



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**IDENTIFICACIÓN DE *Helicobacter pylori* EN ÚLCERAS DE LA CAVIDAD BUCAL.**

**TESIS**

**QUE PRESENTA**

**FERNANDO TENORIO ROCHA**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**TUTORA** DRA. ELBA ROSA LEYVA HUERTA

**ASESORES** DR. LUIS GAITAN CEPEDA  
C.D. DANIEL QUEZADA RIVERA  
C.D. JUAN CARLOS CUEVAS GONZÁLEZ

**INDICE GENERAL**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

<b>Resumen</b>	<b>5</b>
<b>Abstract</b>	<b>6</b>
<b>Introducción</b>	
<b>Antecedentes</b>	<b>7</b>
<i>Helicobacter pylori</i>	
<i>Distribución y frecuencia</i>	9
<i>Patogenia</i>	13
<i>Diagnóstico de la infección del H. pylori</i>	14
<i>La cavidad bucal como reservorio para H. pylori</i>	16
<i>Etiología de las úlceras en boca</i>	18
<b>Planteamiento del Problema</b>	<b>23</b>
<b>Justificación</b>	<b>23</b>
<b>Objetivo General</b>	<b>23</b>
<i>Objetivos específicos</i>	23
<b>Hipótesis</b>	<b>24</b>
<i>Alternativa</i>	
<i>Nula</i>	
<b>Diseño del Estudio</b>	<b>25</b>
<i>Tipo de estudio</i>	
<i>Población de estudio</i>	
<i>Selección y tamaño de la muestra</i>	
<b>Variables</b>	<b>25</b>
<i>Independientes</i>	
<i>Dependientes</i>	
<b>Material y equipo</b>	
<b>Metodología</b>	<b>26</b>
<i>Histoquímica</i>	27
<i>Inmunohistoquímica</i>	27
<b>Resultados</b>	<b>28</b>
<b>Discusión</b>	<b>35</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>43</b>

## INDICE DE FIGURAS

**Figura 1** A), B),C) y D), en las imágenes mostramos la presencia y distribución del *H. pylori*. A) zona de tejido conjuntivo en donde se observa la positividad del *H. pylori* cercana a una pequeña arteriola. B) Zona de infiltrado inflamatorio en lámina propia donde se observan inclusiones intracitoplasmáticas positivas de la bacteria dentro de los macrófagos. C) Fue frecuente encontrar los microorganismos en el tejido epitelial adyacente a la lesión con ubicación focal y expresión severa y D) *H. pylori* estuvo presente asimismo en zonas de fibrina e inclusive en áreas de tejido necrótico FUENTE DIRECTA

**Figura 2** *Helicobacter pylori* se observó distribuido en los diferentes tejidos A) Ocasionalmente se encontraba disperso entre las células del estrato basal del epitelio. B) Fue más evidente su ubicación en el estrato espinoso en donde por lo general fue intensamente positivo. C y D) En los casos de TUGSE cuando la lesión presentaba tejido muscular se observó inmunoreacción al Ac en los septos musculares como se puede observar en la imagen. FUENTE DIRECTA

**Figura 3.** *Helicobacter pylori* se observó distribuido en los diferentes tejidos A) Ocasionalmente se encontraba disperso entre las células del estrato basal del epitelio. B) Fue más evidente su ubicación en el estrato espinoso en donde por lo general fue intensamente positivo. C y D) En los casos de TUGSE cuando la lesión presentaba tejido muscular se observó inmunoreacción al Ac en los septos musculares como se puede observar en la imagen. FUENTE DIRECTA

**Figura 4.** Localización de *Helicobacter pylori* FUENTE DIRECTA

**Figura 5.** *Helicobacter pylori* asociado a infiltrado inflamatorio. FUENTE DIRECTA

**Figura 6.** Ubicación tisular del microorganismo y tipo de úlcera. FUENTE DIRECTA

## INDICE DE CUADROS

TABLA 1. Infección por *Helicobacter pylori* a nivel mundial<sup>12</sup>

TABLA 2. Prevalencia de *Helicobacter pylori* en países en desarrollo en adultos e infantes<sup>12</sup>

## RESUMEN

No ha sido establecido si la cavidad bucal es un refugio viable permanente para *Helicobacter pylori* o simplemente sirve como vía de transmisión para otros sitios, por lo que el papel que juega la cavidad bucal como reservorio significativo de esta bacteria aún no se ha establecido. **Objetivo:** Identificar *H. pylori* en lesiones ulcerativas de la cavidad bucal, **Metodología:** Del archivo del Laboratorio de Patología Bucal Clínica y Experimental de la DEPEI. FO. UNAM., se seleccionaron las lesiones diagnosticadas como úlceras. Se realizaron cortes histológicos a 4 micras y se incubaron con el Ac. primario *H. pylori* E3010 Spring Bioscience. El análisis de los tejidos se realizó bajo el microscopio de luz, basándose en criterios morfológicos: Presencia, ubicación, cantidad, distribución y asociación con infiltrado inflamatorio; el estudio se realizó a triple ciego previa estandarización, se obtuvo la Kappa con un valor de 0.86. **Resultados:** De 57 casos, 52 (91.2%) fueron positivos y 5 (8.8%) negativos, se considero leve en 24 (42.1%), moderada en 19 (33.3%) severa en 9 (15.8%) y nula en 5 casos (8.8%), la distribución fue dispersa en 24 casos (42.1%) focal en 22 (38.6%) y en 12 (21.1%) la distribución fue aislada. Para el análisis Se utilizo  $X^2$ . Existieron diferencias estadísticamente significativas entre la presencia o ausencia del *H. pylori* (38.754  $p < 0.001$ ) en epitelio (6.090,  $p = .014$ ) y en tejido conjuntivo (4.597  $p = .032$ ) también fue estadísticamente significativo. La localización del *H. pylori* cercano a la lesión fue estadísticamente significativo (4.282  $p = .039$ ) así como su distribución en el infiltrado inflamatorio (20.131  $p < 0.001$ ) indicando una posible asociación entre ambos. **Conclusiones:** Nuestros resultados indican una posible asociación entre el *H. pylori* y las úlceras en boca.

## ABSTRACT

It has not been established whether the oral cavity is a viable permanent shelter for *Hp* or simply serves as a means of transmission to other sites, so the role of the oral cavity as a significant reservoir of this bacterium has not yet been established. Objective: Identify the *Hp* in ulcerative lesions of the oral cavity, Methodology: From File of Oral Pathology Laboratory of Clinical and Experimental DEPeI. Dentistry School, UNAM., were selected as ulcerative lesions diagnosed. Tissue sections of 4  $\mu$ m were incubated with a *Hp* E3010 Spring Bioscience primary antibody. The microscopy analysis was based on morphological criteria for *Hp* which consisted of: presence, location, quantity, distribution and association with inflammatory infiltrates, the study was performed out after triple blind standardization, Kappa was obtained with a value of 0.86. Results: Of 57 cases, 52 (91.2%) were positive and 5 (8.8%) were negative, was mild in 24 (42.1%), moderate in 19 (33.3%) severe in 9 (15.8%) and nil in 5 cases ( 8.8%), distribution was dispersed in 24 cases (42.1%), focal in 22 (38.6%) and 12 (21.1%) was isolated distribution. For  $X^2$  analysis was used. . Statistically significant differences between the presence or absence of *H. pylori* (38 754  $p < 0.001$ ) in epithelium (6090,  $p = . 014$ ) and tissue (4597  $p = . 032$ ) was also statistically significant. The *H. pylori* location close to the lesion was statistically significant ( $p = 039 4282$ ) and its distribution in the inflammatory infiltrate (20 131  $p < 0.001$ ) indicates a possible association between them. Conclusions: Our results suggest a possible association between *H. pylori* and mouth ulcers.

## INTRODUCCIÓN

### ANTECEDENTES

#### ***Helicobacter pylori.***

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es una bacteria gram negativa, curva, espiriforme, móvil, no fermentadora, microaerofílica que mide de 2.5 a 4 micras de longitud por 0.5 a 1 micra de ancho, con un mechón de flagelos en uno de sus extremos en número de 4 a 8 envainados y que le dan gran movilidad; la forma espiral es más evidente cuando se le identifica en las biopsias, pero cuando se le identifica en los cultivos la morfología es más recta y se aprecian bacterias que han perdido sus flagelos; además de que se han descrito formas redondas como cocos, habiéndose postulado tres posibilidades: una de que son formas de resistencia implicadas en la transmisión, que son formas viables pero no cultivables, o de que son formas de bacterias muertas. Como bacteria gram negativa, comparte características estructurales de ellas, como son la presencia de una membrana plasmática y una membrana externa; internamente se caracteriza por un complejo constituido por elementos fibrilares nucleares y ribosomas, que se entremezclan entre sí, pudiendo mostrar en ocasiones bacteriófagos; como hecho importante es de que la vaina de sus flagelos tiene una estructura lipídica exactamente igual a la de la membrana externa, cuya función es proteger a los flagelos de su degradación por el pH ácido de la mucosa gástrica ( 1, 2, 3 ). *H. pylori* se cultiva en preparaciones de agar, es de crecimiento lento, necesitando un medio microaerofílico o con concentraciones de O<sub>2</sub> de 2 % a 8 % y de CO<sub>2</sub> de 7 % a 10 %, lo que muestra que requiere concentraciones de O<sub>2</sub> menores a las atmosféricas, necesitando además hidrógeno como fuente de energía; los medios de cultivo selectivos enriquecidos necesitan nutrientes, tales como: peptona, triptona, extractos de levadura, glucosa, sales como cloruro de sodio, bisulfito de sodio, en un pH de 6.6 a 8.4 y temperaturas de 33 a 40.5 grados centígrados. Requiere por lo menos seis días de incubación, identificándose colonias pequeñas, transparentes y muy similares. ( 1, 2, 3 )

Las dos características fundamentales de la bacteria para lograr un habitat natural en la mucosa gástrica humana, es la de ser la infección bacteriana crónica más frecuente y

extendida y solo superada por el problema de las caries dental, mostrando una enorme capacidad de adaptación a la acidez de la superficie gástrica logrando un micronicho de colonización permanente. Esto se debe a que dentro de sus genes destaca la producción a gran escala de ureasa, enzima vital que se localiza en la superficie de la bacteria y que junto al cofactor níquel catalizan la hidrólisis de urea en bióxido de carbono y en amonio rodeándola con un **halo o nube** protectora que neutraliza el ácido gástrico, elevando el pH de 1.5 a 6 o 7 en el entorno bacteriano, permitiéndole situarse entre el espesor de la capa de moco y la superficie epitelial, en donde el pH es neutro. La enzima ureasa revela una extraordinaria eficacia hidroeléctrica que le permite actuar aún con las escasas concentraciones de urea que existe en el estómago; la proteína que fue nombrada ure1, miembro de las amidoporinas, que regula la transferencia de urea externa del epitelio gástrico, hacia el citoplasma de la bacteria, mediante canales o compuertas transportadores específicos que atraviesan la membrana celular, de tal manera que cuando el medio externo es excesivamente ácido, los canales incrementan notablemente la entrada de urea al citoplasma bacteriano, aumentando la producción de amonio para neutralizar las dos capas de la membrana celular bacteriana; el microorganismo se hace vulnerable al pH ácido, representando así, el mecanismo extraordinario de adaptación, defensa y sobrevivencia ante condiciones extremas ( 3, 4 ); además, si el pH gástrico se alcaliniza por efecto de una comida, la urea no entra al citoplasma, no es desdoblada por la ureasa, evitándose un posible efecto letal alcalino sobre *H. pylori*. Este microorganismo produce otras enzimas como catalasas, proteasas, oxidasas, fosfolipasas, hemoaglutininas, adhesinas que permiten entender su patogenicidad ( 2 ). La adaptación de *H. pylori* al estómago humano, se ha logrado por su capacidad de desarrollar el mecanismo de neutralizar el ácido gástrico , por la producción de la enzima ureasa, pero también por su capacidad de regular dicha producción e incluso incrementarla, por la capacidad que tiene la bacteria de producir N-metilhistamina, lo que sugiere mecanismos reguladores del pH del micronicho de colonización de acuerdo a sus necesidades; por estas capacidades se ha mencionado que la infección gástrica por la bacteria podría representar una asociación benéfica, ya que ante la posibilidad de aumentar la producción de ácido y desde el punto de vista preventivo, se disminuiría la posibilidad de entrada de bacterias enteropatógenas al estómago que no están preparadas para sobrevivir en el medio hostil gástrico ( 5 ).

Como mecanismo de infección y diseminación se han propuesto las vías: oral-oral y la fecal-oral, últimamente se maneja la transmisión vía gastro-oral y también la posibilidad de la infección a partir de agua y alimentos contaminados ( 6 ).

La transmisión fecal-oral se produciría por la contaminación del agua y alimentos mediante la materia fecal con *H. pylori*. La transmisión a través del agua ha demostrado ser tres veces más frecuentes en los niños de hogares con bajos ingresos económicos y en especial los que tienen sus fuentes de agua de consumo externas a sus hogares. La infección a través de los alimentos es más factible por la ingesta de vegetales no cocinados, por la posibilidad de contaminación con aguas tratadas que se utilizan para el riego de las plantaciones. ( 6, 7 )

La transmisión oral-oral se puede producir a través de la saliva, por la presencia de la bacteria en lesiones de la cavidad oral y en la placa dental. Esta transmisión se logra a través del beso, al compartir alimentos y utensilios contaminados con la saliva. La placa dental puede ser un sitio de colonización de *H. pylori* y puede actuar como importante reservorio manteniendo la infección, perpetuando el ciclo infeccioso de la bacteria. En saliva la presencia del *H. pylori* puede ser intermitente, como resultado del reflujo gastroesofágico. La ruta gastro-oral se puede producir por regurgitación del contenido gástrico a la boca. ( 2, 6, 7, 8, 9 )

### **Distribución y frecuencia**

A veinticinco años de haberse demostrado la colonización bacteriana de la mucosa gástrica humana por *H. pylori*, se sabe que la infección es de distribución mundial por estudios de prevalencia. Y que la enfermedad puede adquirirse desde la infancia, en relación a dos factores fundamentales y de efecto inversamente proporcional y que son: el nivel de desarrollo de los países y los niveles de sanidad del medio ambiente de los mismos, y como otras enfermedades a la infección por *H. pylori* se le califica como indicador de pobreza. Para los países en desarrollo y con condiciones no óptimas de sanidad, se han reportado frecuencias o prevalencias muy altas de infección en sus infantes, con cifras hasta de 70 % a 80 %; en cambio en países desarrollados y con condiciones sanitarias óptimas, la prevalencia en su población infantil es de sólo 0.5 % a

1 % para menores de diez años; en general la prevalencia para todas las edades a nivel mundial se presenta en la Tabla 1 y dividido para adultos y niños en la Tabla 2 ( 2, 3,10, 11, 12 ).

**TABLA 1 INFECCIÓN POR *H. pylori* A NIVEL MUNDIAL**

CONTINENTE	%
MÉXICO, AMERICA CENTRAL Y AMÉRICA DEL SUR	70 % - 90 %
AFRICA	70 % - 90 %
ASIA	70 % - 80 %
EUROPA ORIENTAL	70 %
EUROPA OCCIDENTAL	30 % - 35 %
CANADA Y USA	30 %
AUSTRALIA	20 %

**TABLA 2 PREVALENCIA DE *H. pylori* EN PAÍSES EN DESARROLLO EN ADULTOS E INFANTES**

CONTINENTE	PAIS	ADULTOS (>21) %	INFANTES %
AFRICA	ETIOPIA	>95%	48% (2-4) a 80% (6)
	GAMBIA	>95%	95% (5)
	NIGERIA	91%	82% (5-9)
ASIA	BANGLADESH	>90%	58% (0-4) a 82% (8-9)
	CHINA	>55%	41% (3-12)
	INDIA	88%	22% (0-4) a 87% (10-19)
	SIBERIA	85%	30% (5) a 63% (15-20)
	SRI LANKA	72%	67% (6-19)
MEDIO ORIENTE	EGIPTO	90%	50% (3)
	JORDANIA	82%	¿
	LIBIA	94%	50% (1-9) a (10-19)
	ARABIA SAUDITA	80%	40% (5-9)
AMERICA DEL NORTE	TURQUIA	80%	64% (6-17)
	MEXICO	70%	43% (5-9)
AMERICA CENTRAL	GUATEMALA	65%	51% (5-10)
AMERICA DEL SUR	BOLIVIA	¿	54% (5)
	BRASIL	82%	30% (6-8) a (10-19)
	CHILE	72%	36% (3-9)
	PERU	¿	52% (3)

La edad, etnia y género son factores que pueden influir en la incidencia y en la prevalencia de la infección por *H. pylori*, pero lo que más influye es sin duda el estado socioeconómico, mencionándose principalmente condiciones como: hacinamiento, promiscuidad, vivienda sin servicios básicos, agua contaminada, falta de higiene en el

manejo de alimentos y la desnutrición, hablando de países en desarrollo. Como resultado de estos informes y considerándose que es una infección de distribución mundial, se acepta actualmente que la transmisión de la bacteria ocurre de persona a persona, que es entre familiares, de madre a hijo, por vías oral-oral, oral-fecal y oral-aguas contaminadas, por lo que la prevalencia en niños a nivel mundial se estima en 30 %, con cifras de seroprevalencia o seroconversión de 24 % entre los 3 y 5 años, para llegar al 45 % en edades de 16 a 20 años ( 2, 8, 13, 14, 15, 16 ).

En México podemos citar el trabajo de Torres publicado en 1998 en el J. Infect. Dis. sobre la sero-epidemiología e infección por *H. pylori* en México; el estudio iniciado en 1997, se efectuó con sueros representativos de la población de todos los estados de la República Mexicana; muestra que incluyó a 11, 605 sueros y procedentes de personas con edades de 1 a 90 años; los resultados muestran que el 20 % de los niños de 1 año de edad tenían anticuerpos contra *H. pylori*, que la sero-positividad aumentó progresivamente a cifras de 50 % en niños de 10 años, lo que demuestra el hecho ya aceptado a nivel mundial, que la infección en México como país en desarrollo también se adquiere desde la infancia, alcanzando cifras de 80 % en la población joven con edades de 18 a 20 años, y de que la seropositividad aumenta un 5 % cada año de los primeros 10 años de vida ( 17 ). Lagunes reportó la prevalencia de *H. pylori* en infantes sanos en edad escolar de 6 a 13 años, mediante la investigación de antígeno de *H. pylori* en materia fecal en 46 niños y 48 niñas , encontrando resultados positivos en 13 niños y en 10 niñas con una prevalencia de 24 %, sin diferencias en el género; la autora considera la necesidad de dar seguimiento a esta población de infantes portadores asintomáticos, para conocer el momento y el comportamiento o no de sintomatología; sus cifras que se acercan a las reportadas en países desarrollados, como en Austria cuya población infantil de 6 a 10 años muestran una prevalencia de 28.3 %, y se alejan de las reportadas en países en desarrollo como Brasil cuya población de 10 años muestran una prevalencia de 48.8 % ( 18 ). Constanza (2004), estudia la sero-prevalencia de *H. pylori* en 5861 adolescentes del estado de Morelos, reportando una sero-prevalencia general de 47.6%, correspondiendo al 40.6 % en preadolescentes de 11 a 14 años, de 48.6 % en adolescentes de 15 a 17 años y de 59.8 % en adultos jóvenes con 18 a 24 años de edad ( 19 ). Goodman estudió la epidemiología de la infección por *H pylori* en mujeres

embarazadas controladas en una clínica de atención materno-infantil de la ciudad del Paso Texas de U.S.A. y de atención del Instituto Mexicano del Seguro Social de la Ciudad de Juárez Chihuahua, investigando condiciones de sanidad del medio ambiente además de la detección de anticuerpos séricos para *H. pylori*; se muestrearon 751 sueros y reportó una seroprevalencia de 74 % para las mujeres de la ciudad del lado de la frontera de México, y de 56 % para las de la ciudad del lado de U.S.A.; concluyendo que las altas prevalencias de infección en mujeres embarazadas atendidas en ambas zonas fronterizas, se derivan de deficientes condiciones de sanidad, hacinamiento en la vivienda y situaciones socioeconómicas bajas, que son más evidentes del lado mexicano de la frontera ( 20 ). Mohar en 2001, estudió la prevalencia de lesiones precursoras de adenocarcinoma gástrico asociadas a la infección por *H. pylori* en la población de Comitán del estado de Chiapas, en donde las altas prevalencias de infección por *H. pylori* y de adenocarcinoma gástrico representan un problema de salud para dicha entidad federativa; en su revisión incluyó 281 personas asintomáticas con estudios serológicos positivos de anticuerpos y para la citotoxina CagA del *H. pylori*, a todos se les efectuó endoscopias y biopsias para identificar a la bacteria y las alteraciones de la mucosa gástrica; solo en el 10.7 % no se pudo identificar al *H. pylori* en las biopsias, en el 59 % se encontró gastritis crónica activa, un 51 % de metaplasia intestinal, un 12.5 % de displasia moderada o severa, y un caso de carcinoma in situ ( 5, 21 ).

*H. pylori* es una de las causas principales para el desarrollo de enfermedades gastroduodenales tales como gastritis crónica activa y úlceras gástricas ( 22 ). Investigaciones realizadas en la última década con relación a la enfermedad ulcerosa, la gastritis crónica y el cáncer gástrico (considerado como carcinogénico tipo I por la IARC International Agency for Research on Cancer), se planteó la posibilidad de que *H. pylori* sea uno de los principales responsables de su desarrollo; esto asociado a la presencia de factores de virulencia como cag A y vac A y T, genotipos que ha sido detectados en pacientes con estas alteraciones. vac A es una citotoxina de 95 kDa que induce apoptosis que se ha relacionado con inmunomodulación y colonización. Por otro lado, Cag A es un antígeno inmunodominante de 128 kDa que interfiere con la señalización intracelular produciendo cambios tanto morfológicos como funcionales en células epiteliales. (8, 12, 16, 17) La forma espiral y la motilidad conferida por sus

flagelos son considerados esenciales para los rápidos movimientos del *H. pylori* a través del jugo gástrico en busca de su microambiente. Tras un periodo de incubación de la bacteria algunos pacientes manifiestan dolor epigástrico, vómitos y principalmente hipoclorhidria transitoria lo que puede generar un ambiente propicio para la proliferación intestinal de patógenos que normalmente serían destruidos por la acidez gástrica. Este microorganismo es de difícil cultivo en los medios habituales pero puede ser aislado en medios de cultivos apropiados como medio agar-soya con sangre de caballo. ( 2, 8, 9 )

En relación a los estudios realizados se establece; que la presencia de la bacteria es a nivel mundial, la mayoría de las personas infectadas permanecen asintomáticas, pero que en una proporción variable que puede ser de un 10 % a 20 %. La infección por *H. pylori* causa de gastritis aguda , gastritis crónica persistente, gastritis atrófica, úlceras duodenales y úlceras gástricas; además y que ha sido la preocupación mayor, es de que los adultos infectados y no tratados, tienen de dos a seis posibilidades de riesgo para desarrollar neoplasias gástricas como adenocarcinoma y tumores parecidos a los linfomas; asimismo con los años se ha demostrado la asociación del *H. pylori* su asociación con padecimientos extragástricos ( 2, 6, 9, 22 ).

## **Patogenia**

*H. pylori* se adhiere a las células epiteliales gástricas a través de adhesinas, provocando daño a la mucosa debido a la respuesta inmune local entre las que destaca en modelos humanos y en animales el papel que juega los linfocitos T cooperadores, caracterizando una sobre regulación de interferon  $\delta$  en la severidad de las lesiones producidas en la mucosa, dentro de las toxinas se encuentran: Citotoxinas, ureasa, mucinasa, lipopolisacaridasa, lipasa, fosfolipasa A2 y hemolisinas. (8, 12, 21) En cuanto a la proliferación de eosinófilos, Berczi et al, refieren que el incremento esta en relación se debe al efecto quimiotáctico del propio *H. pylori* sobre los mismos. (22)

La hipótesis de Gastrin-Link y la secreción de pepsina, son factores que coadyuvan en el desarrollo de la enfermedad ulcerosa, además de que el incremento de los niveles de gastrina, así como el aumento en el pico de secreción ácida observada en los pacientes portadores de *H. pylori*, podrían jugar un rol de importancia en los pacientes que

padecen úlcera duodenal. La erradicación del microorganismo., disminuye la concentración de gastrina sérica, pero esto no se traduce en una disminución del pico de secreción ácida, la cual permanece elevada. La hipergastrinemia tiene su explicación en la hipótesis “Gastrin-link”, la cual refiere que en las zonas infectadas por *H. pylori* existe una mayor alcalinidad debido a la producción de amonio, lo que genera a nivel local un falso mensaje que el organismo interpreta como falta de secreción, dando lugar a una mayor liberación de hormona por parte de las células productoras de gastrina. ( 8, 21)

### **Diagnóstico de la infección del *Helicobacter pylori*.**

Existen diversos métodos para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*. Estos podrían agruparse en métodos invasivos y no invasivos. Dentro de los primeros a su vez se cuenta a aquellos que se pueden denominar directos, tales como la observación directa (endoscopia) y cultivo y aquellos indirectos, como la prueba de la ureasa. Los métodos no invasivos comprenderían la prueba del aliento y las pruebas serológicas. La prueba de la urea (inclusión de la muestra en una solución rica en urea) evidenciaría la presencia del *H. pylori* a través de un aumento de pH y un cambio en la coloración de la mencionada solución por acción de la ureasa producida por el agente infeccioso. ( 23, 24, 25 )

La prueba del aliento consiste en el empleo de una solución de urea marcada con C 13 o C14 que se administraría al paciente por vía oral a fin de que si existiera colonización de la mucosa gástrica por el microorganismo la ureasa producida por este desdoblará la urea y liberará CO<sub>2</sub> marcado a través del aliento, el CO<sub>2</sub> marcado sería medido a través de un espectrómetro de masa poniendo de manifiesto la presencia de la infección. ( 2, 23, 24, 25 )

Las pruebas serológicas son las más utilizadas en este momento, la detección de anticuerpos específicos por ELISA, permiten un monitoreo serológico en un corto tiempo usando un método simple altamente específico sin recurrir a técnicas invasivas Desde el punto de vista diagnóstico, niveles altos de anticuerpos específicos deberán ser interpretados como un indicador de gastritis asintomática tipo B, de hecho títulos

elevados de IgM y IgA indican infección inicial o activa por *H. pylori*, mientras que niveles elevados de Ig G pueden indicar infección activa o resuelta. ( 23, 24, 25 )

*Helicobacter pylori* se ha detectado en la placa dental y en saliva por lo que la transmisión oral podría ser posible. Para detectar este microorganismo se utiliza una prueba rápida de ureasa o el CLO (Campylobacter like organisms), los cuales se basan en la producción de ureasa por parte del *H. pylori*, siendo el único en la mucosa gástrica ureasa positivo. Así mismo *H. pylori* puede llegar a convertirse en factor etiológico en el desarrollo de la deficiencia de vitamina B12 ocasionada por las lesiones gástricas que producen posteriormente mala absorción, ( 23, 24, 25 )

La elección del método depende más de la experiencia, preferencia y posibilidades de cada laboratorio que de una clara ventaja de una técnica de tinción en particular. Entre estas tinciones, destacan la tinción de plata, la tinción de hematoxilina y eosina y Whartin Starry. ( 1, 2, 3, 26 )

La tinción de Hematoxilina-Eosina es la técnica más utilizada para el diagnóstico de las muestras incluidas en parafina. Su principal ventaja consiste en que, permite el diagnóstico y graduación de la lesión histológica asociada, además de ser una técnica fácil de realizar, utilizada de forma rutinaria en los laboratorios de anatomía patológica, por lo que no añade costos ni tiempo al procesamiento habitual de las biopsias. ( 1, 2, 3 )

La tinción de Whartin Starry, descrita en 1922, es la utilizada habitualmente para la identificación de espiroquetas, pero resulta muy buena también para visualizar el microorganismo, pero es relativamente complicada de realizar, es laboriosa y tiene un elevado costo por el tipo de reactivos utilizados. Además en ocasiones pueden producirse falsos positivos al ser difícil distinguir al microorganismo de los precipitados de plata en la capa mucosa. Ello hace que habitualmente no se utilice como técnica de rutina, reservándose para aquellos casos en que existan dudas diagnósticas. Otra técnica ampliamente utilizada es la tinción de Giemsa, que a diferencia de la anterior, permite una fácil identificación de *H. pylori* que aparece teñido de azul intenso sobre el fondo azul luminoso, por su simplicidad, rapidez y bajo costo, se considera al Giemsa como la tinción de elección. ( 1, 2, 3, 26 )

## **La cavidad bucal como reservorio para *H. pylori*.**

No ha sido establecido si la cavidad bucal es un refugio viable permanente para *H. pylori* o simplemente sirve como vía de transmisión para otros sitios, por lo que el papel que juega la cavidad bucal como un reservorio significativo de *H. pylori* es no concluyente. Si la cavidad bucal es un reservorio para dicho microorganismo, esto es significativo para la subsecuente infección gástrica y esto a su vez el riesgo a desarrollar enfermedad (10, 27, 28, 29, 30, 31).

El reservorio natural para *H. pylori* no es la boca, sin embargo la cavidad bucal ha sido el foco de atención al respecto, algunos sitios de la cavidad bucal han sido reportados como reservorios para *H. pylori*, tales como la placa subgingival, supragingival, saliva, mucosa bucal y presencia del Helicobacter en algunas lesiones orales; Trevizani y cols. (2010) ( 32 ) afirman que el *H. pylori* en la placa dental indica que la colonización de esta bacteria no se limita a la mucosa gástrica y que la boca puede servir como una posible fuente de reinfección de la mucosa gástrica. Perrone y Berroteran (2002) afirman que la presencia de esta bacteria en la cavidad bucal hace que los resultados de la investigaciones sean relevantes, entre ellas las que se refieren a la presencia de *H. pylori* en la cavidad bucal como consecuencia del reflujo gástrico o como miembro de una microbiota transitoria. Resultados de diversos estudios sugieren una asociación positiva entre el *H. pylori* bucal y gástrico, con mayor especificidad, la identificación de la misma cepa en cavidad bucal y gástrico, puede soportar la teoría que cavidad bucal es un reservorio adecuado. La transmisión de este microorganismo vía oral-oral se lleva a cabo entre individuos vía saliva contaminada; así como fecal-oral ( 31, 32, 33 ).

En 48 casos estudiados por Scarano Pereira el 100% de los pacientes presentaron positividad a *H. pylori* en placa dental independientemente de la presencia de lesión en la mucosa gástrica y de ellos 9 pacientes usaban prótesis dental. Karaca y cols. asocian la presencia de *H. pylori* al desarrollo de estomatitis aftosa recurrente y Birek y cols. demostraron la presencia de *H. pylori* en las aftas del 71.8% de los pacientes con EAR. ( 16, 28, 34, 36, 37 )

Sepulveda y cols. en Venezuela realizaron un estudio con el propósito de relacionar la presencia del *H. pylori* en la mucosa gástrica y en cavidad bucal, en 54 pacientes de la Unidad de Gastroenterología del Hospital Regional de Concepción los cuales tenían indicado dentro de su tratamiento el estudio endoscópico. A cada paciente se le tomo biopsia de mucosa gástrica de antro y cuerpo y tres muestras de cavidad bucal correspondientes a placa bacteriana, saliva de la base de la lengua y piso de boca. El total de las muestras fueron cultivadas y sometidas a análisis por PCR convencional y en tiempo real. Veintiún pacientes resultaron positivos en las muestras de tomadas de cavidad bucal por PCR en tiempo real 20/21 en placa bacteriana, 21/21 en saliva de piso de boca y 20/21 en base de lengua, mencionan que sus resultados sugieren que existe correlación entre la presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica y en cavidad bucal y que la técnica de PCR en tiempo real es la más adecuada para detectar bajo número de *H. pylori* en boca. (10, 33, 36, 37, 38, 39 )

Como se menciona anteriormente *H. pylori* ha sido reconocido como el agente patógeno causante de la gastritis crónica y la enfermedad ulceropéptica, asimismo se ha establecido su asociación con el incremento del cáncer gástrico. Los estudios sobre la colonización de este microorganismo en cavidad bucal varían dependiendo de la técnica de detección empleada, por lo que se ha reportado utilizando la técnica de PCR una prevalencia del 97% en la cavidad bucal independientemente del estado de infección gástrica sugiriendo que el *H. pylori* puede ser parte de la flora bucal normal (16 ) es difícil comparar prevalencias debido a la variedad de metodología en cada estudio ( 28, 29, 30, 33, 41, 42, 43, 44 ).

### **Etiología de las úlceras en boca**

El dolor provocado por las úlceras en el entorno de la boca hace que constituyan una urgencia y requieran de la atención inmediata por parte del estomatólogo. Las úlceras en cavidad bucal son por lo general el resultado de una gran variedad de factores entre los que se pueden incluir: el trauma, la predisposición asociada a antígenos de histocompatibilidad, como es el caso de la estomatitis aftosa, la reacción a alérgenos, las autoinducidas, las provocadas por agentes infecciosos y las asociadas a

enfermedades sistémicas, así como las neoplasias malignas y las úlceras idiopáticas. (44, 46, 47 )

Las úlceras traumáticas son las mas comunes y pueden ser provocadas por traumatismos, quemaduras químicas, eléctricas o térmicas. Una úlcera considerada de naturaleza traumática o inclusive inmune es la alteración conocida como úlcera granulomatosa traumática con eosinofilia estromal (TUGSE), relacionada a traumatismos en el 50% de los casos. Es una lesión aguda o crónica, benigna autolimitante de la mucosa bucal ( 49 ) , localizada en lengua, labios o mucosa bucal; sitios que pueden estar asociados a traumatismo dental; es una lesión de patogénesis no clara que se distingue por su patrón histopatológico ya que muestra una reacción inflamatoria, pseudoinvasiva y profunda de resolución lenta y espontánea ( 49, 50 ), no asociada a granuloma eosinófilo o Histiocitosis X ( 50 ) ; esta alteración es similar a la que se ha podido reproducir de manera experimental en lenguas de ratas posterior a un trauma crónico. En úlceras traumáticas de pacientes con disautonomía familiar, el cual es un desorden caracterizado por indiferencia al dolor, así como la condición conocida como la Enfermedad de Riga – Fede ( 46 ). Cuando es imposible asociarlas a trauma, se le ha considerado como un proceso linfoproliferativo de tipo no neoplásico de células T, con formación de estructuras semejantes a granulomas (46, 49, 50, 51, 52).

TUGSE, fue descrito por primera vez por Carderelli en 1857 ( 53 ) como afta cachettica, posteriormente Riga describe aspectos importantes de la misma, en 1890 Fede describió el primer caso documentado con estudio histopatológico y se propone el nombre de Enfermedad de Riga – Fede; la cual es considerada una entidad poco frecuente, que se presenta en individuos de todas las edades, desde infantes hasta ancianos, con una media de 46 años, sin predilección por género. La ulcera de Riga-Fede que corresponde a una úlcera eosinofílica, comúnmente se observa en recién nacidos o en la primera década de vida. La localización más frecuente es el dorso y bordes laterales de la lengua así como labio, paladar y piso de boca ( 49, 50, 51, 52, 53 ). Popoff en 1956 lo describe por primera vez en adultos; desde entonces en la literatura se ha descrito con diferentes nombres lo que ha provocado confusión al describirlos. El nombre más utilizado para diferenciar esta entidad de otras úlceras es el de granuloma

traumático o úlcera eosinofílica de lengua así como úlcera granulomatosa traumática con eosinofilia estromal ( 46 ) o granuloma ulcerativo eosinofílico ( 50 )

El patrón histológico de una úlcera traumática común se caracteriza por la presencia de una membrana de fibrina de diferente grosor entremezclada con un infiltrado inflamatorio agudo, predominantemente neutrofílico; en la base de la úlcera se observa tejido de granulación entremezclado con linfocitos, histiocitos, neutrófilos y en ocasiones células plasmáticas ( 46 ). Sin embargo, en los casos de presencia de úlceras eosinofílicas, aunque el patrón es muy similar, el infiltrado inflamatorio se extiende hacia los tejidos profundos como el músculo subyacente e inclusive puede llegar a involucrar glándulas salivales con la consecuente activación de la quimiotaxis de eosinófilos, macrófagos, neutrófilos y células plasmáticas así mismo se puede observar una población de grandes células linforeticulares pleomórficas que presentan figuras mitóticas; lo anterior ha sido considerado en algunos estudios como un posible desorden linfoproliferativo, identificándose algunas células como CD 68 y CD 30+ ( 46, 49, 50 ).

La enfermedad de Riga- Fede descrita originalmente por Antonio Riga en 1881; y reportados nuevos casos por F. Fade en 1890, es también llamada granuloma eosinófilo ulcerado diutinum, granuloma eosinófilo ulcerado o granuloma traumático ulcerado. Típicamente esta lesión se encuentra en la cara ventral de la lengua debido al trauma repetitivo de los dientes neonatales o natales. Puede haber disminución de la succión y alimentación debido al dolor o molestia que estos le provocan por lo que es necesario identificarla a tiempo y así evitar un grado de desnutrición en el recién nacido. El pronóstico es bueno y suele resolver espontáneamente de una a tres semanas, sin embargo hay reportes de cicatrización hasta de un año de duración, haciendo énfasis en retirar el factor traumático. La recurrencia no suele ser frecuente y se han descrito en reportes aislados. ( 46, 50)

Debido a la similitud clínica de esta entidad con TUGSE es importante abordarla, es de relevancia mencionar que el papel que juegan los eosinófilos en este tipo de úlcera no está bien establecido. Estudios en animales de experimentación han propuesto que estos pueden contribuir a la regulación de los procesos biológicos involucrados en la

reparación de heridas debido a que estas células producen dos citocinas multifuncionales transformantes del crecimiento, el factor-alfa (TGF $\alpha$ ) y el factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1). Los linfocitos T activados por los factores antes mencionados producen varias linfocinas entre ellas la IL 1 y el TNF  $\alpha$  que actúan como quimiotácticos y facilitan la adhesión de los eosinófilos al endotelio vascular; también hay liberación por los mismos linfocitos T de IL 5, linfocina inductora de la maduración de los eosinófilos. ( 45, 47, 48, 49, 50,51, 52 )

Otro grupo de úlceras que deben ser consideradas dentro de este estudio corresponden a la enfermedad aftosa recurrente, conocida también como estomatitis aftosa recurrente. ( 46 ) la cual es una alteración inflamatoria de etiología desconocida caracterizada por úlceras dolorosas y recurrentes (aftas) en la mucosa bucal; afecta al 20% de la población general y es considerada la forma más común de ulceración bucal. ( 16, 54, 55, 56, 57, 58, 59 )

Diversos factores han sido relacionados a la etiología de esta alteración, entre ellos se encuentran los factores genéticos y familiares, autoinmunes, cambios hormonales, reacciones de hipersensibilidad a ciertos alimentos, medicamentos, agentes infecciosos y varias enfermedades sistémicas. Y en personas fumadoras, el tabaco es considerado como un factor protector. ( 57, 58, 59 )

El diagnóstico de estomatitis aftosa recurrente es basado en el hallazgo clínico ya que no existe un examen diagnóstico específico para esta alteración. Es de importancia descartar esta alteración de alteraciones sistémicas como la enfermedad de Behcet, neutropenia cíclica, enfermedad celíaca, inmunodeficiencia, FAPA [fiebre, adenitis, faringitis y aftas], síndrome de Sweet, síndrome de úlceras bucales y genitales con cartílago inflamado MAGIC) que se manifiestan con la presencia de úlceras en cavidad bucal ( 57, 58, 59 )

Otro grupo de lesiones ulcerativas que se deben de tomar en cuenta aunque no forman parte de este estudio son las provocadas por el virus del herpes simple La primoinfección del herpes simple es conocida como gingivoestomatitis herpética, por lo general afectando a población pediátrica, la sintomatología puede ser variable, desde pequeñas úlceras hasta alteración de la cavidad bucal completa así como involucro a

cadenas ganglionares, fiebre, malestar general, etc. Por lo general afecta mucosa tanto masticatoria y de revestimiento, además de afectar la mucosa que recubre la lengua; por lo general tiene una resolución espontánea al cabo de 10 días. El herpes labial es la forma secundaria de la infección, la cual se presenta en forma de vesículas y úlceras, que de la misma manera resuelven al cabo de 10 a 12 días. (16, 54, 55, 56, 57, 58, 59 )

Recientemente se ha postulado la hipótesis de que algunos tipos de úlceras como las aftosas recurrentes y el TUGSE, son consecuencia de una reacción autoinmune contra el epitelio bucal, sugiriendo que esta reacción autoinmune puede ser llevada a cabo por una reacción cruzada activada por proteínas heat-shock liberadas por bacterias. Sin embargo los microorganismos presentes en estas lesiones han sido estudiados en base a técnicas de cultivo y recientemente a la obtención de secuencias de DNA, sin la necesidad de llevar a cabo el cultivo de las mismas, por medio de esta técnica Marchini et al, en una muestra de 535 clonas identificaron 57 especies bacterianas en lesiones aftosas, sin embargo lograron descartar la presencia de *H. pylori* en úlceras de pacientes con estomatitis aftosa recurrente. ( 60 )

Riggio et al, analizaron las biopsias de 28 pacientes con estomatitis aftosa recurrente (EAR), además de 20 pacientes con liquen plano y 13 biopsias de tejido normal como control por medio de PCR; encontrando 3 pacientes con EAR positivos y ninguna muestra positiva en el resto de la población. En contraste, Birek et al, sugieren que *H. pylori* puede estar asociado frecuentemente a estomatitis aftosa recurrente y que su estudio es consistente con los reportados en la literatura, sin embargo la posible asociación del *H pylori* en úlceras bucales es discutible. ( 10, 45 )

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las úlceras en cavidad bucal representan una entidad frecuente que tiene diferente naturaleza, ya sea inflamatoria, neoplásica o metabólica; entre las más frecuentes se encuentra la úlcera traumática incluyendo al TUGSE así como úlceras asociadas a la estomatitis aftosa; actualmente existe la hipótesis de asociar a la etiología de ese tipo de úlceras al *Helicobacter pylori*, siendo este microorganismo polémico con respecto a su relación con la cavidad bucal; por tal motivo es necesario analizar los métodos de diagnóstico propuestos para la identificación de esta bacteria en lesiones bucales frecuentes; por lo tanto la pregunta de investigación es:

¿Es posible identificar a *Helicobacter pylori* en úlceras traumáticas, TUGSE estomatitis aftosa recurrente y en otro tipo de úlceras como las inespecíficas de la cavidad bucal?

## **JUSTIFICACIÓN:**

Buscar la posible asociación del *Helicobacter pylori* como factor etiológico de alteraciones ulcerativas como; úlceras traumáticas, aftas recurrentes, úlceras inespecíficas y en TUGSE,

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar la presencia de *Helicobacter pylori* por medio de inmunoreacción en lesiones ulcerativas de la cavidad bucal, diagnosticadas en el Laboratorio de Patología Bucal Experimental y Clínica de la División de Estudios de Posgrado e Investigación en el periodo comprendido de 1963 a 2008.

## **Objetivos Específicos**

- Identificar la presencia del *H. pylori* en las diferentes lesiones del estudio.
- Determinar en las lesiones la localización de *Helicobacter pylori*.
- Correlacionar la presencia de la bacteria con el tipo de úlcera diagnosticada histopatológicamente.
- Asociar la presencia y/o ausencia del *Helicobacter pylori* con la edad y género de los pacientes

## **- HIPOTESIS**

ALTERNA: Por medio de la inmunorreacción se podrán identificar al microorganismo *Helicobacter pylori* en lesiones ulcerativas diagnosticadas en el Laboratorio de Patología Bucal Clínica y Experimental de la División de Estudios de Posgrado e Investigación en el periodo comprendido de 1963 a 2008

NULA: Por medio de la inmunorreacción no se podrán identificar al microorganismo *Helicobacter pylori* en lesiones ulcerativas diagnosticadas en el en el Laboratorio de Patología Bucal Experimental y Clínica de la División de Estudios de Posgrado e Investigación en el periodo comprendido de 1963 a 2008

## **CRITERIOS DE INCLUSION**

- Especímenes diagnosticados como lesiones ulcerativas (úlceras traumáticas, úlcera inespecífica, aftas recurrentes (estomatitis aftosa), TUGSE). del Laboratorio de Patología Bucal Clínica y Experimental de la División de Estudios de Posgrado e Investigación en el periodo comprendido de 1963 a 2008.

- Especímenes que cuenten con tejido remanente en bloque de parafina.

## **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- Ausencia de tejido remanente en el bloque de parafina.
- Imposibilidad para realizar la inmunorreacción con el anticuerpo anti *Helicobacter pylori*.

## **CRITERIOS DE ELIMINACIÓN**

- Todas aquellas lesiones que al confirmar el diagnóstico histopatológico no sean lesiones ulcerativas.

## **DISEÑO DEL ESTUDIO**

### **Tipo de estudio.**

Retrospectivo, Observacional, Descriptivo.

### **Población objetivo**

Bloques de parafina de especímenes diagnosticados como lesiones ulcerativas (úlceras traumáticas, úlcera inespecífica, aftas recurrentes (estomatitis aftosa), TUGSE). del Laboratorio de Patología Bucal Clínica y Experimental y Clínica de la División de Estudios de Posgrado e Investigación en el periodo comprendido de 1963 a 2008.

### **Selección y tamaño de muestra**

Es una muestra por conveniencia a partir de la base de datos correspondiente a los especímenes de estudios histopatológicos del Laboratorio de Patología Bucal de la División de Estudios Posgrado e Investigación, en el periodo comprendido del año 1963 al año 2008, serán seleccionados todos los especímenes diagnosticados como lesiones ulcerativas (úlceras traumáticas, úlcera inespecífica, aftas recurrentes (estomatitis aftosa), TUGSE).

### **Definición de Variables**

#### **Independientes.**

<b>Variable</b>	<b>Def. operacional</b>	<b>Escala de medición</b>
Edad	Número de años cumplidos.	nominal
Género	Condición que divide masculino y femenino	Femenino, masculino
Especímenes diagnosticados como TUGSE	úlceras traumáticas granulomatosas con eosinofilia estromal, que corresponde al diagnóstico final del espécimen a estudiar.	Ordinal
Especímenes diagnosticados como úlceras traumáticas	Solución de continuidad del epitelio sustituido por fibrina provocada por un	Ordinal

	estímulo irritativo sobre el epitelio	
Especímenes diagnosticados como aftas recurrentes (estomatitis aftosa)	Condición autoinmune manifestada por úlceras recurrentes en mucosa de revestimiento.	Ordinal
Especímenes diagnosticados como úlcera idiopática	Solución de continuidad del epitelio sin estímulo o factor etiológico conocido	Ordinal

### Dependientes.

Variable	Def. operacional	Escala de medición
<i>Helicobacter pylori</i>	Microorganismo microarefílico espiral Gram negativo	Positivo - Negativo

### METODOLOGÍA

Se revisó la base de datos del archivo del Servicio de Diagnóstico Histopatológico del Laboratorio de Patología Clínica y Experimental de 1963 al 2008 seleccionando todos los casos diagnosticados histopatológicamente como lesión ulcerativa que incluyó úlcera traumática, úlcera inespecífica, aftas recurrentes (estomatitis aftosa) así como TUGSE. Se revisaron las solicitudes clínicas para estudio histopatológico y se vaciaron los datos referentes a edad, género y localización, en el formato de recolección de información (Anexo 1). Se seleccionaron las laminillas y los bloques de parafina correspondientes. Se prepararon y procesaron los tejidos para la histoquímica e inmunohistoquímica. Se revisaron al microscopio de luz las laminillas teñidas con hematoxilina y eosina por un experto en patología oral para corroborar el diagnóstico o en su caso rediagnosticar el caso. A los casos seleccionados con diagnóstico de úlcera se les realizó cortes adicionales para ser teñidos con hematoxilina y eosina para confirmar el diagnóstico,

además se realizó inmunohistoquímica utilizando anticuerpo monoclonal contra *Helicobacter pylori*.

Se describen a continuación las técnicas empleadas en el estudio:

## HISTOQUÍMICA

### Hematoxilina y Eosina.

#### **Procedimiento.**

1. Desparafinar e hidratar con agua
2. Impregnar en solución de hematoxilina por 15 minutos.
3. Lavar en agua corriente por 15 minutos
4. Lavar en agua destilada
5. Lavar en alcohol etílico al 80% por 1 o 2 minutos.
6. Contrastar en solución de eosina-phloxine por 2 minutos
7. Deshidratar y limpiar exhaustivamente en 2 cambios en alcohol etílico al 95%, alcohol etílico absoluto, y xileno, 2 minutos cada uno.
8. Montaje.

#### **Resultados**

- Núcleo azul
- Citoplasma rosa-rojo

## INMUNOHISTOQUÍMICA

### Anticuerpo específico contra *Helicobacter pylori*.

#### **Procedimiento.**

1. Desparafinar e hidratar con agua destilada
2. Lavar con buffer de fosfatos salinos pH 7.4 (PBS)
3. Recuperación y exposición antigénica con buffer de citrato de sodio 10 mM pH 6.0 en baño maría durante 30 minutos a 37°C y se dejó enfriar.
4. Lavar con PBS por 3 minutos
5. Bloqueo de actividad enzimática de peroxidasa con solución de agua destilada-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
6. Lavar con PBS por 3 minutos
7. Incubación de anticuerpo primario *Helicobacter pylori* a una dilución 1:200 en cámara húmeda por 3 horas.
8. Lavar con buffer de fosfatos salinos pH 7.4 (PBS) por 3 minutos
9. Colocación de anticuerpo secundario e incubación por 40 min a 37°
10. Lavar con PBS por 3 minutos
11. Revelado con DAB
12. Contraintinción con hematoxilina y eosina

### 13. Montaje de laminilla

#### **Revisión microscópica**

Una vez obtenidas todas las tinciones de los especímenes se llevó cabo la lectura en un microscopio de campo claro, la lectura se realizó a triple ciego previa estandarización, se midió la concordancia intra e inter observador por medio de la prueba Kappa obteniendo un valor de 0.86 participando el tesista y 2 asesores; los resultados de cada uno de los tejidos analizados fueron asentados en la cédula de recolección de datos (Anexo 2).

La lectura se basó en la observación de los siguientes criterios morfológicos para *Helicobacter pylori*:

Presencia o ausencia, ubicación (*Epitelial, lámina propia, tejido conjuntivo y/o cercanos a la lesión*), Cantidad, (*nulo, leve, moderado y severo*), distribución (*aislada, focal y/o dispersa*), asociado al infiltrado inflamatorio (*si o no*)

#### **Análisis de la información**

Se obtuvieron medidas de dispersión central para los datos cuantitativos y de distribución de frecuencias para las variables cualitativas. Con fines de establecer asociación estadística se utilizó la prueba de chi cuadrada con un nivel de significancia del 95% ( $\leq 0.05$  IC95%).

## **RESULTADOS.**

En el periodo comprendido de 1963 a 2008 se revisaron 17,155 especímenes diagnosticados histopatológicamente en el Laboratorio de Patología Clínica y Experimental de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM. De éstos, se excluyeron 322 casos ya que no contaron con diagnóstico.

De los restantes, se identificaron 86 casos con diagnóstico de úlcera oral, de los cuales 26 se excluyeron ya que no se tenía bloques de parafina o tejido remanente. De tal forma que, 60 casos cubrieron los criterios de inclusión. Durante la realización de la

técnica inmunohistoquímica se eliminaron 3 casos por motivos técnicos, por lo que, solamente se procesaron 57 casos.

El promedio de edad del total de los casos fue de 46.4 años  $\pm$ 19.3. Con respecto a el género, 35 (61.4%) correspondieron al género femenino (promedio de edad 48.7 años  $\pm$  19.4, rango 10 a 78 años), mientras que 21 (36.8%) casos correspondieron al género masculino (promedio de edad 44.2 años  $\pm$ 17.7; rango de 8 a 70 años). En 1 casos no fue posible determinar el género.

Las lesiones topográficamente se distribuyeron de la siguiente forma: 20 (35.1%) casos se ubicaron en la lengua, seguido del labio con 10 casos (17.5%); encía y mucosa yugal con 8 casos (14.0%) cada uno. 5 casos se ubicaron en el paladar (8.8%) y solo un (1.8%) caso en el piso de boca. En un caso no se pudo identificar la localización.

En relación al diagnóstico la distribución de frecuencias fue de la siguiente forma: 17 casos se diagnosticaron como úlceras traumáticas, 26 correspondieron a úlceras de origen no especificado, 13 tuvieron un diagnóstico de TUGSE, y solo un caso diagnosticado como estomatitis aftosa.

Se observó inmunoexpresión a *H. Pylori* en 52 casos para una prevalencia del 91.2%. 5 casos (8.8%) fueron negativos. La prevalencia de portadores de *H. pylori* en relación al género mostró que los varones presentaron una mayor prevalencia que las mujeres; 95.2% vs 88.6%, respectivamente, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p >0.05$ ).

En relación al tipo de úlcera y presencia de *H. pylori* se observó que el 100% de las úlceras de origen no especificado fueron positivas a *H. pylori*, seguido de TUGSE con el 84.6% de prevalencia y de úlcera traumática con el 82.4%. Siendo esta asociación estadísticamente significativa ( $p 0.05$ ).

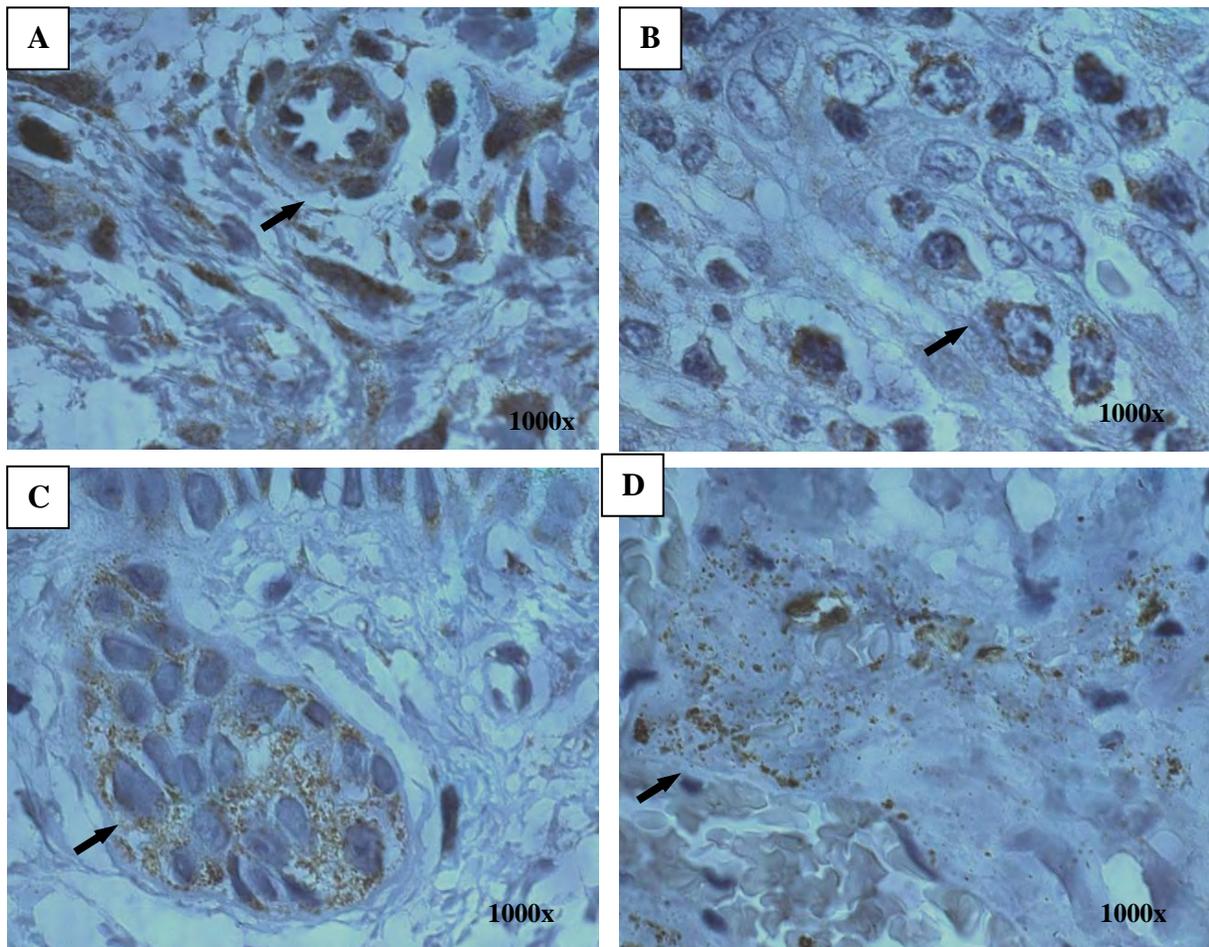


Figura 1. Distribución de *H. pylori* en diferentes estados patológicos. (flechas). A) zona de tejido conjuntivo en donde se observa la positividad del *H. pylori* cercana a una pequeña arteriola. B) Zona de infiltrado inflamatorio en lámina propia donde se observan inclusiones intracitoplasmáticas positivas de la bacteria dentro de los macrófagos. C) Fue frecuente encontrar los microorganismos en el tejido epitelial adyacente a la lesión con ubicación focal y expresión severa y D) *H. Pylori* estuvo presente asimismo en zonas de fibrina e inclusive en áreas de tejido necrótico.

En relación a la intensidad de los 52 casos positivos, 24 presentaron inmunoreactividad leve, en 19 casos (33.3%) fue moderada, mientras que en 9 casos (15.8%) fue fuerte. Cuando se analiza la intensidad de la inmunoreactividad en relación al tipo de úlcera se obtuvo que de los casos de úlcera traumática el 29.4% de ellos mostró tanto inmunoreactividad leve como moderada. En el caso de TUGSE el 46.2% de los casos

mostraron inmunoreactividad moderada, mientras que el 57.7% de las úlceras de origen no especificado mostraron inmunoreactividad leve. En todos los casos el menor porcentaje de inmunoexpresión fue la inmunoreactividad fuerte, sin embargo las úlceras traumáticas presentaron el mayor porcentaje de inmunoexpresión fuerte. Esta última asociación no fue estadísticamente significativa.

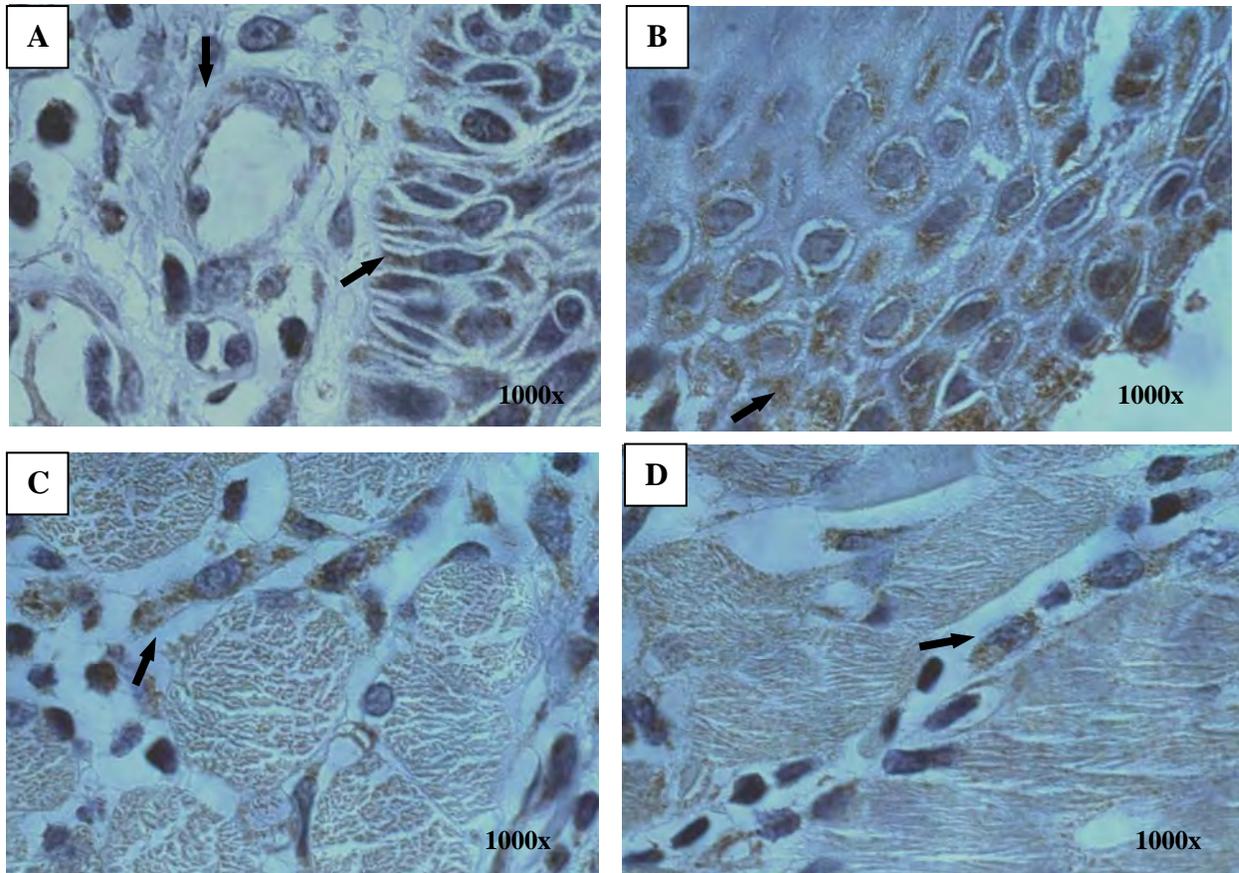


Figura 2. *H. pylori* se observó distribuido en los diferentes tejidos A) Ocasionalmente se encontraba disperso entre las células del estrato basal del epitelio. B) Fue más evidente su ubicación en el estrato espinoso en donde por lo general fue intensamente positivo. C y D) En los casos de TUGSE cuando la lesión presentaba tejido muscular se observó inmunoexpresión al Ac en los septos musculares como se puede observar en la imagen.

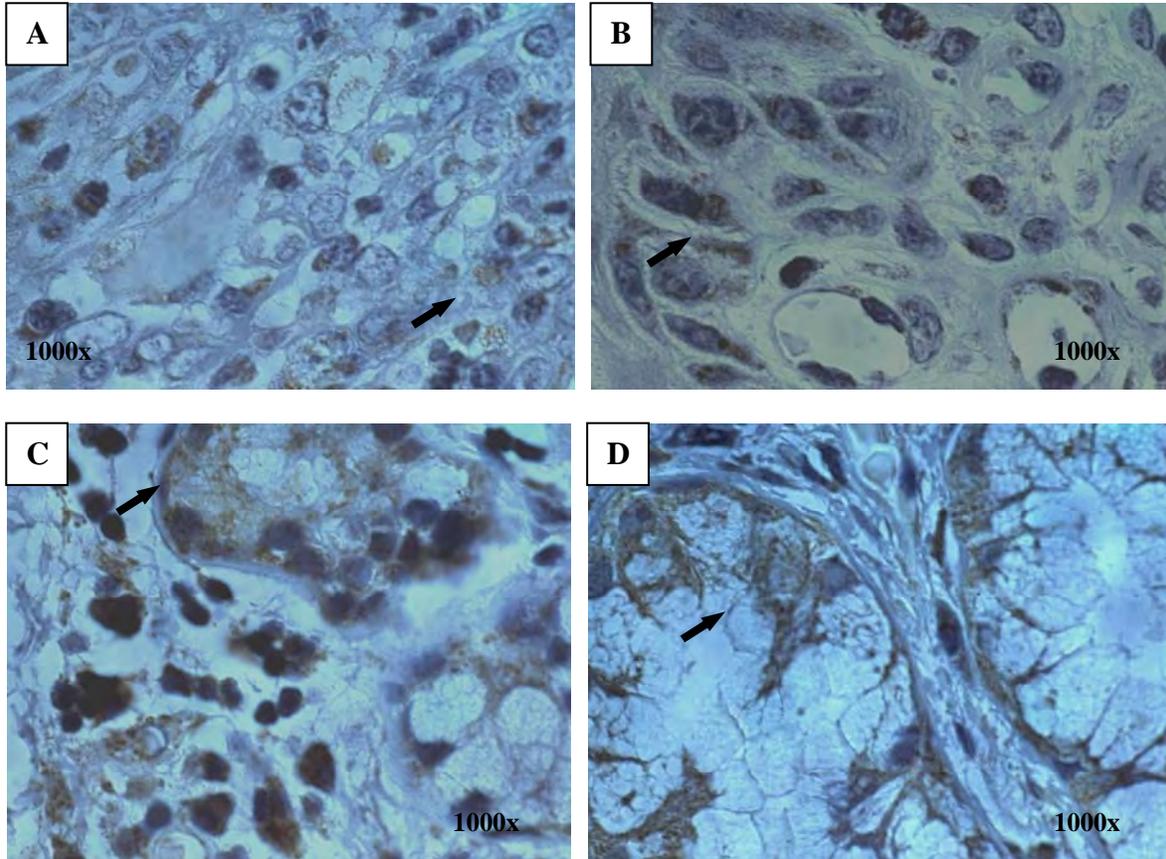


Figura 3. Macrófagos fueron observados en los diferentes sitios de las lesiones estudiadas. A) En esta figura se observa un macrófago englobando a *H.pylori*. Esta situación fue encontrada en las zonas de lesión franca. B) Otro hallazgo fue la asociación de la bacteria a los vasos sanguíneos de diferentes calibres como se muestra en esta figura. C y D) También encontramos al *H.pylori* en tejido glandular salival específicamente en los septos de tejido conjuntivo y ocasionalmente en los conductos.

La inmunoreactividad a el anticuerpo anti-*H. pylori* se observó dispersa en 24 casos (42.1%); focal en 22 casos (38.6%) y en 12 casos (21.1%) fue aislada. En el caso de las úlceras traumáticas el patrón de inmunoreactividad que más predominó fue el focal con el 33.3; en el caso de TUGSE predominó el patrón disperso con el 41.6%, y en el caso de las úlceras de origen no especificado predominó el patrón focal con el 40%. La cantidad de patrones es mayor que el número de casos porque un caso podría tener 2 o más patrones de distribución de la inmunoreactividad.

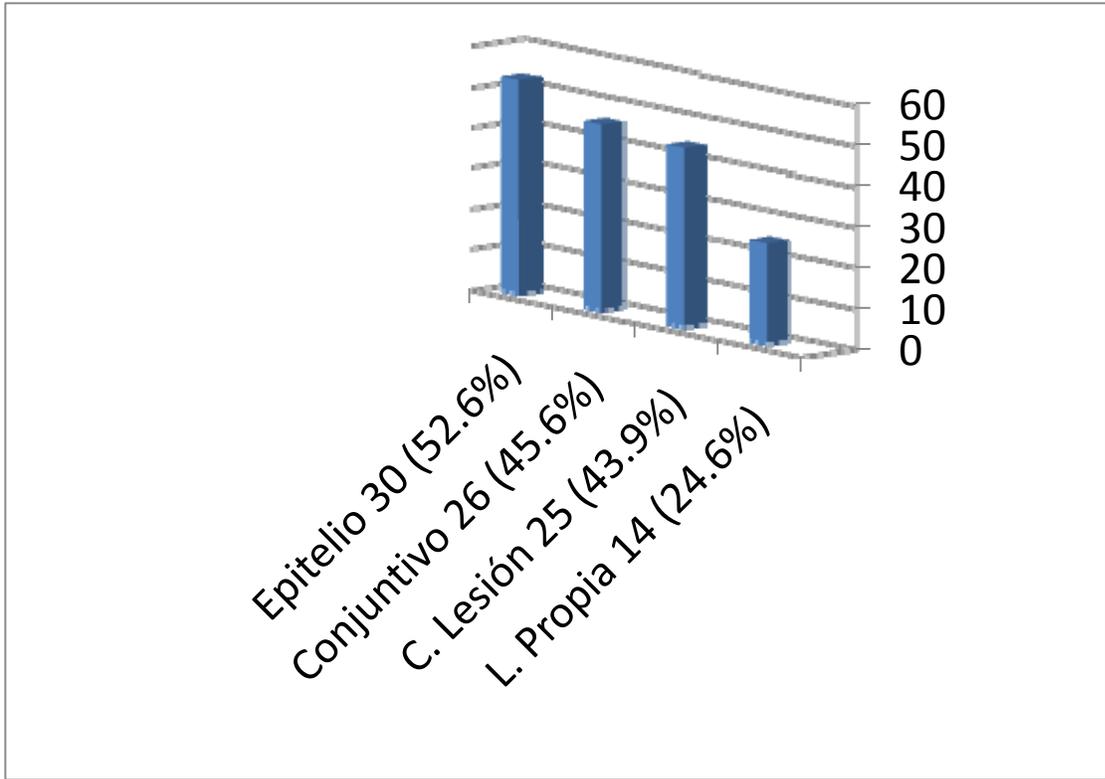


Figura 4. Localización de *Helicobacter pylori*

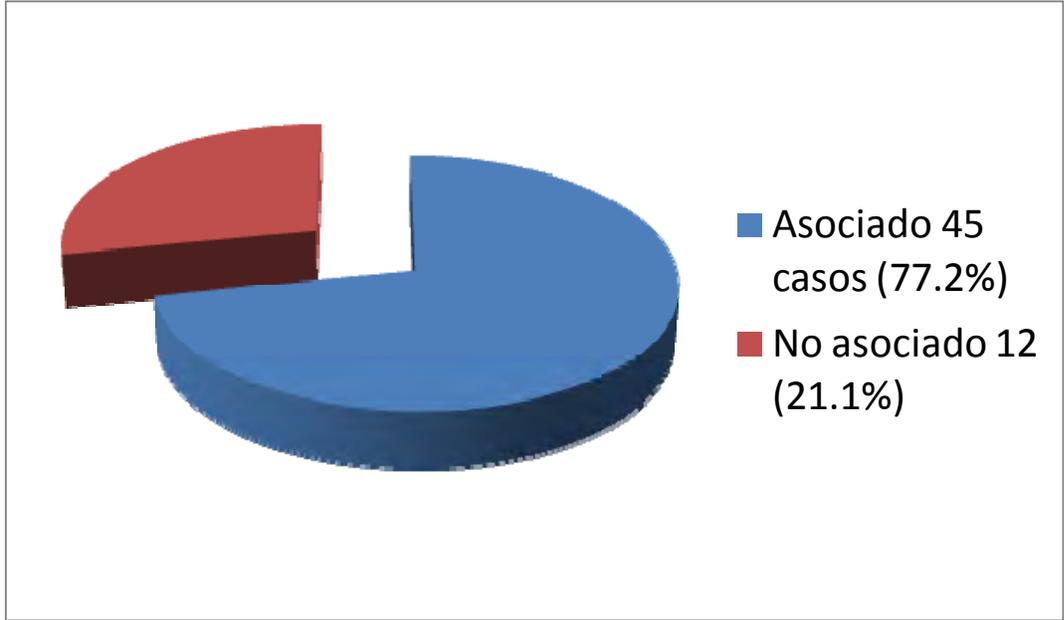
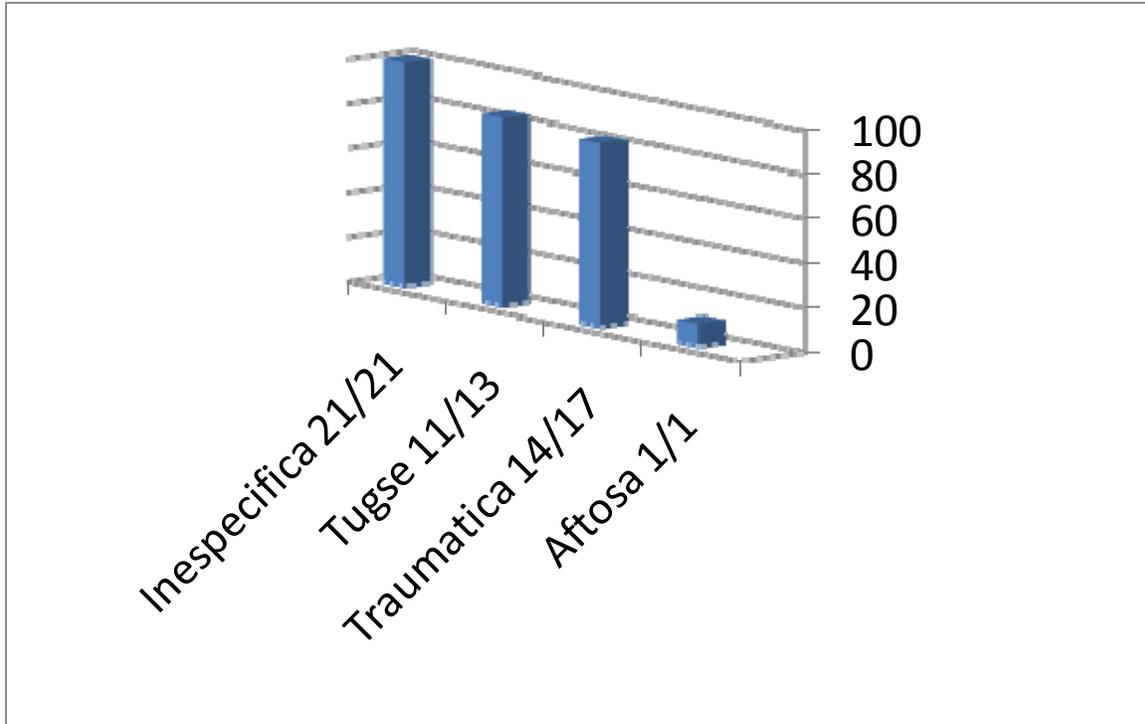


Figura 5. *Helicobacter pylori* asociado a infiltrado inflamatorio.  $\chi^2= 20.553$   $P=.000$



**Figura 6. Ubicación tisular del microorganismo y tipo de úlcera.**

El total de identificaciones positivas es mayor que el número de casos porque un solo caso podía tener inmunoreacción en varios tejidos.

La predilección de colonización por el epitelio fue estadísticamente significativo ( $p > 0.01$ ). En el caso de TUGSE no se observa una predominancia de tejido ya que la distribución fue muy semejante, 38.4% de los TUGSE presentaron *H. pylori* en epitelio, misma cifra en tejido conjuntivo y en la lámina propia se observaron *H. pylori* en el 23% de estos casos. En cuanto a las úlceras de origen desconocido la principal colonización de *H. pylori* se observó en epitelio (65.3%) así como en el tejido conjuntivo (57.6%).

Para identificar si el microorganismo solamente se ubicaba en el lecho de la úlcera o si se encontraba colonizando áreas adyacentes se buscaron áreas circundantes buscando inmunoreacción positiva. Los resultados muestran que 25 de los 57 casos fueron colonizados por *H. pylori* en áreas adyacentes a la úlcera. El tipo de úlcera que mostró mayor colonización adyacente a la úlcera fue TUGSE, ya que en el 53.8% de los casos se pudo identificar dicho patrón. A pesar de que esta asociación no fue

estadísticamente significativa, vale la pena mencionar que en los casos de TUGSE fue donde se identificó la mayor extensión de colonización. Se pudo identificar *H. pylori* en músculo y en inclusiones intracitoplásmicas de macrófagos espumosos.

Un dato a resaltar es el hecho de que, aun cuando en los objetivos de esta tesis no se incluía su análisis, en los casos donde la muestra incluía glándulas salivales menores, independientemente del diagnóstico, se pudo observar inmunoreacción positiva en conductos y en acinos mucosos pero no en los serosos. En casos aislados se pudo observar permeación vascular del *H. pylori* y patrón de colonización en el estrato basal del epitelio.

## **DISCUSION.**

El presente trabajo tuvo como principal objetivo demostrar la presencia de *H. pylori* en lesiones ulceradas de la mucosa oral de diferentes orígenes utilizando anticuerpos monoclonales y técnica inmunohistoquímica como herramienta de estudio. Nuestros resultados muestran una prevalencia del 91.2% en el total de las 57 úlceras. La posible asociación entre úlceras orales y *Helicobacter pylori* ha sido abordada sin embargo los estudios son contradictorios y no concluyentes. Por una parte reportes sugieren una baja presencia de *H. pylori* en sujetos con estomatitis aftosa recurrente (EAR). En Inglaterra se reportó que el 30.6% de pacientes con EAR son *H. pylori*-seropositivos, mientras que los pacientes con otros tipos de úlceras el 39% fueron seropositivos a *H. pylori*. Sin embargo el 24% de sus controles (sujetos sin úlceras orales) también fueron seropositivos a *H. pylori* (12). Resultados similares fueron obtenidos estudiando niños y adolescentes brasileños ya que se mostró que no existe diferencia en la prevalencia de portadores de *H. pylori* entre sujetos con estomatitis aftosa recurrente y sujetos sin estomatitis aftosa recurrente (8) independientemente de la presencia de enfermedad

gástrica asociada a *H. pylori*. Aún más estudios realizados en población de Iraníes y Chinos han mostrado en sus respectivas series de pacientes con diagnóstico de EAR solo un paciente positivo a *H. pylori* tomando la muestra directa de la úlcera y utilizando PCR como método de identificación (59, 60), concluyendo que esta bacteria no está involucrada de ninguna forma con úlceras orales. Las bajas prevalencia de *H. pylori* oral son justificadas por el hecho de que las siembras directas en medios de cultivos selectivos ha fallado para cultivar *H. pylori*. Sin embargo esta bacteria pudiera encontrarse en formas cocoides no cultivables (14).

Por otra parte existen reportes que muestran altas prevalencias. A través de pruebas de urea en el aliento, se estableció una prevalencia de positividad del 37.2% en sujetos con EAR mientras que el 31.8% de sujetos sin EAR también mostraron positividad (Maleki Z. et al) (2009). En pacientes chinos con cuadros clínicos activos de EAR se identificó *H. pylori* en su saliva en el 43.9%, mientras que solo 16.2% de los sujetos controles fueron positivos (15). Utilizando PCR como herramienta de identificación de *H. pylori* obtenido de frotis directos de úlceras aftosas orales la prevalencia aumenta hasta 71.8%. ( 16 ) Independientemente de los aspectos epidemiológicos acerca de la presencia de *H. pylori* en úlceras orales, no se ha dilucidado cual es papel que juega esta bacteria: causal o casual. La asociación causal entre *H. pylori* oral y EAR ha sido propuesta debido a que pacientes con EAR y antecedentes de gastritis y/o enfermedad dispéptica asociada a *H. pylori*, mejoran los episodios clínicos de EAR al controlar y suprimir *H. pylori* gástrico. ( 34 ) Del análisis de la literatura se puede establecer que a pesar de que la evidencia sobre la causalidad de *H. pylori* en la génesis de úlceras aftosas orales no es concluyente, si hay suficiente evidencia que sugiera que *H. pylori* se encuentra presente

en la mucosa oral de sujetos con y sin EAR. Nosotros obtuvimos una prevalencia de positividad a *H. pylori* mucho más alta que lo reportado en la literatura, 91.2%. A pesar de las limitaciones del diseño del estudio (muestras biológicas en parafina vs pacientes) podemos sugerir que el *H. pylori* es capaz de colonizar úlceras orales. Es necesario mencionar que uno de los posibles justificantes para esta aparente no-concordancia pudiera radicar en el método de identificación. La técnica de identificación principalmente utilizada es la PCR. La reacción de la cadena de polimerasa es uno de los métodos más sensibles y específicos de identificación microbiana, sin embargo existen discordancias en su sensibilidad ya que artículos reportan prevalencias altas y otros reportes muestran prevalencias bajas, ambos utilizando PCR y el mismo perfil de pacientes. Nosotros utilizamos muestras biológicas embebidas en parafina que abarcaron toda la úlcera e incluyera la base de la lesión. En nuestro conocimiento esta técnica no había sido utilizada en la identificación de *H. pylori* en lesiones orales por lo que este trabajo es la primera vez que se utilizan muestras biológicas de biopsias completas de úlceras. Nuestros resultados muestran que la técnica inmunohistoquímica es una técnica confiable. El incluir en el campo de observación la base de la lesión principalmente formado por tejido conjuntivo e inclusive músculo, pudiera ser también un hecho concomitante para justificar la mayor prevalencia encontrada por nosotros. Nosotros no encontramos diferencias en la prevalencia de *H. pylori* en las úlceras orales en función del género, estando de acuerdo con lo reportado (41), ni tampoco diferencias significativas dependientes de la etiología.

La colonización e infección gástrica por *H. pylori* ocurre durante los dos o tres primeros años de vida, declinando rápidamente después de los 5 años de edad. La principal vía

de contagio es la transmisión vertical madre-hijo (11). Aunque las posibles vías de contagio oral de *H. pylori* son aún discutidas, aparentemente la transmisión oral-oral, fecal-oral y por reflujo gástrico parecen ser las más comunes. La colonización oral es favorecida por la mala higiene oral y presencia de caries múltiples (37). Aún más, recientemente se ha sugerido un rol cariogénico del *H. pylori* ya que se ha teorizado la facilitación de la desmineralización del esmalte debido a la secreción de enzimas proteolíticas asociadas a amonio ( 27 ). La prevalencia de *H. pylori* gástrico en la población mexicana es de aproximadamente 80%. Nosotros obtuvimos una prevalencia del 92% en úlceras orales. Uno de los escasos reportes de *H. pylori* oral en población mexicana señala que su detección está fuertemente asociado a enfermedad gastrointestinal. ( 5 ) Dato que coincide con lo reportado en otras poblaciones, por ejemplo Iraníes, brasileños y argentinos ( 8, 26, 59 ). La información científica disponible soporta la idea de que la colonización gástrica y oral por *H. pylori* es universal e independiente de factores étnicos, geográficos y sociodemográficos. Aunque se ha sugerido que los países en vías de desarrollo presentan mayor colonización que la población de países desarrollados.

La presencia y viabilidad de *H. pylori* en la cavidad oral ha sido cuestionada. Aparentemente puede ser inhibido su desarrollo por otros microorganismos orales, aunque también se ha sugerido asociación simbiótica entre *H. pylori* y fusobacterias periodontales. Se ha propuesto que se considere una bacteria en tránsito aunque también se ha sugerido que se debe de considerar como una bacteria residente de la cavidad oral, específicamente de la placa dental, y que puede colonizar la cavidad oral de manera independiente de la de la colonización gástrica. ( 31 ) Nuestros resultados

sugieren que se debe considerar un microorganismo residente de la cavidad oral. El hecho de que nosotros fuimos capaces de identificar en *H. pylori* no únicamente en el lecho de la úlcera sino que también en el epitelio adyacente a la úlcera y en tejido conjuntivo y músculo así como en inclusiones intracitoplásmicas de macrófagos espumosos, especialmente en los casos de TUGSE implica una penetración del epitelio a tejidos profundos y al menos sugiere que puede existir la posibilidad biológica de que sobrevivan en estas condiciones. Esta suposición es soportada aún más por la presencia de *H. pylori* en glándulas salivales menores. La principal fuente de *H. pylori* oral es la placa dental, inclusive se le ha asignado un probable rol causal de periodontitis. La presencia de *H. pylori* en placa dental es mayor en sujetos con periodontitis que en sujetos con adecuada salud e higiene bucal, sin embargo se ha propuesto que la periodontitis favorezca la colonización de *H. pylori* y no que el *H. pylori* produzca lesiones periodontales. ( 33 ) Independientemente de que se requiere confirmar y establecer su posible papel como bacteria periodontopatógena y a pesar de que se ha asumido su presencia como parte de la microbiota oral, los datos acerca de la prevalencia de *H. pylori* en la placa dental son contradictorios. Por una parte existe una serie de reportes que muestran elevadas prevalencias de *H. pylori* en placa dental de series de sujetos, específicamente en sujetos con antecedentes de úlcera gástrica. Se ha reportado una prevalencia de portadores de *H. pylori* en placa dental de 65% que se incrementa hasta el 75% cuando se asocia a enfermedad péptico-gástrica ( 36 ). En sujetos chinos con dispepsia la prevalencia de portadores de *H. pylori* en placa dental es 59.4% ( 40 ), mientras que en brasileños con los mismos antecedentes es de 42.3% ( 32 ) y de 72% cuando los pacientes presentan úlcera gástrica ( 41 ). Sin embargo también se han reportado prevalencia tan bajas como 5.9% en pacientes con

periodontitis ( 28 ). Aún más, existen reportes que han fallado en identificar *H. pylori* oral en pacientes con dispepsia funcional ( 29 ). Un hecho que pudiera justificar al menos parcialmente la disparidad en las cifras de prevalencia pudiera radicar en la metodología empleada en la identificación de la bacteria. Las técnicas más comúnmente utilizadas para identificar *H. pylori* gástrico no son las adecuadas para evaluar infección y colonización de *H. pylori* en tejidos orales ( 30 ). Las técnicas de amplificación genética son los métodos más confiables para la identificación bacteriana, sin embargo también es cierto que aún estas técnicas han sido cuestionadas, habiéndose sugerido un rango de sobre-identificación de hasta 25% ( 41 ). Las técnicas moleculares pueden identificar DNA bacteriano sin embargo la cantidad de bacterias viables puede ser tan pequeña que no permita obtener cultivos positivos. Entonces se ha sugerido que el *H. pylori* puede ser identificado en úlceras y lesiones orales pero puede no ser cultivable. Cuando se comparen resultados de proyectos de investigación con datos disímboles forzosamente deberá ser tomado en cuenta la técnica de obtención utilizada. El presente estudio mostró que es posible identificar *H. pylori* en tejidos orales embebidos en parafina utilizando métodos inmunohistoquímicos. Por lo que se considera necesario contar con técnicas alternativas de identificación de *H. pylori*.

La importancia de demostrar que la colonización oral por *H. pylori* va mas allá que su posible rol periodontopatógeno o como agente causal en las úlceras aftosas. El aspecto clínico/médico más importante atribuible a *H. pylori* es como agente etiológico de gastritis crónica así como de enfermedad por reflujo gástrico y de manera concomitante su participación causal en la génesis de adenocarcinoma gástrico cardial y no-cardial. ( 42 ). De tal forma que si la cavidad oral es considerada como un reservorio de *H. pylori* puede ser la causa de recolonización gástrica posterior a un tratamiento anti-H pylori

aparentemente exitoso. Recientemente se ha demostrado, utilizando métodos de identificación moleculares, que la fuente principal de la colonización oral de *H. pylori* tiene su origen en el reflujo gástrico, ya que las cepas de *H. pylori* aisladas de la placa dental son genéticamente idénticas a las aisladas en el estómago ( 36, 41 ). Por otra parte el hecho de que exista coincidencia temporal entre la colonización en la placa dental y la gástrica refuerza la sugerencia de considerar a la cavidad bucal como un reservorio de *H. pylori*. En el caso de las úlceras orales estudiadas en la presente tesis al ser material de archivo impide hacer cualquier sugerencia o inferencia sobre el origen de la colonización. Independientemente de lo anterior una de las utilidades del presente trabajo es que pone de manifiesto que las úlceras orales son reservorios de *H. pylori* y por lo tanto posibles fuentes de recolonización en sujetos sometidos a tratamiento anti-*H. pylori* gástrico. El papel del *H. pylori* en el desarrollo del carcinoma de células escamosas de cavidad oral ha sido poco estudiado. No se ha reportado asociación entre seropositividad a *H. pylori* y carcinoma de células escamosas de cavidad oral ( 42 ). Tampoco ha sido posible identificar en sujetos con hábito de masticar nuez de betel una posible asociación entre *H. pylori* y cáncer oral. ( 33 )

El análisis de la literatura ( 37 ) así como nuestros resultados muestran a la cavidad oral como un reservorio para *H. pylori* y que esta capacidad de colonización oral está fuertemente asociada a pacientes refractarios al tratamiento anti-*H. pylori*. Se ha recomendado que la terapia anti-*H. pylori* no solo se debe circunscribir a la triple terapia (antibióticos, antimicrobianos e inhibidores la bomba de protones) sino que debe abarcar o incluir terapia periodontal. Se puede sugerir entonces que en pacientes con diagnóstico de gastritis asociada a *H. pylori* se establezca tratamientos profilácticos

dirigidos a suprimir la colonización oral a través de una terapia conjunta multidisciplinaria entre gastroenterólogo-odontólogo. Se ha reportado un incremento en la erradicación de *H. pylori* de hasta un 50% más cuando se incorpora terapia periodontal al tratamiento ( 28, 38 ). Ya que los resultados del presente trabajo mostraron presencia de *H. pylori* en lesiones ulcerativas orales, se sugiere además tener estrecha supervisión y seguimiento en pacientes con enfermedad gástrica que además desarrollen lesiones orales ulcerativas.

## ANEXO 1

39	INESPECIFICA DX	GÉNERO	EDAD	LOCALIZACIÓN
40	INESPECIFICA	F	76	2
41	TRAUMÁTICA	M	59	4
42	TRAUMÁTICA	F	58	3
43	TRAUMÁTICA	M	64	3
44	TRAUMÁTICA	F	39	2
45	TRAUMÁTICA	M	37	3
46	TRAUMÁTICA	M	41	4
47	INESPECIFICA	M	38	3
48	TRAUMÁTICA	M	43	6
49	ÚLCERA	M	48	5
50	TRAUMÁTICA	F	36	6
51	AFTOSA	M	46	3
52	ÚLCERA	M	69	6
53	TRAUMÁTICA	F	77	5
54	TRAUMÁTICA	F	13	2
55	TRAUMÁTICA	M	78	4
56	INESPECIFICA	F	32	5
57	INESPECIFICA	F	36	4
58	INESPECIFICA	F	69	5
59	AFTOSA	F	28	4
60	INESPECIFICA	F	20	4
21	TRAUMÁTICA	F	21	5
22	INESPECIFICA	F	77	2
23	TRAUMÁTICA	M	50	2
24	INESPECIFICA	F	60	5
25	INESPECIFICA	M	56	1
26	TUGSE	F	28	2
27	INESPECIFICA	F	43	3
28	INESPECIFICA	M	66	1
29	INESPECIFICA	M	22	2
30	INESPECIFICA	F	62	1
31	INESPECIFICA	M	50	2
32	TRAUMÁTICA	M	62	4
33	ÚLCERA CRÓNICA	F	66	6
34	ÚLCERA CRÓNICA	M	29	1
35	TUGSE	F	45	2
36	ÚLCERA	M	47	1 2 5
37	TUGSE	F	60	5
38	INESPECIFICA	M	34	3





6. Dowsett S, Kowolik M, Oral *Helicobacter pylori*, can We stomach it?, Crit Rev Oral Biol Med, 2003, 14(3):226-233.
7. Martínez-Gomiz, Diouf A, Lakhssassi N, Sixou M, Absence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity of 10 non-dyspeptic subjects demonstrated by real-time polymerase chain reaction, Oral Microbiology Immunology 2006; 21, 407-10
8. Fritscher AMG, Cherubini K, Chies J, Dias ACO, Association between *Helicobacter pylori* and recurrent aphthous stomatitis in children and adolescents. J Oral Pathol Med, 2004;33:129-32
9. Loster B, Majewski W, Czesnikiewicz-Guzik M, et al, The relationship between the presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity and gastric in the stomach, Journal of physiology and pharmacology 2006, 57 Supp3, 91-100.
10. Sepúlveda T, Briceño C, Loreto M, Detección de *Helicobacter pylori* en mucosa gástrica y cavidad oral /*Helicobacter pylori* detection in gastric and oral mucosa, Gastroenterol latinoam; 2008 19 (2): 73-79.
11. Okuda M, Fukuda Y: *Helicobacter pylori* infection in childhood. Nippon Rinsho. 2009 Dec;67(12):2239-44.
12. Porter SR, Barker GR et al. Serum IgG antibodies to *Helicobacter pylori* in patients..Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1997;83:325-8
13. Karaka S, et al, The effect of gastric *Helicobacter pylori* eradication on recurrent aphthous stomatitis. International Journal of Dermatology 2008, 47, 615 – 617.
14. Shimoyama T, Horie N, Kato T, Kaneko T, Komiyama K: *Helicobacter pylori* in oral ulcerations. J Oral Sci. 2000 Dec;42(4):225-9
15. Maleki Z , Sayyari AA, Alavi K, Sayyari L, Baharvand M. A study of the relationship between *Helicobacter pylori* and recurrent aphthous stomatitis using a urea breath test. J Contemp Dent Pract. 2009 Jan 1;10(1):9-16
16. Birek C, Grandhi R, McNeill K, Singer D, Ficarra G, Bowden G: Detection of *Helicobacter pylori* in oral aphthous ulcers. J Oral Pathol Med. 1999 May;28(5):197-203
17. Torres J, Leal Y, Pérez G, Gómez A. A community-based, seroepidemiology study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico, Journal of Infectious Diseases, 1999, 178: 1089-94.
18. Lagunes B, Calva R, Luna J, Rivera M, Calva; Prevalencia de *Helicobacter pylori* en tres poblaciones de niños en la ciudad de Puebla, México y sus factores de riesgo. Rev Gastr. Mex., 2006 Vol. 71, Num. 4.
19. Constanza M, Determinants of *Helicobacter pylori*, seroprevalence in Mexican adolescents; *Helicobacter* 9: 2, 2004, 106-114.
20. Goodman K., Dynamics of *Helicobacter pylori* infections in a US-Mexico cohort during the first years of life, Int. J. Epidemiology, 2005, 34: 6, 1348-55.
21. Mohar A, Guarner J, The association of *Helicobacter pylori* with gastric cancer and preneoplastic gastric lesions in Chiapas México, Cancer 1993, 71:2, 297-301

22. Aydemir,S, Ozel I, Numanoglu G, Borazan A, Ustundag Y, Eosinophil infiltration, gastric juice and serum eosinophil cationic protein levels in Helicobacter pylori-associated chronic gastritis and gastric ulcer, *Mediators of inflammation* 2004, Vol. 13,369-372.
23. Nihal A, Avcu F, et al, The relation between gastric-oral Helicobacter pylory and oral hygiene in patients with vitamin B12- deficiency anemia, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod* 2001;92:166-9.
24. Rokkas T, Liatsos C, et al, Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) immunostaining in Helicobacter Pylori infection: Impact of Eradication., *Pathology Oncology Research*, 1999, Vol. 5, No. 4.
25. Long BJ , Chen K, Wu BL, Duan JM: Detection of Helicobacter pylori in oral cavity of patients with recurrent aphthous ulcer *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2007 Apr;27(4):477-8
26. Medina ML, Medina MG, Martín GT, Picón SO, Bancalari A, Merino LA: Molecular detection of helicobacter pylori in oral samples from patients suffering digestive pathologies. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010; 15(1): 38-42
27. Moseeva MV, belova EV, Vakhrushev IaM: Helicobacter pylori in the development of dental caries. *Ekso Klin Gastroenterol* 2010; 2:19-2
28. Eskandari A, Mahmoudpour A, Abolfazli N, Lafzi A: Detection of Helicobacter pylori using PCR in dental plaque of patients with and without gastritis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010; 15(1):e28-31.
29. Silva Rossi-Aguiar VP, Navarro-Rodriguez T, Mattar R, Siqueira de Melo Peres MP, Correa Barbuti R, Silva FM, Carrilho FJ, Eisig JN: Oral cavity is not a reservoir for Helicobacter pylori in infected patients with functional dyspepsia. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24(3):255-9.
30. Vilarinho S, Guimarães NM, Ferreira RM, Gomes B, Wen X, Vieira MJ, Carneiro F, Godinho T, Figueiredo C: Helicobacter pylori colonization of the adenotonsillar tissue: Facto r fiction?. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2010; 74(7):807-11.
31. Bürgers R, Schneider-Brachert W, Reischl U, Behr A, Hiller KA, Lehn N, Schmalz G, Ruhl S: Helicobacter pylori in human oral cavity and stomach. *Eur J Oral Sci* 2008;116(4):297-304.
32. Trevizani R., et al: Helicobacter pylori detection in gastric biopsies, saliva and dental plaque. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2010, 105(3):3256-30
33. Neluka F, et al: Presence of Helicobacter pylorin in betel chewers with and without *BMC Oral health* 2009; 9:23
34. Karaca S, Seyhan M, Senol M, Harputluoglu MM, Ozcan A: The effect of gastric Helicobacter pylori eradication on recurrent aphthous stomatitis. *Int J Dermatol*. 2008 Jun;47(6):615-7
35. Scarano G; Correia A, et al; Detección de Helicobacter pylori en placa dental y en mucosa gástrica de pacientes sometidos a endoscopía digestiva / Detection of Helicobacter pylori in dental plaque and gastric mucosa from patients undergoing digestive endoscopy, *Acta odontol. venez*; 2005, 43(2), ago.
36. Medina ML, Medina MG, Martín G, Mosqueda N, Dikstein B, Gorodner J, Merino L., Estudio preliminar sobre la presencia de Helicobacter pylori en muestras de placa dental y saliva en pacientes con diferentes patologías de tracto digestivo superior, *Ann Med* 1995; 27:559-63. 14.

37. Liu Y, Yue H, Li A, Wang J, Jiang B, Zhang Y, Bai Y: An epidemiologic study on the correlation between oral helicobacter pylori and gastric H. pylori. *Curr Microbiol* 2009; 58(5):449-53.
38. Zaric S, Bojic B, Jankovic Lj, Dapcevic B, Popovic B, Cakic S, Milasin J: Periodontal therapy improves gastric *Helicobacter pylori* eradication. *J Dent Res* 2009; 88(10):946-50.
39. Morales-Espinosa R, Fernandez-Presas A, Gonzalez-Valencia G, Flores-Hernandez S, Delgado-Sapien G, Mendez-Sanchez JL, Sanchez-Quezada E, Muñoz-Pérez L, Leon-Aguilar R, Hernandez-Guerrero J, Cravioto A: *Helicobacter pylori* in the oral cavity associated with gastroesophageal disease. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24(6):464-8.
40. Liu Y, Lin H, Bai Y, Qin X, Zheng X, SUn Y, Zhang Y: Study on the relationship between *Helicobacter pylori* in the dental plaque and the occurrence of dental caries or oral hygiene index. *Helicobacter* 2008; 13(4):256-60.
41. Assumpacion MB, Martins LC, et al. *Helicobacter pylori* in dental plaque and stomach of patientes. *World J gastroenterol* 2010;16(24):3033-9
42. Chaudhry S, Idrees M, Izhar M, Butt AK, Khan AA: Simultaneous amplification of two bacterial genes: more reliable method of *Helicobacter pylori* detetction in microbial rich dental plaque samples. *Curr Microbiol* 2010; May 30.
43. Chen Wu; Deng-CHyan Wu, Association between *Helicobacter pylori* seropositivity and digestive tract cancers; *World J Gastroenterol* 2009; 15(43):5465-71
44. Marchini L, Campos M, Silva L, Nobrega F; Bacterial diversity in aphtous ulcer, *Oral Microbiology Immunology* 2007; 22: 225–231.
45. Marx R, *Oral and Maxillofacial Pathology*, Editorial Quintessence Publishing, 2003.
46. Neville B, Damm D, Bouquet J, *Oral and Maxillofacial Pathology*, Saunders, 2nd. Edition, 2002, 287-294.
47. Delgado W, Úlcera eosinofílica de la lengua, *Rev. Estomatol Herediana*, 2003; 13, 1-2.
48. Segura. S, Romero D, J. Mascaró M Jr, Colomo L, \* Ferrando J and Estrach T. eosinophilic ulcero of the oral mucosa: another histological simulator of CD30+ limphoproliferative disorders, *Br J Dermatol* 2006, Aug; 155, 460-63.
49. Hirsberg A, et al, Traumatic ulcerative granuloma with stromal eosinophilia: a reactive lesion of the oral mucosa, *Am J Clin Pathol.* 2006 Oct; 126 (4) 522-9
50. Movassaghi K, Goodman D, Ulcerative eosinophilic granuloma: a reporto f five new cases, *British Journal of Oral and Maxilofacial Surgery* 1996; 34, 115-1117.
51. Kinderman et al, Bilateral eosinophilic ulcers in an infant treated with propolis, *Journal of Dermatological Treatmen*, 2001, 12, 29-31
52. Chung H, et al, Eosinophilic ulcer of oral mucosa, Morphology, *International Journal of Dermatology* 1998, 37, 432.
53. Vizcaya L, Núñez M, Toranzo M, Falcon R, Úlcera eosinofílica de a lengua (Reporte de un caso clínico), *Revista ADM, LX*, no. 1, 2003, 40-42
54. Ficarra G, Prignano F, Romagnoli P, Traumatic Eosinophilic Granuloma of the oral Mucosa: a CD 30+ (ki-1) Lymphoproliferative Disorder? *Oral Oncol.* 1997 Sep;33(5):375-9.

55. Hae-Shin C, Nam K, et al, Eosinophilic ulcer of oral mucosa, *International Journal of Dermatology* 1998, 37, 432.
56. Miti Yasu Ei, Kimura R, Kawamura K, S. Akiyama, DDS, PhD. And Morisaki I, DDS, PhD, Sao Paulo, Brazil and Osaka, Japan. A modified oral screen appliance to prevent self-inflicted oral trauma in a infant with cerebral palsy: A case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2004 april, 97 (4), 471-75
57. Buchanan S, B D S c(Melb), MDS (Sad), FRALDS\* C. R. Jenkins, BDS (Syd)+.Riga-Fedes Syndrome. Natal or neonatal teeth associated with tongue ulceration, Case report. *Australian Dental Journal* 1997;42(4), 225-7
58. Lombardi T, Kuffer R, Samson J. Eosinophilic ulceration of the oral mucosa. A case report. *Int. J. Oral Maxillofac Sug* 1993 Dec; 22 (6): 366-367
59. [Mansour-Ghanaei F](#), [Asmar M](#), [Bagherzadeh AH](#), [Ekbataninezhad S](#): Helicobacter pylori infection in oral lesions of patients with recurrent aphthous stomatitis. *Med Sci Monit.* 2005 Dec;11(12):CR576-9. Epub 2005 Nov 24
60. [Iamaroon A](#), [Chaimano S](#), [Linpisarn S](#), [Pongsiriwet S](#), [Phornphutkul K](#): Detection of Helicobacter pylori in recurrent aphthous ulceration by nested PCR. *J Oral Sci.* 2003 Jun;45(2):107-10