



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**EXPRESIÓN DE LOS GENES *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* DE LA
REGIÓN DE PLASTICIDAD DE *Helicobacter pylori* EN AISLADOS CLÍNICOS
DE NIÑOS Y ADULTOS**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

MEJÍA LÓPEZ LENIN ANTONIO

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. CAROLINA MARÍA ANTONIETA ROMO GONZÁLEZ
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

**COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ
DR. JUAN MIRANDA RÍOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

MÉXICO, CD. MX., DICIEMBRE, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**EXPRESIÓN DE LOS GENES *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* DE LA
REGIÓN DE PLASTICIDAD DE *Helicobacter pylori* EN AISLADOS CLÍNICOS
DE NIÑOS Y ADULTOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MEJÍA LÓPEZ LENIN ANTONIO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. CAROLINA MARÍA ANTONIETA ROMO GONZÁLEZ
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ
DR. JUAN MIRANDA RÍOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, CD. MX., DICIEMBRE, 2017

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 11 de septiembre de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **MEJÍA LÓPEZ LENIN ANTONIO** con número de cuenta **305107495**, con la tesis titulada **"EXPRESIÓN DE LOS GENES *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* DE LA REGIÓN DE PLASTICIDAD DE *Helicobacter pylori* EN AISLADOS CLÍNICOS DE NIÑOS Y ADULTOS"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. CAROLINA MARÍA ANTONIETA ROMO GONZÁLEZ**:

Presidente: DRA. MARGARITA CAMORLINGA PONCE
Vocal: DRA. MARTHA PONCE MACOTELA
Secretario: DR. JUAN MIRANDA RÍOS
Suplente: DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ
Suplente: DRA. MARÍA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 14 de noviembre de 2017

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Esta tesis se realizó gracias al apoyo del Posgrado en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México; y al apoyo de beca de proyecto de maestría por parte del CONACYT con número de CVU/Becario: 630901/330492.

El financiamiento para insumos y otras actividades relevantes a esta investigación fueron financiados por Recursos Fiscales del Instituto Nacional de Pediatría con No. de Proyecto 083/2010.

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Carolina María Antonieta Romo González en el Laboratorio de Bacteriología Experimental del Instituto Nacional de Pediatría y bajo la coordinación en conjunto del comité tutor conformado por, la Dra. María del Carmen Maldonado Bernal del Hospital Infantil de México Federico Gómez y el Dr. Juan Miranda Ríos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Dedicatorias

Este trabajo se lo dedico a toda mi familia y amigos que me han apoyado e inspirado para continuar con mis estudios de posgrado. En especial a mi madre y mi padre, María del Rosario López Ángel y José Antonio Mejía Barreto, que siempre son los primeros en impulsarme para que pueda cumplir cada una de mis metas.

Además, quisiera agradecer al Dr. José Ángel Iván Romero Espinoza y el Dr. Juan Andrés Burgueño Ferreira, por sus asesorías y disposición para desarrollar este proyecto de investigación.

Espero además que, este trabajo pueda contribuir de alguna forma en el desarrollo de la educación, la ciencia y la tecnología.

Índice

I. Índice de tablas	I
II. Índice de figuras	II
III. Resumen	1
IV. Abstract	2
V. Introducción	3
VI. Antecedentes	5
1. Características microbiológicas de <i>H. pylori</i>	5
1.1 Aislamiento e identificación de <i>H. pylori</i>	5
2. Infección por <i>H. pylori</i>	6
2.1 Patologías asociadas con <i>H. pylori</i> en adultos	9
2.2 Infección por <i>H. pylori</i> en niños	9
3. Genes de <i>H. pylori</i> asociados a virulencia	10
3.1. Diversidad genética de <i>H. pylori</i>	12
4. Región de plasticidad del genoma de <i>H. pylori</i>	13
4.1. Genes de la región de plasticidad asociados a enfermedad	15
5. Características de los genes <i>jhp0940</i> , <i>jhp0945</i> , <i>jhp0947</i> y <i>jhp0949</i>	18
6. Justificación	20
7. Planteamiento del problema	20
8. Hipótesis	20
9. Objetivo general	20
10. Metodología	21
10.1. Obtención de cepas de <i>H. pylori</i>	22
10.2. Extracción de DNA de cepas de <i>H. pylori</i>	22
10.3. Identificación de los genes <i>ureA</i> , <i>16S rRNA</i> , <i>jhp0940</i> , <i>jhp0945</i> , <i>jhp097</i> y <i>jhp0949</i> por PCR punto final	23
10.4. Extracción de RNA de cepas control positivo, negativo y problema de <i>Helicobacter pylori</i>	24

10.5.	Tratamiento con DNASE I	25
10.6.	Estandarización de la técnica de retrotranscripción (RT)	25
10.7.	Validación de la retrotranscripción de los genes de <i>H. pylori</i> 16S rRNA, <i>jhp0940</i> , <i>jhp0945</i> , <i>jhp097</i> y <i>jhp0949</i>	26
10.8.	qRT-PCR para los genes de <i>H. pylori</i> 16S rRNA, <i>jhp0940</i> , <i>jhp0945</i> , <i>jhp097</i> y <i>jhp0949</i>	27
11.	Análisis estadístico	28
12.	Resultados	29
12.1.	Población de estudio	29
12.2.	Genotipificación por PCR punto final	29
12.3.	Expresión de los genes constitutivos 16S rRNA y <i>ureA</i> en aislados de <i>H. pylori</i> de niños y adultos	30
12.4.	Expresión de los genes <i>jhp0940</i> , <i>jhp0945</i> , <i>jhp0947</i> y <i>jhp0949</i> en aislados de <i>H. pylori</i> de niños y adultos	32
12.5.	Comparación de los niveles de expresión de los genes <i>jhp0945</i> , <i>jhp0947</i> y <i>jhp0949</i> en aislados de <i>H. pylori</i> de niños y adultos	33
13.	Discusión	37
14.	Conclusiones	40
15.	Literatura Citada	41
	Anexos. En esta sección se detallan las concentraciones de cada uno de los reactivos, los procedimientos específicos de cada metodología empleada y se precisan los resultados que se generaron como resultado de cada procedimiento experimental.	48

I. Índice de tablas

Tabla 1. Secuencias de primers para PCR punto final para los genes <i>16S rRNA</i> , <i>ureA</i> , <i>jhp0940</i> , <i>jhp0945</i> , <i>jhp0947</i> y <i>jhp0949</i> .	23
Tabla 2. Diseño de primers y sonda TaqMan para ensayo de RT-PCR de los genes <i>16S rRNA</i> , <i>ureA</i> , <i>jhp0940</i> , <i>jhp0945</i> , <i>jhp0947</i> y <i>jhp0949</i> .	26
Tabla 3. Frecuencia de los genes <i>jhp0940</i> , <i>jhp0945</i> , <i>jhp0947</i> y <i>jhp0949</i> en el grupo de niños y adultos.	29
Tabla 4. Correlación entre los genes <i>jhp0945</i> , <i>jhp0947</i> y <i>jhp0949</i> en cepas de <i>H. pylori</i> .	36

II. Índice de gráficos y figuras

Figura 1. Mapa coroplético de la prevalencia global de <i>H. pylori</i> . Imagen modificada de Hooi y cols. 2016	7
Figura 2. Región de plasticidad de la cepa J99.	14
Figura 3. Categorías de los Factores de Virulencia de <i>H. pylori</i> de acuerdo a la clasificación de Yamaoka y cols. 2008	15
Figura 4. Proceso metodológico	21
Gráfica 1. Ensayo de qRT-PCR del gen <i>16S rRNA</i> de cepas cultivadas de <i>H. pylori</i> provenientes de niños, cepa control positivo J99 y control negativo 26695.	30
Gráfica 2. Ensayo de qRT-PCR del gen <i>16S rRNA</i> de cepas cultivadas de <i>H. pylori</i> provenientes de adultos, cepa control positivo J99 y control negativo 26695.	31
Gráfica 3. Ensayo de qRT-PCR del gen <i>ureA</i> de cepas cultivadas de <i>H. pylori</i> provenientes de niños, cepa control positivo J99 y control negativo 26695.	31
Gráfica 4. Ensayo de qRT-PCR del gen <i>ureA</i> de cepas cultivadas de <i>H. pylori</i> provenientes de adultos, cepa control positivo J99 y control negativo 26695.	32
Grafica 5. Expresión relativa de los genes <i>jhp0949</i> , <i>jhp0945</i> y <i>jhp0947</i> de <i>H. pylori</i> normalizados con <i>16S rRNA</i> .	34
Gráfico 6. Análisis de correlación de la expresión relativa de los genes <i>jhp0945</i> , <i>jhp0947</i> y <i>jhp0949</i> de las cepas aisladas de niños y adultos.	35

Resumen

Antecedentes: En la región de plasticidad del genoma de *H. pylori*, se encuentran los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*, los cuales se han asociado a enfermedades gastroduodenales como gastritis, úlcera duodenal y cáncer gástrico. Hasta el momento se desconoce la función de estos genes a excepción de *jhp0940* el cual codifica para una Ser/Treo cinasa conocida como *ctka* (cell translocating kinase A), que se introduce en las células gástricas y activa a NF- κ B, el cual aumenta el infiltrado de neutrófilos en la mucosa. La presencia de estos genes muestra un patrón heterogéneo entre los aislados de *H. pylori*, sin embargo, su prevalencia entre aislados de niños es mayor que en adultos. Hasta el momento no se tiene información acerca de expresión cuantitativa de ninguno de estos genes. **Objetivo:** Evaluar la expresión de los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* de *H. pylori* en aislados de niños y adultos. **Material y Métodos:** Se obtuvieron 17 cepas de *H. pylori* de biopsias gástricas, de 8 niños y 9 adultos. Mediante qRT-PCR se evaluó la expresión de los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947*, *jhp0949*. Se comparó el nivel de expresión entre el grupo de adultos y niños mediante una prueba t de Student. Para el análisis de correlación de la expresión entre estos genes se utilizó la prueba de correlación de Pearson. **Resultados:** El gen *jhp0940* no se expresó en las cepas de niños y adultos. No se encontró diferencia en la expresión de *jhp0945* ($p=0.36$); *jhp0947* ($p=0.67$); *jhp0949* ($p=0.531$), entre el grupo de niños y adultos. En el grupo de niños se encontró una correlación positiva en la expresión de los genes *jhp0945-jhp0947* ($p= 0.010$) y *jhp0947-jhp0949* ($p= 0.021$), y en el grupo de adultos entre *jhp0947-jhp0949* ($p= 0.002$). **Conclusiones:** Las cepas de *H. pylori* de niños y adultos no expresaron el gen *jhp0940*. En ambos grupos no hubo diferencia en los niveles de expresión de *jhp0945-jhp0947-jhp0949*. En cepas de *H. pylori* tanto de niños como de adultos hubo correlación entre la expresión de *jhp0945-jhp0947-jhp0949*. Aún hacen falta más estudios para entender completamente la función de estos genes y su asociación con desarrollo de enfermedad, este estudio es el primero que evalúa los niveles de expresión de los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* en cepas de niños y adultos.

Abstract

Background: In the plasticity region of the *H. pylori* genome, are the genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* and *jhp0949*, which have been associated with gastroduodenal diseases such as gastritis, duodenal ulcer and gastric cancer. To date the function of these genes is unknown except for *jhp0940* which codes for a Ser / Thr kinase known as *ctka* (cell translocating kinase A), which is introduced into the gastric cells and activates NF- κ B, which increases the neutrophil infiltrate in the mucosa. The presence of these genes shows a heterogeneous pattern among *H. pylori* isolates; however, their prevalence among isolates of children is higher than in adults. No information on quantitative expression of any of these genes has yet been available. **Objective:** To evaluate the expression of the genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* and *jhp0949* of *H. pylori* in isolates of children and adults. **Material and Methods:** Seventeen strains of *H. pylori* were obtained from gastric biopsies of 8 children and 9 adults. The expression of the genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947*, *jhp0949* was evaluated by qRT-PCR. Expression level was compared between the group of adults and children using a Student's t-test. For the correlation analysis of the expression between these genes we used the Pearson correlation test. **Results:** The *jhp0940* gene was not expressed in strains of children and adults. No difference was found in the expression of *jhp0945* ($p = 0.36$); *jhp0947* ($p = 0.67$); *jhp0949* ($p = 0.531$), among the group of children and adults. In the group of children a positive correlation was found in the expression of the genes *jhp0947* ($p = 0.010$) and *jhp0947-jhp0949* ($p = 0.021$) in the group of children, and in adults between *jhp0947-jhp0949* ($p = 0.002$). **Conclusions:** *H. pylori* strains from children and adults did not express the *jhp0940* gene. In both groups there was no difference in the level expression of *jhp0945-jhp0947-jhp0949*. In *H. pylori* strains of both children and adults there was correlation between the expressions of *jhp0945-jhp0947-jhp0949*. Further studies are needed to understand the role of these genes and their association with disease development. This study is the first to evaluate the expression levels of the *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* and *jhp0949* genes in children strains and adults.

Introducción

Helicobacter pylori es una de las bacterias con mayor prevalencia de infección a nivel mundial, se estima que el 50% de la población está infectada y la mayor proporción de estas personas se encuentra en los países en desarrollo, donde alcanza hasta el 80%.^{1, 2} La infección con *H. pylori* principalmente se adquiere en la niñez, es capaz de producir gastritis superficial y durar décadas asintomático o bien producir una gastritis crónica, úlcera péptica o cáncer gástrico. *H. pylori* es el principal agente etiológico de este cáncer a nivel mundial, siendo declarada por la Agencia Internacional para la Investigación de Cáncer como carcinógeno tipo I.³ En México se determinó que el 20% de los niños menores de un año ya están infectados, aumentando al 50% en la población de 10 años y al 80% a los 25 años de edad.⁴

H. pylori presenta una gran cantidad de herramientas moleculares que contribuyen a la colonización del hospedero como las enzimas urea, catalasa, sus flagelos y algunas adhesinas; además de algunas otras herramientas que favorecen la permeancia de éste patógeno llamados factores de virulencia, entre los más estudiados se encuentran los *cagA*, *vacA*, *cagPAI*, *babA* y *dupA*. La caracterización del genoma de las cepas J99 y 26695 de *H. pylori* permitió conocer que existen genes específicos de cepas, los cuales se encuentran principalmente agrupados dentro de regiones hipervariables en su genoma. Estas regiones se caracterizan por contar con alto contenido de G+C en comparación al resto del genoma, la mayoría de estos genes son de función desconocida y se encuentran asociados a transmisión horizontal.

Recientemente se han estudiado las prevalencias de algunos genes de la región de plasticidad en *H. pylori* de población adulta y se ha encontrado que la ausencia del gen *jhp0940* parece estar relacionada con el riesgo de presentar cáncer gástrico, tal es el caso de Japón y Costa Rica donde este gen tiene menor frecuencia en cáncer gástrico comparado con gastritis y úlcera duodenal.^{5, 6} El gen *jhp0940* es conocido

como *ctkA* (cell translocating kinase A) por su actividad Ser/treo cinasa que se introduce en las células humanas y activa al factor de transcripción NF- κ B lo cual incrementa la activación transcripcional de p65 y este a su vez la transcripción de TNF- α , IL-6 e IL-8, esto aumenta el reclutamiento y el infiltrado de neutrófilos en la mucosa gástrica^{7, 8}, y probablemente contribuyendo con el establecimiento de un ambiente pro-inflamatorio.

Respecto al gen *jhp0947* se ha encontrado asociación con úlcera duodenal, úlcera gástrica y cáncer gástrico⁹. Se ha propuesto que estos tres genes *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* actúan en conjunto formando parte de un operón y esto podría ser posible pues se sabe que, su disrupción reduce significativamente la capacidad de *H. pylori* de inducir la producción de IL-12 en monocitos THP-1.¹⁰

La frecuencia de los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* en cepas de niños infectados es mayor al 50% y estos genes no tienen relación con los factores de virulencia *cagA*, *cag PAI* y *dupA*¹¹. Se sabe que, la presencia de los cuatro genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* se encuentra con mayor frecuencia en las cepas de niños, en comparación de las cepas de adultos. Estos descubrimientos apoyan la hipótesis, de que existen otros genes involucrados en la inducción de inflamación, que podrían conferir ventajas selectivas a las cepas de niños, que permitan su colonización y permanencia. Hasta el momento son escasos los trabajos que se han realizado sobre cepas de *H. pylori* de niños con la intención de identificar estos genes, mientras que la investigación acerca de la expresión de estos genes se desconoce totalmente.

VI. Antecedentes

1. Características microbiológicas de *H. pylori*

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa de aproximadamente 5 µm de largo, de morfología espiral. Contiene entre 5 y 7 flagelos polares, los cuales le facilitan desplazarse entre el moco gástrico¹². Esta bacteria se encontrará con mayor frecuencia en la sección del cuerpo y antro gástrico¹³. Aunque dependiendo de la severidad de las lesiones en el estómago su ubicación puede variar, como sucede en pacientes con gastritis atrófica la cual se caracteriza por inflamación crónica, pérdida de glándulas gástricas que son remplazadas por células del epitelio intestinal y tejido fibroso, en este caso es frecuente encontrarla en la curvatura mayor del cuerpo^{14, 15, 16}. *H. pylori* es capaz de neutralizar los niveles de acidez gástrica a través de la producción de ureasa¹⁷. En cultivo, crece en condiciones micro-aerófilas a 37°C, 9% CO₂, sin embargo, aún se debate si requiere de niveles atmosféricos de O₂ (15 a 20%) para un óptimo crecimiento^{18, 19, 20}.

1.1 Aislamiento e identificación de *Helicobacter pylori*

Los métodos para la identificación de *H. pylori* se clasifican en dos principalmente: invasivos y no invasivos. Los métodos invasivos dependen de una biopsia tomada mediante una endoscopia para realizar una examinación histológica, cultivo bacteriano, el examen rápido de ureasa, el uso de sondas de DNA y el análisis de la reacción de cadena de la polimerasa (PCR). En el caso de los métodos no invasivos destacan, la prueba de aliento con urea-C¹³ y las pruebas serológicas, además de la detección de antígeno en heces.^{21, 22}. Los exámenes invasivos no se utilizan comúnmente como pruebas de monitoreo clínico.

La prueba rápida de ureasa en biopsias gástricas se basa en colocar una pequeña muestra de tejido gástrico en urea y observar un cambio de coloración de amarillo a rosa por el cambio de pH ocasionado por la actividad de la ureasa de *H. pylori*, pues esta enzima cataliza la producción de amoníaco y dióxido de carbono a partir de urea²³. Otra prueba importante, es el diagnóstico de *H. pylori* mediante ensayos de

PCR utilizando secuencias específicas de los genes *16S rRNA*, *ureA* y *23S rRNA*, también es posible identificar características genómicas de relevancia epidemiológica como factores de virulencia y genes de resistencia a antibióticos²⁴.

Las pruebas de identificación no invasivas no presentan el riesgo de un procedimiento endoscópico para los pacientes, por lo que es posible utilizarlas como pruebas de monitoreo; la serología nos identifica la presencia de anticuerpos contra la bacteria, que indica si el paciente ha estado en contacto con la bacteria, pero no es posible saber mediante estas pruebas, si se trata de una infección aguda. Otra prueba no invasiva es, la prueba de aliento con urea la cual se basa en la hidrólisis de urea en amonio y CO₂ por medio de la ureasa de *H. pylori*, de tal forma que, al suministrar vía oral al paciente urea marcada con ¹³C o ¹⁴C, es posible detectar el CO₂ liberado mediante un espectrómetro de masas. La prueba de aliento a partir del isótopo ¹³C se ha convertido en la prueba de elección, ya que ésta no utiliza isótopos radiactivos como es el caso del isótopo ¹⁴C. Esta prueba presenta una alta sensibilidad y especificidad (0.96 y 0.93 respectivamente) sin importar que isótopos se utilizan y nos indica la presencia de una infección aguda²⁵.

2. Infección por *H. pylori*

A partir de toda la información generada sobre *H. pylori* hasta el 2016, Hooi y colaboradores tras revisar de forma sistemática 184 publicaciones que incluían datos de 62 países, determinaron que la prevalencia a nivel mundial de este patógeno es superior al 50%; las regiones con mayor prevalencia son África, América del Sur y Este de Asia, mientras que las de menor son Oceanía, Oeste Europeo y Norte America²⁶ (Figura 1).

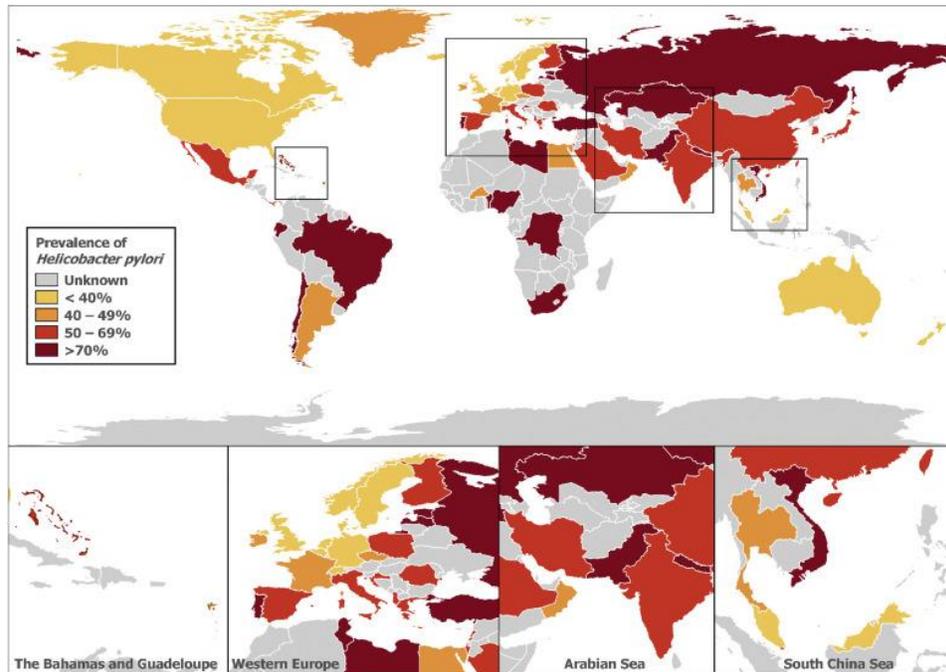


Figura 1. Mapa coroplético de la prevalencia global de *H. pylori*. Imagen modificada de Hooi y cols. 2016, No. Referencia 26.

La vía de transmisión de *H. pylori* aún permanece sin aclararse completamente; sin embargo, los mecanismos más aceptados de transmisión son fecal-oral- u oral-oral, que son las formas más comunes de transmisión entre madre e hijo²⁷; por otro lado, también el consumo de agua contaminada, más frecuentemente en países en desarrollo, pueden ser relevantes en la transmisión de este patógeno²⁸.

Una vez que *H. pylori* se encuentra en el estómago del hospedero y fue capaz de atravesar las barreras químicas como el pH ácido y las barreras físicas como el moco gástrico, entra en contacto con el epitelio gástrico y células adyacentes como las células dendríticas, donde estos responden como primera línea de defensa inmune generando una fuerte respuesta inflamatoria y el reclutamiento de otras células inmunes. En particular este primer contacto con células dendríticas y células del epitelio gástrico incrementa la síntesis de quimiocinas y citocinas como IL-8, IL-1 β , TNF- α , TGF- β , IL-6, IL-12, CCL2-5, β -defensinas, IL-10; además de estimular el reclutamiento de neutrófilos, linfocitos T, macrófagos, mastocitos y linfocitos B²⁹⁻³¹.

Sin embargo, *H. pylori* es capaz de evadir la respuesta inmune induciendo tolerancia, donde algunos de estos mecanismos se basan en la auto edición de su genoma a través de variación de fase³² o mecanismos tipo reóstato³³. La variación fase es un mecanismo mediante el cual, un factor es encendido o apagado, en ocasiones de forma reversible. Este mecanismo genera un re-arreglo genómico, que puede incluir inversiones sitio específico. Generalmente cambia el estado transcripcional (encendido/apagado) del gen, alterando la relación de este con el promotor o con elementos regulatorios. Estos mecanismos pueden incluir la pérdida o ganancia de la función, además de la pérdida de genes o regiones enteras del genoma, principalmente en regiones denominadas regiones de plasticidad. *H. pylori* tiene la capacidad de interactuar directamente con receptores de membrana o segundos mensajeros de las células del hospedero, principalmente con los receptores tipo Toll (TLR)³⁴, los cuales se encargan de desatar una respuesta inflamatoria principalmente mediada por NF- κ B. *H. pylori* puede favorecer la regulación anti-inflamatoria a partir de la diferenciación de células T reguladoras (Treg) FoxP3, que inducen la liberación de IL-10, IFN- γ e IL-17A citocinas características de linfocitos Treg, Th1 y Th17, en una ruta dependiente de la actividad enzimática de γ -Glutamiltanspeptidasa de *H. pylori*.³⁵ Este mecanismo favorece la diferenciación de células Treg en células dendríticas a partir de la vía del receptor de quimiocinas C-C tipo 2³⁶.

Debido a su capacidad de generar estrategias de evasión inmune, *H. pylori* puede regular la respuesta inflamatoria generada por el hospedero y de esta manera permanecer dentro de la mucosa gástrica durante décadas. La línea que divide una interacción crónica libre de riesgos y una que desarrolle un daño entre el hospedero y este patógeno es muy fina, pues si la respuesta inflamatoria es lo suficientemente agresiva puede tanto eliminar a la bacteria como ocasionar un daño en su nicho, generando diversas patologías de alto riesgo en el humano.

2.1 Patologías asociadas con *H. pylori* en adultos

H. pylori es capaz de colonizar el estómago de su hospedero durante décadas y el sujeto puede permanecer asintomático, aun cuando el sistema inmune del hospedero desate una respuesta inflamatoria aguda en un primer momento, esto puede ser controlado por diferentes mecanismos, algunos de los que ya se han explicado. Aproximadamente el 20% de la población infectada por este microorganismo desarrolla una patología, en este caso el paciente presenta un proceso crónico inflamatorio o gastritis crónica, el 10-20% de la población total infectada desarrolla úlceras duodenales o úlceras gástricas, 1-3% adenocarcinoma gástrico y el 0.1% linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT). El cáncer gástrico es la quinta causa de muertes por cáncer en la población mundial, presentando una tasa de supervivencia general a 5 años inferior al 30%³⁷. La infección de *H. pylori* se considera que juega el papel etiológico primario en esta patología, por tal motivo la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) la clasificó como carcinógeno tipo I³⁸.

El establecimiento de una de estas patologías en el paciente, es el resultado de múltiples factores en función de a) la bacteria: factores de virulencia de *H. pylori*; b) el hospedero: bagaje genómico, fisiológico y estado inmunológico, implicados directamente con la respuesta inflamatoria; c) factores ambientales como el consumo sal, tabaco y la dieta³⁹.

2.2 Infección por *H. pylori* en niños

La infección por *H. pylori* normalmente, se adquiere en la niñez y permanece durante décadas en el hospedero sin desarrollar una enfermedad. En países en desarrollo la mayoría de los niños a los 5 años ya están infectados^{40, 41}. En México, 13% de los niños menores de 5 años están infectados⁴², aumentando hasta el 38% en niños de 6 a 13 años^{43, 44}. La presencia de *H. pylori* en estos pacientes se relaciona con hipoclorhidria y deficiencia de hierro principalmente; en los últimos años se ha

abordado la asociación de este patógeno con el desarrollo de otras patologías en niños como alergias o desnutrición. En población de niños en México, la desnutrición y obesidad resultan problemas de salud pública, un estudio en niños mexicanos asocio la presencia de *H. pylori* con bajos niveles de las hormonas leptina y obestatina encargadas de la regulación del apetito y crecimiento, poniendo de manifiesto la importancia de conocer más a fondo el papel que juega este patógeno en los infantes⁴⁵.

Existen diferencias a nivel de enfermedades gastroduodenales asociadas a *H. pylori* entre adultos y niños, la más evidente es que en niños la presencia de úlcera péptica cáncer y Linfoma tipo MALT es rara. En los pacientes pediátricos los niveles de inflamación gástrica son más bajos en comparación con los adultos y esto no se asocia al tipo de cepa o algún factor de virulencia. En estos pacientes a diferencia de los adultos, la respuesta inmune inflamatoria, Th1, Th17 y la infiltración de neutrófilos es menor, mientras que la respuesta inmune antiinflamatoria IL-10, TGF- β y los linfocitos Treg (reguladores) se encuentran en mayor medida. Estas diferencias son claves en el mantenimiento del patógeno dentro del hospedero, las cuales parecen ser reguladas principalmente por factores de virulencia de *H. pylori*⁴⁶.

3. Genes de *H. pylori* asociados a virulencia

El proceso de colonización de *H. pylori* inicia con su capacidad de resistir los niveles de acidez del estómago, para después desplazarse a través del moco gástrico y adherirse a las células del epitelio gástrico, donde las condiciones son más favorables para su desarrollo. Como ya se mencionó antes, el adherirse al epitelio del estómago y su capacidad de permanecer allí, a pesar de la respuesta del hospedero, requiere de diversas herramientas moleculares presentes en el genoma de *H. pylori*, algunas de las cuales se denominan factores de virulencia.

La presencia de los factores de virulencia es variable entre las cepas de *H. pylori*, sin embargo, la mayoría de estos se asocia al desarrollo de alguna patología. El principal

factor de virulencia con actividad de adhesina es BabA, la cual se une al antígeno Lewis B fucosilado, éste es asociado al incremento de lesiones histológicas en el epitelio gástrico y presenta una dinámica de recombinación significativa⁴⁷. SabA es otra importante adhesina que se presenta más frecuentemente en pacientes con gastritis, este factor es regulado de forma importante por el mecanismo de SSM (por las siglas en ingles de slipped strand mispairing) lo cual da ventajas importantes de evasión inmune ante el hospedero⁴⁸. La regulación por SSM se da en repetidos multimericos, que consisten en motivos homogéneos, heterogéneos o secuencias repetidas del genoma. Estos sitios son puntos importantes de desacoplamiento por la replicación del DNA, que resultan en el desplazamiento del marco abierto de lectura.

Algunos otros factores de virulencia son asociados al daño en la mucosa gástrica generado por la presencia de *H. pylori*, además de relacionarse con mecanismo de regulación inmune. En este grupo se encuentran los factores de virulencia más estudiados y de mayor relevancia para el desarrollo de una patología, dos de este tipo de factores de virulencia codifican para las proteínas CagA y VacA. La proteína CagA es, una oncoproteína que es traslocada a las células del hospedero, a través de, la maquinaria de sistema de secreción tipo IV presente en la isla de patogenicidad CagPAI; esta proteína es capaz de activar varias rutas oncogénicas vía p53, además de ser capaz de interactuar con diferentes rutas de fosforilación. Mientras que VacA es una toxina formadora de poros, presente en la mayoría de las cepas de *H. pylori*, su mecanismo de secreción aún no se conoce del todo, sin embargo, parece estar relacionado con los niveles de pH ácidos; VacA es capaz de ocasionar múltiples alteraciones celular incluyendo la muerte celular⁴⁹.

Otro gran grupo de genes considerados factores de virulencia incluye a, los que codifican para proteínas externas de membrana (OMP), los cuales conforman un grupo ampliamente distribuido en las islas de patogenicidad, entre los que destacan *oipA*, *iceA* y *dupA*.

3.1. Diversidad genética de *H. pylori*

Se considera que esta bacteria es un organismo con gran diversidad genética resultado de su alta tasa de transmisión horizontal, mutaciones, sustituciones, inversiones, inserciones y depleciones genómicas^{50, 51}.

Lin y colaboradores en 2009 observaron que, la media de integración del DNA de *H. pylori* en un cromosoma es de 2058 ± 1494 pb, lo que indica que *H. pylori* tiene una eficiencia de recombinación muy alta de un fragmento de integración⁵². Este dato resulta de gran importancia, tomando en cuenta que, en un solo paciente puede presentarse co-infección con distintas cepas. Un estudio en Corea observó, inconsistencia genotípica en 234 aislados, de 43 pacientes, donde particularmente existió una variación en el gen *cagA* del 16.4%, en *vacA* 19.7%, 34.4% para *iceA* y 21.3% en el gen *oipA*, esta inconsistencia se observó en el 51% de los pacientes, además de, observarse co-infección en 68.4% de 19 pacientes evaluados por DNA-PCR fingerprinting de la misma cohorte⁵³.

Algunos investigadores han sugerido que, los fagos han contribuido significativamente en la microevolución de *H. pylori* insertando elementos genéticos dentro de su genoma⁵⁴, tal es el caso del transposón ISHp609 hallado en el profago B38 de *H. pylori* similar a los fagos de la familia *Siphoviridae*⁵⁵.

Como se mencionó antes, las mutaciones dirigen en gran medida la diversidad genética, tal como lo observaron Furuta y colaboradores en 2015, ellos colectaron muestras gástricas de una familia, madre e hijos. Encontrando alta sustitución de aminoácidos en genes de OMP's, además de otros implicados en la biosíntesis de lipopolisacáridos, relacionados con lipoproteínas, proteínas de unión a penicilina en la pared celular y en la división celular⁵⁶. Ellos argumentan que las mutaciones se relacionan a la adaptación de las cepas de la madre, en el estómago de los hijos receptores.

4. Región de plasticidad del genoma de *H. pylori*

El genoma de *Helicobacter pylori* cuenta con alrededor de 1.6 millones de pares de bases (1.6Mb), que contienen aproximadamente 39% de G-C, su genoma alberga 1500 marcos abiertos de lectura (ORF's) y cerca de 1500 proteínas⁵⁷. Las primeras cepas secuenciadas fueron la J99⁵⁸ y 26695⁵⁹. Hasta la fecha se cuenta con 687 genomas secuenciados disponibles en la base de datos PATRIC⁶⁰. Se estima que, el core-genoma de *H. pylori* se compone de alrededor de 244 genes por genoma y mantiene un pan-genoma abierto.

Alrededor del 4% del genoma se constituye por secuencias repetidas, las cuales son resultado del mecanismo de variación de fase, se estima que 46 genes se asocian con este mecanismo, entre los que se encuentran genes relacionados con la biosíntesis de LPS, genes de proteínas asociadas a la superficie celular, genes del sistema de restricción modificación (M-R), genes de proteínas hipotéticas y genes relacionados con los procesos metabólicos de la bacteria⁶¹. Se ha observado que, el 7% de los genes de *H. pylori* son característicos de una cepa determinada, por lo que a estos genes se le denomina genes específicos de cepa y se ubican principalmente en regiones hipervariables, denominadas zonas de plasticidad o regiones de plasticidad⁶². Estas regiones de plasticidad están formadas por diversos genes de restricción modificación, transposasas, topoisomerasas y OMP, siendo consideradas regiones de flujo genético continuo⁶³.

Las regiones de plasticidad mantiene características muy similares a las de un sistema de secreción tales como que el porcentaje de GC es distinto al del resto del genoma, regiones de acoplamiento con elementos IS, genes de integración, factores de un sistema de secreción, moléculas efectores con capacidad de translocación en las células del hospedero, además de contener el mayor número de genes específicos de cepa y OMP's del genoma, junto a un grupo de genes con homología funcional principalmente^{64, 65}. Kersulyte y colaboradores en 2009 observaron que, las regiones de plasticidad de *H. pylori* pueden estar conformadas por transposones

tipo 1, 2 y 1b los cuales se identifican a partir de secuencias altamente relacionadas a repetidos flanqueados por la secuencia 5'AAGAATG, además de diferencias en la secuencia del DNA y el orden de los genes que la componen; estos genes posiblemente integrados por la tirosina recombinasa XerT⁶⁶.

Una de las regiones de plasticidad más caracterizada es de la cepa J99. Esta región cuenta con alrededor de 45 Kb que se componen de los genes *jhp0914* al *jhp0961*, se constituye principalmente por proteínas de replicación del DNA, de recombinación, modificación y restricción, sistemas de reparación, además de genes sin homología con otros genes (Figura 2).

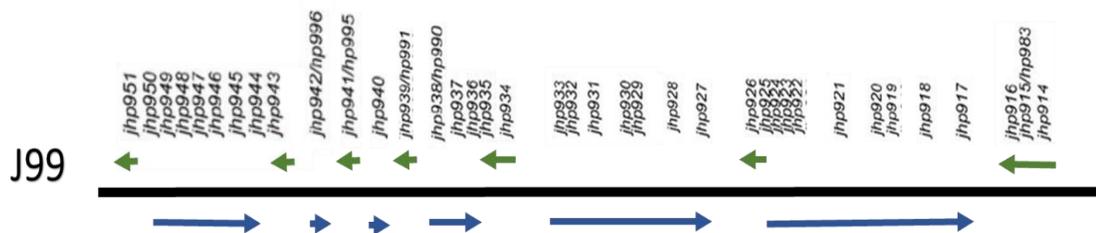


Figura 2. Región de plasticidad de la cepa J99. Esta región comprende del ORF *jhp0914* al *jhp0951*, los cuales pueden ser transcritos en sentido hacia derecha del promotor (flecha azul) o a la izquierda (flecha verde).

Se sabe que, factores de virulencia como el gen promotor de úlceras duodenales a (*dupA*), el gen inducido por contacto con el epitelio A (*iceA*) y las regiones de plasticidad 1 y 2 (PZ1 y PZ2), que están fuertemente asociados a la plasticidad genómica, no se asocian a un mismo grupo filogeográfico; mientras que los factores de virulencia como *cagA*, *vacA* y en el gen *babA*, mantienen una distribución parcialmente correlacionada en un mismo grupo filogeográfico⁶⁷. Lo que pone en relevancia, que algunos de los principales factores de virulencia pueden tener una

estrecha relación filogenética y algunos otros ser dirigidos principalmente por mecanismos de plasticidad.

4.1. Genes de la región de plasticidad asociados a enfermedad

La frecuencia de los genes pertenecientes a la región de plasticidad ha sido estudiada en cepas de diferentes regiones geográficas, en cepas de niños y adultos, cepas de adultos con diferentes enfermedades gastroduodenales, lo que ha permitido conocer que algunos de ellos están asociados a enfermedad. Gracias al estudio de factores de virulencia asociados a enfermedad que se encuentran dentro y fuera de las regiones de plasticidad de *H. pylori* ha sido posible encontrar algunas características con las cuales es posible clasificarlas en tres principales categorías, tal como propuso Yamaoka en 2008 (Figura 3).

FACTORES DE VIRULENCIA			
Categoría	Genes específicos de cepa	Genes con variación de fase	Genes con fenotipos o estructura diferentes
Estado de DNA o proteína	Genes positivos o negativos	Genes positivos, pero productos no funcionales o no funcionales	Genes positivos, funciones o niveles de producción de la proteína diferentes entre cepas
Ejemplo de Factores de Virulencia	<i>cag PAI</i> , regiones de plasticidad	<i>oipA</i> , <i>babA</i> , <i>sabA</i> (regulados por SSM)	<i>vacA</i> (combinación s1/s2 y m1/m2) <i>cagA</i> (regiones repetidas tipo Asia del Este y tipo Oeste)

Figura 3. Categorías de los Factores de Virulencia de *H. pylori* de acuerdo a la clasificación de Yamaoka y cols. 2008 No. Referencia 68.

Primero, él propone a los genes específicos de cepa, los cuales se presentan solo en una cepa de *H. pylori*, la segunda categoría incluye a los genes que son modificados por el mecanismo de variación de fase, mientras que la tercera categoría incluye a los genes que presentan genotipos o estructuras variables, dependiendo de la cepa.

De acuerdo a esta clasificación podemos incluir a la región de plasticidad de la cepa J99 de *H. pylori* dentro de los factores de la primera categoría⁶⁸.

Uno de los primeros estudio sobre esta región de plasticidad incluyó 20 de los ORF's que la constituyen en población latinoamericana, encontrando mayor frecuencia de los genes *jhp0940* y *jhp0947* en cepas de pacientes con cáncer gástrico⁶; la asociación de esta región de plasticidad y el desarrollo de una patología como cáncer gástrico y úlcera pépticas ha sido evaluada en alrededor de una decena de estudios. En Brasil se observó la asociación del gen *jhp0947* en cepas de pacientes con cáncer gástrico y úlcera duodenal, además de no encontrar relación del gen *jhp0940* con estos pacientes⁶⁹. Otro estudio en Turquía, encontró relación con los genes *jhp0912* y *jhp0931* y el desarrollo de úlceras pépticas, pero no con el gen *jhp0940*⁷⁰. En 29 pacientes adultos que incluían pacientes con gastritis no atrófica, con úlcera duodenal y cáncer gástrico en población mestiza mexicana, Romo-González y colaboradores en 2009, observaron mediante un ensayo de microarreglos que de 1660 genes identificados en el total de aislados, el 20.5% (341) de los genes eran genes que no se encontraban en más de un genoma, de los cuales el 37% (127) de estos genes, se encontraban en una región de plasticidad distinta a la región *cag* PAI. Además, estas regiones de plasticidad contenían un patrón genómico significativamente distinto entre los grupos de gastritis no atrófica y el grupo de úlcera duodenal o cáncer gástrico⁶³. Yakoob y colaboradores en Pakistán observaron, mayor frecuencia del gen *jhp0940* en pacientes con úlceras gástricas, el gen *jhp0947* con úlcera duodenal y ambos en pacientes de cáncer gástrico; y que esta asociación era independiente de la presencia del gen *cagA*⁷¹. En un estudio que incluyó a más de 500 pacientes de países occidentales (Estados Unidos y Colombia) y países del Este de Asia (Corea del Sur y Japón), se concluyó que la presencia del gen *jhp0940* se relaciona con un menor riesgo de presentar úlceras pépticas, mientras que el gen *jhp0945* tenía una prevalencia mayor en úlcera gástrica, úlcera duodenal y cáncer gástrico, comparado con gastritis en los pacientes del Este de Asia⁵, de igual forma otro estudio en China encontró la misma asociación del gen *jhp0945* con

pacientes de cáncer gástrico, además de observar que el gen *jhp0949* parece estar relacionado en cepas de pacientes que desarrollan úlceras pépticas o cáncer gástrico⁷².

En Teherán se invitó a 143 familiares (hermanos, hermanas o hijos) de pacientes que desarrollaron cáncer gástrico y fueron sometidos a una cirugía; para comparar a los diferentes alelos de los factores de virulencia *cagA*, *vacA* y el gen *jhp0947*, ellos encontraron que la combinación alélica con *vacA* y *cagA* con *jhp0947* presentó una prevalencia mayor al 50%, que no presentan una diferencia significativa en pacientes con gastritis o que presentan atrofia, sin embargo también determinaron que la ganancia y pérdida del gen *jhp0947* parece ser un fenómeno dinámico que ocurre durante la infección crónica de esta bacteria⁷³.

En 2013 en Argentina, se evaluó el perfil de co-infección de la mucosa a partir de aislados de pacientes con úlceras duodenales, úlceras gástricas y cáncer gástrico tomando muestras de estos pacientes de diferentes regiones del estómago como la curvatura media mayor, antro y cuerpo entre otras. Se encontró que la variación de los genes *jhp0926* y *jhp0945* es significativamente mayor en aislados recuperados de pacientes con úlcera péptica, además de que la variación de los genes *jhp0940*, *jhp0947* y *jhp0949* era similar en pacientes con úlcera péptica y cáncer⁷⁴. También encontraron que existía relación en la prevalencia de los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* con los pacientes que desarrollaron cáncer gástrico. En México en 2015, se evaluó la frecuencia de los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* además de su asociación con otros factores de virulencia *cagA*, *cagPAI* y *dupA* en cepas de niños. Estos genes tienen una frecuencia mayor al 50% en esta población, donde el gen *jhp0940* se presentó en el 53.1%, el gen *jhp0945* en el 44.9%, el gen *jhp0947* en 77.6% y el gen *jhp0949* en 83.7% de los aislados. Por otro lado, el patrón genotípico, que incluye a los cuatro genes fue el más frecuente (24.5%). Tras este resultado ellos identificaron que los patrones y prevalencias genotípicas en los niños eran totalmente distintos a los observados en adultos, lo que los hizo apoyar

la idea de que estos genes podrían ser importantes en el proceso de adaptación previo al desarrollo de una enfermedad como cáncer gástrico o úlceras pépticas¹¹. Las investigaciones más recientes en India (2016) en pacientes adultos con dispepsia no ulcerativa y úlcera duodenal reportan prevalencias de 13.3% para *jhp0940*, 38.9% para *jhp0945*, 39.8% con *jhp0947* y 31% para *jhp0949* determinando que existía una asociación de estos genes con enfermedad⁷⁵. Además, en este estudio evaluaron la inducción de IL-8 en células AGS de cepas positivas para *cagA*, *vacA* y esos cuatro genes, encontrando que estas cepas generan una mayor inducción de esta quimiocinas, generando mayor apoptosis en estas células. Estudios en Irán en 2017 en pacientes con gastritis no atrófica, úlceras duodenales, úlceras gástricas y cáncer gástrico, observaron una correlación positiva en el desarrollo de cáncer gástrico y úlcera duodenal con la presencia de los genes *cagE*, *jhp0940*, *jhp0945* y *jhp0947*⁷⁶. Ellos también observaron que la presencia de *jhp0940*, por si sola, presentaba una fuerte asociación con el desarrollo de cáncer gástrico y una correlación negativa con el desarrollo de úlceras pépticas.

5. Características de los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*

El gen que más se ha caracterizado entre los genes de la región de plasticidad asociados a enfermedad es *jhp0940*. Este gen junto con *jhp0947* ha sido asociado a inflamación crónica, definida por un incremento de linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia⁷¹. El gen *jhp0940* es llamado cinasa A de translocación celular *ctkA* por sus siglas en inglés, tiene una actividad de autofosforilación además de ser una Serina/treonina cinasa capaz de aumentar la fosforilación de NF- κ B induciendo TNF- α de manera dosis dependiente en células HeLa⁷. Previamente Rizwan y colaboradores en 2007, tras cultivar macrófagos TPH-1 con la proteína recombinantes de CTKA, también observaron la inducción de TNF- α , IL-6 e IL-8 de manera dosis dependiente vía translocación de NF- κ B⁸. Tenguria y colaboradores en 2014 encontraron que *H. pylori* es capaz de secretar la proteína de CTKA e inducir la expresión de caspasa-1 en macrófagos RAW264.7 aumentando la transcripción de

IL-1 β , lo que induce el reclutamiento e infiltrado de células inmunes en la mucosa gástrica, además de observar que CTKA es capaz de disminuir la viabilidad celular a través del receptor Fas⁷⁷.

Occhialini y colaboradores en 2000 ya habían propuesto que probablemente los genes *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* se regulaban como un operón⁶. Sin embargo, la información que se tiene de estos genes es escasa. Se sabe que las cepas que contienen estos tres ORF's muestran una mayor inducción de IL-8 al co-cultivarse con células AGS, además de inducir en éstas células, mayor cantidad de muerte celular por apoptosis vía caspasa-3⁷⁵. Un estudio en Holanda determinó con 1061 cepas silvestres y 231 mutantes de *H. pylori*, que la disrupción del locus *jhp0945-jhp0947-jhp0949* disminuye su capacidad de inducir la producción de IL-12 en monocitos TPH-1, lo que disminuiría la activación de la respuesta inmune Th-1 asociada a un fenotipo proinflamatorio que resulta en daño a tejido, entendiendo que el locus completo confiere a una cepa mayor capacidad patogénica⁷⁷.

Un estudio menciona que el gen *jhp0947* es homólogo al gen *jhp0938* (*hp0990*) y a *jhp253* (*hp133*), y su región N-terminal tiene homología con *jhp0477* (*hp0528*) el cual forma parte del importante sistema de secreción tipo IV de la *cag* PAI¹⁰. Sin embargo, poco se sabe de la función específica de los genes *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*.

6. Justificación

Los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* han sido propuestos como genes asociados a enfermedad gastroduodenal, se han sugerido como marcadores de virulencia en la patogénesis de *H. pylori*. Sin embargo, se desconocen los niveles de expresión en aislados de *H. pylori* de niños y adultos.

7. Planteamiento del problema

No se conocen los niveles de expresión de los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* de la región de plasticidad de *H. pylori*. Tampoco se sabe si existe diferencia entre los niveles de expresión de estos genes en el grupo de pacientes pediátricos y adultos. El análisis del genoma de *H. pylori* sugiere, que puede haber co-expresión entre los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*, sin embargo, no existen datos experimentales que lo corroboren.

8. Hipótesis

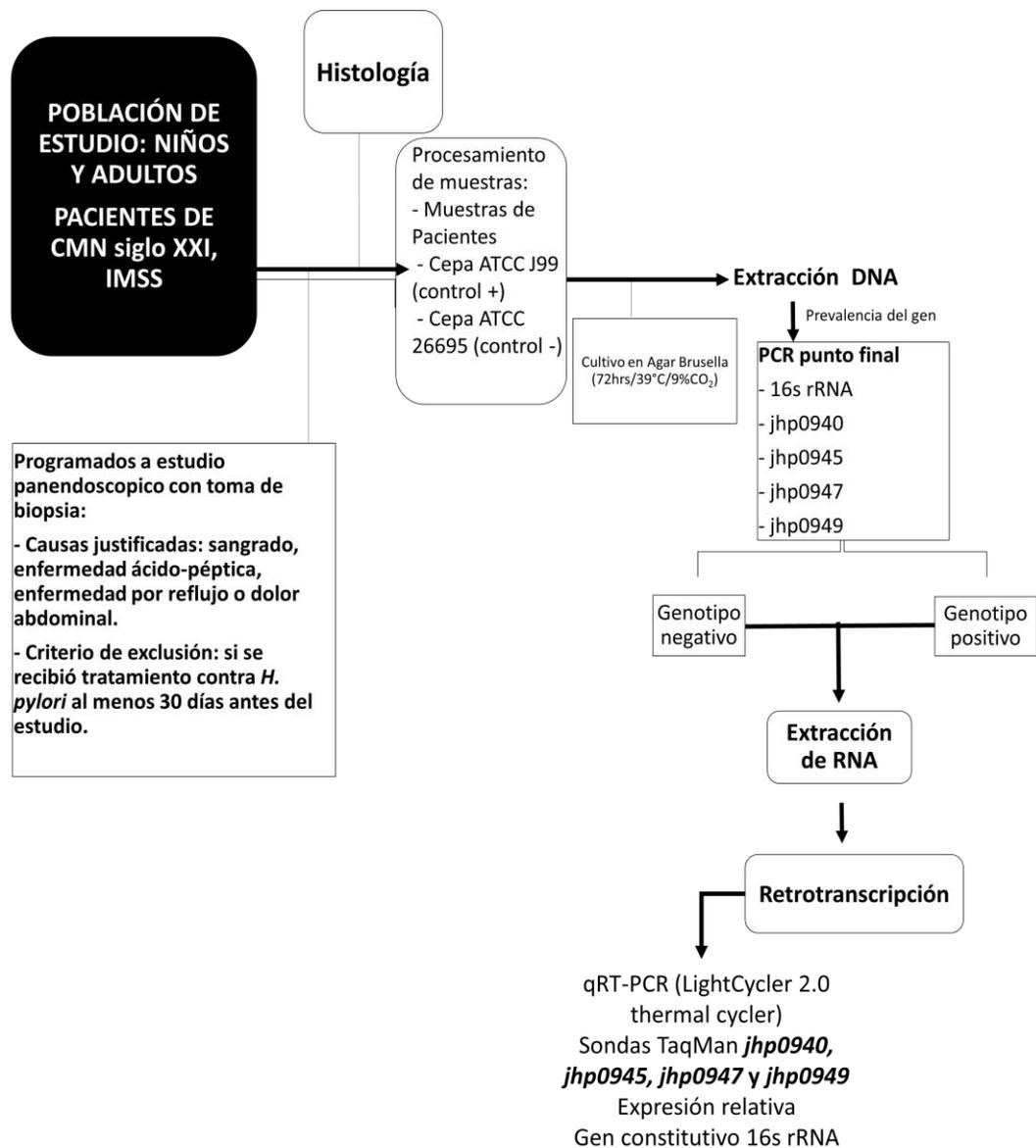
1. Existirá una diferencia significativa en los niveles de expresión de los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* entre el grupo de niños y adultos.
2. Habrá asociación en la expresión de los genes de la región de plasticidad *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*.

9. Objetivo

Determinar los niveles de expresión de los genes de la región de plasticidad *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* en aislados de *H. pylori* de niños y adultos.

10. Metodología

Para este estudio se obtuvieron aislados de *Helicobacter pylori* de biopsias gástricas de niños y adultos. Mediante qRT-PCR se evaluó la expresión de los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* a partir del RNA de cultivo de cepas de pacientes infectados. El proceso metodológico se resume en el siguiente diagrama (Figura 4).



10.1. Obtención de cepas de *Helicobacter pylori*.

Las cepas de *H. pylori* se obtuvieron del Laboratorio de Bacteriología de la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI. *H. pylori* se aisló de biopsias gástricas de niños y adultos, se contaba con carta de consentimiento informado en el caso de los adultos, mientras que en el caso de pacientes menores de edad, cartas de asentimiento y consentimiento informado.

Cada uno de los aislados de *H. pylori* se encontraban preservados a -70°C en caldo Brucella al 16% de glicerol (Anexo 1), para su manipulación las muestras se mantuvieron en hielo seco evitando su total descongelamiento, lo que podría disminuir su viabilidad. En el laboratorio, se inoculó aproximadamente 100 µl de cada cepa, en cajas Petri con agar base sangre (Anexo 1) con 5% v/v de sangre de carnero y 0.2% v/v de antibiótico TV (trimetoprim y vancomicina) y se incubó a 37°C por 48 horas en ambiente con 9% de CO₂. Una vez transcurrido este tiempo de crecimiento se sembró por estriado en una placa nueva de agar base sangre y se incubó en las mismas condiciones para la posterior extracción de ácido nucleico. Se contó con cepas control de *H. pylori* ATCC J99 (control positivo) la cual, posee los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*; y como control negativo se utilizó la cepa ATCC 26695, la cual carece de estos genes.

10.2. Extracción de DNA de cepas de *H. pylori*

Se extrajo DNA a todas las cepas, mediante el kit comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega. Madison, WI, EUA), de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Se cuantificó en Nanodrop la cantidad de DNA obtenido y se verificó la pureza de acuerdo al índice 260/280, donde el valor promedio de las muestras estaba entre 1.7-1.9. Una vez que se obtuvo el DNA, este material genético fue preservado a una temperatura de -20°C hasta su uso.

10.3. Identificación de los genes *ureA*, *16S rRNA*, *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp097* y *jhp0949* por PCR punto final

Se realizó PCR punto final para identificar la presencia de los genes constitutivos *16S rRNA*, *ureA* y los genes de la zona de plasticidad *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*, tanto en las cepas control (J99 y 26695) como en las cepas problema (Anexo 2). Las condiciones del termociclador utilizadas para los genes *16s rRNA* y *ureA* fueron: se aplicó una temperatura inicial de 95°C por 5 min, y 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por 10 seg, alineamiento a 59°C por 40 seg y extensión de 72°C por 1 min; para terminar con un hold de 72°C por 5 min. En el caso del gen *jhp0940* se realizó un hold inicial de 94°C por 5 min, luego 35 ciclos de desnaturalización a 92°C por 30 seg, alineamiento de 56°C a 45 seg y extensión de 72°C por 5 min; finalmente se incubó a 72°C por 5 min. Los genes *jhp0945* y *jhp0947* se incubaron inicialmente a 94°C por 5 min, junto con 35 ciclos con un tiempo de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 62°C por 1 min y extensión de 72°C por 1 min; para finalizar con un hold de 72°C por 7 min. Para el gen *jhp0949* se utilizaron dos juegos de primers (*jhp0949a* y *jhp0949b*), considerándose como presencia del gen, si con algunos de los dos pares de primers amplificaban. Con los dos pares de cebadores se realizó una incubación inicial de 95°C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento de 48°C por 45 seg y extensión de 72°C por 30 seg; para terminar con incubando a 72°C por 5 min. Para el *jhp0949b* una temperatura de alineamiento de 56°C. Las secuencias de todos los se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de primers para PCR punto final para los genes *16S rRNA*, *ureA*, *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*.

GEN	Primer Forward	Primer Reverse	pb	Referencia
<i>16S rRNA</i>	5'TGCGAAGTGGAGCCAATCTT-3'	5'GGAACGTATTACCGCAACA-3'	118	Yamazaki No. Ref. 85
<i>ureA</i>	5'-CGT GGC AAG CAT GAT CCA T-3'	5'-GGG TAT GCA CGG TTA CGA GTT T-3'	77	Ramírez-Lázaro No.

				Ref. 84
jhp0940	5'-GAA ATG TCC TAT ACC AAT GG-3'	5'-CCT AAG TAG TGC ATC AAG G-3'	591	Occhialini No. Ref. 6
jhp0945	5' CAA TGC GAC TAA CAG CAT AG-3'	5' CGC ATT TGC TGT CAT CTT TG-3'	1028	Occhialini No. Ref. 6
jhp0947	5'-GAT AAT CCT ACG CAG AAC G-3'	5'-GCT AAA GTC ATT TGG CTG TC-3'	611	Occhialini No. Ref. 6
jhp0949a	5'-ATA GGA GTG GGT GCT TAC TT-3'	5'-AGC AAC AAC AAA GGC ATG TA-3'	787	de Jonge No. Ref. 10
jhp0949b	5'-TTC AAA AAG TCC CCG AAA TG-3'	5'-GGA TGT CCT GGC ATG TCT CT-3'	200- 300	Sugimoto No. Ref. 5

10.4. Extracción de RNA de cepas control positivo negativo y problema de *Helicobacter pylori*

La extracción del RNA se realizó por medio de la técnica de Trizol (Invitrogen. Carlsbad, CA, EUA). La concentración de bacteria se unificó utilizando una concentración de 0.6 O.D. de células en todos los casos. Se centrifugó cada muestra a 10,000 rpm por 1 min y se decantó el sobrenadante. A continuación se adicionaron 200 µl de GES y se mantuvo a temperatura ambiente por 5 min, las células fueron homogeneizadas por pipeteo, una vez transcurrido el tiempo se agregaron 800 µl de Trizol y se incubó a 30°C por 10 min. Posteriormente se agregaron 200 µl de cloroformo frío y se agitó por 10 seg, la muestra se dejó a temperatura ambiente por 3 min, en esta etapa la muestra comienza a separarse en tres fases, para mejorar la separación de estas fases se mantuvo la muestra a 4°C por 5 minutos, después de este tiempo y se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorf y se agregaron 500µl de Isopropanol a temperatura ambiente por 10 min, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a 4°C, al terminar se decantó el sobrenadante. El RNA se lavó dos veces con etanol al 75%, se centrifugó a 8000 rpm por 5 min a 4°C y al finalizar el

etanol fue decantado. Se dejó secar completamente, para eliminar residuo de etanol. El RNA se diluyó en 35 µl de agua libre de DNasas y RNAsas y se incubó a 56°C por 10 min e inmediatamente después se preservó a -70°C.

Para determinar la integridad del RNA se realizó una electroforesis durante 50 minutos a 90 volts, en un gel de Agarosa al 2% con TBE 1x y 0.001% de Bromuro de etídio. Se buscó observar las subunidades ribosomales 16S y 23S, las cuales se identificaron con ayuda de un marcador de peso molecular RiboRuler High Range RNA Ladder (Thermo Fisher Scientific. EUA) por su número de bases 1,500 y 2,800 respectivamente. El RNA se cuantificó utilizando nanodrop. En el caso del índice 260/280 se debían obtener valores entre 1.8 y 2 mientras que para el índice 260/230 se buscaron los valores de 1.7 a 1.9 para considerar una extracción de RNA libre de contaminantes.

10.5. Tratamiento con DNASE I

Para evitar la contaminación en el RNA por DNA genómico, lo que puede dar resultados falsos positivos en las pruebas de qRT-PCR, se realizó un tratamiento de eliminación de DNA a partir de la enzima DNase I (Thermo Fisher Scientific. EUA) donde se agregó 1U de la enzima con una concentración 1X del regulador de DNase para cada µg de RNA, siguiendo las indicaciones del proveedor.

10.6. Estandarización de la técnica de retrotranscripción (RT)

Una vez que se obtuvo el RNA se realizó la retrotranscripción mediante el protocolo de SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen. CA, EUA) (Anexo 3). Para este ensayo se prepararon 20 µl de reacción con 50 ng de hexámeros al azar, además de una concentración final de 0.5 mM de la mezcla de dNTP's, 1X RT Buffer, 5 mM de MgCl₂, 5 mM DTT y 40U de RNaseOUT para retrotranscribir una muestra de 1µg de RNA con previo tratamiento de DNasa.

10.7. Validación de la retrotranscripción de los genes de *H. pylori* 16S rRNA, ureA, jhp0940, jhp0945, jhp097 y jhp0949

Se verificó la síntesis de cDNA de los genes constitutivos así como de los genes problema de todas las muestras y controles mediante PCR punto final. Para los genes 16S rRNA, ureA, jhp0945, jhp0947 y jhp0949 se realizó una incubación inicial de 95°C por 5 min, junto con 40 ciclos con un tiempo de desnaturalización a 95°C por 5 seg, alineamiento a 59 °C por 40 seg y extensión de 72°C por 1 min; para finalizar se incubó a 72°C por 5 min. Para el gen jhp0940 se realizó un ensayo de PCR por gradiente donde la temperatura de alineamiento abarcó de 50-64 °C, las condiciones de desnaturalización y extensión fueron iguales a las de los demás genes (Tabal 2).

Tabla 2. Diseño de primers y sonda TaqMan para ensayo de RT-PCR de los genes 16S rRNA, ureA, jhp0940, jhp0945, jhp0947 y jhp0949.

Gen	Primers Forward	Primers Reverse	Sonda TaqMan	pb
16S rRNA	5' tgcgaagtg gagccaatctt3'	5' ggaacgtattcaccgcaaca3'	5'-6FAM-CCTCCTAgTT CggATTgTAG gCTgCAAC-- BBQ3'	199 [‡]
jhp0940	5' cgtggcaa gcatgatccat3'	5' gggtatgcacggttacgagttt3'	5'-Cyan500-TCAGgAAACA TCg CT TCAATACCCA CTT -- BBQ3'	591 ^{*‡}
jhp0945	5' gaaatgtcct ataccaatgg3'	5' cctaagtagtgcataagg3'	5'-6FAM- TTACCACCCA TCA ATACgA gCTTgTAGA--BBQ3'	179 [‡]
jhp0947	5' agagatgaca ctaaatgcttat3'	5' tgtaaggcgcatttgctg3'	5'-6FAM-AgTTgCATgg CgTATTgAg CgC C-BBQ3'	122 [‡]
jhp0949	5' tggataatcct acgcagaacg3'	5' cctatctaattgtcttgagcg3'a3'	5'-6FAM-TggAATggTgCT AAAAGAg CATgggA-BBQ3'	235 [‡]
ureA	5' ggatgtcctggcatgtctct3'	5' ttcaaaaagtccccgaaatg3'	5'-6FAM-ACgCTATCTTTg gCACACAA ggTggT--BBQ3'	77 ⁺

[‡]Diseño por Empresa Tib Molbiol

^{*}Occhialini y cols. 2000 diseño primers. No. Referencia 6

⁺Ramírez-Lázaro y cols. 2011 No. Referencia 84

10.8. qRT-PCR para los genes de *H. pylori* 16S rRNA, ureA, jhp0940, jhp0945, jhp097 y jhp0949

Para este análisis primero se realizó un ensayo de expresión a partir de una curva de dilución para cada uno de los genes tanto constitutivos como genes problema, para hacer este ensayo se utilizó la cepa control positivo de *H. pylori* J99, donde se generó una regresión lineal con los datos de la Cp de cada punto, se evaluó la Eficiencia (E) de la reacción que debía situarse entre 2-1.9 y se determinó el Error (e) con valores aceptables menores a 0.02. Los puntos evaluados en la recta fueron en base a diluciones a partir de 1 µg/µl de cDNA (1:10, 1:100, 1:1,000 y 1:10,00), donde cada punto fue evaluado por duplicado. Los ensayos para cada uno de los genes se realizaron de forma individual, incluyendo como control positivo la cepa J99 de *H. pylori*, como control negativo la cepa 26695 de *H. pylori* y un blanco.

La qRT-PCR se realizó mediante la técnica de hidrólisis por sondas TaqMan (diseño TibmolBiol), de acuerdo al protocolo estándar del kit LightCycler Taqman Master Versión 08 (ROCHE. Mannheim, Alemania), las corridas se realizaron en un termociclador capilares modelo LightCycler 2.0 (Anexo 4). Todas las muestras de los pacientes se analizaron por triplicado; incluyendo un control interno sin templete (blanco), un control positivo (cepa *H. pylori* J99) y un control negativo (cepa *H. pylori* 26695), utilizando una dilución 1:10. Cada reacción fue realizada en un volumen final de 10 µl con una concentración de cebadores y sondas TaqMan de 1 µM y 0.07 µM respectivamente (Tabla 2). Las condiciones de qRT-PCR para todos los genes fueron: para comenzar se incubó a 95°C por 10 min, 45 ciclos de desnaturalización a 95°C por 10 segundos, alineamiento a 59°C por 45 segundos y extensión de 72°C por 1 segundo; para finalizar con un hold de 72°C por 30 segundos.

Se consideró cada valor de Cp en cada ensayo como positivo si a) eran positivas en el análisis de presencia del gen por PCR, b) si la desviación estándar de cada ensayo por triplicado de qRT-PCR era menor a 0.02. Se evaluaron dos genes constitutivos, el 16S rRNA y ureA para este estudio, donde se buscó principalmente la homogeneidad

de las mediciones en las muestras. Otros factores que influyen son el número de Cp de distancia entre el gen problema y el gen constitutivo, siendo que cada 3 Cp es 1×10^3 pb de diferencia; a partir de los datos obtenidos se determinó que estos dos genes eran candidatos idóneos para este estudio. Por lo que los resultados fueron determinados a partir del gen *16SrRNA*, ya que es uno de los genes constitutivos más recurrentes en la literatura.

Los valores de la Cp de cada uno de los genes problema se normalizó con el gen constitutivo *16S rRNA* de *H. pylori* para determinar su expresión relativa, mediante la fórmula: Expresión relativa del gen= $\Delta\text{Cp Gen problema} - \Delta\text{Cp de } 16S \text{ rRNA}$.

11. Análisis estadístico

Se comparó el nivel de expresión entre el grupo de adultos y niños mediante una prueba t de Student, considerando una diferencia significativa de $p \leq 0.05$. Para el análisis de correlación de la expresión entre los genes se utilizó la prueba de correlación de Pearson, considerando una diferencia significativa de $p \leq 0.05$.

12. Resultados

12.1. Población de estudio

Se estudiaron un total de 17 cepas de *H. pylori* obtenidas de niños y adultos, de las cuales 9 cepas fueron de adultos y 8 de niños. En el grupo de los adultos 3 de ellos presentaban gastritis crónica, 2 úlcera duodenal, 3 cáncer y 1 metaplasia. Los niños presentaban dolor abdominal recurrente y agudo, al momento del estudio.

12.2. Genotipificación por PCR punto final

Se identificó la presencia de los genes constitutivos *16S rRNA* y *ureA* así como los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* tanto en las cepas control J99 y 26695 como en las cepas de niños y adultos del estudio (Anexo 5). La frecuencia de cada uno de estos genes fue la siguiente: *ureA* 100% (17/17), *16S rRNA* 100% (17/17), *jhp0940* 17.64%(3/17), *jhp0945* 58.82%(10/17), *jhp0947* 58.82%(10/17), y *jhp0949* 64.70%(11/17). No se encontró diferencia significativa en la frecuencia de los genes problema entre el grupo de adultos y niños (Tabla 3).

Tabla 3. Frecuencia de los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* en el grupo de niños y adultos.

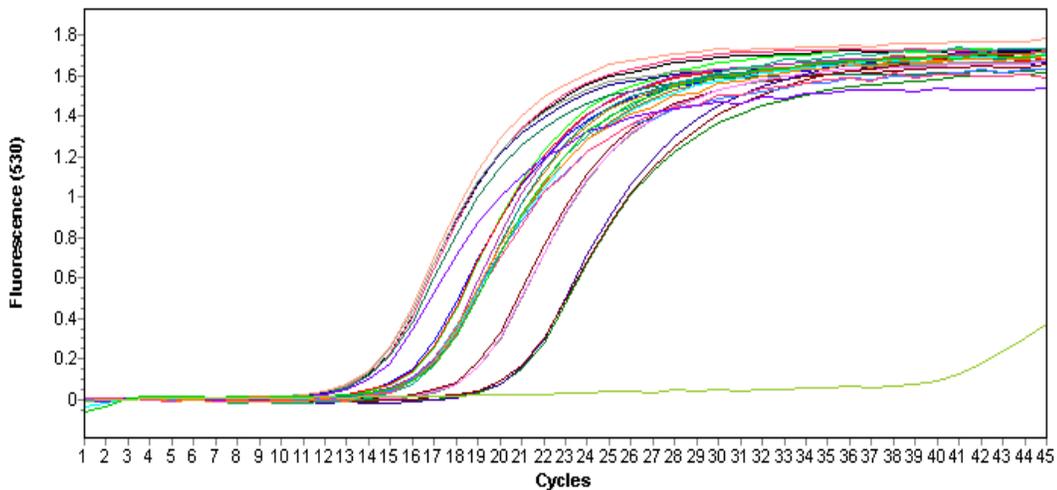
GEN	NIÑOS (N=8) %	ADULTOS (N=9) %	$P^* \leq 0.05$
<i>jhp0940</i>	(3)37.5	(0) 0	0.082
<i>jhp0945</i>	(4)50	(6)66.6	0.3
<i>jhp0947</i>	(4)50	(6)66.6	0.3
<i>jhp0949</i>	(4)50	(7)77.1	0.2

* Prueba estadística T de student.

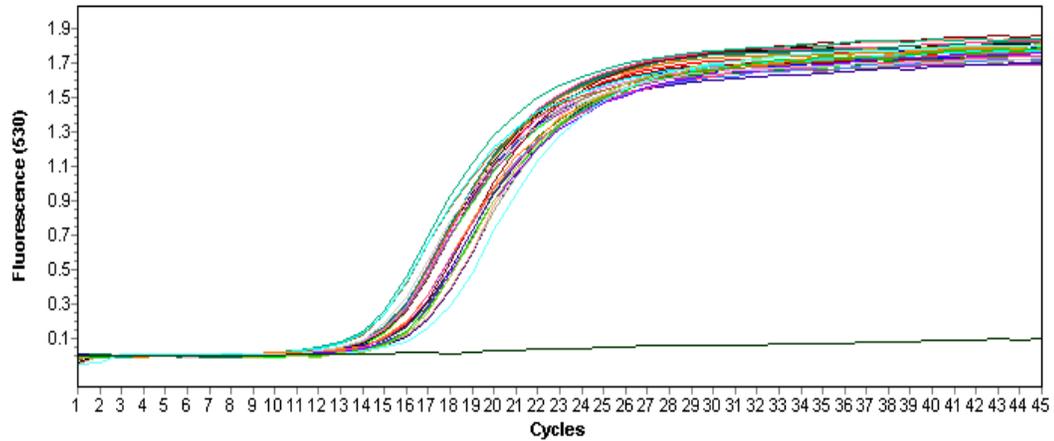
12.3. Expresión de los genes constitutivos *16S rRNA* y *ureA* en aislados de *H. pylori* de niños y adultos

La expresión de los genes constitutivos a partir del RNA (Anexo 6), fueron evaluados en las muestras problema y en los controles. Se utilizaron 200 ng de cDNA para cada ensayo de qRT-PCR, y cada ensayo fue realizado por triplicado. Previó al análisis de las muestras se realizó la curva estándar de concentración a partir de las cepas control positivo y negativo de cada uno de los genes constitutivos y problema, donde se determinó utilizar las diluciones 1:10 (Anexo 7).

No se encontró diferencia significativa en la expresión de *16S rRNA* de adultos respecto a niños ($p < 0.05$). En las cepas de los niños el límite menor de expresión fue de 13.1 Cp mientras que el rango mayor de 19.4 Cp; en el caso de los adultos el límite menor fue de 12.92 Cp y el límite mayor fue de 15.2 Cp (Gráfica 1 y 2). Aunque no se observó diferencia en los niveles de expresión entre los dos grupos, se hizo evidente que los niveles de expresión en el grupo de adultos se expresaban de forma más homogénea en comparación con el grupo de niños, ya que el tratamiento fue el mismo en los dos grupos es probable que este resultado se relacione directamente con las características del grupo.

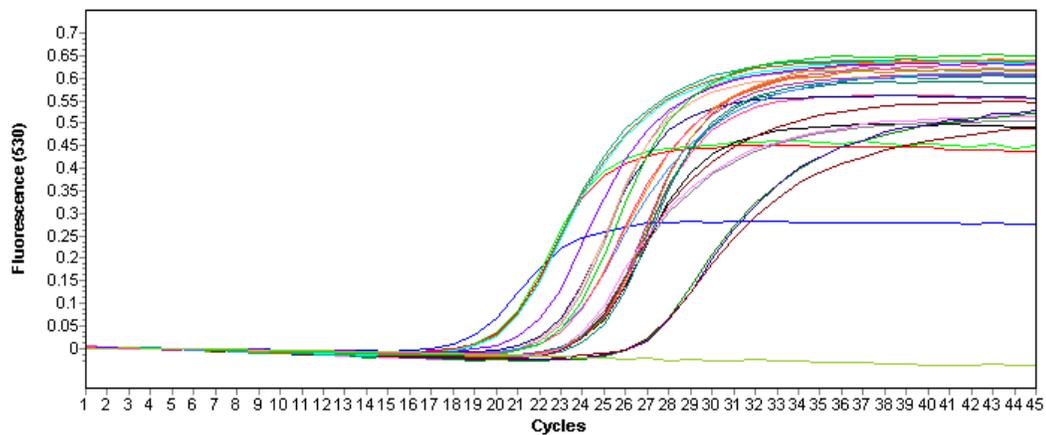


Gráfica 1. Ensayo de qRT-PCR del gen *16S rRNA* de cepas cultivadas de *H. pylori*.

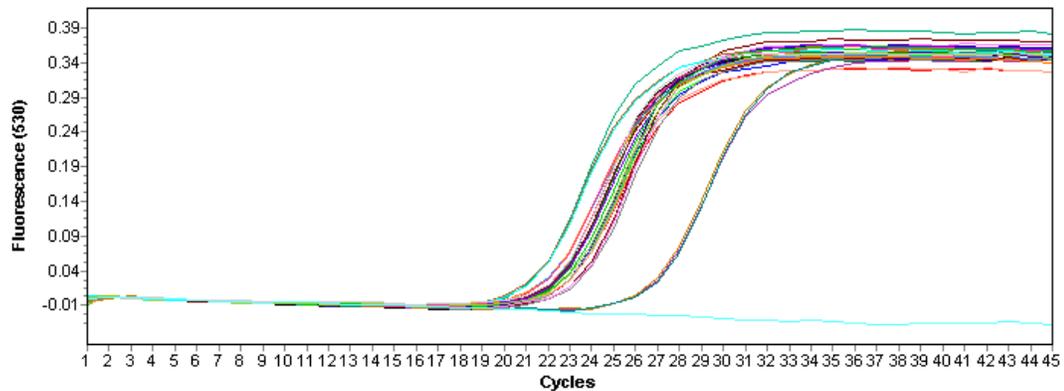


Gráfica 2. Ensayo de qRT-PCR del gen *16S rRNA* de cepas cultivadas de *H. pylori*.

En el caso del gen *ureA* el límite menor en el grupo de niños fue de 18.1 Cp y el límite mayor de 25.51 Cp; en el caso del grupo de adultos el límite menor fue de 19.66 Cp y el límite mayor fue de 25.17 Cp. En este gen tampoco hubo diferencia significativa en los niveles de expresión de los dos grupos ($p= 069$) (Gráfica 3 y 4). En el caso del gen *ureA* al igual que con *16S rRNA* se observó que las muestras en el grupo de adultos se expresaban de forma más homogénea en comparación con las cepas de los niños.



Gráfica 3. Ensayo de qRT-PCR del gen *ureA* de cepas cultivadas de *H. pylori*.



Gráfica 4. Ensayo de qRT-PCR del gen *ureA* de cepas cultivadas de *H. pylori*.

12.4. Expresión de los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* en aislados de *H. pylori* de niños y adultos

En el caso de los genes problema se realizó el ensayo de qRT-PCR en las muestras que fueron positivas al ensayo de PCR a partir de DNA genómico (Anexo 8). Como ya se mencionó antes, la frecuencia de los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* es distinta de acuerdo a la población, la cepa, la población de estudio y la edad de los pacientes. Cada muestra de paciente mantuvo un patrón que podía incluir: solo uno de estos genes, los cuatro genes, ninguno o una combinación de ellos. Por tal motivo 3 muestras de niños y 2 muestras de pacientes fueron excluidas del ensayo de qRT-PCR debido a que no presentaron ninguno de los genes problema.

Al realizar la qRT-PCR para el gen *jhp0940*, en las tres muestras positivas de pacientes niños, no se observó la expresión de este gen, tanto en cepas control positivo como en cepas de pacientes. Estos resultados fueron confirmados por PCR punto final utilizando en cDNA como template.

Los niveles de expresión de los genes *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* fueron evaluados en todas las cepas de pacientes positivas por PCR de DNA genómico, teniendo en cuenta que podían contener uno, dos o los tres genes. La metodología para el

ensayo de qRT-PCR en los genes problema fue la misma que en los genes constitutivos.

Al realizar las curvas de dilución de estos genes en la cepa control positivo J99, se observó que los límites mínimos detectables de concentración en la dilución se encontraban entre 1:100 y 1:1000 a partir de una muestra con 1000 ng de cDNA por lo que se decidió trabar con la dilución 1:10. A demás, se encontró en un rango menor de concentración de entre 6 a 9 Cp en relación a genes los constitutivos.

12.5. Comparación de los niveles de expresión de los genes *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* en aislados de *H. pylori* de niños y adultos

Para este estudio se utilizó la expresión relativa de todos los genes problema a partir de normalizar los datos con el gene *16S rRNA* (Anexo 9). Sin embargo, también se realizó el mismo ejercicio utilizando en gen *ureA*, en el cual no se encontró diferencia significativa (Anexo 10).

La expresión de los genes *jhp0945*, *jhp0947* y *Jhp0949* se observó en todas las cepas donde estos genes estuvieron presentes. Al comparar la expresión de estos genes entre niños y adultos no se encontró diferencia significativa en los genes *jhp0945* ($p=0.36$); *jhp0947* ($p=0.67$); *jhp0949* ($p=0.531$) (Gráfica 5).

Sin embargo, tras realizar una análisis de variancias con la prueba F de Fisher entre las cepas de niños y adultos, considerando un valor significativo de $p<0.05$, se observó que existía una diferencia significativa en la distribución de los datos en cada grupo (*jhp0945* $p=0.014$; *jhp0947* $p=0.02$; *jhp0949* $p=0.002$) este resultado indica que aunque no exista una diferencia en el nivel de expresión entre cepas de niños y adultos, las cepas de niños tuvieron mayor heterogeneidad en la expresión de estos genes en comparación a las cepas de adultos, donde la desviación estándar entre las muestras fue menor. En este caso el número de las muestras es un factor

muy importante a considerar, ya que, es evidente que el rango de expresión de estos genes es totalmente distinto entre niños y adultos. Lo que podría indicar, por un lado que al aumentar el número de muestra en el grupo con mayor heterogeneidad, surjan dos o más subgrupos que estarán asociados por característica específica. Y estos subgrupos, a su vez, pueden estar más o menos relacionados con alguna de las patologías que se desarrollan los pacientes adultos.

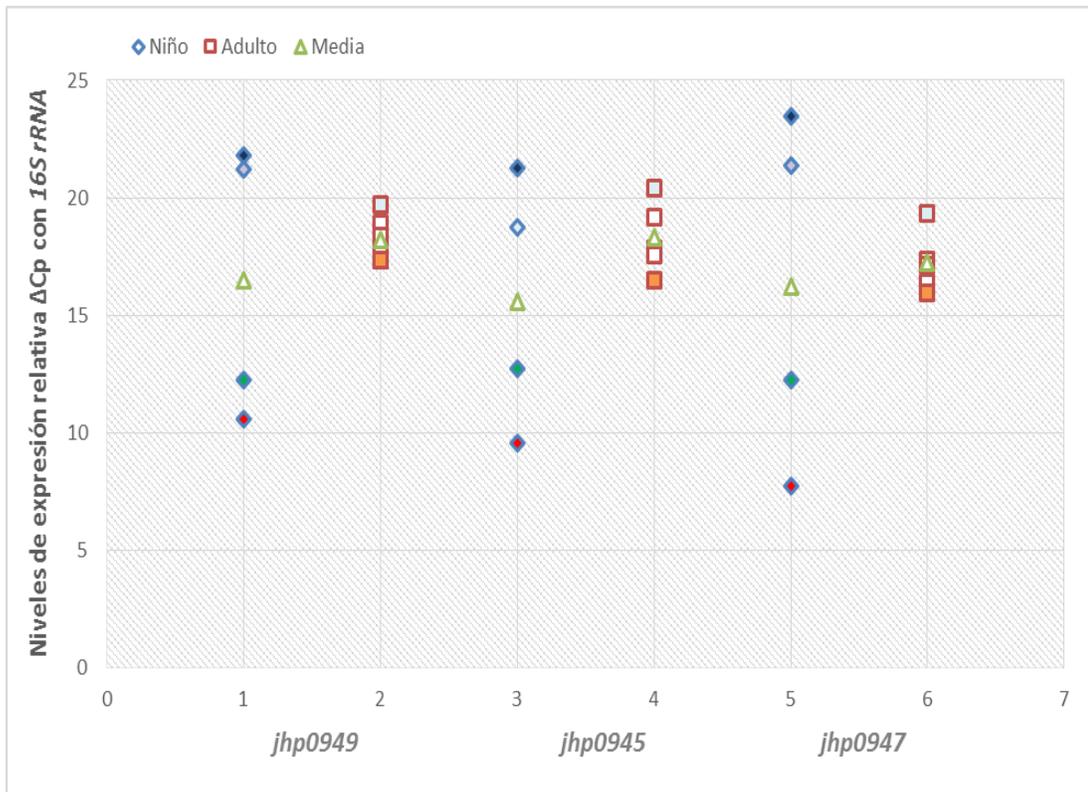


Gráfico 5. Expresión relativa de los genes *jhp0949*, *jhp0945* y *jhp0947* de *H. pylori* normalizados con *16S rRNA*. Rombos= cepas de niños para el gen *jhp0949* (n=4), *jhp0945* (n=4) y *jhp0947* (n=4). Cuadrados= cepas de adultos para el gen *jhp0949* (n=7), *jhp0945* (n=6) y *jhp0947* (n=6). Los triángulos representan la media de cada uno de los grupos. Cada paciente pediátrico está señalado con el mismo color en cada gen y en el caso de los pacientes adultos sólo se señaló el paciente con mayor y menor nivel de expresión en cada gen.

A partir de los datos generados, queríamos saber si los niveles de expresión de nuestros genes se asocian entre sí, lo cual pudiera responder a una posible co-expresión, ya que los datos de frecuencia en diversas poblaciones los asocian fuertemente. Se observó una asociación positiva entre la expresión de *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*, al realizar el análisis de correlación de Pearson (Gráfico 6) (Tabla 5). También se analizó en cada grupo esta correlación, encontrándose una correlación positiva en la expresión de los genes *jhp0945*- *jhp0947* ($p= 0.010$) y *jhp0947*- *jhp0949* ($p= 0.021$) en el grupo de niños. En adultos la correlación fue únicamente entre *jhp0947*- *jhp0949* ($p= 0.002$).

Círculo rojo=Adultos
Círculo azul=Niños

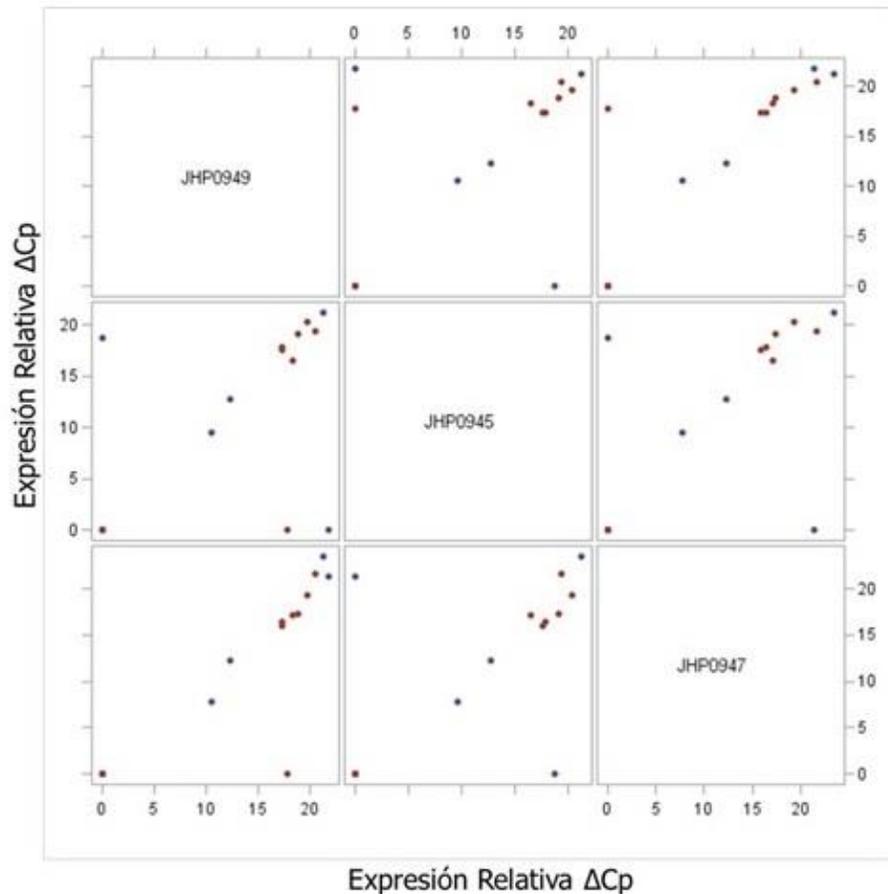


Gráfico 6. Análisis de correlación de la expresión relativa de los genes *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* de cepas aisladas de niños y adultos.

Tabla 4. Correlación entre los genes *jhp0949*, *jhp0945* y *jhp0947* en cepas de *H. pylori*.

Coeficiente de correlación/valor de <i>p</i>			
Gen	<i>jhp0949</i>	<i>jhp0947</i>	<i>jhp0945</i>
<i>jhp0945</i>	0.97/<0.0001	0.94/<0.0001	-
<i>jhp0947</i>	0.96/<0.0001	-	0.94/<0.0001
<i>jhp0949</i>	-	0.96/<0.0001	0.97/<0.0001

*Diferencia significativa está determinada por $p < 0.05$

13. Discusión

La hipervariabilidad genómica de *H. pylori* se ve de manifiesto en sus regiones de plasticidad, la cual ha cobrado importancia en el estudio de esta, ya que dentro de esta región se han propuesto nuevos genes asociados a enfermedad, como *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*.

En nuestro estudio, encontramos únicamente en 3 cepas de niños el gen *jhp0940*, mientras que ninguna de las cepas de nuestra población adulta lo tenía, el encontrarse este gen principalmente en cepas de niños en comparación con adultos ya ha sido reportado¹¹. Particularmente este gen se ha reportado ausente en cepas de *H. pylori* provenientes de adultos con cáncer gástrico en nuestra población⁶³. Sin embargo, la prevalencia de estos genes es diferente en relación al área geográfica, aunque ésta, sólo se conozca en otros países en cepas de adultos. Un estudio en Brasil encontró a *jhp0940* solo en 3 de 200 cepas de adultos⁶⁹, en población del Este de Asia se ha encontrado una prevalencia de 19.8%⁵ y en India 13.3%⁷⁵; sin embargo, en otras poblaciones en adultos se han reportado prevalencias mayores como en China y Argentina que alcanza hasta un 42.55%⁷² y 74.6% respectivamente⁷⁴. Esta diversidad que se reporta en la mayoría de los genes de plasticidad, no solamente implica la ausencia total del gen, también es probable que estos genes se encuentren incompletos o mutados, pues como ya se explicó antes, el mecanismo de variación de fase conduce principalmente esta diversidad.

En un reporte en Costa Rica⁶, cuyo objetivo fue determinar la prevalencia de todos los genes de la región de plasticidad de J99 en cepas de *H. pylori* provenientes de adultos con cáncer gástrico y gastritis crónica, se encontró mediante RT-PCR el transcrito de los cuatro genes que estudiamos en este trabajo. Sin embargo, en nuestro caso no encontramos el RNA de *jhp0940* en las tres cepas que presentaron el gen, ni en la cepa J99, a diferencia de los genes *jhp045*, *jhp0947* y *jhp0949* en donde se encontró tanto el transcrito (RT-PCR) como su expresión por tiempo real (qRT-PCR).

Ya que el gen *jhp0940* es capaz, a partir de su proteína CTKA inducir citocinas pro-inflamatorias como NF- κ B, y su presencia es mayor en niños en comparación con adultos, apuntaba a que la actividad de este gen pudiera ser importante en una fase temprana de la infección, cuando un estado inflamatorio predomina. Esperábamos que encontrar una actividad transcripcional significativa al menos en este grupo, sin embargo, esto no fue así. Consideramos, que una de las razones puede ser debido a que únicamente se encontraron 3 cepas positivas para este gen en niños, lo que nos limita para poder concluir. Otra de las posibles explicaciones también es, que este gen responda al contacto de *H. pylori* con la mucosa gástrica, debida a su característica de cinasa capaz de traslocarse en las células gástricas⁷; lo cual tendría que ser corroborado in situ. Mediante un ensayo de co-cultivo entre la cepa J99 como con las cepas de niños que presentaron el gen y células AGS (línea epitelial gástrica), pudiéramos observar si la expresión de este gen requiere de algún estímulo para poder transcribirse.

Respecto a los genes *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*, aún se desconoce su función y por tanto el mecanismo por el cual estos genes pudieran relacionarse con el desarrollo de enfermedad gástrica, sin embargo, su prevalencia en las cepas de *H. pylori*, se ha asociado a cáncer gástrico o úlceras pépticas en pacientes adultos, a diferencia de lo encontrado en gastritis crónica^{72, 73, 75, 76}. En población Mexicana Romo-González y colaboradores observaron una diferencia significativa en la frecuencia de los genes *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949*, mayor al 50%, en niños, cuando se comparó con dos estudios en población adulta del este de Asia y occidente¹¹. Ellos reportan que el locus *jhp0940-jhp0945-jhp0947-jhp0949* está presente en la mayoría de las cepas de niños, mientras que en adultos la frecuencia de estos genes es más heterogénea, por lo que proponen que esto se debe a, que a lo largo de la infección estos genes pueden ser perdidos por sus características de alta plasticidad. Es importante destacar que, la inflamación crónica causada por el proceso crónico de infección con *H. pylori*, resulta en la pérdida y regulación de estos genes, para así disminuir el daño a tejido gástrico, además de evadir la respuesta inmune adaptativa⁸⁰. Sin

embargo, en este estudio no se encontró una diferencia significativa en la frecuencia de los genes *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* entre el grupo de niños y adultos, por lo que consideramos que esto se debe al número de cepas incluidas en el estudio, lo cual puede ser una limitante.

Los tres genes se expresaron en nuestras cepas, sin embargo, no hubo diferencia significativa en los niveles de expresión de *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* entre las cepas de niños y adultos. Es necesario caracterizar a detalle la población de niños, ya que se observó que la expresión de estos genes fue más heterogénea en sus cepas. Como ya se mencionó, probablemente esto sí pueda estar relacionado con alguna patología al aumentarse el número de muestra.

Por otro lado, encontramos que existe una correlación positiva en la expresión de los tres genes *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* de *H. pylori*. Aunque, se ha observado en otros estudios, una correlación positiva entre su presencia en el genoma de las cepas ^{71, 72, 75, 73 y 11}, no se tenían resultados sobre su expresión. Lo cual es importante, ya que esto apoya la idea de que estos genes pueden estar relacionados entre sí, a manera de un operón. Se sabía que, su orientación en el genoma es la misma y los tres genes parecían transcribirse en las mismas condiciones⁶. A demás, Kersulyte y colaboradores hacen una clasificación de esta zona de plasticidad y han propuesto que estos tres genes forman parte de un transposon denominado TnPZ tipo 1b, el cual tiene la capacidad de integrarse en el genoma de *H. pylori* completamente. Por otro lado, el gen *jhp0940*, es parte del transposon TnPZ tipo 2⁶⁶, el cual parece integrarse en el genoma de forma independiente a los otros tres genes, y quizá por esta razón, quizá su expresión este regulada por otro mecanismo donde se involucren otros genes. Estos resultados apoyan la hipótesis, de que los genes *jhp0945-jhp0947-jhp0949* funcionan como un operón, debido a que existe una fuerte correlación positiva entre sus niveles de expresión, en cepas de *H. pylori* tanto de niños como de adultos.

14. Conclusión

Las cepas de *H. pylori* no expresaron el gen *jhp0940 in vitro*. Los niveles de expresión de los genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* en aislados de *H. pylori* de niños y adultos fueron similares.

Este es el primer estudio que evalúa la expresión de los genes de la región de plasticidad *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949* en cepas de *H. pylori* de niños y adultos. De acuerdo a lo encontrado se sugiere, la importancia de evaluar la expresión de estos genes *in vivo*, en la mucosa gástrica de niños y adultos; pues, aún hacen falta más estudios que ayuden a entender completamente su función y su asociación con desarrollo de una gastroduodenal enfermedad.

15. Literatura Citada

1. al-Moagel MA, Evans DG, Abdulghani ME, Adam E, Evans DJ Jr, Malaty HM, Graham DY. Prevalence of *Helicobacter* (formerly *Campylobacter*) *pylori* infection in Saudi Arabia, and comparison of those with and without upper gastrointestinal symptoms. *Am J Gastroenterol*. 1990 Aug;85(8):944-8. PubMed PMID: 2375321.
2. Malaty HM. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2007;21(2):205-14. Review. PubMed PMID: 17382273.
3. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7–14 June (1994) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans / World Health Organization, vol. 61, pp. 1–241 ISBN 92 832 12614.
4. Torres J, Leal-Herrera Y, Camorlinga-Ponce M, Jimenez-Ramirez C, Gomez A (1996) Sero prevalence to *Helicobacter pylori* infection in México. *Gut*; 39: (Suppl. 2), A83 PMID: PMC1397943
5. Sugimoto M, Watada M, Jung SW, Graham DY, Yamaoka Y (2012) Role of *Helicobacter pylori* plasticity region genes in development of gastroduodenal diseases. *J Clin Microbiol*; 50:441-448.
6. Occhialini A1, Marais A, Alm R, Garcia F, Sierra R, Mégraud F (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: 6240-6249.
7. Kim do J, Park KS, Kim JH, Yang SH, Yoon JY, Han BG, Kim HS, Lee SJ, Jang JY, Kim KH, Kim MJ, Song JS, Kim HJ, Park CM, Lee SK, Lee BI, Suh SW (2010) *Helicobacter pylori* proinflammatory protein up-regulates NF-kappaB as a cell translocating Ser/Thr kinase. *PNAS*; 107: 21418-21423
8. Rizwan M, Alvi A, Ahmed N (2007) Novel protein antigen (JHP940) from the genomic plasticity region of *Helicobacter pylori* induces TNF-alpha and Interleukin- 8 secretion by human macrophages. *J Bacteriol* 2007; 190:1146-1151.
9. Tanaka J, Suzuki T, Mimuro H, Sasakawa (2003) Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol* 2003; 5: 395–404.
10. de Jonge R, Kuipers EJ, Langeveld SC, Loffeld RJ, Stoof J, van Vliet AH, Kusters JG (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* 2004; 41:161–167.
11. Romo-González C, Consuelo-Sánchez A, Camorlinga-Ponce M, Velázquez-Guadarrama N, García-Zúñiga M, Burgueño-Ferreira J, Coria-Jiménez R. Plasticity Region Genes *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947*, and *jhp0949* of *Helicobacter pylori* in Isolates from Mexican Children. *Helicobacter*. 2015 Jun;20(3):231-7. doi: 10.1111/hel.12194. Epub 2015 Mar 3. PubMed PMID: 25735460.
12. O'Rourke J, Bode G. Morphology and Ultrastructure. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC): ASM Press; 2001. Chapter 6.
13. Kato T, Yagi N, Kamada T, Shimbo T, Watanabe H, Ida K; Study Group for Establishing Endoscopic Diagnosis of Chronic Gastritis.. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in gastric mucosa by endoscopic features: a multicenter prospective study. *Dig Endosc*. 2013 Sep;25(5):508-18. doi: 10.1111/den.12031. PubMed PMID: 23369058.
14. Lee JH, Park YS, Choi KS, Kim DH, Choi KD, Song HJ, Lee GH, Jang SJ, Jung HY, Kim JH. Optimal biopsy site for *Helicobacter pylori* detection during endoscopic

mucosectomy in patients with extensive gastric atrophy. *Helicobacter*. 2012 Dec;17(6):405-10. doi: 10.1111/j.1523-5378.2012.00972.x. PubMed PMID: 23066901.

15. Eun Bae S, Hoon Lee J, Soo Park Y, Ok Kim S, Young Choi J, Yong Ahn J, Hoon Kim D, Don Choi K, June Song H, Hyug Lee G, Choe J, Jin Jang S, Jung HY. Decrease of serum total ghrelin in extensive atrophic gastritis: comparison with pepsinogens in histological reference. *Scand J Gastroenterol*. 2016;51(2):137-44. doi: 10.3109/00365521.2015.1083049. PubMed PMID: 26513345.
16. Tongtawee T, Dechsukhum C, Leeanansaksiri W, Kaewpitoon S, Kaewpitoon N, Loyd RA, Matrakool L, Panpimanmas S. Improved Detection of *Helicobacter pylori* Infection and Premalignant Gastric Mucosa Using "Site Specific Biopsy": a Randomized Control Clinical Trial. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(18):8487-90. PubMed PMID: 26745106.
17. Weeks DL, Eskandari S, Scott DR, Sachs G. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science*. 2000 Jan 21;287(5452):482-5. PubMed PMID: 10642549.
18. Park SA, Ko A, Lee NG. Stimulation of growth of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori* by atmospheric level of oxygen under high carbon dioxide tension. *BMC Microbiol*. 2011 May 11;11:96. doi: 10.1186/1471-2180-11-96. PubMed PMID: 21569333; PubMed Central PMCID: PMC3110553.
19. Moore ME, Lam A, Bhatnagar S, Solnick JV. Environmental determinants of transformation efficiency in *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol*. 2014 Jan;196(2):337-44. doi: 10.1128/JB.00633-13. PubMed PMID: 24187089; PubMed Central PMCID: PMC3911246.
20. Park SA, Lee NG. Global regulation of gene expression in the human gastric pathogen *Helicobacter pylori* in response to aerobic oxygen tension under a high carbon dioxide level. *J Microbiol Biotechnol*. 2013 Apr;23(4):451-8. PubMed PMID: 23568198
21. Smith S, Boyle B, Brennan D, Buckley M, Crotty P, Doyle M, Farrell R, Hussey M, Kevans D, Malfertheiner P, Megraud F, Nugent S, O'Connor A, O'Morain C, Weston S, McNamara D. The Irish *Helicobacter pylori* Working Group consensus for the diagnosis and treatment of *H. pylori* infection in adult patients in Ireland. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2017 Jan 10. doi: 10.1097/MEG.0000000000000822. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28079669.
22. Mégraud F, Floch P, Labenz J, Lehours P. Diagnostic of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2016 Sep;21 Suppl 1:8-13. doi: 10.1111/hel.12333. PubMed PMID: 27531532.
23. Uotani T, Graham DY. Diagnosis of *Helicobacter pylori* using the rapid urease test. *Ann Transl Med* 2015;3(1):9. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.12.04
24. Zhang Y, Zhao F, Kong M, Wang S, Nan L, Hu B, Olszewski MA, Miao Y, Ji D, Jiang W, Fang Y, Zhang J, Chen F, Xiang P, Wu Y, Zhao H. Validation of a High-Throughput Multiplex Genetic Detection System for *Helicobacter pylori* Identification, Quantification, Virulence, and Resistance Analysis. *Front Microbiol*. 2016 Sep 7;7:1401. doi: 10.3389/fmicb.2016.01401. PubMed PMID: 27656172; PubMed Central PMCID: PMC5013035.
25. M. Ferwana, I. Abdulmajeed, A. Alhajahmed et al., "Accuracy of urea breath test in *Helicobacter pylori* infection: metaanalysis," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 21, no. 4, pp. 1305–1314, 2015.

26. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, Malfertheiner P, Graham DY, Wong VWS, Wu JCY, Chan FKL, Sung JY, Kaplan GG, Ng SC. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology*. 2017 Apr 26. pii: S0016-5085(17)35531-2. doi: 10.1053/j.gastro.2017.04.022.
27. Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2014 Sep;19 Suppl 1:1-5. doi: 10.1111/hel.12165. Review. PubMed PMID: 25167938
28. Aziz RK, Khalifa MM, Sharaf RR. Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: A review. *J Adv Res*. 2015 Jul;6(4):539-47. doi: 10.1016/j.jare.2013.07.007. Epub 2013 Jul 21. Review. PubMed PMID: 26199743; PubMed Central PMCID: PMC4506966.
29. Kivrak Salim D, Sahin M, Köksoy S, Adanir H, Süleymanlar I. Local Immune Response in *Helicobacter pylori* Infection. *Medicine (Baltimore)*. 2016 May;95(20):e3713. doi: 10.1097/MD.0000000000003713. PubMed PMID: 27196487; PubMed Central PMCID: PMC4902429.
30. Ko SH, Rho da J, Jeon JI, Kim YJ, Woo HA, Kim N, Kim JM. Crude Preparations of *Helicobacter pylori* Outer Membrane Vesicles Induce Upregulation of Heme Oxygenase-1 via Activating Akt-Nrf2 and mTOR-IkB Kinase-NF-κB Pathways in Dendritic Cells. *Infect Immun*. 2016 Jul 21;84(8):2162-74. doi: 10.1128/IAI.00190-16. Print 2016 Aug. PubMed PMID: 27185786; PubMed Central PMCID: PMC4962631.
31. Pero R, Coretti L, Nigro E, Lembo F, Laneri S, Lombardo B, Daniele A, Scudiero O. β-Defensins in the Fight against *Helicobacter pylori*. *Molecules*. 2017 Mar 7;22(3). pii: E424. doi: 10.3390/molecules22030424. Review. PubMed PMID: 28272373
32. Bergman M, Del Prete G, van Kooyk Y, Appelmelk B. *Helicobacter pylori* phase variation, immune modulation and gastric autoimmunity. *Nat Rev Microbiol*. 2006 Feb;4(2):151-9. Review. PubMed PMID: 16415930.
33. Barrozo RM, Hansen LM, Lam AM, Skoog EC, Martin ME, Cai LP, Lin Y, Latoscha A, Suerbaum S, Canfield DR, Solnick JV. CagY Is an Immune-Sensitive Regulator of the *Helicobacter pylori* Type IV Secretion System. *Gastroenterology*. 2016 Dec;151(6):1164-1175.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2016.08.014. Epub 2016 Aug 26. PubMed PMID: 27569724; PubMed Central PMCID: PMC5124400
34. Hu Y, Liu JP, Zhu Y, Lu NH. The Importance of Toll-like Receptors in NF-κB Signaling Pathway Activation by *Helicobacter pylori* Infection and the Regulators of this Response. *Helicobacter*. 2016 Oct;21(5):428-40. doi: 10.1111/hel.12292. Epub 2016 Jan 13. Review. PubMed PMID: 26763943.
35. Käbisch R, Semper RP, Wüstner S, Gerhard M, Mejías-Luque R. *Helicobacter pylori* γ-Glutamyltranspeptidase Induces Tolerogenic Human Dendritic Cells by Activation of Glutamate Receptors. *J Immunol*. 2016 May 15;196(10):4246-52. doi: 10.4049/jimmunol.1501062. Epub 2016 Apr 18. PubMed PMID: 27183641.
36. Sun X, Zhang M, El-Zaatari M, Huffnagle GB, Kao JY. CCR2 mediates *Helicobacter pylori*-induced immune tolerance and contributes to mucosal homeostasis. *Helicobacter*. 2017 Apr;22(2). doi: 10.1111/hel.12366. Epub 2016 Dec 8. PubMed PMID: 27933701; PubMed Central PMCID: PMC5352485.
37. Rugge M, Genta RM, Di Mario F, El-Omar EM, El-Serag HB, Fassan M, Hunt RH, Kuipers EJ, Malfertheiner P, Sugano K, Graham DY. Gastric Cancer as Preventable Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2017 May 19. pii: S1542-3565(17)30602-X. doi: 10.1016/j.cgh.2017.05.023. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28532700.

38. IARC *Helicobacter pylori* Working Group (2014). *Helicobacter pylori* Eradication as a Strategy for Preventing Gastric Cancer. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC Working Group Reports, No. 8).
39. De Falco M, Lucariello A, Iaquinto S, Esposito V, Guerra G, De Luca A. Molecular Mechanisms of *Helicobacter pylori* Pathogenesis. *J Cell Physiol.* 2015 Aug;230(8):1702-7. doi: 10.1002/jcp.24933. Review. PubMed PMID: 25639461.
40. Sarker SA, Mahalanabis D, Hildebrand P, Rahaman MM, Bardhan PK, Fuchs G, Beglinger C, Gyr K. *Helicobacter pylori*: prevalence, transmission, and serum pepsinogen II concentrations in children of a poor periurban community in Bangladesh. *Clin Infect Dis* 1997; 25:990-5; PMID:9402343; <http://dx.doi.org/10.1086/516070>
41. Rowland M, Daly L, Vaughan M, Higgins A, Bourke B, Drumm B. Age-specific incidence of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2006; 130:65-72, quiz 211; PMID:16401469; <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2005.11.004>
42. Castro-Muñoz LJ, González-Díaz CA, Muñoz-Escobar A, Tovar-Ayona BJ, Aguilar-Anguiano LM, Vargas-Olmos R, Sánchez-Monroy V. Prevalence of *Helicobacter pylori* from the oral cavity of Mexican asymptomatic children under 5 years of age through PCR. *Arch Oral Biol.* 2017 Jan;73:55-59. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.09.007. Epub 2016 Sep 19. PubMed PMID: 27665274.
43. Mendoza E, Camorlinga-Ponce M, Perez-Perez G, Mera R, Vilchis J, Moran S, Rivera O, Coria R, Torres J, Correa P, Duque X. Present and past *Helicobacter pylori* infection in Mexican school children. *Helicobacter.* 2014 Feb;19(1):55-64. doi: 10.1111/hel.12098. Epub 2013 Oct 25. PubMed PMID: 24165012.
44. Duque X, Vilchis J, Mera R, Trejo-Valdivia B, Goodman KJ, Mendoza ME, Navarro F, Roque V, Moran S, Torres J, Correa P. Natural history of *Helicobacter pylori* infection in Mexican schoolchildren: incidence and spontaneous clearance. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012 Aug;55(2):209-16. doi: 10.1097/MPG.0b013e318248877f. PubMed PMID: 22227999; PubMed Central PMCID: PMC3697926.
45. Romo-González C, Mendoza E, Mera RM, Coria-Jiménez R, Chico-Aldama P, Gomez-Diaz R, Duque X. *Helicobacter pylori* infection and serum leptin, obestatin, and ghrelin levels in Mexican schoolchildren. *Pediatr Res.* 2017 Jun 14. doi: 10.1038/pr.2017.69. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28422951.
46. Razavi A, Bagheri N, Azadegan-Dehkordi F, Shirzad M, Rahimian G, Rafieian-Kopaei M, Shirzad H. Comparative Immune Response in Children and Adults with *H. pylori* Infection. *J Immunol Res.* 2015;2015:315957. doi: 10.1155/2015/315957. Epub 2015 Oct 1. Review. PubMed PMID: 26495322; PubMed Central PMCID: PMC4606101.
47. Kao CY, Sheu BS, Wu JJ. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomed J.* 2016 Feb;39(1):14-23. doi: 10.1016/j.bj.2015.06.002. Epub 2016 Apr 1. Review. PubMed PMID: 27105595.
48. Sheu BS, Odenbreit S, Hung KH, Liu CP, Sheu SM, Yang HB, Wu JJ. Interaction between host gastric Sialyl-Lewis X and *H. pylori* SabA enhances *H. pylori* density in patients lacking gastric Lewis B antigen. *Am J Gastroenterol.* 2006 Jan;101(1):36-44. PubMed PMID: 16405531.
49. Sgouras DN, Trang TT, Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter.* 2015 Sep;20 Suppl 1:8-16. doi: 10.1111/hel.12251. Review. PubMed PMID: 26372819; PubMed Central PMCID: PMC4572604.

50. Cao Q, Didelot X, Wu Z, Li Z, He L, Li Y, Ni M, You Y, Lin X, Li Z, Gong Y, Zheng M, Zhang M, Liu J, Wang W, Bo X, Falush D, Wang S, Zhang J. Progressive genomic convergence of two *Helicobacter pylori* strains during mixed infection of a patient with chronic gastritis. *Gut*. 2015 Apr;64(4):554-61. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307345. Epub 2014 Jul 9. PubMed PMID: 25007814; PubMed Central PMCID: PMC4392222.
51. Fu Y, Zepeda-Gurrola RC, Aguilar-Gutiérrez GR, Lara-Ramírez EE, De Luna-Santillana EJ, Rodríguez-Luna IC, Sánchez-Varela A, Carreño-López R, Moreno-Medina VR, Rodríguez-Pérez MA, López-Vidal Y, Guo X. The detection of inherent homologous recombination between repeat sequences in *H. pylori* 26695 by the PCR-based method. *Curr Microbiol*. 2014 Feb;68(2):211-9. doi: 10.1007/s00284-013-0466-7. Epub 2013 Oct 6. PubMed PMID: 24097137
52. Lin EA, Zhang XS, Levine SM, Gill SR, Falush D, Blaser MJ. Natural transformation of *helicobacter pylori* involves the integration of short DNA fragments interrupted by gaps of variable size. *PLoS Pathog*. 2009 Mar;5(3):e1000337. doi: 10.1371/journal.ppat.1000337. Epub 2009 Mar 13. PubMed PMID: 19282979; PubMed Central PMCID: PMC2650093.
53. Kim YS, Kim N, Kim JM, Kim MS, Park JH, Lee MK, Lee DH, Kim JS, Jung HC, Song IS. *Helicobacter pylori* genotyping findings from multiple cultured isolates and mucosal biopsy specimens: strain diversities of *Helicobacter pylori* isolates in individual hosts. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2009 May;21(5):522-8. PubMed PMID: 19373969.
54. Daubin V, Ochman H. 2004. Bacterial genomes as new gene homes: the genealogy of ORFans in *E. coli*. *Genome Res*. 14:1036–1042.
55. Lehours P, Vale FF, Bjursell MK, Melefors O, Advani R, Glavas S, Guegueniat J, Gontier E, Lacomme S, Alves Matos A, Menard A, Mégraud F, Engstrand L, Andersson AF. Genome sequencing reveals a phage in *Helicobacter pylori*. *MBio*. 2011 Nov 15;2(6). pii: e00239-11. doi: 10.1128/mBio.00239-11. Print 2011. PubMed PMID: 22086490; PubMed Central PMCID: PMC3221604.
56. Furuta Y, Konno M, Osaki T, Yonezawa H, Ishige T, Imai M, Shiwa Y, Shibata-Hatta M, Kanesaki Y, Yoshikawa H, Kamiya S, Kobayashi I. Microevolution of Virulence-Related Genes in *Helicobacter pylori* Familial Infection. *PLoS One*. 2015 May 15;10(5):e0127197. doi: 10.1371/journal.pone.0127197. eCollection 2015. PubMed PMID: 25978460; PubMed Central PMCID: PMC4433339.
57. Tomb, J. F. et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388, 539–547 (1997).
58. Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, Smith DR, Noonan B, Guild BC, deJonge BL, Carmel G, Tummino PJ, Caruso A, Uria-Nickelsen M, Mills DM, Ives C, Gibson R, Merberg D, Mills SD, Jiang Q, Taylor DE, Vovis GF, Trust TJ. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 1999 Jan 14;397(6715):176-80. Erratum in: *Nature* 1999 Feb 25;397(6721):719. PubMed PMID: 9923682.
59. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*.

1997 Aug 7;388(6642):539-47. Erratum in: Nature 1997 Sep 25;389(6649):412. PubMed PMID: 9252185.

60. Wattam AR, Abraham D, Dalay O, Disz TL, Driscoll T, Gabbard JL, Gillespie JJ, Gough R, Hix D, Kenyon R, Machi D, Mao C, Nordberg EK, Olson R, Overbeek R, Pusch GD, Shukla M, Schulman J, Stevens RL, Sullivan DE, Vonstein V, Warren A, Will R, Wilson MJ, Yoo HS, Zhang C, Zhang Y, Sobral BW. PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:D581–D591.
61. Salaün L, Linz B, Suerbaum S, Saunders NJ. The diversity within an expanded and redefined repertoire of phase-variable genes in *Helicobacter pylori*. *Microbiology.* 2004 Apr;150(Pt 4):817-30. PubMed PMID: 15073292.
62. Janssen PJ, Audit B, Ouzounis CA. Strain-specific genes of *Helicobacter pylori*: distribution, function and dynamics. *Nucleic Acids Res.* 2001 Nov 1;29(21):4395-404. PubMed PMID: 11691927; PubMed Central PMCID: PMC60179.
63. Romo-González C, Salama NR, Burgeño-Ferreira J, Ponce-Castañeda V, Lazcano-Ponce E, Camorlinga-Ponce M, Torres J. Differences in genome content among *Helicobacter pylori* isolates from patients with gastritis, duodenal ulcer, or gastric cancer reveal novel disease-associated genes. *Infect Immun.* 2009 May;77(5):2201-11. doi: 10.1128/IAI.01284-08. Epub 2009 Feb 23. PubMed PMID: 19237517; PubMed Central PMCID: PMC2681767.
64. Dorer MS, Sessler TH, Salama NR. Recombination and DNA repair in *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Microbiol.* 2011;65:329-48. doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102931. Review. PubMed PMID: 21682641; PubMed Central PMCID: PMC3743418.
65. Kersulyte D, Velapatiño B, Mukhopadhyay AK, Cahuayme L, Bussalleu A, Combe J, Gilman RH, Berg DE. Cluster of type IV secretion genes in *Helicobacter pylori*'s plasticity zone. *J Bacteriol.* 2003 Jul;185(13):3764-72. PubMed PMID: 12813069; PubMed Central PMCID: PMC161572.
66. Kersulyte D, Lee W, Subramaniam D, Anant S, Herrera P, Cabrera L, Balqui J, Barabas O, Kalia A, Gilman RH, Berg DE. *Helicobacter Pylori*'s plasticity zones are novel transposable elements. *PLoS One.* 2009 Sep 3;4(9):e6859. doi: 10.1371/journal.pone.0006859. PubMed PMID: 19727398; PubMed Central PMCID: PMC2731543.
67. van Vliet AH, Kusters JG. Use of Alignment-Free Phylogenetics for Rapid Genome Sequence-Based Typing of *Helicobacter pylori* Virulence Markers and Antibiotic Susceptibility. *J Clin Microbiol.* 2015 Sep;53(9):2877-88. doi: 10.1128/JCM.01357-15. Epub 2015 Jul 1. PubMed PMID: 26135867; PubMed Central PMCID: PMC4540916.
68. Yamaoka Y. Roles of the plasticity regions of *Helicobacter pylori* in gastroduodenal pathogenesis. *J Med Microbiol.* 2008 May;57(Pt 5):545-53. doi: 10.1099/jmm.0.2008/000570-0. Review. PubMed PMID: 18436586; PubMed Central PMCID: PMC2833349.
69. Santos A, Queiroz DM, Ménard A, Marais A, Rocha GA, Oliveira CA, Nogueira AM, Uzeda M, Mégraud F. New pathogenicity marker found in the plasticity region of the *Helicobacter pylori* genome. *J Clin Microbiol.* 2003 Apr;41(4):1651-5. PubMed PMID: 12682156; PubMed Central PMCID: PMC153914.
70. Salih BA, Abasiyanik MF, Ahmed N. A preliminary study on the genetic profile of *cag* pathogenicity-island and other virulent gene loci of *Helicobacter pylori* strains from Turkey. *Infect Genet Evol.* 2007 Jul;7(4):509-12. Epub 2007 Mar 24. PubMed PMID: 17434345

71. Yakoob J, Abbas Z, Naz S, Islam M, Abid S, Jafri W. Associations between the Plasticity Region Genes of *Helicobacter pylori* and Gastroduodenal Diseases in a High-Prevalence Area. *Gut Liver*. 2010 Sep;4(3):345-50. doi: 10.5009/gnl.2010.4.3.345. Epub 2010 Sep 24. PubMed PMID: 20981211; PubMed Central PMCID: PMC2956346.
72. Gong Y, Peng X, He L, Liang H, You Y, Zhang J. The distribution of *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947*, *jhp0949* and *jhp0951* genes of *Helicobacter pylori* in China. *BMC Gastroenterol*. 2015 Sep 10;15:115. doi: 10.1186/s12876-015-0341-z. PubMed PMID: 26357838; PubMed Central PMCID: PMC4566367.
73. Siavoshi F, Asgharzadeh A, Ghadiri H, Massarrat S, Latifi-Navid S, Zamani M. *Helicobacter pylori* genotypes and types of gastritis in first-degree relatives of gastric cancer patients. *Int J Med Microbiol*. 2011 Aug;301(6):506-12. doi: 10.1016/j.ijmm.2011.03.002. Epub 2011 Jun 8. PubMed PMID: 21641279.
74. Armitano RI, Matteo MJ, Goldman C, Wonaga A, Viola LA, De Palma GZ, Catalano M. *Helicobacter pylori* heterogeneity in patients with gastritis and peptic ulcer disease. *Infect Genet Evol*. 2013 Jun;16:377-85. doi: 10.1016/j.meegid.2013.02.024. Epub 2013 Mar 21. PubMed PMID: 23523597.
75. Ganguly M, Sarkar S, Ghosh P, Sarkar A, Alam J, Karmakar BC, De R, Saha DR, Mukhopadhyay AK. *Helicobacter pylori* plasticity region genes are associated with the gastroduodenal diseases manifestation in India. *Gut Pathog*. 2016 Mar 22;8:10. doi: 10.1186/s13099-016-0093-5. eCollection 2016. PubMed PMID: 27006705; PubMed Central PMCID: PMC4802902.
76. Gholizade Tobnagh Sh, Bakhti SZ, Latifi Navid S, Zahri S, Sadat Bakhti F. Role of Plasticity Region Genes and *cagE* gene of *cagPAI* of *Helicobacter pylori* in Development of Gastrointestinal (GI) Diseases. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017 Jan 1;18(1):43-49. PubMed PMID: 28240008.
77. Tenguria S, Ansari SA, Khan N, Ranjan A, Devi S, Tegtmeier N, Lind J, Backert S, Ahmed N. *Helicobacter pylori* cell translocating kinase (CtkA/JHP0940) is pro-apoptotic in mouse macrophages and acts as auto-phosphorylating tyrosine kinase. *Int J Med Microbiol*. 2014 Nov;304(8):1066-76. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.07.017. Epub 2014 Aug 6. PubMed PMID: 25172221.
78. Ramírez-Lázaro MJ, Lario S, Casalots A, Sanfeliu E, Boix L, García-Iglesias P, Sánchez-Delgado J, Montserrat A, Bella-Cueto MR, Gallach M, Sanfeliu I, Segura F, Calvet X. Real-time PCR improves *Helicobacter pylori* detection in patients with peptic ulcer bleeding. *PLoS One*. 2011;6(5):e20009. doi: 10.1371/journal.pone.0020009. Epub 2011 May 20. PubMed PMID: 21625499; PubMed Central PMCID: PMC3098855.
79. Yamazaki S, Kato S, Matsukura N et al. (2005) Identification of *Helicobacter pylori* and the *cagA* genotype in gastric biopsies using highly sensitive real-time PCR as a new diagnostic tool. *FEMS Immunol Med Mic* 44: 261–268.
80. Oh JD, Kling-Bäckhed H, Giannakis M, Xu J, Fulton RS, Fulton LA, Cordum HS, Wang C, Elliott G, Edwards J, Mardis ER, Engstrand LG, Gordon JI. The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: evolution during disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jun 27;103(26):9999-10004. Epub 2006 Jun 20. PubMed PMID: 16788065; PubMed Central PMCID: PMC1480403.

Anexo 1. Medios de cultivo utilizados. A continuación se mencionan, las cantidades que se utilizaron de reactivos para la preparación de los medios de cultivo y medios de preservación para *H. pylori*.

Medio para preservar cepas de *H. pylori* a -70 °C.

Caldo Brussella	Agua destilada 100 ml Agar caldo Brusella (2.8g) Glicerol 16% (16ml)
-----------------	--

Medio para cultivo en placa de *H. pylori* Agar Base Sangre.

Agar Base Sangre	Agua destilada 100 ml Agar Base Sangre (4 g) Sangre de carnero 5% v/v (5 ml) Antibiótico TV (trimetoprim y vancomicina) 0.2%v/v (ml)0.2
------------------	--

Anexo 2. Concentración de los reactivos de las reacciones de PCR de los genes *16S rRNA*, *ureA*, *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947*, *jhp0949a* y *jhp0949b*. Este cuadro se colocan las cantidades utilizadas para cada una de las reacciones de PCR.

	Buffer (μ l)	MgCl ₂ (μ l)	dNTPs (μ l)	Primer F/R (μ l)	Taq polimerasa (μ l)	H ₂ O (μ l)	ADN/cDNA (μ l)
<i>16SrRNA</i>	2.5	1.5	0.25	0.2/0.2	0.2	25	1 (80ng/ μ l)
<i>ureA</i>	2.5	1.5	0.5	1/1	0.25	25	1 (50ng/ μ l)
<i>jhp0940</i>	2.5	1.5	0.25	0.2/0.2	0.2	25	1 (80ng/ μ l)

<i>jhp0945</i>	2.5	1.5	0.25	0.2/0.2	0.2	25	1 (80ng/μl)
<i>jhp0947</i>	2.5	1.5	0.5	1/1	0.25	25	1 (50ng/μl)
<i>jhp0949a</i>	2.5	1.5	0.25	0.2/0.2	0.2	25	1 (80ng/μl)
<i>jhp0949b</i>	2.5	1.5	0.25	0.2/0.2	0.2	25	1 (80ng/μl)

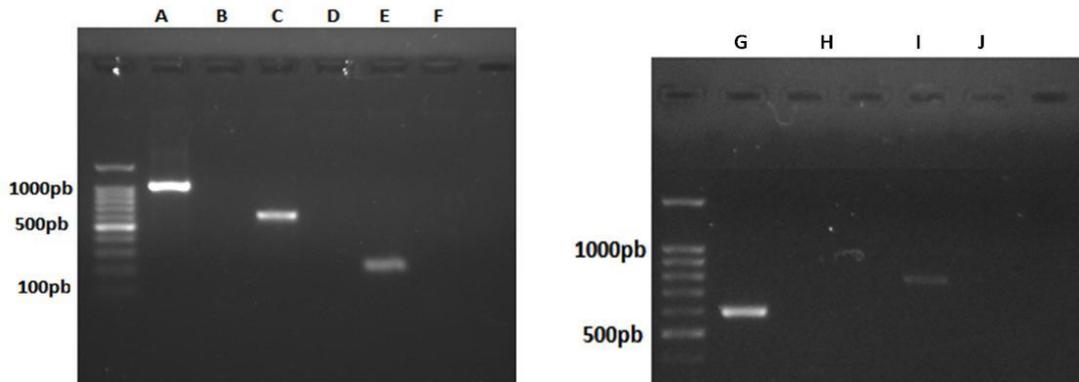
Anexo 3. Diseño experimental de la reacción de Retrotranscripción para el RNA de las cepas control y problema. Las indicaciones aquí referidas se obtuvieron de acuerdo a las indicaciones del proveedor.

Ciclos	Reactivos por ciclo (μl)
1. 65°C-5min	1 dNTPs 10mM 1 Hexameros 50ng/μl 8ARN120ng/5μl - H ₂ O
2. Hielo-1min	
3. 25°C-2min	2 Buffer 10x 4 MgCl ₂ 25mM 2 M DTT 0.1 1 RNase OUT 40U/μl
4. 25°C-10min 42°C-50min 70°C-15min	1 Super Script IIRT50U/μl
	Volumen final 20 μl

Anexo 4. Diseño experimental para la reacción de qRT-PCR para el método LightCycler Taqman Master Version 08 (ROCHE) que se realizó en un termociclador LightCycler 1.5 (ROCHE), de los genes *16S rRNA*, *ureA*, *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949b*. Las indicaciones aquí referidas se obtuvieron de acuerdo a las indicaciones del proveedor.

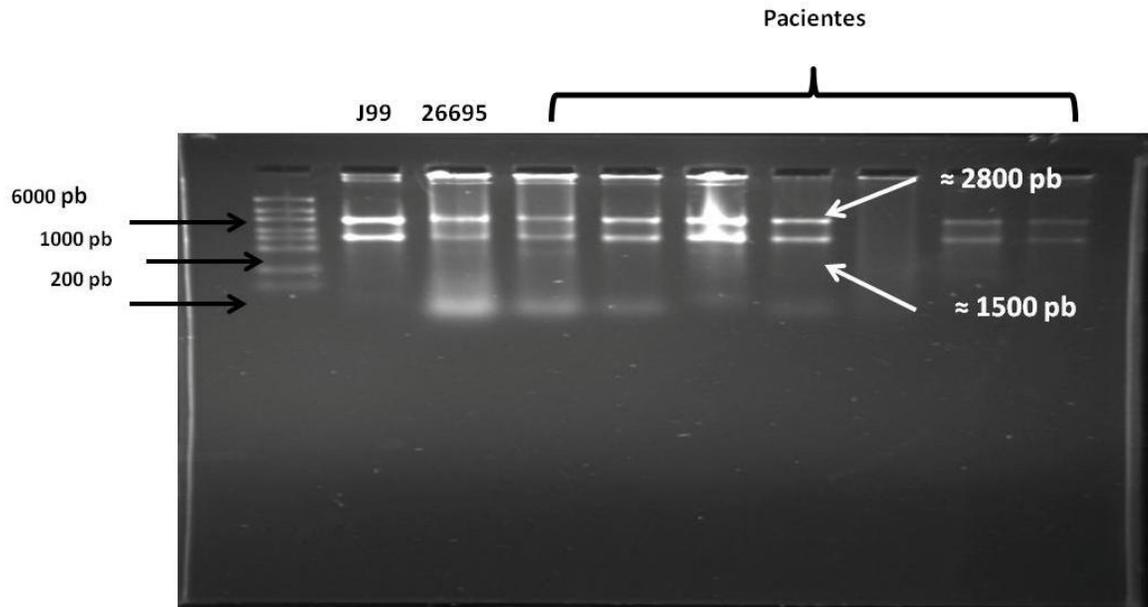
Ciclos	PCR Mix
95°C-10min	H ₂ O grado PCR → 4µl Primer/Sonda → 2µl • Primer F 5mM/Primer R 5mM → 1µl • Sonda 2mM → 1 µl Master Mix → 2 µl cADN → 2 µl
1 ciclo	
95°C-10seg	
52°C-45seg	
72°C-1min	
45 ciclos	
40°C-30seg	
1 ciclo	

Anexo 5. Ejemplo de PCR de DNA de las cepas control positivo J99 y control negativo 26695 de *H. pylori*. La prevalencia de los genes problema se evaluaron para todas las muestras de pacientes pediátricos y adultos.

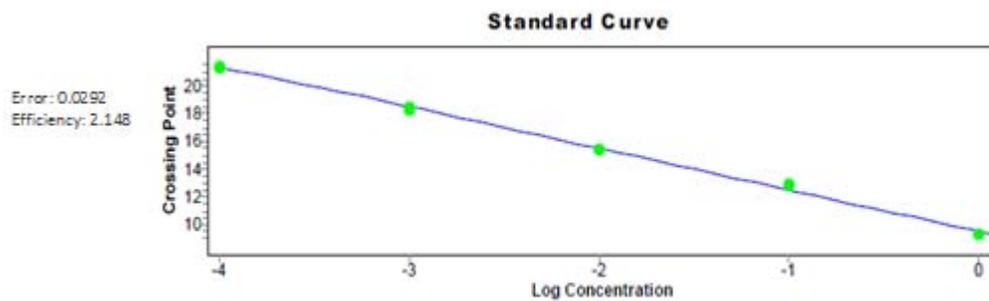


PCR de DNA de las cepas J99 (control positivo A, C, E, G e I) y 26695 (control negativo B, D, F, H y J) de *H. pylori* de los genes problema *jhp0940*, *jhp0945*, *jhp0947* y *jhp0949b*. Control positivo *jhp0945*: A); *jhp0947*: C); *jhp0949b*: E); *jhp0940*: G); *jhp0949a*: I). Control negativo *jhp0945*: B); *jhp0947*: D); *jhp0949b*: F); *jhp0940*: H); *jhp0949a*: J).

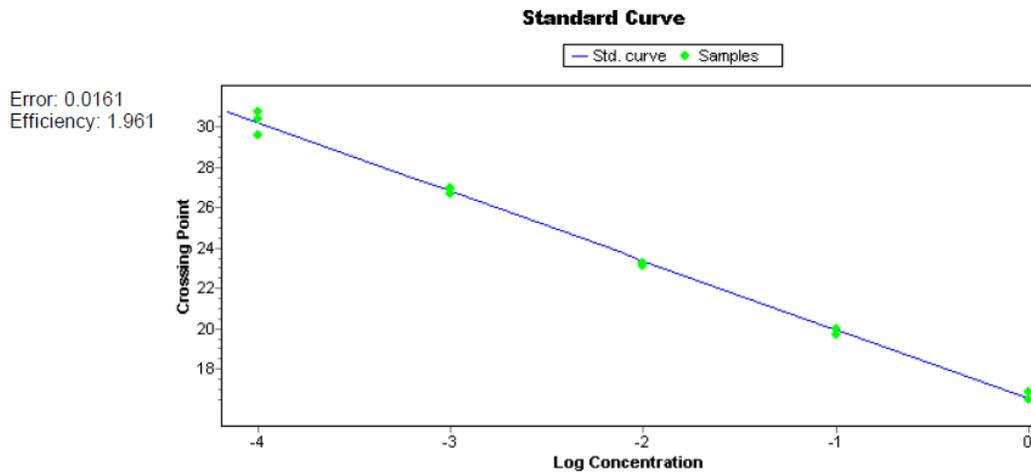
Anexo 6. Ejemplo de electroforesis de RNA de pacientes. Para cada una de las muestras tanto de pacientes y de las cepas control (J99 y 26695) de *H. pylori*, se purificó el RNA a partir del reactivo de Trizol. El tamaño de las bandas de *16S rRNA* y *23S rRNA* de *H. pylori* es de 1500 y 2800 pb respectivamente.



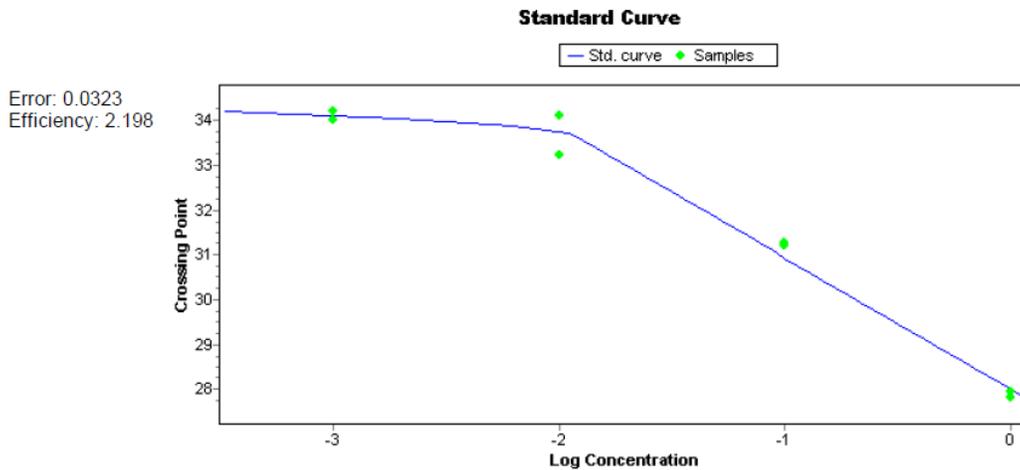
Anexo 7. Curvas estándar de los genes constitutivos y problemas. Aquí se muestra la regresión lineal de cada una de las curvas estándar que se realizaron para cada gen evaluado.



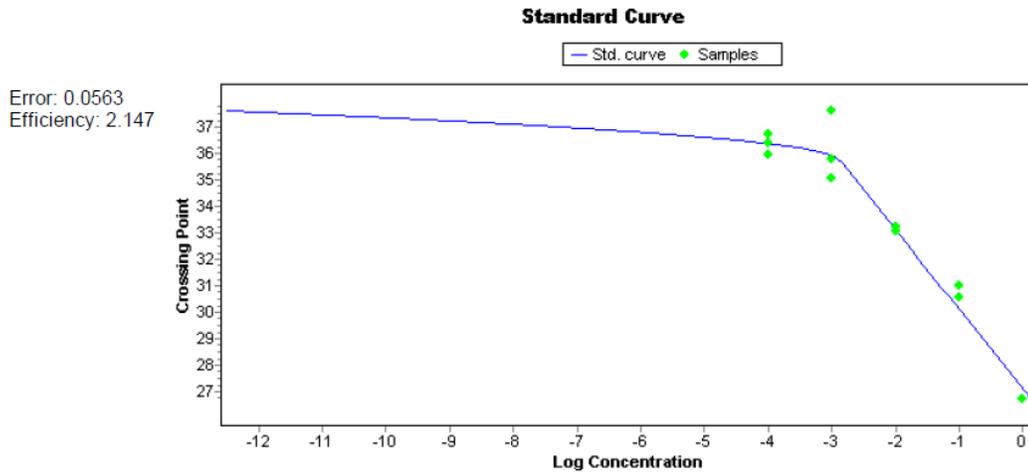
Curva estándar del gen *16S rRNA* (cDNA) en la cepa J99 (control positivo), utilizando sondas TaqMan marcada con 6-FAM.



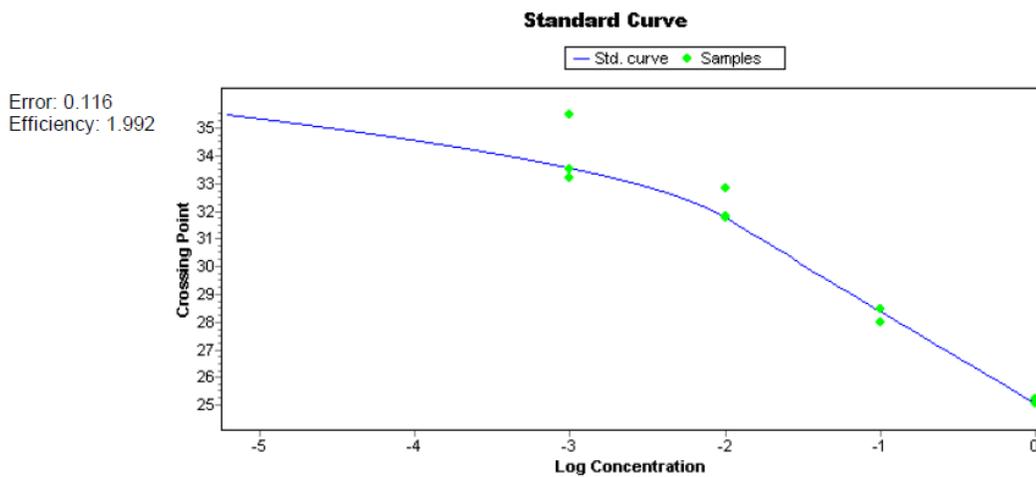
Curva estándar de cuantificación absoluta de cDNA del gen *ureA*, utilizando sondas TaqMan marcadas con Cyan-500. A partir de cultivo en agar sangre de la cepa J99 de *H. pylori*.



Curva estándar de cuantificación absoluta de cDNA del gen *jhp0945*, utilizando sondas TaqMan marcadas con 6-FAM. A partir de cultivo en agar sangre de la cepa J99 de *H. pylori*.

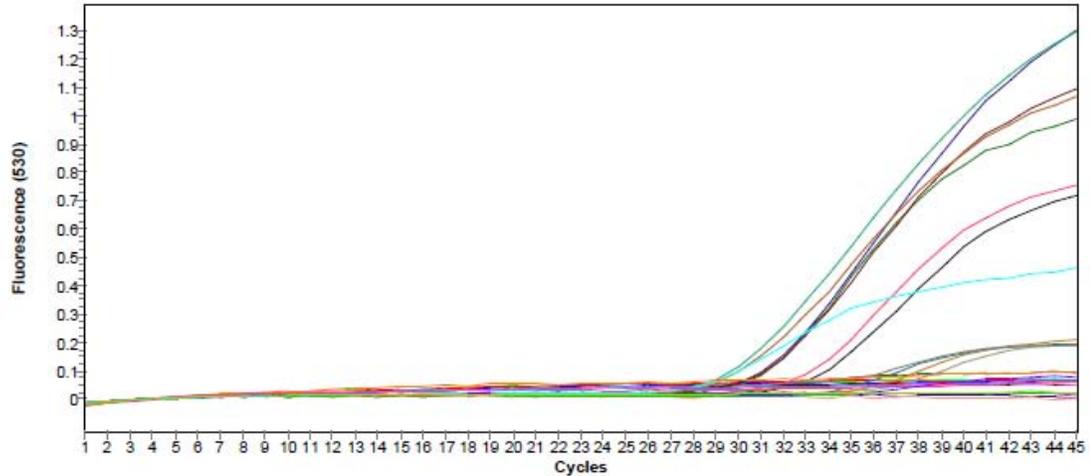


Curva estándar de cuantificación absoluta de cDNA del gen *jhp0947*, utilizando sondas TaqMan marcadas con 6-FAM. A partir de cultivo en agar sangre de la cepa J99 de *H. pylori*.

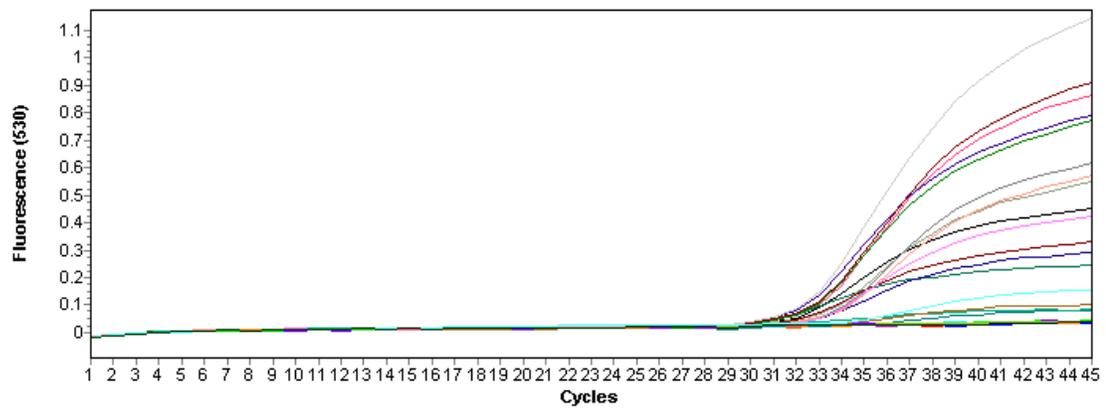


Curva estándar de cuantificación absoluta de cDNA del gen *jhp0949*, utilizando sondas TaqMan marcadas con 6-FAM. A partir de cultivo en agar sangre de la cepa J99 de *H. pylori*.

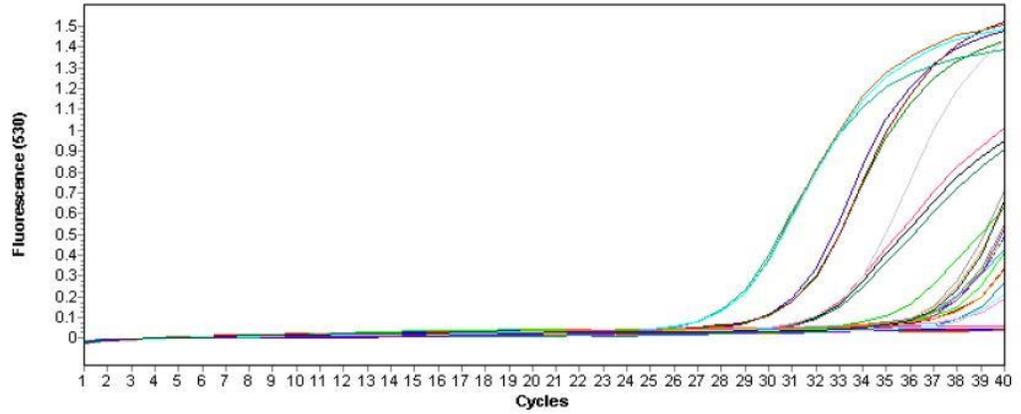
Anexo 8. Ensayos de qRT-PCR en las muestras de pacientes. Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado para obtener la Cp de cada gen para cada paciente.



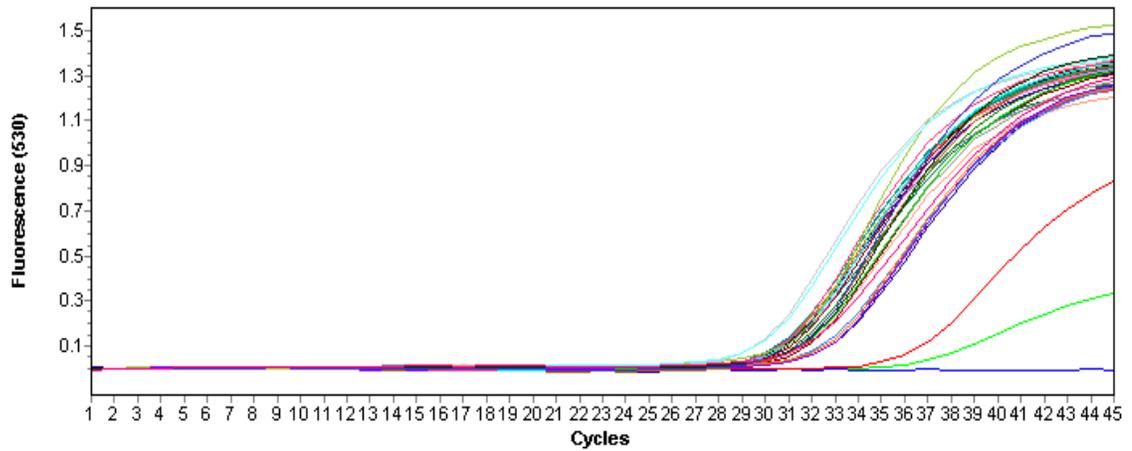
Ensayo de qRT-PCR del gen *jhp0945* de cepas cultivadas de *H. pylori* provenientes de niños, cepa control positivo J99 y control negativo 26695.



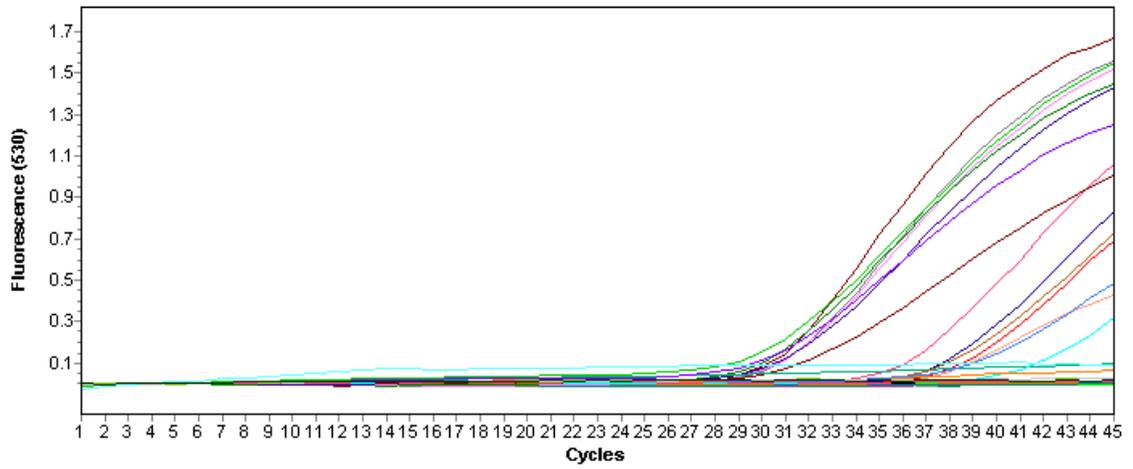
Ensayo de qRT-PCR del gen *jhp0945* de cepas cultivadas de *H. pylori* provenientes de adultos, cepa control positivo J99 y control negativo 26695.



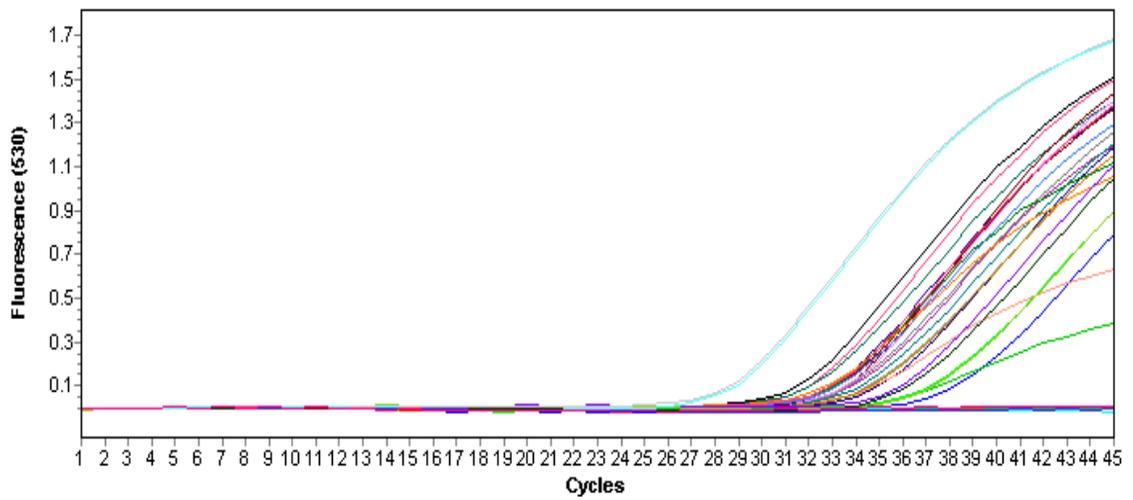
Ensayo de qRT-PCR del gen *jhp0947* de cepas cultivadas de *H. pylori* provenientes de niños, cepa control positivo J99 y control negativo 26695.



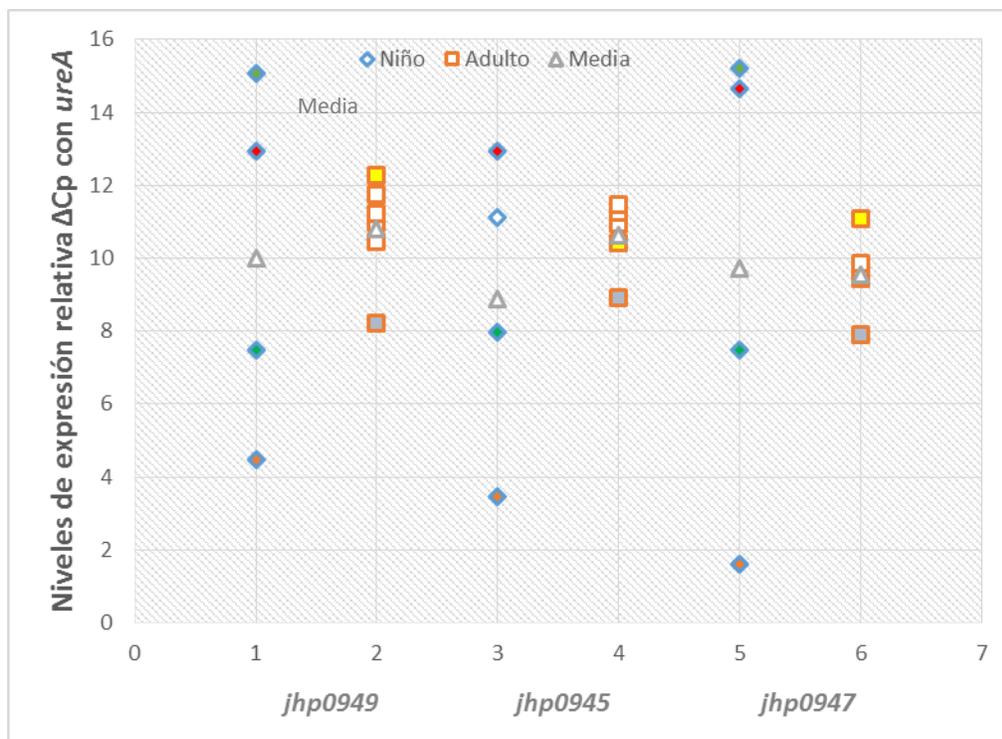
Ensayo de qRT-PCR del gen *jhp0947* de cepas cultivadas de *H. pylori* provenientes de adultos, cepa control positivo J99 y control negativo 26695.



Ensayo de qRT-PCR del gen *jhp0949* de cepas cultivadas de *H. pylori* provenientes de niños, cepa control positivo J99 y control negativo 26695.



Ensayo de qRT-PCR del gen *jhp0949* de cepas cultivadas de *H. pylori* provenientes de adultos, cepa control positivo J99 y control negativo 26695.



Al comparar la expresión de los genes entre niños y adultos no se encontró diferencia significativa en los genes *jhp0949* ($p=0.63$); *jhp0945* ($p=0.38$); *jhp0947* ($p=0.79$). Rombos= cepas de niños para el gen *jhp0949* ($n=4$), *jhp0945* ($n=4$) y *jhp0947* ($n=4$). Cuadrados= cepas de adultos para el gen *jhp0949* ($n=7$), *jhp0945* ($n=6$) y *jhp0947* ($n=6$). Los triángulos representan la media de cada uno de los grupos. Cada paciente pediátrico está señalado con el mismo color en cada gen y en el caso de los pacientes adultos sólo se señaló el paciente con mayor y menor nivel de expresión en cada gen.