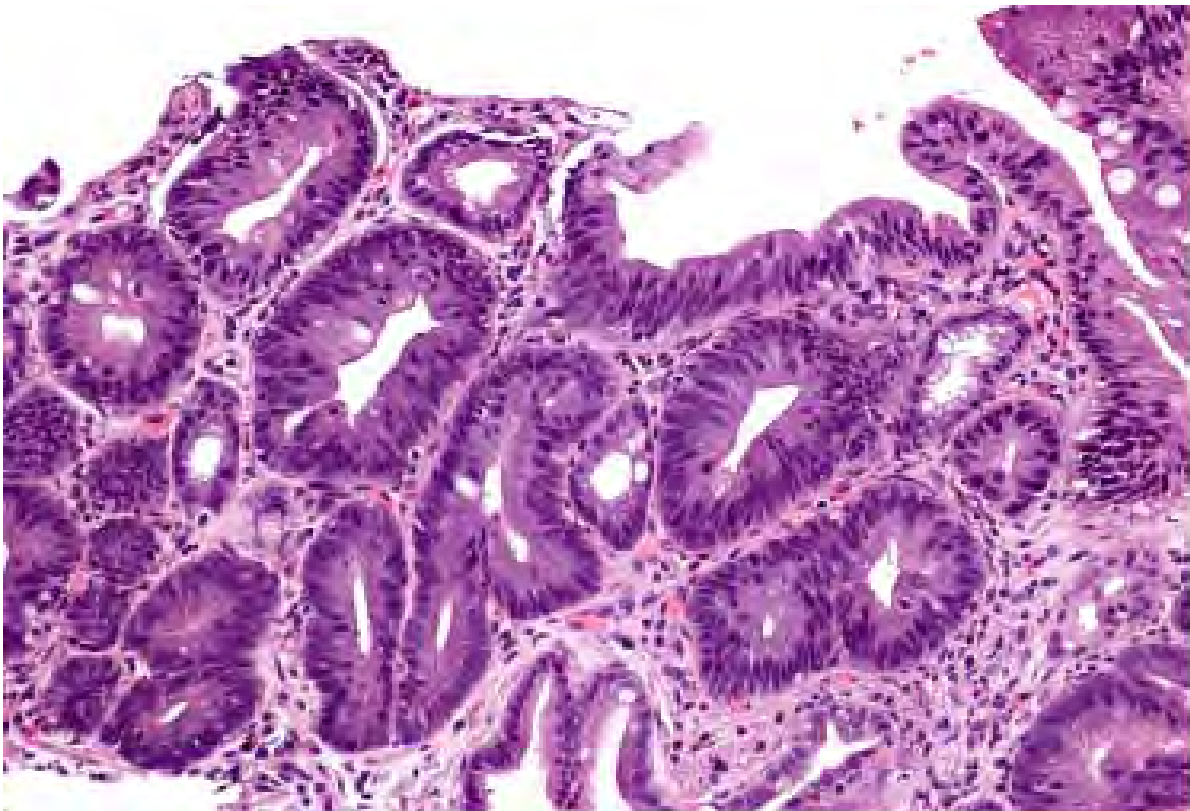


Figura.4

Displasia gástrica de bajo grado

Se observan presencia anormal de glándulas irregulares cubiertas por células epiteliales, núcleo agrandado, hiper Cromático y pseudoestratificado y frecuente mitosis. Tomado de Carcinogenesis of *Helicobacter pylori* ⁽²⁴⁾

Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*

La prevalencia de la infección por *H. pylori* muestra gran variación geográfica. Así la prevalencia de esta bacteria correlaciona inversamente con el estado socioeconómico, en particular a las condiciones de vida durante la niñez ⁽⁶⁵⁾. En países subdesarrollados más del 80% de la población es positiva a la infección confirmada por métodos histológicos, aun a edades jóvenes ⁽⁸⁹⁾, en México el 85% de los adultos mayores de 20 años esta colonizado con este bacilo ⁽¹¹⁰⁾.

Sin embargo, la prevalencia en países industrializados esta abajo del 40% y es considerablemente más bajo en niños y adolescentes que en personas adultas ⁽⁹¹⁾.

En países subdesarrollados, la tasa de infección se incrementa rápidamente en los primeros 5 años de vida y permanece constante, indicando que *H. pylori* es adquirida en etapas tempranas de la niñez ⁽³⁶⁾.

Se piensa que la transmisión de la infección por *H. pylori* que ocurre de manera directa por medio de la transmisión humano-humano por las vías oral-oral u oral-fecal o ambas, de forma primaria durante la niñez y principalmente dentro de familias.

H. pylori ha sido detectado en saliva, vómito, reflujo gástrico y heces ^{(4) (18) (35) (52) (62) (87) (103)}, pero no hay una evidencia concluyente que se incline sobre una vía de transmisión predominante por medio de esos fluidos.

Métodos de diagnóstico de infección por *H. pylori*

Las pruebas de diagnóstico disponibles están generalmente divididas en pruebas invasivas, basadas en toma de biopsias gástricas por endoscopia para histología, cultivo u otros métodos. En las pruebas no invasivas no se requiere biopsia, se utilizan métodos serológicos o la prueba de aliento con urea- C^{13} .⁽⁶⁴⁾ (113) (123). La serología para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* se basan en la detección de anticuerpos séricos de clases IgG o IgA contra antígenos específicos de este microorganismo⁽⁹⁶⁾. Las técnicas más empleadas para la detección de anticuerpos son: ensayo inmunoenzimático de enzima ligada (ELISA), aglutinación en látex, inmunoensayos sobre papel de nitrocelulosa (immunoblotting) e inmunocromatografías (ICM), entre otras⁽⁶⁶⁾. La prueba del aliento se basa también en la actividad de la ureasa de *H. pylori*, pero en este caso con urea marcada. Como resultado de la ingestión de una suspensión de urea marcada con C^{13} o C^{14} , ocurre la hidrólisis de la urea y se forma anhídrido carbónico que se absorbe en los tejidos, se difunde a la sangre, es transportado a los pulmones y de allí es exhalado a través del aliento⁽⁶⁴⁾. La cantidad de CO_2 marcado que se exhala está en relación directa con la intensidad de la hidrólisis de la ureasa del microorganismo y, por tanto, con la presencia de *H. pylori*⁽⁷³⁾. Para propósitos de diagnóstico de rutina, la histología, la prueba de urea en aliento y el cultivo son los métodos más frecuentemente usados (Tabla.1) Para niños, la prueba de antígeno en heces ofrece la oportunidad de diagnosticar infección con *H. pylori* sin la necesidad de una endoscopia o punción venosa.

Diagnostico de infección con <i>H.pylori</i>			
Método de diagnostico	Sensibilidad y especificidad (a)	Aplicación típica	Consideraciones
Métodos invasivos			
Histología	>95%	“Estándar de oro” de diagnostico de rutina en hospitales	Requiere de un patólogo experto; también provee datos histológicos sobre inflamación y atrofia
Cultivo de biopsia	>95%	Alternativa al estándar de oro	Permite pruebas de sensibilidad antimicrobiana; requiere experiencia microbiológica específica
Prueba rápida de ureasa (CLO)	>90%	Prueba rápida y costo-accesible	Requiere una prueba adicional para confirmación de infección con <i>H.pylori</i>
Métodos no invasivos			
Prueba de urea en aliento	>95%	Alternativa al estándar de oro	Muy usada, prueba confiable para evaluar el éxito del tratamiento de erradicación de <i>H.pylori</i> ; disponibilidad limitada debido al requerimiento de equipo costoso
Prueba de antígeno en heces	>90%	Aun no usada ampliamente	Prueba simple pero no confiable para la evaluación del éxito del tratamiento de erradicación de <i>H.pylori</i>
Serología	80-90%	Principalmente usada para estudios epidemiológicos	Confiable insuficiente para procedimiento de rutina; no provee información actual de la infección debido a la memoria inmunológica

(a) Rango global, dependiendo de la variación regional y sujetos

Tabla.1 Tomado de Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection⁽⁵⁹⁾

Tratamiento de la infección por *H. pylori*

En pacientes infectados, uno de los medicamentos más empleados en el tratamiento es claritromicina, la cual tiene una tasa aproximada de erradicación del 40% cuando se administra dos veces al día por 10 o 14 días^{(40) (70) (90)}. Se ha empleado terapia doble combinando una dosis diaria, dos veces al día de PPI (inhibidores de la bomba de protones) con amoxicilina la cual es aun empleada en algunos países, pero han sido reemplazadas por terapias triples la cual tiene como objetivo eliminar la bacteria y tratar los síntomas presentes incluyendo úlcera y gastritis, esta combina tres antibióticos amoxicilina, claritromicina y tetraciclina, con un compuesto de bismuto y PPI. El modo exacto de acción de los compuestos de bismuto es desconocido, pero *H. pylori* es susceptible a estos compuestos tanto *in vivo* como *in vitro*^{(9) (61) (116)}.

La tetraciclina, amoxicilina e imidazoles (predominantemente metronidazol y tinidazol) y unos pocos macrólidos seleccionados (en particular claritromicina y algunas veces azitromicina) son probablemente los fármacos más ampliamente usados para la terapia de erradicación por *H. pylori*.

Desafortunadamente, se ha incrementado el número de infecciones individuales que portan cepas resistentes a este primer tratamiento con antibióticos. Esto ha hecho que el tratamiento inicial falle y se requiera de aplicaciones adicionales de terapia antibiótica. Se utiliza entonces una cuádruple terapia, incorporándose el bismuto, un metal que es también efectivo en combinación con otros fármacos. En casos de resistencia a la claritromicina, se recomienda el uso de levofloxacino como parte de la terapia ⁽⁷¹⁾.

Factores de patogenicidad de *Helicobacter pylori*

Los factores de patogenicidad son aquellos que le permiten a *H. pylori* sobrevivir en el ambiente hostil del lumen gástrico y una vez establecido en el epitelio, causar daño al hospedero. Algunas enzimas metabólicas que son utilizadas por esta bacteria, para producir daño al tejido son la fosfolipasa, mucinasa y ureasa. La primera le ayuda al bacilo a desorganizar la capa protectora de la membrana apical de las células gástricas y la mucinasa desorganiza la barrera de la mucosa gástrica en tanto que la ureasa le permite a la bacteria defenderse de las condiciones adversas del ambiente ácido del estómago ⁽⁶⁾. Esto es posible ya que la ureasa es capaz de hidrolizar cantidades limitadas de urea disponible en el estómago para generar amonio y CO₂, lo cual incrementa el pH. Se ha propuesto que la ureasa externa genera una nube de amonio alrededor de la bacteria que la protege contra la acidez del estómago ⁽²¹⁾.

Factores de virulencia

Los factores de patogenicidad que posee la bacteria para persistir y/o producir daño, no bastan para explicar la variedad de los cuadros clínicos que produce; este bacilo posee varios genes asociados con su virulencia, como son: *vacA*, *cagA*, *babA* y *oipA* ⁽⁶⁾.

Citotoxina vacuolante VacA

Cerca del 50% de todas las cepas de *H. pylori* secretan VacA que es una proteína de 95 KDa muy inmunogénica que induce vacuolización masiva en células epiteliales *in vitro* ⁽²⁷⁾. VacA tiene un papel importante en la patogénesis de la úlcera péptica y el cáncer gástrico ^{(12) (68) (83) (117)}. VacA promueve la formación de canales membranales, la disrupción del endosoma y la actividad lisosomal, tiene efectos sobre la señalización celular inducida por receptor de integrina, interfiere con las funciones celulares dependientes del citoesqueleto, induce apoptosis y modula la respuesta inmune ^{(26) (45)}. Respecto a la inducción de apoptosis Galmiche ⁽³⁹⁾ ha señalado que fragmentos de VacA expresadas en células no gástricas (HeLa) transfectadas temporalmente e insertadas dentro de membranas mitocondriales inducen liberación de citocromo c y activa la cascada de señalización de muerte celular dependiente de caspasa-3. Estas observaciones son consistentes en donde la caspasa-3 activada se incrementa dentro de la mucosa gástrica de humanos y monos infectados con *H. pylori* comparados con tejidos no infectados ⁽¹¹⁾.

Adhesinas y proteínas de membrana externa

La adherencia y colonización son reconocidos como propiedades esenciales de las bacterias patógenas, incluyendo *H. pylori* ⁽¹²⁴⁾. Al menos 32 proteínas de membrana externa de *H. pylori* (*outer membrane protein*, OMPs) han sido identificadas, muchas de las cuales están involucradas en la adherencia bacteriana ⁽¹⁰⁹⁾. Entre estas se incluyen a proteínas de la familia Hop, cuyos miembros más representativos son BabA (HopS), OipA (HopH) y SabA (HopP). OipA está asociada con la isla de patogenicidad *cag* (*cag* PAI) ⁽¹²²⁾.

Isla de patogenicidad Cag A (*cag* PAI)

La presencia de cepas de *H. pylori* más patógenas que otras ésta relacionada con un incremento en la capacidad de las cepas de producir cambios morfológicos, vacuolización y degeneración gradual de células *in vitro* e *in vivo* ⁽⁶³⁾. Esta actividad se vinculó a la presencia de una proteína con un peso molecular de 120 a 140 KDa que fue llamada CagA (“Citotoxina asociada al gen A”).

Esta proteína es altamente inmunogénica y está codificada por el gen *cagA* que es un fragmento de DNA de aproximadamente 40 kb que contiene un grupo de genes que codifican entre 27 y 31 proteínas ^{(2) (3) (25)}, dieciocho de estas proteínas sirven para el ensamblaje del sistema de secreción tipo IV (TFSS, por sus siglas en inglés) ^{(19) (2)}. Este sistema de secreción forma una estructura tipo jeringa capaz de penetrar las células del epitelio gástrico, facilitando la translocación de CagA, peptidoglicanos y otros factores bacterianos ^{(10) (20) (25) (38) (82) (81) (99)}. Una vez translocada CagA se localiza en la superficie interna de la membrana plasmática donde sufre fosforilación de tirosinas por cinasas de la familia Src (SFK) ^{(99) (82) (10) (107) (13) (106) (100)}. Tales como c-Src, Fyn, Lyn y Yes ^{(100) (196)}.

Estas familias de cinasas fosforilan la proteína CagA en residuos de tirosinas dentro de la proteína denominados motivos EPIYA. CagA fosforilada entonces interactúa con moléculas de señalización, tales como la tirosina fosfatasa SHP-2, lo cual resulta en cambios morfológicos en células epiteliales como se describe en la figura 5 ⁽⁷⁴⁾ ⁽⁷⁶⁾. *cag* PAI también afecta la respuesta inmune debido a su habilidad de inducir apoptosis de células T ⁽⁸⁸⁾ ⁽¹¹⁸⁾. La interacción entre la estructura de secreción tipo IV y las células del huésped resulta en la inducción de citocinas proinflamatorias en las células epiteliales ⁽¹¹⁹⁾ ⁽⁹⁹⁾. (Fig.5) Aunque esta respuesta puede estar más asociada a la presencia del peptidoglicano por la interacción del sistema de secreción tipo IV con la célula eucariota ⁽¹¹⁵⁾.

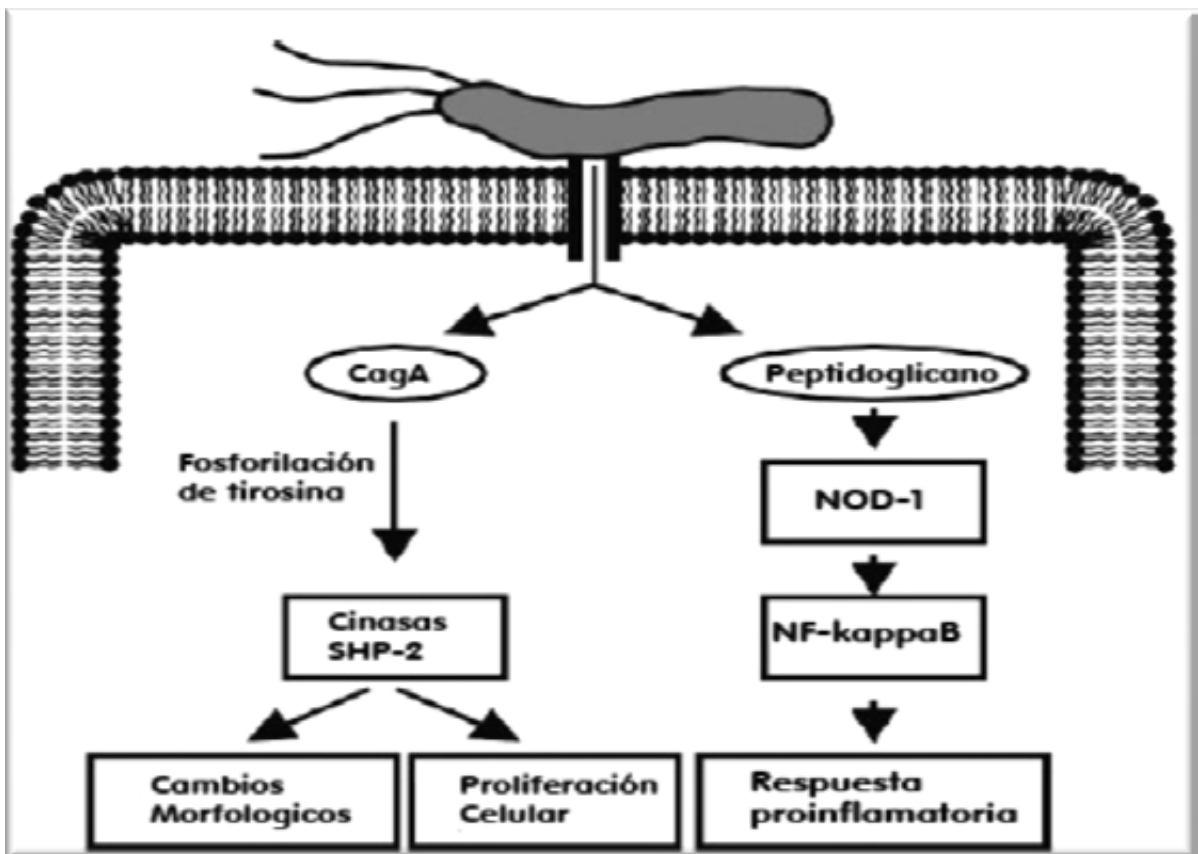


Figura.5

Esquema que representa el papel del sistema de secreción tipo IV para Cag en la modulación del sistema inmune, proliferación celular y cambios morfológicos. Tomado de Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection ⁽⁵⁹⁾.

Motivos EPIYA: Sitios de fosforilación de la proteína CagA

El sitio de fosforilación de tirosinas de CagA está caracterizado por la presencia de un motivo único de **Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala** (EPIYA), los cuales se encuentran presentes en diferentes frecuencias en la región carboxilo terminal ⁽⁴⁸⁾. Como se describe en la figura 6 en las secuencias de aminoácidos que flanquean los motivos EPIYA se distinguen cuatro segmentos EPIYA distintos EPIYA-A -B -C y -D, cada uno contiene un motivo EPIYA único que ha sido identificado en la proteína CagA ⁽⁴⁷⁾ ⁽⁴⁹⁾.

La proteína CagA aislada de cepas occidentales como se describe en la figura 7 se caracteriza por poseer un segmento de 32 aminoácidos que flanquea el motivo EPIYA-A y un segmento de 40 aminoácidos para el motivo EPIYA-B, seguido por un segmento de 34 aminoácidos para el motivo EPIYA-C el cual puede estar repetido de una a tres veces entre diferentes tipos de CagA occidentales como resultado de una recombinación homóloga de un segmento del gen *cagA* de 102 pb, el cual codifica para un segmento EPIYA-C de 34 aminoácidos, el motivo EPIYA-C es el mayor sitio de fosforilación de la proteína CagA occidental por SFK en células epiteliales gástricas ⁽⁴⁷⁾. (Fig.6)

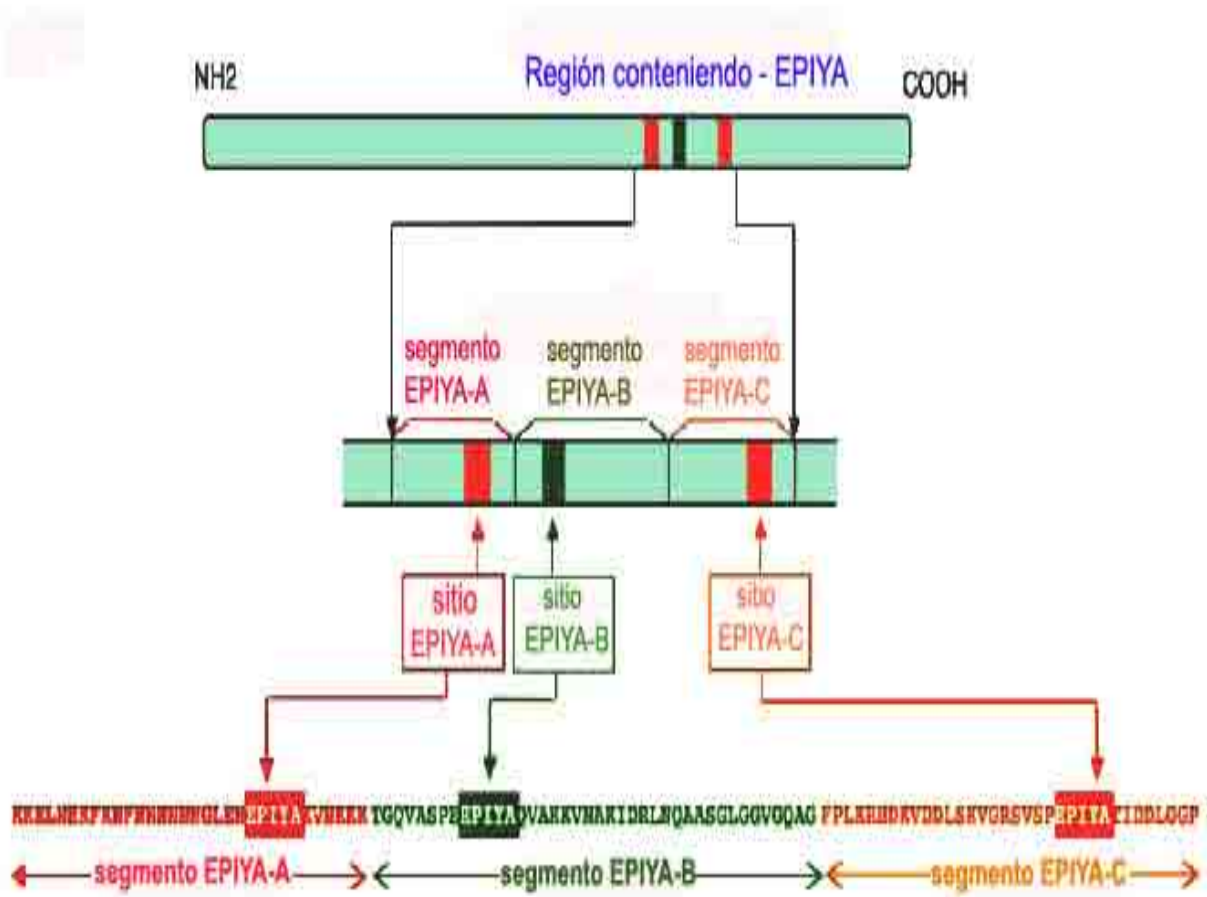


Figura.6 Anatomía molecular de las regiones conteniendo motivos EPIYA de la proteína CagA de aislados de cepas de *H. pylori*. Tomado de *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis ⁽⁴⁴⁾

Motivos EPIYA de cepas del Este de Asia

Algunas proteínas CagA de aislados de *H. pylori* en países del Este de Asia como Japón, Corea y China, también poseen segmento EPIYA-A y EPIYA-B, pero no tienen segmentos repetidos EPIYA-C, en su lugar tienen un segmento denominado EPIYA-D, el cual es único en las especies de CagA del Este de Asia, este segmento representa el mayor sitio de fosforilación de la proteína CagA del Este de Asia (Fig.7)

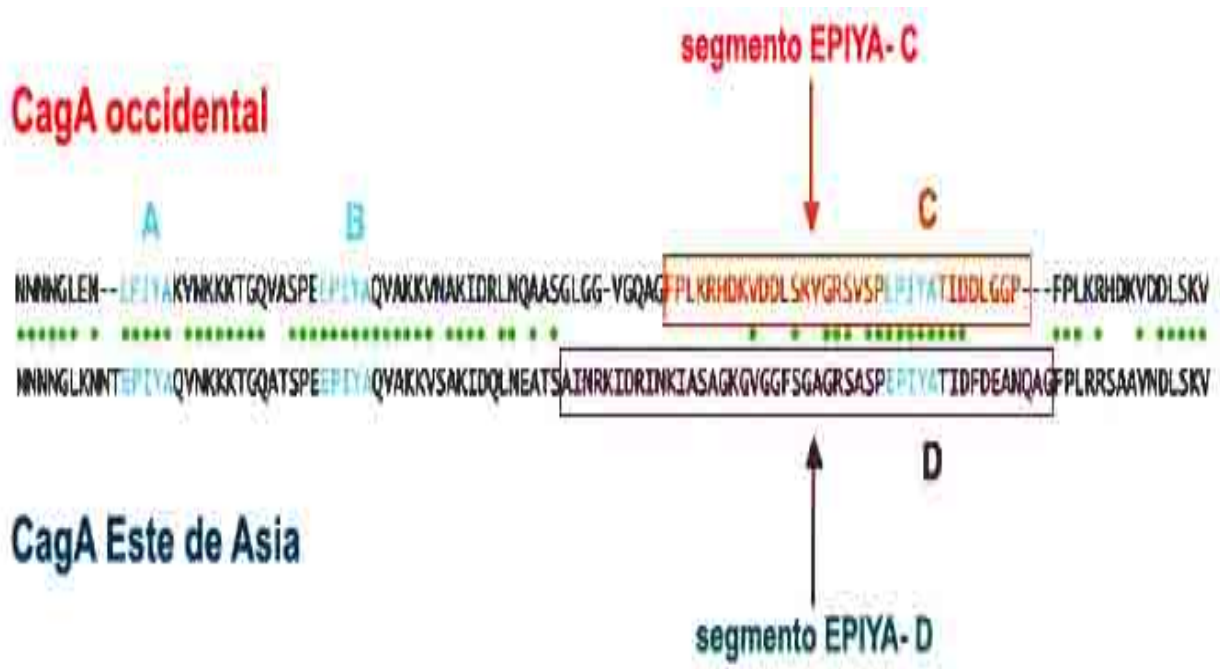


Figura.7 Mapa de las regiones mostrando los motivos EPIYA de la proteína CagA de aislados de *H. pylori* occidentales (EPIYA-A, B, C) y del Este de Asia (EPIYA-A, B, D). Tomado de *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis ⁽⁴⁴⁾

SHP-2 como blanco celular de CagA tirosina fosforilada

Una vez que la proteína CagA es tirosin- fosforilada por la cinasa SFK, adquiere la habilidad de unirse a SHP-2 una proteína tirosin- fosfatasa citoplasmática que tiene dos dominios Src de homología-2 repetidos en tándem, denominados N-SHS y C-SH2, en la mitad amino terminal y un dominio proteína tirosina fosfatasa (PTP) en la mitad carboxilo terminal ^{(48) (43)}.

La unión de CagA con SHP-2 promueve una transformación morfológica celular denominado fenotipo “colibrí” (*Hummingbird*), el cual es caracterizado por una forma celular elongada con un dramático rearrreglo del citoesqueleto ^{(99) (48)}.

Fisiológicamente SHP-2 activa la MAP cinasa Erk por un mecanismo dependiente e independiente de Ras ⁽⁷⁸⁾. Consistente con esto, la expresión de CagA en las células epiteliales gástricas, presentan una activación sostenida de MAP cinasa Erk ⁽⁴⁶⁾.

La actividad prolongada de Erk se ha sugerido que juega un papel importante en la progresión de la fase G₁ a S⁽⁹³⁾. CagA puede predisponer a las células epiteliales gástricas a desregular el crecimiento por una inducción sostenida de la activación de Erk.

Como se describe en la figura 8, la proteína CagA inyectada también interactúa con Grb2 y activa la vía Ras/MEK/ERK, llevando a los fenotipos de dispersión celular en células AGS, línea celular de cáncer gástrico humano y proliferación en células MDCK⁽⁷²⁾. CagA tirosina fosforilada se une y activa la cinasa C terminal Src (Csk) vía su dominio SH2, lo cual a su vez inactiva la familia Src de proteínas tirosinas cinasas. Ya que esta señalización puede inducir apoptosis, la vía Csk puede atenuar otras interacciones de la proteína CagA⁽¹¹¹⁾.

Por la inactivación de Src, la CagA tirosina fosforilada induce desfosforilación de cortactina, lo cual a su vez co-localiza con filamentos de actina (F-actina) en la punta y base de las protrusiones del fenotipo “colibrí”⁽¹⁰¹⁾.

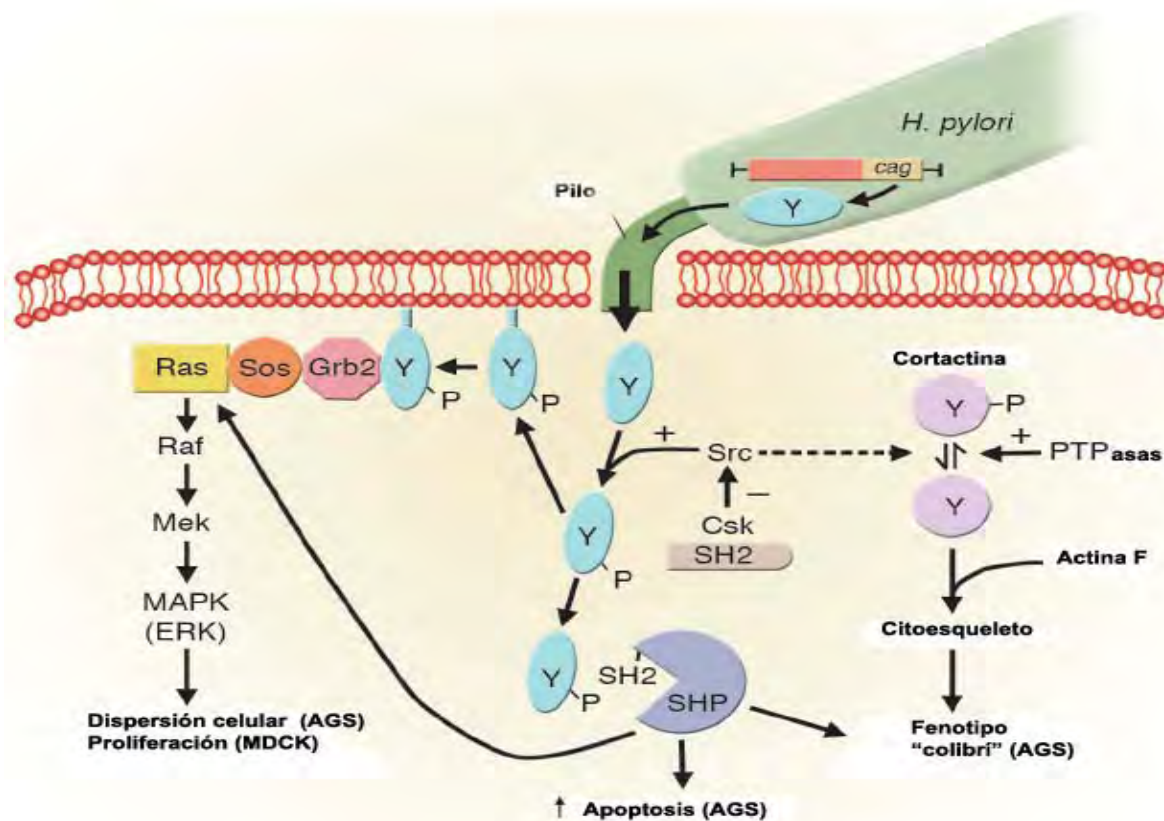


Figura.8 Mecanismo de acción de CagA fosforilada. Tomado de *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease⁽¹⁶⁾

Antecedentes

En 2003 Karita y cols ⁽⁵³⁾ estudiaron la relación entre el tamaño de *cagA* basado en los repetidos presentes en su secuencia y la localización de *Helicobacter pylori* en la mucosa gástrica y el grado de inflamación, encontrando que las cepas *cagA* de tamaño grande se localizan colonizando cerca del epitelio y colonizan menos la zona luminal de la capa de mucosa gástrica, debido a que esta cepa es menos tolerante al ácido ya que en la zona epitelial el pH es menos ácido. Del mismo modo encontraron que las cepas con una secuencia de repetidos grandes estaba más relacionada con mayor grado de inflamación debido a la íntima interacción entre la bacteria y el epitelio del huésped.

En 2006 Naito y cols ⁽⁷⁵⁾ estudiaron como la actividad biológica de *cagA* de *H. pylori* dependía de la fosforilación de los motivos EPIYA repetidos, encontrando que el nivel de fosforilación de tirosinas, el grado de unión a SHP-2 y la magnitud de la actividad que induce el fenotipo de “colibrí “(*hummingbird*) era proporcional al número de sitios EPIYA-C y EPIYA-D en CagA de cepas occidentales y orientales respectivamente.

En 2005 Higashi y cols ⁽⁴⁹⁾, demostraron en células de mamífero que los motivos EPIYA funcionan como un marcaje membranal del factor de virulencia CagA de *H. pylori*. Este grupo menciona que el papel de la fosforilación de los motivos EPIYA en la localización membranal de CagA no depende en sí de la fosforilación como fue demostrado al sustituir un residuo de tirosina por uno de fenilalanina el cual no se fosforila y aun así no se afectó la habilidad de CagA de asociarse con la membrana

Justificación

La prevalencia de la infección con *Helicobacter pylori* es alta desde edades tempranas en la población mexicana. La mayoría de las personas infectadas son asintomáticas y 15 a 20% de estos individuos infectados van a desarrollar alguna de las enfermedades asociadas a *H. pylori*, como gastritis crónica no atrófica, úlcera duodenal o cáncer gástrico. Para que un individuo permanezca asintomático o manifieste alguna de estas enfermedades participan factores ambientales, genéticos del individuo y características de virulencia de la cepa infectante. La infección con cepas de *H. pylori* positivas para el factor de virulencia cagPAI (isla de patogenicidad) ha demostrado que incrementa el riesgo de desarrollar cáncer gástrico. La proteína CagA es codificada en la cagPAI inyectada al interior de las células del hospedero y fosforilada en dominios específicos denominados EPIYA, lo que induce cambios drásticos en la señalización de la célula hospedero. Las cepas de *H. pylori* con mayor número de motivos EPIYA están más asociadas a cáncer gástrico que aquellas con menor número. Por ello, es necesario determinar la presencia de la isla de patogenicidad (cag PAI) de *H. pylori* así como establecer el patrón de motivos de fosforilación y la posible relación entre el patrón de EPIYA´s y la enfermedad gastroduodenal en pacientes infectados.

Hipótesis

“La presencia de los motivos EPIYA A-B-C, EPIYA A-B-CCC y/o EPIYA A-B-D; en cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de biopsias de pacientes mexicanos tendrán relación con el tipo y grado de las lesiones gástricas a los cuales estos motivos han sido asociados”

Objetivos

General

- Determinar el número y patrón de motivos EPIYA en pacientes mexicanos con diagnóstico de gastritis, úlcera duodenal y cáncer gástrico infectados con cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de biopsias gástricas de cuerpo y antro.

Particulares

- Amplificar la región del extremo 3' del gen *cagA* usando el DNA extraído de cepas de *Helicobacter pylori*, mediante reacción en cadena de la polimerasa usando secuencias iniciadoras específicas.
- Establecer mediante secuenciación de los productos de PCR amplificados para la región del extremo 3' la presencia de motivos de fosforilación (EPIYA) presentes en cepas de *H. pylori*.
- Analizar por alineamiento las secuencias de motivos EPIYA presentes en las biopsias de pacientes y relacionar el patrón de los motivos encontrados con los asociados a gastritis no atrófica, úlcera duodenal y cáncer gástrico.

Diseño del estudio

Se llevó a cabo un estudio transversal de tipo observacional y descriptivo donde los sujetos de estudio fueron seleccionados de pacientes con síntomas gastrointestinales protocolizados para gastroscopía del Hospital General de México (HGM, SSA) y del hospital de Oncología (CMNSXXI, IMSS).

Tiempos del estudio

Las biopsias de los pacientes fueron tomadas entre los años 1995 y 1999 se congelaron a -70°C hasta realizar los cultivos en el 2006, un año después se procedió a la extracción de DNA de las cepas obtenidas. La obtención de los productos de amplificación de DNA y secuenciación se llevó a cabo entre los años 2007 y 2008.

Criterios de inclusión

Cáncer: Se incluyeron cepas de *H. pylori* aisladas de biopsias de sujetos con carcinoma invasor del estómago, todos los subtipos y localizaciones, y que no hayan recibido tratamiento previo.

Gastritis crónica atrófica (GCA): Se incluyeron cepas de *H. pylori* aisladas de biopsias de sujetos con GCA diagnosticado como el cambio histológico más severo en las biopsias, sin úlcera péptica asociada.

Normal/Gastritis: Se incluyeron cepas de *H. pylori* aisladas de biopsias de pacientes con mucosa gástrica normal o aquellos con gastritis crónica no atrófica o superficial. Para este grupo, los sujetos con antecedentes o presencia de úlcera péptica fueron excluidos.

Úlcera duodenal (UD): Se incluyeron cepas de *H. pylori* aisladas de biopsias gástricas con diagnóstico endoscópico de úlcera péptica con localización duodenal. Los sujetos fueron incluidos sin importar el tipo de gastritis que presentaron en el estómago.

Criterios de exclusión

- a) Se excluyo a pacientes que hubieran recibido tratamiento previo para cáncer.
- b) Pacientes con úlcera péptica asociada.
- c) Sujetos quienes hayan tomado tratamiento previo en las últimas dos semanas con antibióticos, antiinflamatorios no esteroideos, compuestos de bismuto e inhibidores de la bomba de protones.
- d) Pacientes con varices esofágicas o cualquier otra condición a criterio del endoscopista
- e) Pacientes con enfermedades crónicas severas

Criterios de eliminación

Se eliminaron del estudio las muestras de DNA con presunción de contaminación entre cepas de *H. pylori*, muestras que no presentarán un grado de pureza determinado por espectrofotometría y muestras que presentaran degradación observable por corrimiento de electroforesis en gel de agarosa, mismas que por esta razón no fueron secuenciadas y por lo tanto invalidadas para su posterior análisis.

Metodología

En este estudio sólo se empleó el DNA aislado de cepas de *H. pylori*, pero se describió el proceso completo por medio del cual se obtuvo el material genómico para que el lector tenga un panorama más amplio de la metodología que se implementa desde el procesamiento de las biopsias hasta la extracción de DNA, que sirve como material para diversos estudios sobre esta bacteria de importancia clínica.

Aislamiento de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias

Se realizó endoscopia (por recomendación médica) a los pacientes con enfermedad gastroduodenal. Se tomaron 2 biopsias de antro y dos de cuerpo gástrico, la primera biopsia de cada sitio se empleó para cultivo y aislamiento de *H. pylori*, al momento de tomarla se transportó al laboratorio en un tubo rotulado que contenía caldo Brucella-glicerol al 10%, la segunda biopsia fue para estudios histopatológicos y se conservó en formalina al 10%. Para el cultivo de *H. pylori* las biopsias se maceraron en un homogenizador de vidrio previamente esterilizado, con 100µl de caldo brucella. De la dilución se tomaron 50 µl y se extendieron con un asa bacteriológica sobre una placa con medio no selectivo de agar base de sangre (BBL) suplementada con sangre de carnero al 5% previamente marcada. Las placas se incubaron en jarras de anaerobiosis con Campypack plus (BBL Microbiology System) o en una incubadora de CO₂ (9% de CO₂) y condiciones de alta humedad a 37°C durante 3 a 10 días. Las placas se observaron a los 3 días y se aseguro que las colonias fueran convexas, transparentes y con apariencia de rocío.

Cultivo y/o resiembra de las colonias de *H. pylori*

La cepa se extendió con un asa bacteriológica o con un hisopo estéril en una placa con medio agar sangre de carnero al 5% con y sin antibióticos. Las placas se incubaron en microaerofilia con Campypack plus (BBL Microbiology System) o en una incubadora de CO₂ (9% de CO₂) y condiciones de alta humedad a 37°C durante 3 a 10 días.

Tinción de Gram y pruebas bioquímicas para la identificación de *Helicobacter pylori*

La tinción de Gram tuvo como finalidad verificar la morfología de la bacteria así como verificar que no hubiera contaminación por otros microorganismos, esta se llevó a cabo tomando una colonia y extendiéndola sobre un portaobjetos con una gota de agua estéril al centro, el portaobjetos se hizo pasar por la flama de un mechero para fijar la muestra. Posteriormente se expuso a unas gotas de cristal violeta por 1 min, uniformemente toda la laminilla después se lavó al agua corriente, posteriormente se le agregó lugol por 1 min, inmediatamente se le adiciono acetona, después se le agregó safranina por 1 min.

Finalizado el procedimiento se puso la muestra a secar a temperatura ambiente, la muestra se observó en microscopio óptico a 100x con aceite de inmersión

H. pylori presenta positividad para la oxidasa, ureasa y catalasa. La prueba de ureasa ($(\text{NH}_2)_2\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$) se llevó a cabo en placas de 96 pozos. Al 1^{er} pozo se le agregó 100 µl de reactivo de ureasa, con una punta de micropipeta estéril se tomó solo una colonia y se mezcló con el reactivo, la positividad se observó con el cambio de color de canela a un rosa mexicano. La prueba de catalasa ($2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) se llevó a cabo agregando una gota de H₂O₂ al 30% en un segundo pozo, se tomó una colonia con una punta estéril, la positividad se observo con el burbujeo al entrar en contacto las bacterias con el reactivo.

La prueba de oxidasa se llevó a cabo en placas comerciales (DrySlide, BD™, DIFCO), se tomó una colonia y se extendió sobre la superficie de la placa, siendo positiva a la prueba el desarrollo de una tonalidad azul oscuro sobre el sitio donde se extendió la colonia.

Método de GES modificado para la extracción de DNA cromosómico bacteriano ⁽¹²⁵⁾

Se procedió a cosechar las cepas de *H. pylori* ya crecidas e identificadas y se resuspendió en 1 ml de solución salina de un cuarto a una placa de cultivo en agar sangre de *H. pylori* de 48-72 hrs (~ 1x10⁹ UFC/ml). Se centrifugó la suspensión a máxima velocidad en una centrifuga refrigerada (MIKRO 200R Hettich Zentrifugen) aprox. a 20°C y 13 000 rpm por 5 min. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 100 µl de TE (Tris 10mM pH 8.0, EDTA 1mM pH 8.0) se adicionaron 400 µl de reactivo de GES (tiocianato de guanidina 5 M, EDTA 100 mM, Sarcosil 0.5 % (v/v)), se mezcló gentilmente a temperatura ambiente y se colocó en hielo, se adicionaron 250 µl de solución de acetato de amonio 7.5 M a 4°C, se mezcló y se dejó reposar en hielo por 5 min, pasado el tiempo se adicionaron 680 µl de cloroformo frío se mezcló y se centrifugó a 13 000 rpm a 4°C por 5 min, se removió la fase acuosa usando puntas para DNA y se repitió el procedimiento un vez más con la finalidad de remover la mayor cantidad de proteínas, después de remover la fase acuosa del último paso se adicionaron 320 µl de isopropanol se mezcló gentilmente y se dejó precipitar 1 hora a – 20°C. Pasado el tiempo se centrifugo la muestra a 13 000 rpm a 4°C por 5 min y se removió el sobrenadante. Se lavó el paquete obtenido con 800 µl de etanol al 70% y se centrifugo a 13 000 rpm a 4°C por 1 min.

Se decantó el etanol y se dejó secar a temperatura ambiente toda la noche, envolviendo los microtubos en papel estroza para evitar la entrada de polvo.

Al otro día se disolvió el DNA con 100 µl de TE, se tomaron 2 µl de la muestra y se verifico la pureza al obtener el cociente 280/260 (1.8-2.0) y concentración en el equipo NANODROP (ND-1000 Spectrophotometer), con el programa ND-1000 V3.5.1.

Se corrió una electroforesis para observar la integridad del DNA aislado en un gel de agarosa al 1% con 2 µl de bromuro de etidio y mezclando 5 µl de la muestra con 1 µl de amortiguador de carga, la electroforesis se corrió a 100V por 45 min, se observaron las bandas, la muestra se almaceno a - 20°C hasta su uso.

Reacción en cadena de polimerasa (PCR) del extremo 3´del gen *cagA*

Se realizó PCR empleando un volumen total de 25 µl de la siguiente mezcla de reacción: amortiguador para PCR 10x (2.5 µl), cloruro de magnesio (0.75 µl), deoxinucleótidos tri-fosfatados (dNTPs 0.5 µl), oligonucleótidos sentido, y oligonucleótidos antisentido (0.5 µl) (tabla), *Taq* DNA polimerasa (0.25 µl), agua para PCR c.b.p (19 µl), muestra templado (1 µl). Las muestras se amplificaron en un termociclador Eppendorf Mastercycler® ep, bajo las siguientes condiciones de amplificación: 1 intervalo inicial de 94°C por 5 min, desnaturalización a 95°C por 1 min, alineamiento a 53°C por 1 min, extensión a 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 7 min, durante 35 ciclos. Los productos de PCR se visualizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, con la adición de 1 a 3 µl de bromuro de etidio, utilizando 8 µl de producto y 2 µl de amortiguador de carga y se fotografiaron en el documentador de imágenes GeneGenius de SYNGENE empleando el programa GeneSnap V6.03.00.

Tabla. 2 Iniciadores del extremo 3' del gen *cagA*

Gen	Iniciadores	Secuencia	Tamaño (pb)	Referencia
<i>cagA</i>	cag2	5'-GGAACCCTAGTCGGTAATG-3'	450-850	Rudi y cols (1998) ⁽⁹⁴⁾
	cag4	3'-ATCTTTGAGCTTGTCTATCG-5'		

Reacción en cadena de polimerasa (PCR) de secuenciación.

Se realizó un PCR de secuenciación empleando el protocolo GenomeLab™ Dye Terminator Cycle Sequencing proveído por Beckman Coulter; para un volumen total de 5.2 µl de la siguiente mezcla de reacción: a una serie de tubos de reacción de 10 µl se les marcó con el número de muestra y se rotularon sentido y/o antisentido según el oligonucleótido que se fuera a amplificar, se agregaron 2 µl de muestra templado, 1.2 µl del oligonucleótido (sentido/antisentido) del extremo 3' del gen *cagA* y 2 µl de mezcla DTCS (Dye Terminator Cycle Sequencing).

Al mismo tiempo se realizó una mezcla como control de reacción de secuenciación: 1 µl del templado control (pUC18), 1 µl del oligonucleótido de secuenciación (M13-47), 1 µl de agua para PCR y 2 µl de mezcla DTCS, para un volumen final de 5 µl de mezcla de reacción.

La reacción de amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones en un termociclador Eppendorf Mastercycler® ep: desnaturalización a 96°C por 20'', alineamiento a 50°C por 20'', elongación a 60°C por 4', por 30 ciclos.

Purificación de los productos de PCR de secuenciación

Para purificar los productos de PCR de secuenciación se empleó el kit DyeEx™ de QIAGEN siguiendo el protocolo DyeEx spin control para la remoción del marcaje terminal. Primeramente la columna de purificación se agitó en vortex para resuspender la resina, se quitó la tapa de seguridad de la columna girándola, la columna se pasó a un tubo de 2 ml, se centrifugó a 2800 rpm por 3 min. a temperatura ambiente en una centrifuga Heraus Biofuge Fregol. La columna se transfirió a un tubo limpio de 2 ml, lentamente se aplicó el producto de secuenciación (10-20 µl) (como el volumen total del PCR de secuenciación era de 5 µl se completó el volumen con agua para PCR), se procedió a centrifugar por 3 min. a 2800 rpm, el DNA eluido y purificado quedó en el fondo del tubo.

El DNA se concentró en el equipo Eppendorf Concentrator 5301, a 45°C por 10 minutos. El DNA concentrado se almacenó a – 20°C.

Secuenciación de la región del extremo 3´del gen cagA

Al DNA purificado y concentrado se le agregó 20 µl de formamida proveída por el kit de secuenciación, se agitó ligeramente y se dejó reposar por 10 min, el DNA se transfirió a placas de micropozos, previo acceso al programa LFR-1 del programa de secuenciación para fragmentos de 500 a 700 pb, se verificó que no hubiera burbujas y se agregó aceite mineral proveído con el kit de secuenciación.

La secuenciación se llevó a cabo en el equipo Beckman Coulter CEQ™ 8800 Genetic Analysis y por el programa de secuenciación CEQ System.

Análisis de las secuencias del extremo 3´del gen *cagA*

Las secuencias fueron analizadas mediante el programa DNAMAN V3.02.1 (Lynnon Biosoft) y el programa Chromas V1.62 (Technelysium), Las secuencias sentido y antisentido fueron alineadas entre sí con el propósito de verificar que no hubiera una posible variación en ambas secuencias, así mismo se alinearon con la secuencia de una cepa bien caracterizada y considerada tipo de *H. pylori* aislada de un paciente con úlcera duodenal denominada J99 (NC_000921) la cual es positiva para *cagA*, esto garantizó que la secuencia fuera correspondiente con la región del extremo 3´del gen *cagA*, después se procedió a realizar el traducido, y se buscó la presencia de los motivos EPIYA.

Resultados

Se obtuvieron un total de 48 muestras de DNA purificadas de igual número de clonas de *H.pylori*. Estas muestras correspondieron a biopsias de pacientes con úlcera duodenal (UD), gastritis no atrófica (GNA), gastritis atrófica (GA) y cáncer gástrico (CG) (Tabla.3).

Diagnóstico	Número de DNA de <i>H. pylori</i>
gastritis No atrófica	5
gastritis atrófica	12
úlceras duodenales	2
Cáncer	29
Total	48

Tabla.3 Número total de DNA extraído de cultivos de biopsias con lesiones gastroduodenales.

En todas las muestras de DNA, se amplificó la región 3' del gen *cagA*, por PCR, usando iniciadores específicos. De las 48 muestras de DNA de *H. pylori*, el porcentaje mayor de cepas *cagA* PAI+ (60%) fue de los casos de cáncer, el 25% correspondió a gastritis atrófica, el 11% a gastritis no atrófica y la frecuencia menor se relacionó a los casos de úlcera duodenal (4%) (Fig.9)

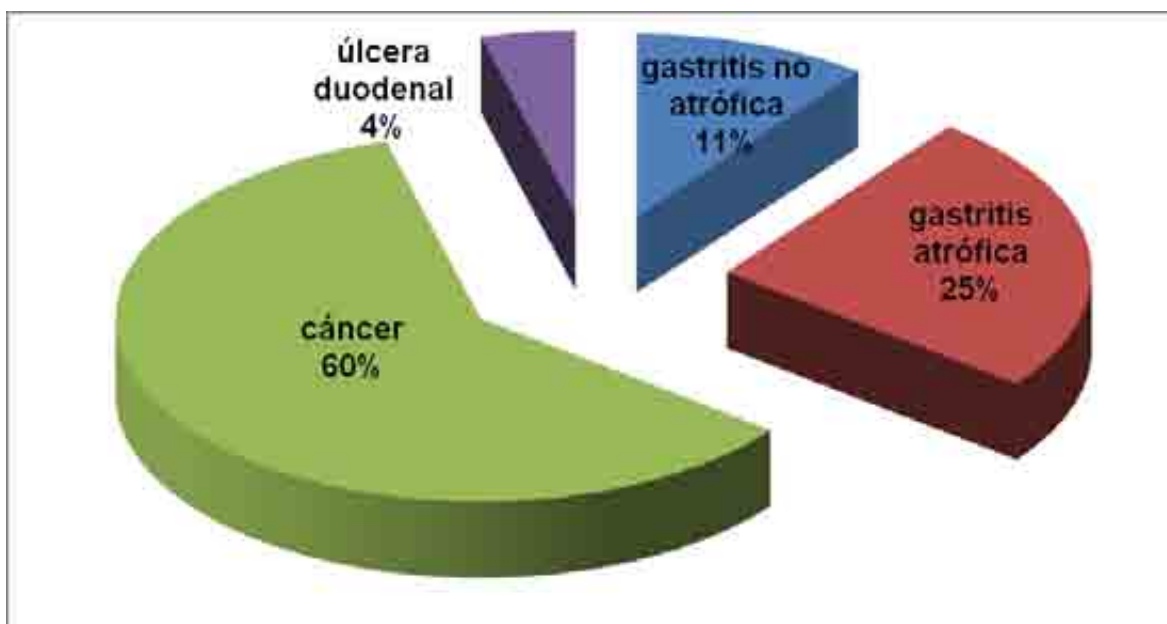


Figura.9 Frecuencia de *H.pylori* CagA positivas aisladas de pacientes con enfermedad gastroduodenal

Diagnóstico	Clonas cagPAI +	%	Clonas cagPAI -	%
Gastritis No atrófica	25	18.25	0	0
Gastritis atrófica	44	32.12	0	0
Úlcera duodenal	9	6.57	0	0
Cáncer	35	25.5	24	17.5

Tabla.4 Frecuencia y porcentaje de cultivos cagPAI positivos y negativos

Como se observa en la tabla 4, y la figura 9, las cepas cagPAI positivas fueron más frecuentes en las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con gastritis atrófica y cáncer gástrico. Las clonas cagPAI negativas solo se identificaron en los caso de cáncer. (fig.10)

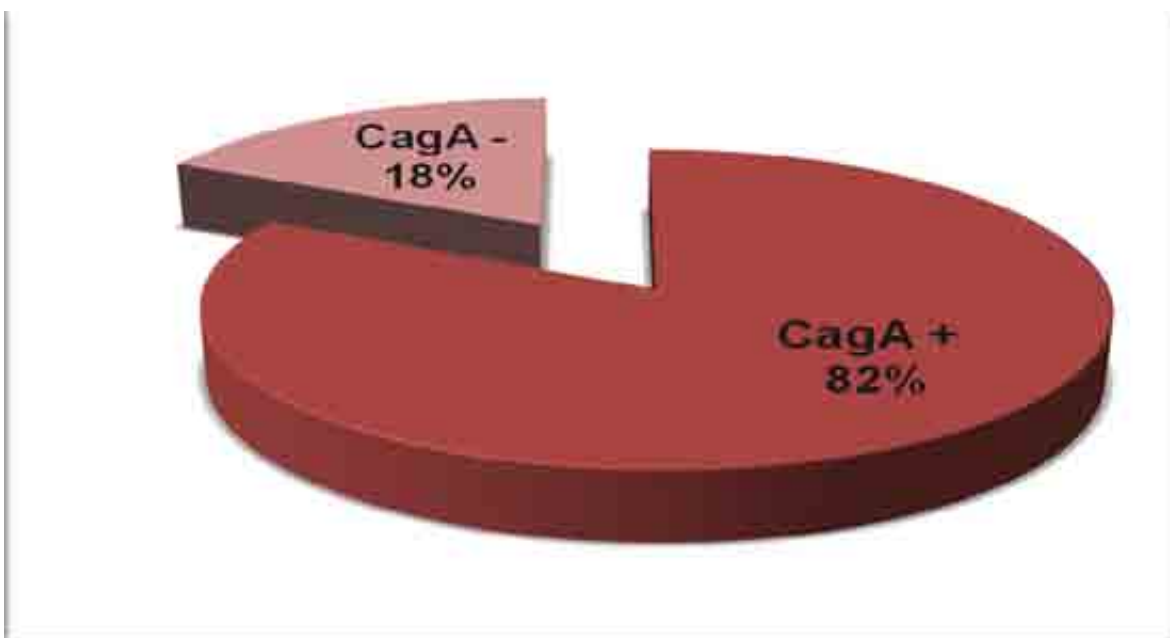


Figura.10 Frecuencia de *H. pylori* Cag PAI positivas y negativas

Para comprobar la presencia de la cagPAI, se amplificaron por PCR las clonas de *H. pylori* con iniciadores específicos para determinar la ausencia de la isla de patogenicidad en las muestras de DNA (sitio vacío). Se observó que carecían de las cagPAI solo cepas aisladas de pacientes con cáncer.

Hubo una diferencia en la frecuencia de cepas cagPAI entre la región de antro y cuerpo donde se observó ausencia de ésta, como se muestra en la figura 11.

En la figura 12 se muestra un gel con los productos del PCR para cagPAI usando los iniciadores de sitios vacíos. La presencia del producto nos indica la ausencia de la CagPAI.

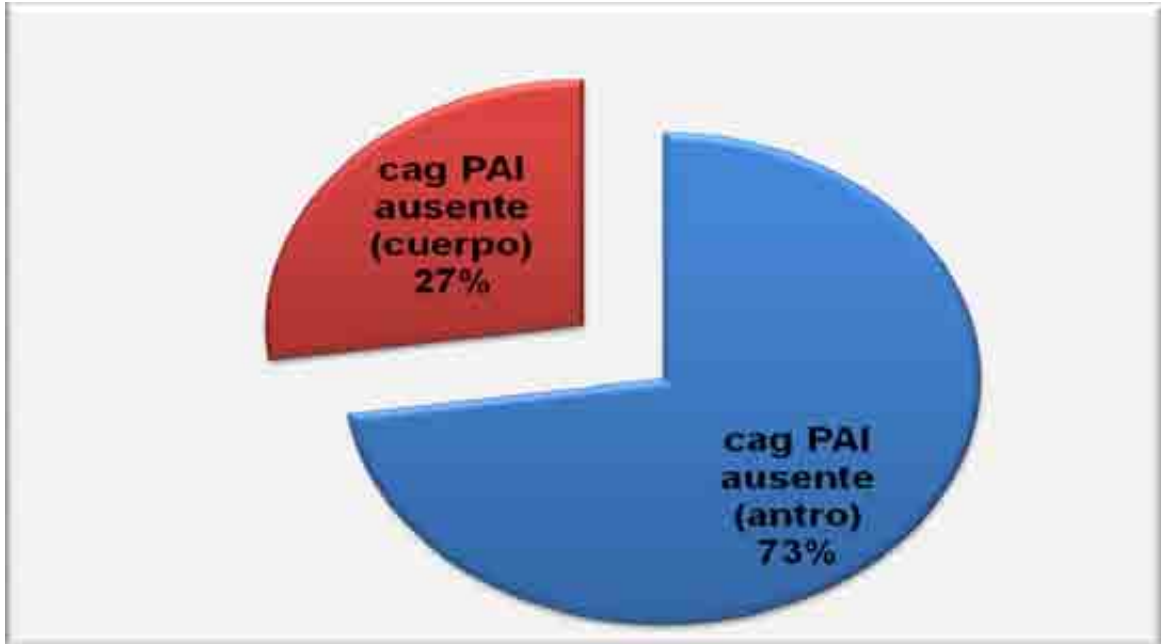


Figura.11 Frecuencia de *H.pylori* CagA positivas y negativas aisladas de antro y cuerpo gástrico

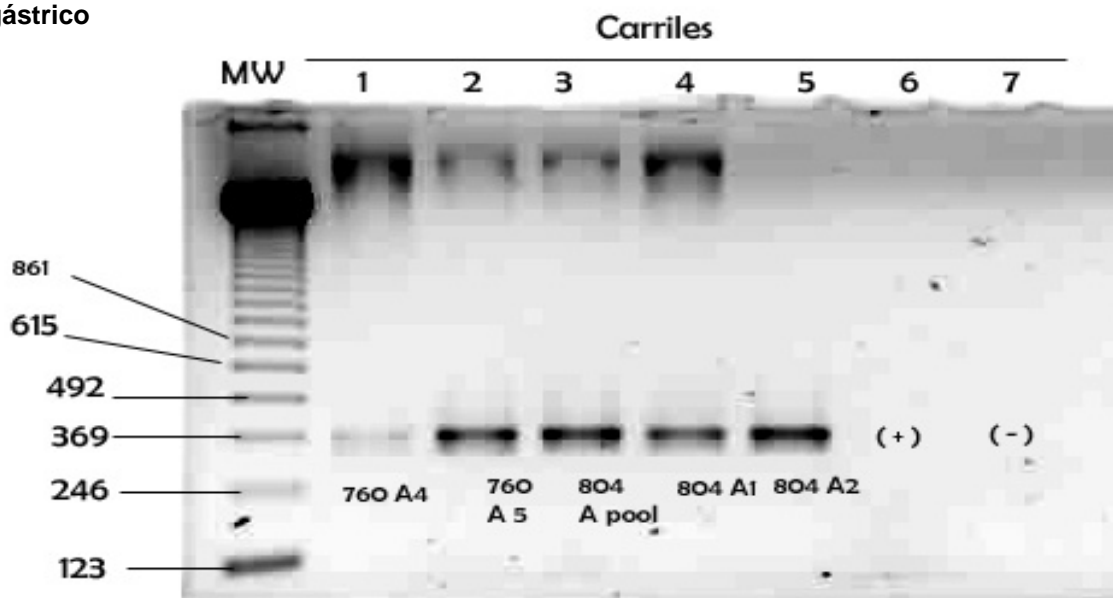


Figura.12 Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) de los productos (tamaño ~ 369 pb) de PCR de las clonas de cultivos provenientes de biopsias de cáncer amplificadas con el par de iniciadores 2_25, indicando ausencia de la isla de patogenicidad Cag (Cag PAI)

Se determinó el tamaño de los productos obtenidos de la amplificación de la región 3' del gen *cagA*, por medio de electroforesis en gel de agarosa usando como referencia un marcador de 123 pb, los resultados presentados en la tabla 5 y figura 13 corresponden a la frecuencia de los productos con diferente tamaño (400-599, 600-799 y 800-999 pb) y la enfermedad gastroduodenal de origen.

Enfermedad gastroduodenal	n	Producto de PCR (pb) (No/%)		
		400-599	600-799	800-999
gastritis no atrófica	5	2 (40)	2 (40)	1 (20)
gastritis atrófica	12	11 (91.6)	0	1 (8.3)
cáncer	23	15 (65)	3 (13)	5 (21)
úlceras duodenales	4	1 (25)	2 (50)	1 (25)

Tabla.5 Número y porcentaje de los tamaños (pb) de los productos de PCR obtenidos por amplificación de la región 3' del gen *cagA*

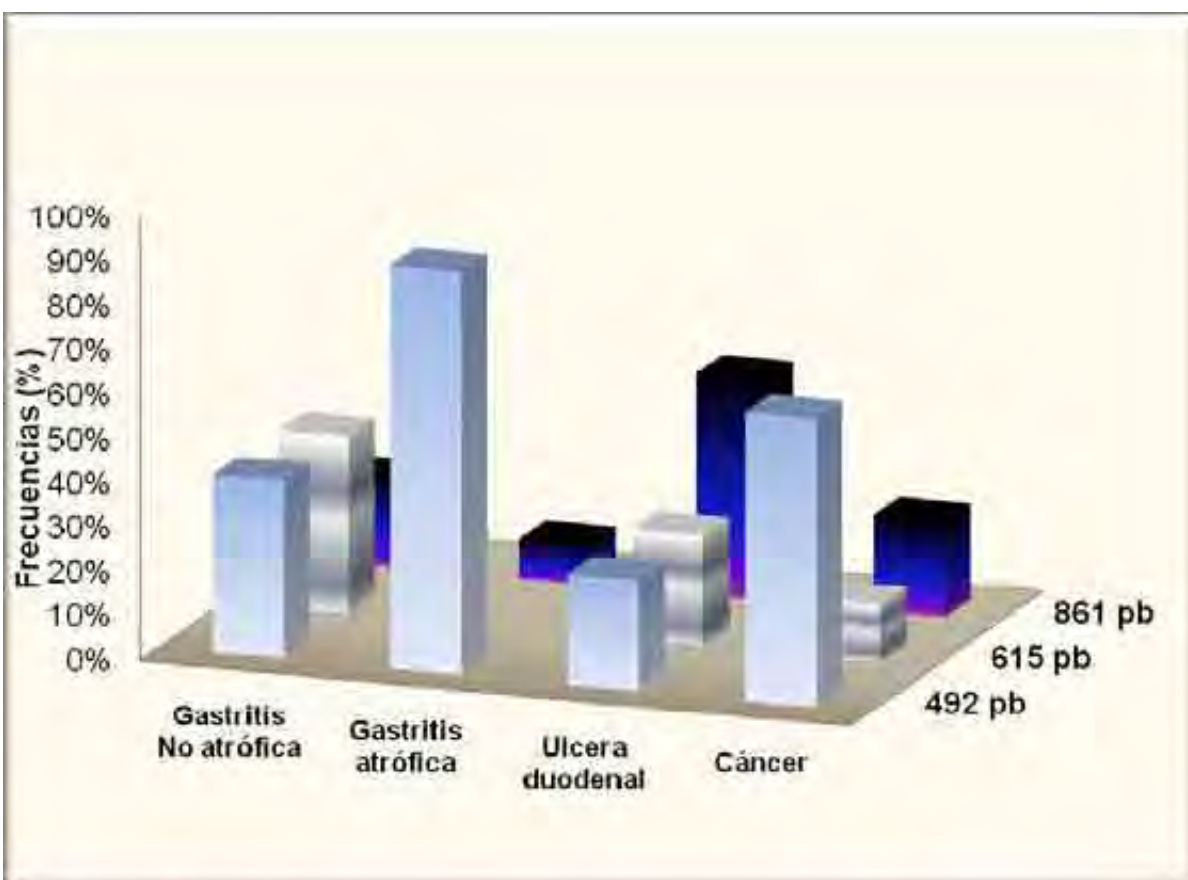


Figura. 13 Frecuencia por tamaños (pb) de los productos amplificados por PCR para la región 3' del gen *cagA* provenientes de diferentes lesiones gastroduodenales.

En la figura 14 se muestra un gel de agarosa al 1.5% en el que se visualizan los diferentes tamaños de los productos de PCR del extremo 3' del gen *CagA*, se confirmaron los diferentes tamaños de los productos con respecto al número de motivos EPIYA-C que contenían, se muestran algunos de ellos como la clona 204 (UD), la clona 5 (GNA) y la clona 2 (GNA), (fig.14) posteriormente fueron secuenciadas junto con las clonas 228 (GA), 888 (CA), 995 (UD) y la 249 (UD). (Datos no mostrados)

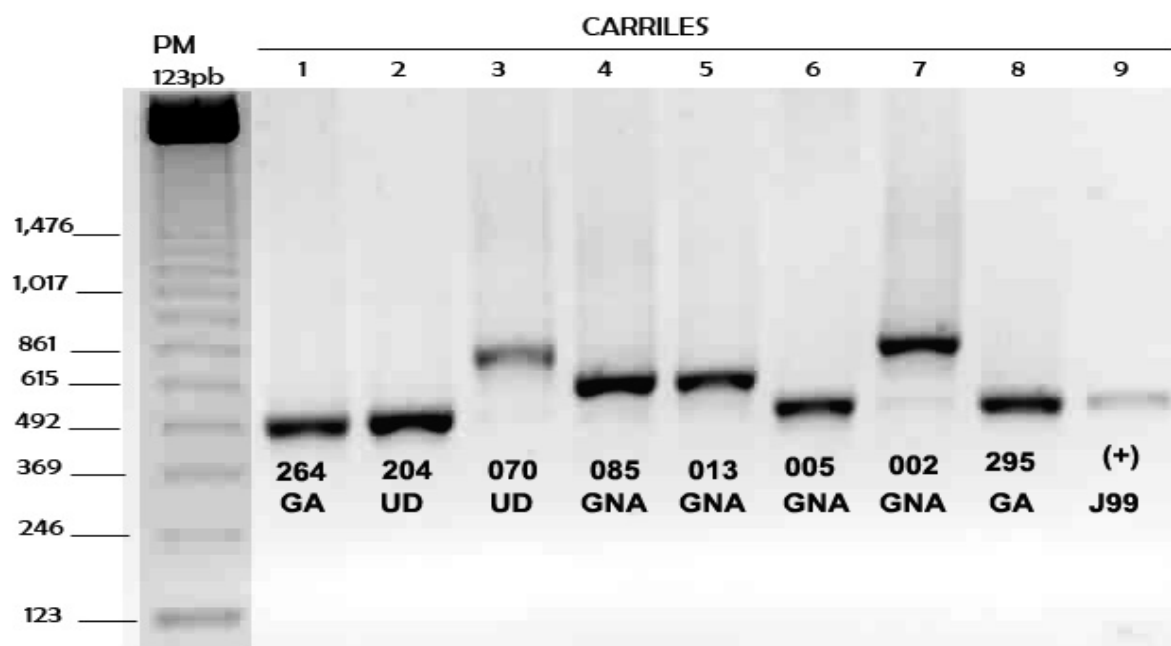


Figura 14

Electroforesis de los productos de PCR obtenido de clonas aisladas de *H. pylori* empleando iniciadores del extremo 3' de *cagA*. Sentido **GGAACCCTAGTCGGTAATG** y Antisentido **ATCTTTGAGCTTGTCTATCG**, tamaño de producto 450-850 pb

Se secuenciaron siete muestras de DNA procedentes de cultivos de biopsias con diferente diagnóstico de lesiones gastroduodenales 4 de ellas presentaron un tamaño de 492pb, 1 tuvo un tamaño de 861pb y otra un tamaño de 650pb. (Tabla.6)

La secuencia de aminoácidos deducidos a partir de las diferentes secuencias de DNA mostraron un patrón de motivos EPIYA diferentes entre sí (Fig.15)

No. Biopsia	No. Clona	Región	Diagnóstico	Tamaño (pb)	Patrón de EPIYA
228	4	cuerpo	gastritis atrófica	492	ABC
888	4	cuerpo	cáncer	492	ABC
204	3	cuerpo	úlceras duodenal	492	ABC
5	5	cuerpo	gastritis no atrófica	492	ABC
2	5	cuerpo	gastritis no atrófica	861	ABCCC
995*	pool	antro	úlceras duodenal	650	ABCC
249	3	antro	úlceras duodenal	861	ABCCC

Tabla.6 Relación entre el DNA secuenciado procedente de diferentes lesiones gastroduodenales y el número y tipo de patrón de motivos EPIYA

*Esta muestra se tomó cosechando una sola cepa de *H. pylori* proveniente de una sola placa de cultivo, no se realizó el aislamiento para obtener clones de él

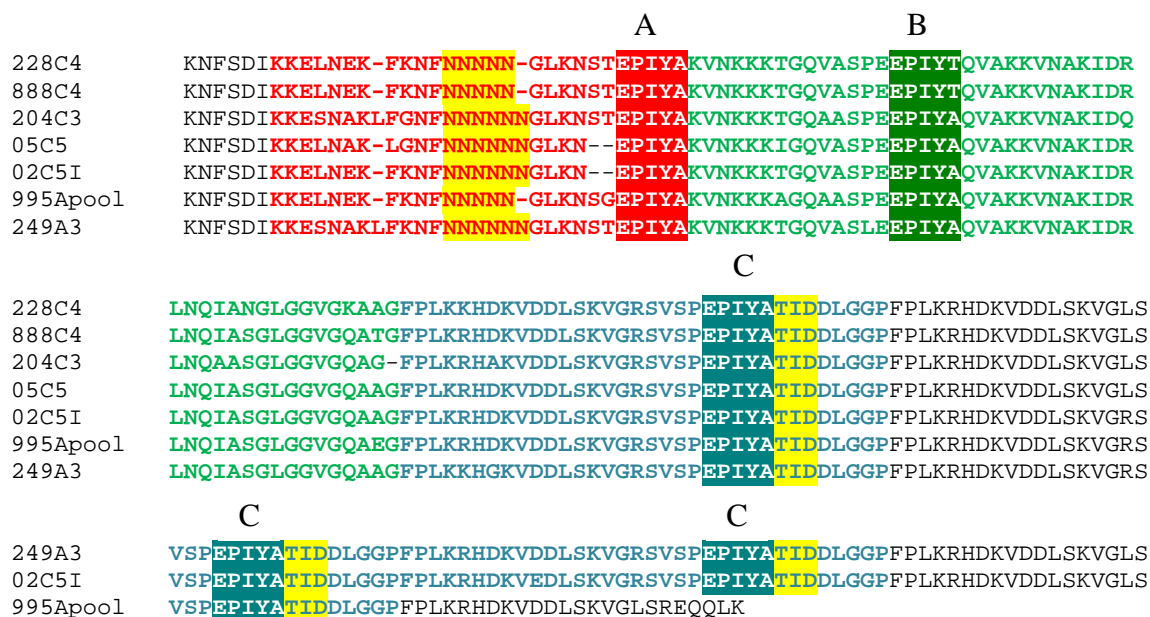


Figura.15 Secuencias de aminoácidos deducidos de la región de repetidos C-terminal de cultivos aislados y positivos para cagPAI provenientes de biopsias de pacientes con diferentes lesiones gastroduodenales

Discusión

El cáncer gástrico es una enfermedad que sigue siendo una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Se sabe que la manifestación de esta enfermedad se relaciona a factores genéticos del hospedero, factores ambientales como la alimentación y a factores de virulencia de *H. pylori*. El objetivo de este trabajo fue estudiar uno de los factores de virulencia de *H. pylori* que se han relacionado a severidad de la enfermedad como es la presencia de cagPAI y el patrón de motivos EPIYA del extremo 3' del gen *cagA* de las cepas aisladas de diferentes enfermedades gastroduodenales desde la más benigna, gastritis, hasta úlcera duodenal y cáncer gástrico.

cagA es un gen altamente polimórfico con diversidad en la región 3', el cual es importante para la actividad biológica de la proteína codificada. Esta región codifica el sitio de fosforilación de tirosinas y el sitio de unión a la fosfatasa SHP-2. La interacción de estas proteínas activa una serie de vías de señalización, causando un incremento en la proliferación y motilidad celular anormal⁽¹¹¹⁾. Se ha sugerido que existe una relación entre el número de sitios de fosforilación con la severidad de enfermedad, por lo tanto es importante hacer estudios sobre los polimorfismos en la región 3' de *CagA*, y el análisis de los sitios de fosforilación localizados en los motivos EPIYA. Este análisis podría servir como herramienta en el diagnóstico y pronóstico de la presencia de *H. pylori* en pacientes con gastritis no atrófica y su progresión a cáncer gástrico.

El tamaño de los productos de amplificación de la región 3', corresponde a determinado patrón de motivos EPIYA, esto fue analizado en dos reportes previos de Argent⁽⁸⁾ y Panayotopoulou⁽⁸⁵⁾.

Como se observó en el estudio los patrones de motivos EPIYA de tipo ABC muestran un tamaño de 492pb, los patrones ABCC, un tamaño de 650pb y los de 850pb correspondieron al patrón ABCCC.

Al analizar los productos de PCR de la región variable del extremo 3' de *cagA* se pudo observar una variación en el tamaño de estos debido a la presencia de secuencias repetidas en esta región del gen que corresponden al patrón de motivos EPIYA de *H. pylori* como lo ha reportado Panayotopoulou ⁽⁸⁵⁾. De forma similar a lo observado en este estudio Karita y cols ⁽⁵³⁾ mencionan que el tamaño de los fragmentos de la región variable se pueden clasificar en tamaño largo, medio y pequeño de acuerdo a su peso molecular y que esta característica está relacionada con la localización regional de *H. pylori* en el estómago, por la resistencia o susceptibilidad al pH ácido del ambiente gástrico.

El patrón más frecuente observado en las cepas de *H. pylori* de nuestro estudio fue el patrón EPIYA de tipo A-B-C y no se observó relación con severidad de enfermedad ya que este patrón se obtuvo tanto en cepas de gastritis no atrófica, úlcera duodenal y cáncer gástrico a diferencia de otros estudios como se menciona en la revisión de Hatakeyama y Higashi ⁽⁴⁴⁾, que han manifestado relación entre el patrón de motivos EPIYA y la severidad de las lesiones.

Aunque en este estudio encontramos que algunas cepas con patrones de segmentos EPIYA-C del tipo ABCCC y ABCC correspondían a biopsias de gastritis atrófica y úlcera duodenal, no descartamos la evidencia aportada por Basso y cols ⁽¹⁴⁾ los cuales encontraron una relación entre el aumento del número de segmentos repetidos EPIYA-C y el riesgo de cáncer, al observar dicha asociación en cepas *CagA* positivas con 2 o más segmentos EPIYA-C.

De manera similar a lo demostrado por Sicinschi ⁽¹⁰²⁾, nosotros observamos que cepas con un solo motivo EPIYA-C estaban asociadas con lesiones gástricas menos severas como gastritis no atrófica pero a diferencia de este reporte nosotros encontramos asociación de este patrón con gastritis atrófica y cepas con múltiples motivos EPIYA-C estaban asociadas con lesiones más severas como displasia y metaplasia intestinal. En nuestro estudio se observó un mayor número de motivos EPIYA-C del tipo ABC en biopsias de gastritis atrófica, úlcera duodenal y cáncer, mientras que dos biopsias de úlcera duodenal y una de gastritis no atrófica mostraron motivos EPIYA del tipo ABCC y ABCCC.

Karita ⁽⁵³⁾ ha sugerido que cepas con un alto contenido de segmentos EPIYA-C son menos capaces de sobrevivir a un pH bajo, relacionando esta capacidad con la región del estómago del cual han sido aisladas, como lo ha reportado también Basso ⁽¹⁴⁾ en donde las biopsias con un alto número de repetidos EPIYA-C fueran aisladas de la región del cuerpo. En nuestro estudio casi todas las biopsias analizadas que mostraban motivos EPIYA-C del tipo ABC y una ABCCC fueron aisladas del cuerpo, solo una biopsia de úlcera duodenal con motivo ABCC se aisló del antro, todavía no sabemos si esto tenga alguna significancia en el diagnóstico de riesgo de padecer alguna enfermedad gastroduodenal maligna ya que la mayoría de las biopsias que contenían motivos EPIYA-C son consideradas de bajo riesgo. Se ha visto que hay otros factores que condicionan este riesgo como los asociados al huésped. También es importante mencionar que los pacientes están colonizados por cepas de *H. pylori* con genotipos diferentes y que las cepas que nosotros aislamos representan solo algunas de las múltiples clonas que colonizan la mucosa gástrica.

Diversos estudios han demostrado una asociación entre la infección con *H. pylori* y el desarrollo de cáncer gástrico ⁽¹²¹⁾ ⁽⁵⁴⁾. La presencia de la infección con cepas de *H. pylori* conteniendo el factor de virulencia *cagA* contribuye al riesgo de cáncer gástrico, especialmente el de tipo intestinal. No obstante el número de personas que desarrollan malignidades es una pequeña fracción de los individuos infectados con cepas *cagA* positivas, como lo visto en este estudio al reportar un número igual de biopsias con diagnóstico de cáncer y gastritis no atrófica, sin embargo no encontramos una biopsia de cáncer que presentara más de tres segmentos repetidos EPIYA-C. Es probable que el desarrollo de cáncer gástrico dependa no solo de los factores de virulencia sino también de otros factores ambientales y factores genéticos del huésped. Algunos de estos factores incluyen la variación en genes que afectan la respuesta inmune, entre ellos la secreción de IL-1, IL-8 e IL-10 ⁽¹¹⁸⁾.

La meta de este estudio fue el utilizar la determinación del número de repetidos EPIYA-C como marcadores de riesgo en biopsias provenientes de pacientes con múltiples diagnósticos de enfermedades gastroduodenales, sin embargo no encontramos una relación directa entre el diagnóstico y el patrón de motivos EPIYA-C, como lo han demostrado otros estudios llevados a cabo en pacientes orientales donde existe una mayor prevalencia de cáncer gástrico ⁽²⁸⁾. Por lo que podemos mencionar que en nuestro pacientes no hubo una relación entre el estado de severidad de las lesiones gastroduodenales y la presencia de múltiples segmentos EPIYA-C que condicionen o pronostiquen el resultado de una enfermedad gástrica, más bien el utilizar la presencia de segmentos de longitud variable EPIYA –C junto con otros marcadores de virulencia como lo es el gen *VacA* y los factores del huésped como son la medición de los niveles de IL-8 secretados pueden coadyuvar tanto al diagnóstico como al pronóstico de padecer una enfermedad gastroduodenal asociada a la infección con cepas *CagA* positivas de *H. pylori*. Así mismo el tener en cuenta el historial del paciente, el tiempo de la infección y las características propias del huésped, podrán integrar una mejor herramienta diagnóstica

Conclusiones

En este estudio no se encontró una relación entre el estado de severidad de las lesiones gastroduodenales y el patrón de segmentos EPIYA analizados en pacientes con diagnóstico de enfermedad gástrica. A sí mismo la presencia de múltiples segmentos EPIYA-C no condicionaron o pronosticaron el resultado de la enfermedad. El empleo del análisis de los segmentos EPIYA de longitud variable como herramienta de pronóstico, junto con otros marcadores de virulencia de la bacteria y factores asociados al huésped pueden coadyuvar tanto al diagnóstico como al pronóstico de padecer una enfermedad gastroduodenal asociada a la infección con cepas de *H. pylori* CagA positivas.

ANEXO

Material

Caldo Brucella-glicerol (10%)	Oligonucleótido sentido (500pM)
Asa bacteriológica	Oligonucleótido antisentido (500pM)
Homogenizador de vidrio	<i>Taq</i> DNA polimerasa
Agar base de sangre (BBL)	Agua para PCR
Sangre de carnero al 5%	Agarosa (1.5%)
Bolsas de incubación (Campypack plus, BBL)	Bromuro de etidio (0,5µg/ml)
Reactivo ureasa (CimaScientific™)	Amortiguador de carga (6x)
Peróxido de hidrógeno (30%)	Kit GenomeLab™Dye Terminator Cycle Sequencing (Beckman Coulter)
Placa de identificación (DrySlide, BD™)	Kit DyeEx™ (QIAGEN)
Colorante cristal violeta	Deoxinucleotidos tri-fosfatados (dNTPs)
Lugol	Amortiguador PCR (10x)
Acetona	Cloruro de magnesio
Safranina	
Solución salina (NaCl) 0.9%	
Amortiguador TE (Tris 10mM pH 8.0, EDTA 1mM pH 8.0)	
Reactivo de GES (Tiocianato de guanidina 5M, EDTA 100mM, Sarcosil 0.5% v/v)	
Acetato de amonio (7.5M)	
Cloroformo	
Isopropanol	
Etanol (70%)	

Equipo

Incubadora (Thermo Scientific)

Centrifuga refrigerada (MIKRO 200R)

Espectrofotómetro NANODROP (ND-1000)

Programa ND-1000 V3.5.1

Cámara de electroforesis para DNA (Mini-sub cell GT, BIORAD)

Fuente de poder (Power Pac Basic, BIORAD)

Termociclador (Eppendorf mastercycler™ep)

Documentador GeneGenius (SYNGENE)

Programa GeneSnap V6.03.00

Centrifuga (Heraus Biofuge Fregol)

Concentrador (Eppendorf Concentrator, BIORAD)

Vortex

Secuenciador Beckman Coulter CEQ™ 8800 Genetic Analysis

Programa CEQ System

Computadora estación de trabajo (*work station*, Hewlett Packard)

Programa DNAMAN V3.02.1 (Lynnon Biosoft)

Programa Chromas V1.62 (Tecnelysium)

REFERENCIAS

1. Achtman, M. and S. Suerbaum (2000). "Sequence variation in *Helicobacter pylori*." Trends Microbiol 8(2): 57-8.
2. Akopyants, N. S., S. W. Clifton, et al. (1998). "Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*." Mol Microbiol 28(1): 37-53.
3. Alamuri, P. and R. J. Maier (2006). "Methionine sulfoxide reductase in *Helicobacter pylori*: interaction with methionine-rich proteins and stress-induced expression." J Bacteriol 188(16): 5839-50.
4. Allaker, R. P., K. A. Young, et al. (2002). "Prevalence of *Helicobacter pylori* at oral and gastrointestinal sites in children: evidence for possible oral-to-oral transmission." J Med Microbiol 51(4): 312-7.
5. Alm, R. A., L. S. Ling, et al. (1999). "Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*." Nature 397(6715): 176-80.
6. Ando, T., R. M. Peek, Jr., et al. (2002). "Host cell responses to genotypically similar *Helicobacter pylori* isolates from United States and Japan." Clin Diagn Lab Immunol 9(1): 167-75.
7. Appelmelk, B. J., R. Negrini, et al. (1997). "Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* and the host." Trends Microbiol 5(2): 70-3.
8. Argent, R. H., Y. Zhang, et al. (2005). "Simple method for determination of the number of *Helicobacter pylori* CagA variable-region EPIYA tyrosine phosphorylation motifs by PCR." J Clin Microbiol 43(2): 791-5.
9. Armstrong, J. A., S. H. Wee, et al. (1987). "Response of *Campylobacter pyloridis* to antibiotics, bismuth and an acid-reducing agent in vitro--an ultrastructural study." J Med Microbiol 24(4): 343-50.
10. Asahi, M., T. Azuma, et al. (2000). "*Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells." J Exp Med 191(4): 593-602.

11. Ashktorab, H., M. Neapolitano, et al. (2002). "In vivo and in vitro activation of caspase-8 and -3 associated with *Helicobacter pylori* infection." *Microbes Infect* 4(7): 713-22.
12. Atherton, J. C., P. Cao, et al. (1995). "Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration." *J Biol Chem* 270(30): 17771-7.
13. Backert, S., E. Ziska, et al. (2000). "Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus." *Cell Microbiol* 2(2): 155-64.
14. Basso, D., C. F. Zambon, et al. (2008). "Clinical relevance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA gene polymorphisms." *Gastroenterology* 135(1): 91-9.
15. Berg, D. E., P. S. Hoffman, et al. (1997). "The *Helicobacter pylori* genome sequence: genetic factors for long life in the gastric mucosa." *Trends Microbiol* 5(12): 468-74.
16. Blaser, M. J. and J. C. Atherton (2004). "*Helicobacter pylori* persistence: biology and disease." *J Clin Invest* 113(3): 321-33.
17. Boneca, I. G., H. de Reuse, et al. (2003). "A revised annotation and comparative analysis of *Helicobacter pylori* genomes." *Nucleic Acids Res* 31(6): 1704-14.
18. Cattoli, G., A. Bart, et al. (2000). "Helicobacter acinonychis eradication leading to the resolution of gastric lesions in tigers." *Vet Rec* 147(6): 164-5.
19. Censini, S., C. Lange, et al. (1996). "cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25): 14648-53.
20. Christie, P. J. and J. P. Vogel (2000). "Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells." *Trends Microbiol* 8(8): 354-60.
21. Clyne, M., B. Dolan, et al. (2007). "Bacterial factors that mediate colonization of the stomach and virulence of *Helicobacter pylori*." *FEMS Microbiol Lett* 268(2): 135-43.

22. Correa, P., W. Haenszel, et al. (1975). "A model for gastric cancer epidemiology." *Lancet* 2(7924): 58-60.
23. Correa, P., W. Haenszel, et al. (1990). "Gastric precancerous process in a high risk population: cohort follow-up." *Cancer Res* 50(15): 4737-40.
24. Correa, P. and J. Houghton (2007). "Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*." *Gastroenterology* 133(2): 659-72.
25. Covacci, A., S. Censini, et al. (1993). "Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(12): 5791-5.
26. Cover, T. L. and S. R. Blanke (2005). "*Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality." *Nat Rev Microbiol* 3(4): 320-32.
27. Cover, T. L. and M. J. Blaser (1992). "Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*." *J Biol Chem* 267(15): 10570-5.
28. Danesh, J. (1999). "*Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: systematic review of the epidemiological studies." *Aliment Pharmacol Ther* 13(7): 851-6.
29. de Jonge, R., E. J. Kuipers, et al. (2004). "The *Helicobacter pylori* plasticity region locus jhp0947-jhp0949 is associated with duodenal ulcer disease and interleukin-12 production in monocyte cells." *FEMS Immunol Med Microbiol* 41(2): 161-7.
30. Dixon, M. F., R. M. Genta, et al. (1996). "Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994." *Am J Surg Pathol* 20(10): 1161-81.
31. Doig, P., B. L. de Jonge, et al. (1999). "*Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains." *Microbiol Mol Biol Rev* 63(3): 675-707.
32. Dunn, B. E., H. Cohen, et al. (1997). "*Helicobacter pylori*." *Clin Microbiol Rev* 10(4): 720-41.

33. Ernst, P. B. and B. D. Gold (2000). "The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer." *Annu Rev Microbiol* 54: 615-40.
34. Falush, D., T. Wirth, et al. (2003). "Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations." *Science* 299(5612): 1582-5.
35. Ferguson, D. A., Jr., C. Li, et al. (1993). "Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva." *J Clin Microbiol* 31(10): 2802-4.
36. Fiedorek, S. C., H. M. Malaty, et al. (1991). "Factors influencing the epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in children." *Pediatrics* 88(3): 578-82.
37. Filipe, M. I., F. Potet, et al. (1985). "Incomplete sulphomucin-secreting intestinal metaplasia for gastric cancer. Preliminary data from a prospective study from three centres." *Gut* 26(12): 1319-26.
38. Fischer, W., J. Puls, et al. (2001). "Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8." *Mol Microbiol* 42(5): 1337-48.
39. Galmiche, A., J. Rassow, et al. (2000). "The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release." *Embo J* 19(23): 6361-70.
40. Graham, D. Y., A. R. Opekun, et al. (1993). "Clarithromycin for the eradication of *Helicobacter pylori*." *J Clin Gastroenterol* 16(4): 292-4.
41. Graham, D. Y., A. R. Opekun, et al. (2004). "Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers." *Gut* 53(9): 1235-43.
42. Hansson, L. E., O. Nyren, et al. (1996). "The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease." *N Engl J Med* 335(4): 242-9.
43. Hatakeyama, M. (2004). "Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein." *Nat Rev Cáncer* 4(9): 688-94.

44. Hatakeyama, M. and H. Higashi (2005). "*Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis." *Cáncer Sci* 96(12): 835-43.
45. Hennig, E. E., M. M. Godlewski, et al. (2005). "*Helicobacter pylori* VacA cytotoxin interacts with fibronectin and alters HeLa cell adhesion and cytoskeletal organization in vitro." *FEMS Immunol Med Microbiol* 44(2): 143-50.
46. Higashi, H., A. Nakaya, et al. (2004). "*Helicobacter pylori* CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation." *J Biol Chem* 279(17): 17205-16.
47. Higashi, H., R. Tsutsumi, et al. (2002). "Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(22): 14428-33.
48. Higashi, H., R. Tsutsumi, et al. (2002). "SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein." *Science* 295(5555): 683-6.
49. Higashi, H., K. Yokoyama, et al. (2005). "EPIYA motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells." *J Biol Chem* 280(24): 23130-7.
50. Honda, S., T. Fujioka, et al. (1998). "Development of *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils." *Cáncer Res* 58(19): 4255-9.
51. Huang, J. Q., S. Sridhar, et al. (1998). "Meta-analysis of the relationship between *Helicobacter pylori* seropositivity and gastric cáncer." *Gastroenterology* 114(6): 1169-79.
52. Kabir, S. (2004). "Detection of *Helicobacter pylori* DNA in feces and saliva by polymerase chain reaction: a review." *Helicobacter* 9(2): 115-23.
53. Karita, M., S. Matsumoto, et al. (2003). "The size of cagA based on repeat sequence has the responsibility of the location of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus and the degree of gastric mucosal inflammation." *Microbiol Immunol* 47(9): 619-30.

54. Konturek, P. C., J. Kania, et al. (2003). "H. pylori infection, atrophic gastritis, cytokines, gastrin, COX-2, PPAR gamma and impaired apoptosis in gastric carcinogenesis." *Med Sci Monit* 9(7): SR53-66.
55. Kuipers, E. J. (1999). "Review article: exploring the link between *Helicobacter pylori* and gastric cancer." *Aliment Pharmacol Ther* 13 Suppl 1: 3-11.
56. Kuipers, E. J., D. A. Israel, et al. (2000). "Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host." *J Infect Dis* 181(1): 273-82.
57. Kuipers, E. J., J. C. Thijs, et al. (1995). "The prevalence of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease." *Aliment Pharmacol Ther* 9 Suppl 2: 59-69.
58. Kusters, J. G., M. M. Gerrits, et al. (1997). "Cocoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death." *Infect Immun* 65(9): 3672-9.
59. Kusters, J. G., A. H. van Vliet, et al. (2006). "Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection." *Clin Microbiol Rev* 19(3): 449-90.
60. Labenz, J., A. L. Blum, et al. (1997). "Curing *Helicobacter pylori* infection in patients with duodenal ulcer may provoke reflux esophagitis." *Gastroenterology* 112(5): 1442-7.
61. Lambert, J. R. and P. Midolo (1997). "The actions of bismuth in the treatment of *Helicobacter pylori* infection." *Aliment Pharmacol Ther* 11 Suppl 1: 27-33.
62. Leung, W. K., K. L. Siu, et al. (1999). "Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implication in gastro-oral transmission." *Am J Gastroenterol* 94(10): 2881-4.
63. Leunk, R. D., P. T. Johnson, et al. (1988). "Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*." *J Med Microbiol* 26(2): 93-9.
64. Logan, R. P. (1998). "Urea breath tests in the management of *Helicobacter pylori* infection." *Gut* 43 Suppl 1: S47-50.

65. Malaty, H. M. and D. Y. Graham (1994). "Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection." *Gut* 35(6): 742-5.
66. Malfertheiner, P., F. Megraud, et al. (1997). "Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht Consensus Report. The European *Helicobacter pylori* Study Group (EHPSG)." *Eur J Gastroenterol Hepatol* 9(1): 1-2.
67. Marais, A., G. L. Mendz, et al. (1999). "Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era." *Microbiol Mol Biol Rev* 63(3): 642-74.
68. Marchetti, M., B. Arico, et al. (1995). "Development of a mouse model of *Helicobacter pylori* infection that mimics human disease." *Science* 267(5204): 1655-8.
69. Matsukura, N., K. Suzuki, et al. (1980). "Distribution of marker enzymes and mucin in intestinal metaplasia in human stomach and relation to complete and incomplete types of intestinal metaplasia to minute gastric carcinomas." *J Natl Cancer Inst* 65(2): 231-40.
70. Megraud, F. (1995). "Rationale for the choice of antibiotics for the eradication of *Helicobacter pylori*." *Eur J Gastroenterol Hepatol* 7 Suppl 1: S49-54.
71. Megraud, F. and H. Lamouliatte (2003). "Review article: the treatment of refractory *Helicobacter pylori* infection." *Aliment Pharmacol Ther* 17(11): 1333-43.
72. Mimuro, H., T. Suzuki, et al. (2002). "Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities." *Mol Cell* 10(4): 745-55.
73. Minoli, G., A. Prada, et al. (1998). "A simplified urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection using the LARA System. Laser Assisted Ratio Analyzer." *J Clin Gastroenterol* 26(4): 264-6.
74. Moese, S., M. Selbach, et al. (2004). "*Helicobacter pylori* induces AGS cell motility and elongation via independent signaling pathways." *Infect Immun* 72(6): 3646-9.

75. Naito, M., T. Yamazaki, et al. (2006). "Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA." *Gastroenterology* 130(4): 1181-90.
76. Naumann, M., S. Wessler, et al. (1999). "Activation of activator protein 1 and stress response kinases in epithelial cells colonized by *Helicobacter pylori* encoding the cag pathogenicity island." *J Biol Chem* 274(44): 31655-62.
77. Nedenskov, P. (1994). "Nutritional requirements for growth of *Helicobacter pylori*." *Appl Environ Microbiol* 60(9): 3450-3.
78. Neel, B. G., H. Gu, et al. (2003). "The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling." *Trends Biochem Sci* 28(6): 284-93.
79. Nishi, T., K. Okazaki, et al. (2003). "Involvement of myeloid dendritic cells in the development of gastric secondary lymphoid follicles in *Helicobacter pylori*-infected neonatally thymectomized BALB/c mice." *Infect Immun* 71(4): 2153-62.
80. Occhialini, A., A. Marais, et al. (2000). "Distribution of open reading frames of plasticity region of strain J99 in *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric carcinoma and gastritis patients in Costa Rica." *Infect Immun* 68(11): 6240-9.
81. Odenbreit, S., B. Gebert, et al. (2001). "Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the cag pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA." *Cell Microbiol* 3(1): 21-31.
82. Odenbreit, S., J. Puls, et al. (2000). "Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion." *Science* 287(5457): 1497-500.
83. Ogura, K., S. Maeda, et al. (2000). "Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil." *J Exp Med* 192(11): 1601-10.

84. O'Toole, P. W., M. C. Lane, et al. (2000). "*Helicobacter pylori* motility." *Microbes Infect* 2(10): 1207-14.
85. Panayotopoulou, E. G., D. N. Sgouras, et al. (2007). "Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA protein in *Helicobacter pylori* clinical isolates." *J Clin Microbiol* 45(2): 488-95.
86. Parsonnet, J., G. D. Friedman, et al. (1997). "Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection." *Gut* 40(3): 297-301.
87. Parsonnet, J., H. Shmueli, et al. (1999). "Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults." *Jama* 282(23): 2240-5.
88. Paziak-Domanska, B., M. Chmiela, et al. (2000). "Potential role of CagA in the inhibition of T cell reactivity in *Helicobacter pylori* infections." *Cell Immunol* 202(2): 136-9.
89. Perez-Perez, G. I., D. Rothenbacher, et al. (2004). "Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection." *Helicobacter* 9 Suppl 1: 1-6.
90. Peterson, W. L., D. Y. Graham, et al. (1993). "Clarithromycin as monotherapy for eradication of *Helicobacter pylori*: a randomized, double-blind trial." *Am J Gastroenterol* 88(11): 1860-4.
91. Pounder, R. E. and D. Ng (1995). "The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries." *Aliment Pharmacol Ther* 9 Suppl 2: 33-9.
92. Reynolds, D. J. and C. W. Penn (1994). "Characteristics of *Helicobacter pylori* growth in a defined medium and determination of its amino acid requirements." *Microbiology* 140 (Pt 10): 2649-56.
93. Roovers, K. and R. K. Assoian (2000). "Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery." *Bioessays* 22(9): 818-26.
94. Rudi, J., C. Kolb, et al. (1998). "Diversity of *Helicobacter pylori* vacA and cagA genes and relationship to VacA and CagA protein expression, cytotoxin production, and associated diseases." *J Clin Microbiol* 36(4): 944-8.

95. Rugge, M., P. Correa, et al. (2000). "Gastric dysplasia: the Padova international classification." *Am J Surg Pathol* 24(2): 167-76.
96. Sabbi, T., P. De Angelis, et al. (2005). "Efficacy of noninvasive tests in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in pediatric patients." *Arch Pediatr Adolesc Med* 159(3): 238-41.
97. Santos, A., D. M. Queiroz, et al. (2003). "New pathogenicity marker found in the plasticity region of the *Helicobacter pylori* genome." *J Clin Microbiol* 41(4): 1651-5.
98. Scott, D. R., E. A. Marcus, et al. (2002). "Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori*." *Gastroenterology* 123(1): 187-95.
99. Segal, E. D., J. Cha, et al. (1999). "Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(25): 14559-64.
100. Selbach, M., S. Moese, et al. (2002). "Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo." *J Biol Chem* 277(9): 6775-8.
101. Selbach, M., S. Moese, et al. (2003). "The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation." *Embo J* 22(3): 515-28.
102. Sicinschi, L. A., P. Correa, et al. (2009). "CagA C-terminal variations in *Helicobacter pylori* strains from Colombian patients with gastric precancerous lesions." *Clin Microbiol Infect*.
103. Sinha, S. K., B. Martin, et al. (2004). "The incidence of *Helicobacter pylori* acquisition in children of a Canadian First Nations community and the potential for parent-to-child transmission." *Helicobacter* 9(1): 59-68.
104. Siurala, M., K. Varis, et al. (1966). "Studies of patients with atrophic gastritis: a 10-15-year follow-up." *Scand J Gastroenterol* 1(1): 40-8.
105. Snelling, W. J., A. P. Moran, et al. (2007). "HorB (HP0127) is a gastric epithelial cell adhesin." *Helicobacter* 12(3): 200-9.

106. Stein, M., F. Bagnoli, et al. (2002). "c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs." *Mol Microbiol* 43(4): 971-80.
107. Stein, M., R. Rappuoli, et al. (2000). "Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translocation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(3): 1263-8.
108. Stingl, K., K. Altendorf, et al. (2002). "Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis?" *Trends Microbiol* 10(2): 70-4.
109. Tomb, J. F., O. White, et al. (1997). "The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*." *Nature* 388(6642): 539-47.
110. Torres, J., G. P. Perez, et al. (2003). "The association of intestinal parasitosis and H. pylori infection in children and adults from a Mexican community with high prevalence of parasitosis." *Helicobacter* 8(3): 179-85.
111. Tsutsumi, R., H. Higashi, et al. (2003). "Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase." *J Biol Chem* 278(6): 3664-70.
112. Uemura, N., S. Okamoto, et al. (2001). "*Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer." *N Engl J Med* 345(11): 784-9.
113. Vaira, D., P. Malfertheiner, et al. (1999). "Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen-based assay. HpSA European study group." *Lancet* 354(9172): 30-3.
114. Van Zanten, S. J., M. F. Dixon, et al. (1999). "The gastric transitional zones: neglected links between gastroduodenal pathology and helicobacter ecology." *Gastroenterology* 116(5): 1217-29.
115. Viala, J., C. Chaput, et al. (2004). "Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island." *Nat Immunol* 5(11): 1166-74.

116. Vogt, K., M. Warrelmann, et al. (1989). "The minimum inhibitory concentrations of various bismuth salts against *Campylobacter pylori*." *Zentralbl Bakteriol* 271(3): 304-10.
117. Wada, A., E. Yamasaki, et al. (2004). "*Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA, is responsible for gastric ulceration." *J Biochem (Tokyo)* 136(6): 741-6.
118. Wang, J., E. G. Brooks, et al. (2001). "Negative selection of T cells by *Helicobacter pylori* as a model for bacterial strain selection by immune evasion." *J Immunol* 167(2): 926-34.
119. Wang, T. C., C. A. Dangler, et al. (2000). "Synergistic interaction between hypergastrinemia and *Helicobacter* infection in a mouse model of gastric cancer." *Gastroenterology* 118(1): 36-47.
120. Watanabe, T., M. Tada, et al. (1998). "*Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils." *Gastroenterology* 115(3): 642-8.
121. Webb, P. M., M. C. Yu, et al. (1996). "An apparent lack of association between *Helicobacter pylori* infection and risk of gastric cancer in China." *Int J Cancer* 67(5): 603-7.
122. Yamaoka, Y., D. H. Kwon, et al. (2000). "A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(13): 7533-8.
123. Zagari, R. M., F. Bazzoli, et al. (1999). "Review article: non-invasive methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection." *Ital J Gastroenterol Hepatol* 31(5): 408-15.
124. Testerman T.L; McGee D.J y Mobley, HTL. Adherence and colonization. En: Mobley, LT; Mendz, G.L; Hasell, S.L., eds. *Helicobacter pylori: Physiology Genetics*. Washington DC: ASM Press, 2001: 381-417
125. Pitcher, DG, Saunders, NA, Owen, RJ (1989) Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Lett Appl Microbiol* 8,109-114