



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Carrera de Química Farmacéutico Biológica

Hospital Infantil de México Federico Gómez  
Unidad de Investigación de Enfermedades Infecciosas  
Área de Genética Bacteriana

**Frecuencia y abundancia relativa de *Cutibacterium acnes* y *Helicobacter pylori* en pacientes con enfermedades gástricas**

**T E S I S**

Que para obtener el título de  
**Química Farmacéutica Bióloga**

**P R E S E N T A**

Arguello Bustos Anayeli Maribel

**JURADO DE EXAMEN**

**DIRECTOR:** M. en C. Uriel Gomez Ramirez

**ASESORA:** Dra. Martha Legorreta Herrera

**ASESORA:** Dra. Adriana Hernández Reyes

**SINODAL:** Dra. Raquel Retana Ugalde

**SINODAL:** M. en C. Omar Fernández Rivera

Ciudad de México, 2024





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.

# Agradecimientos

*A mis papás:*

*Catalina Bustos Ramírez y Justino Gregorio Arguello Leon, muchas gracias por su apoyo incondicional en todo este camino, por su amor infinito y sacrificio. Nada de esto sería posible sin ustedes. Por siempre serán mi fuente de inspiración.*

*A los amigos que la universidad me dio la dicha de conocer:*

*Blanca Rosales, por ser mi cómplice en cada paso del camino. Un verdadero honor poder trabajar y compartir sueños contigo.*

*Cristian Cedillo, por ser mi eterno compañero de equipo en toda la carrera y darme momentos dignos de recordar.*

*Wendy Hernández, por ser mi amiga incondicional desde el primer día de clases, agradezco mucho poder compartir tantos momentos preciosos, pero también estresantes en toda la carrera.*

*Gracias por enseñarme tanto acerca de la amistad.*

*A mi pareja*

*Juan Carlos Argüelles Álvarez, has sido una parte fundamental en mi trayectoria académica desde que te conocí. Gracias por todo tu amor, paciencia, ánimo, apoyo y por siempre impulsarme a seguir mis sueños.*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme los conocimientos y recursos a lo largo de mis estudios de licenciatura.*

*Al Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, por brindarme la oportunidad trabajar en sus instalaciones, proporcionándome todos los recursos para la realización de este trabajo.*

*A la Dra. Norma Velázquez Guadarrama*

*Por la valiosa oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio, por siempre creer en mi desde el primer momento y brindarme toda su orientación y experiencia.*

*Al M. en C. Uriel Gomez Ramirez*

*Gracias por ser mi guía en este proyecto. Te agradezco infinitamente toda la paciencia, confianza y disposición que has tenido desde el primer momento. Todos tus consejos tanto en el ámbito académico como en el personal son muy valiosos para mí. Que afortunados son tus próximos alumnos, tan afortunados como ahora yo lo soy.*

*Al equipo de investigación del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas*

*Q.B.P Beatriz López, gracias por enseñarme tanto acerca de la PCR en tiempo real con la manera tan bonita que tienes de explicar y por brindarme tu valiosa amistad.*

*M. en C. Carolina Nolasco, por ayudarme tanto con la biología molecular y a avanzar con mi proyecto, siempre alentándome con tu increíble personalidad.*

*Dra. Sandra Mendoza, gracias por su valiosa ayuda con todo lo relacionado a Helicobacter pylori, compartiendo siempre su conocimiento de una manera preciosa.*

*Biólogo Juan Carlos Viguera, por toda su comprensión y apoyo durante mi estancia en el laboratorio.*

*A los miembros del jurado:*

*Dra. Martha Legorreta Herrera, Dra. Adriana Hernández Reyes, Dra. Raquel Retana Ugalde y M. en C. Omar Fernández Rivera, por todo el tiempo que le han dedicado a la revisión de este trabajo y por sus comentarios para siempre mejorar. Gracias a todos por sus contribuciones.*

# Índice

|  |    |
|--|----|
| Índice de figuras.....   | 5  |
| Índice de tablas.....  | 6  |
| Abreviaturas .....   | 8  |
| 1. Introducción.....   | 9  |
| 2. Marco teórico.....  | 10 |
| 2.1 <i>Helicobacter pylori</i> .....                             | 10 |
| 2.1.1 Diagnóstico de <i>Helicobacter pylori</i> .....            | 11 |
| 2.1.2 Clasificación de enfermedades gástricas .....              | 11 |
| 2.2 <i>Cutibacterium acnes</i> .....                             | 13 |
| 2.3 Técnicas de biología molecular .....                         | 14 |
| 2.3.1 PCR cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR) ..... | 15 |
| 2.3.1.1 Gen 16S rRNA .....                                       | 17 |
| 3. Planteamiento del problema.....                               | 18 |
| 4. Hipótesis.....  | 19 |
| 5. Objetivos.....  | 19 |
| 6. Material y métodos.....                                       | 20 |
| 6.1 Diseño .....   | 20 |
| 6.2 Universo .....   | 20 |
| 6.3 Materiales .....   | 22 |
| 6.4 Métodos .....  | 24 |
| 7. Resultados.....   | 30 |
| 8. Discusión.....  | 46 |
| 9. Conclusiones.....   | 52 |
| 10. Perspectivas.....  | 54 |
| 11. Referencias.....   | 55 |
| 12. Anexos.....  | 61 |

# Índice de figuras

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 1.</b> Sitios recomendados para tomar una biopsia gástrica.   | <b>13</b> |
| <b>Figura 2.</b> Figura de amplificación obtenida en RT-qPCR.   | <b>16</b> |
| <b>Figura 3.</b> Componentes del ribosoma bacteriano  | <b>18</b> |
| <b>Figura 4.</b> Presencia y viabilidad de <i>Cutibacterium acnes</i> en biopsias gástricas parafinadas de pacientes con enfermedades gástricas.                  | <b>31</b> |
| <b>Figura 5.</b> Presencia y viabilidad de <i>Helicobacter pylori</i> en biopsias gástricas parafinadas de pacientes con enfermedades gástricas.                  | <b>31</b> |
| <b>Figura 6.</b> Frecuencia de <i>Cutibacterium acnes</i> y <i>Helicobacter pylori</i> en biopsias gástricas parafinadas de pacientes con enfermedades gástricas. | <b>32</b> |
| <b>Figura 7.</b> Curvas de amplificación obtenidas con cDNA de <i>C. acnes</i> .  | <b>33</b> |
| <b>Figura 8.</b> Curvas de amplificación obtenidas con cDNA de <i>H. pylori</i> .   | <b>33</b> |
| <b>Figura 9.</b> Curva estándar de cDNA de <i>Cutibacterium acnes</i> generada por RT - qPCR a partir de diluciones con factor de dilución 1:2.                   | <b>34</b> |
| <b>Figura 10.</b> Curva estándar de cDNA de <i>Helicobacter pylori</i> generada por RT-qPCR a partir de diluciones seriadas 1:10.                                 | <b>35</b> |
| <b>Figura 11.</b> Abundancia relativa de <i>C. acnes</i> y <i>H. pylori</i> en pacientes con enfermedades gástricas.  | <b>39</b> |
| <b>Figura 12.</b> Abundancias relativas de <i>C. acnes</i> y <i>H. pylori</i> ordenadas por enfermedad.   | <b>42</b> |

# Índice de tablas

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabla 1.</b> Características de la evaluación histopatológica en biopsias según la clasificación de Sydney.  | <b>12</b> |
| <b>Tabla 2.</b> Diagnóstico clínico de pacientes con enfermedad gástrica inicialmente diagnosticados con infección por <i>Helicobacter pylori</i> .   | <b>20</b> |
| <b>Tabla 3.</b> Material para desparafinación de tejidos.   | <b>22</b> |
| <b>Tabla 4.</b> Material para extracción de ácidos nucleicos.   | <b>22</b> |
| <b>Tabla 5.</b> Material para síntesis de cDNA.   | <b>23</b> |
| <b>Tabla 6.</b> Material para PCR punto final.  | <b>23</b> |
| <b>Tabla 7.</b> Material para RT-qPCR.  | <b>23</b> |
| <b>Tabla 8.</b> Cebadores para <i>Cutibacterium acnes</i> y <i>Helicobacter pylori</i> .  | <b>24</b> |
| <b>Tabla 9.</b> Reacción para el tratamiento de RNA con DNAsa I.  | <b>27</b> |
| <b>Tabla 10.</b> Componentes de la mezcla de reacción para la síntesis de cDNA.   | <b>27</b> |
| <b>Tabla 11.</b> Componentes de la mezcla de reacción para PCR para <i>Cutibacterium acnes</i> y <i>Helicobacter pylori</i> .   | <b>28</b> |
| <b>Tabla 12.</b> Perfil térmico para PCR punto final para identificación de <i>Cutibacterium acnes</i> y <i>Helicobacter pylori</i> en biopsias gástricas parafinadas de pacientes con enfermedades gástricas | <b>28</b> |
| <b>Tabla 13.</b> Componentes de la mezcla de reacción RT-qPCR para <i>Cutibacterium acnes</i> .   | <b>29</b> |
| <b>Tabla 14.</b> Componentes de la mezcla de reacción RT-qPCR para <i>Helicobacter pylori</i> .   | <b>29</b> |
| <b>Tabla 15.</b> Perfil térmico para RT-qPCR.   | <b>30</b> |
| <b>Tabla 16.</b> Número de copias de cDNA por microorganismo en pacientes con enfermedad gástrica.  | <b>36</b> |
| <b>Tabla 17.</b> Significancia para la prueba de Shapiro-Wilk.  | <b>42</b> |
| <b>Tabla 18.</b> Significancia del número de copias de <i>C. acnes</i> y <i>H. pylori</i> por la prueba de Mann Whitney (U).  | <b>43</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabla 19.</b> Significancia para la prueba de U de Mann Whitney del número de copias de <i>C. acnes</i> y <i>H. pylori</i> en el grupo de pacientes diagnosticados con gastropatía. | <b>44</b> |
| <b>Tabla 20.</b> Significancia para la prueba de Kruskall-Wallis del número de copias de <i>C. acnes</i> en enfermedades gástricas.  | <b>45</b> |
| <b>Tabla 21.</b> Valores de curva estándar para <i>Cutibacterium acnes</i> .   | <b>61</b> |
| <b>Tabla 22.</b> Valores de curva estándar para <i>Helicobacter pylori</i> .   | <b>62</b> |
| <b>Tabla 23.</b> Detalles en la obtención de número de copias de <i>Cutibacterium acnes</i> y <i>Helicobacter pylori</i> .   | <b>63</b> |



# Abreviaturas

**PCR**.....Reacción en Cadena de la Polimerasa

**DNA**.....Ácido desoxirribonucleico

**RT-qPCR**.....Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa con Retrotranscripción Inversa

**qPCR**.....Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa

**RNA**.....Ácido Ribonucleico

**MALT**.....Linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa gástrica

**UBT**.....Prueba de aliento con Urea

**RUT**.....Prueba Rápida de la Ureasa

**ROS**.....Especies Reactivas de Oxígeno

**dNTPs**.....Desoxinucleótidos trifosfatados

**cDNA**.....Ácido Desoxirribocleico de cadena Complementaria

**Ct**.....Ciclo Threshold

**rRNA**.....Ácido Ribonucleico Ribosomal

**DEPC**.....Dietilpolicarbonato

**EDTA**.....Ácido Etilendiaminotetraacético

**DMSO**.....Dimetilsulfóxido

**Pb**.....Pares de Bases

**SPSS**..... Statistical Package for the Social Sciences

**IBP**.....Inhibidores de la Bomba de Protones

**VBNC**.....Células Viables No Cultivables

**N-NA**.....N-Nitrosaminas

**IL-15**.....Interleucina 15

**SPEM**.....Polipéptido espasmódico

**Muc6**.....Mucina 6

**rpm**.....Revoluciones Por Minuto

**min**.....Minutos

**S**.....Segundos

# 1. Introducción

---

El microbioma humano está compuesto por comunidades de bacterias, virus y hongos que cumplen distintas funciones en un órgano específico. La homeostasis del sitio anatómico es importante, ya que, de encontrarse en condiciones de disbiosis (estado de desequilibrio entre microorganismos y células del hospedero), induce alteraciones órgano-específicas beneficiando el establecimiento y colonización por patobiontes (definido como un microorganismo endógeno que bajo un estado de disbiosis es capaz de provocar enfermedad). Es importante distinguir a aquellos microorganismos que pueden actuar como patobiontes, y determinar su presencia o ausencia en condiciones disbióticas mediante técnicas de biología molecular (1).

Las técnicas de biología molecular se utilizan ampliamente para diagnosticar enfermedades infecciosas. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica en la que se puede detectar un gen de interés a partir de la amplificación de un fragmento específico de ácido desoxirribonucleico (DNA). La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-qPCR), se emplea para la determinación de la cantidad de ARN mensajero. Con esta técnica se puede evidenciar la viabilidad celular y abundancia relativa de algún microorganismo en condiciones órgano-específicas, como *Helicobacter pylori* en estómago bajo condiciones de disbiosis (2).

*H. pylori* es una bacteria que ocasiona diferentes enfermedades gástricas. Sin embargo, existen reportes de infecciones gástricas en ausencia de esta bacteria, entre las cuales se ha encontrado a *Cutibacterium acnes* (3).

*C. acnes* es una bacteria de gran importancia en el microbioma de la piel, presenta múltiples beneficios en este órgano. Sin embargo, se considera patógeno oportunista, debido a su capacidad de causar acné y otras enfermedades infecciosas. También se ha aislado en el estómago de sujetos sanos y pacientes con enfermedad gástrica, lo que genera interrogantes acerca de su presencia en

este órgano. Sin embargo, se desconoce la relación entre la presencia de *C. acnes* y enfermedades gástricas (4).

## 2. Marco teórico

---

En el sistema digestivo existen comunidades microbianas que conforman la microbiota gastrointestinal. La riqueza y diversidad microbiana en el ambiente gástrico es específica gracias a la secreción de jugos gástricos con pH ácido que proporciona un ambiente selectivo y limita el establecimiento de patobiontes (5).

A pesar de que estas comunidades presentan funciones específicas para el mantenimiento de la homeostasis del hospedero, existen múltiples factores que alteran su estructura, por ejemplo: la dieta, la medicación, la hospitalización o las enfermedades infecciosas crónicas, los cuales generan eventos disbióticos (5).

Los eventos de disbiosis inducen múltiples mecanismos para el fácil establecimiento y colonización de bacterias adaptadas en microambientes selectivos como el estómago, por ejemplo, *H. pylori* (5).

### 2.1 *Helicobacter pylori*

*H. pylori* es un bacilo Gram negativo, microaerófilo, con forma de espiral y flagelado, cuyo reservorio principal es el estómago humano. Esta bacteria presenta características particulares que le permiten sobrevivir al pH ácido que prevalece en el microambiente gástrico (6). Estas características incluyen: 1) los flagelos que le permiten penetrar la mucosa gástrica; 2) la producción de ureasa, enzima que cataliza la hidrólisis de urea en dióxido de carbono y de amoníaco para basificación del pH gástrico; y 3) las moléculas de adhesión y receptores de superficie que participan en la adhesión a la mucosa gástrica y la señalización proinflamatoria (7).

La infección por esta bacteria induce una respuesta inflamatoria en la mucosa gástrica, por lo que la presencia de *H. pylori* implica el inicio y desarrollo de gastritis crónica, úlcera péptica y adenocarcinoma gástrico distal, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa gástrica (MALT), entre otras (8).

### **2.1.1 Diagnóstico de *Helicobacter pylori***

Existen diversas pruebas diagnósticas para la detección de *H. pylori*. Estas pruebas incluyen métodos invasivos y no invasivos. Los métodos no invasivos incluyen a la prueba de aliento con urea (UBT), la cual se basa en el mecanismo de degradación de la urea marcada con  $^{13}\text{C}$  o  $^{14}\text{C}$  en  $\text{CO}_2$ . Los métodos invasivos abarcan la prueba rápida de la ureasa (RUT), la evaluación histopatológica para determinar el daño relacionado con la colonización e infección de *H. pylori*, que incluyen el empleo de tinciones, como la tinción de Giemsa y técnicas moleculares, que por su alta sensibilidad y especificidad permiten la identificación de agentes patógenos al emplear genes constitutivos especie-específicos como el gen 16S rRNA, a partir de muestras clínicas con ciertas limitaciones, como los tejidos incluidos en bloques de parafina(7).

Las biopsias gástricas, generalmente se incluyen en medios de soporte como la parafina para su diagnóstico clínico mediante análisis histopatológico, son una herramienta de diagnóstico importante para la evaluación histológica de enfermedades infecciosas en el tracto gastrointestinal que también se pueden utilizar para el diagnóstico molecular (9).

### **2.1.2 Clasificación de enfermedades gástricas**

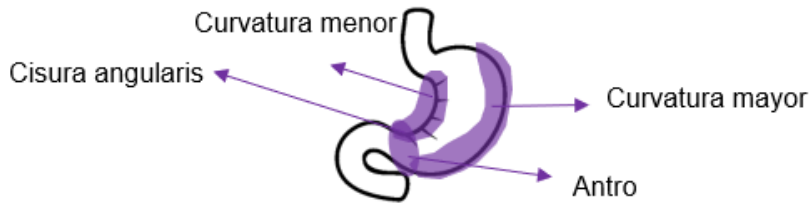
A pesar de las diversas clasificaciones de las gastritis y las gastropatías para diagnóstico clínico, la clasificación de Sydney es la más empleada para la generación de diagnósticos con información estandarizada que permite la uniformidad en los reportes, ya que, es un sistema que describe hallazgos histopatológicos en muestras de biopsias gástricas posiblemente asociados a la presencia de *H. pylori* (10).

Los parámetros del sistema de clasificación de Sydney consideran las características de la lesión gástrica y los grados de daño de dicha lesión (Tabla 1).

**Tabla 1.** Características de la evaluación histopatológica en biopsias según la clasificación de Sydney (11)

| Característica                     | Definición   | Grado de daño                       |                                   |                                       |                                   |
|------------------------------------|--|-------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
|                                    |  | 0 (ninguno)                         | 1 (leve)                          | 2 (moderado)                          | 3 (grave)                         |
| <b>Inflamación crónica</b>         | Densidad de linfocitos y células plasmáticas                             | 2-5 linfocitos, plasma y macrófagos | 5-10 células                      | 11-20 células                         | >21 células                       |
| <b>Infiltración de neutrófilos</b> | Infiltrados neutrofilicos de la lámina propia o del epitelio superficial | Ninguno                             | < 1/3 de la superficie infiltrada | 1/2 - 2/3 de la superficie infiltrada | > 2/3 de la superficie infiltrada |
| <b>Atrofia glandular</b>           | Pérdida de glándulas especializadas                                      | Ninguno                             | Leve                              | Moderado                              | Severo                            |
| <b>Metaplasia</b>                  | Metaplasia intestinal del epitelio                                       | Ninguno                             | < 1/3 de la mucosa afectada       | 1/3 a 2/3 de la mucosa afectada       | > 2/3 de la mucosa involucrada    |
| <b><i>Helicobacter pylori</i></b>  | Densidad del epitelio  | Ninguno                             | 1-3 bacterias                     | Una capa de bacterias                 | Grupo de bacterias                |

El estudio endoscópico es un método altamente invasivo, por lo que se limita la cantidad de biopsias. El protocolo de Sydney recomienda la toma de 5 biopsias (2 en antro, 2 de cuerpo gástrico y 1 de la cisura *angularis*) (Figura 1) (12). El sitio para la toma de muestra considera a *H. pylori* como agente etiológico, por la identificación de esta bacteria principalmente en antro gástrico (13).



**Figura 1.** Sitios recomendados para tomar una biopsia gástrica (13)

La infección por *H. pylori* es una de las causas de disbiosis en la microbiota gástrica. Se han determinado abundancias relativas >97% en pacientes infectados con este microorganismo. Sin embargo, recientemente se determinó el desarrollo de eventos disbióticos en el microambiente gástrico en abundancias relativas bajas e incluso en ausencia de esta bacteria. Adicionalmente, se ha descrito un aumento significativo de bacterias patobiontes como *Prevotella melaninogenica*, *Streptococcus anginosus* y, recientemente descrito, *Cutibacterium acnes* (14).

## 2.2 *Cutibacterium acnes*

*Cutibacterium* (anteriormente conocido como *Propionibacterium*) *acnes* es un bacilo Gram positivo anaerobio aerotolerante (4). Esta bacteria se considera microbiota dominante en piel humana y, al ser un microorganismo lipofílico es dominante en unidades pilosebáceas. *C. acnes* también se ha aislado e identificado en otras regiones del cuerpo humano como la boca, el estómago, los pulmones, el tracto urinario y la próstata (15).

*C. acnes* presenta funciones específicas para el mantenimiento de la homeostasis en la piel, como: 1) la modulación del pH en piel (que oscila entre 4.1 y 5.8) mediante la secreción de una triacilglicerol lipasa para producción de ácidos grasos de cadena corta a través de la hidrólisis de los triacilglicéridos; 2) producción de cutimicina, tiopéptido antimicrobiano que confiere protección a la piel contra otros patógenos, como *Staphylococcus aureus*; 3) modulación inmune por interacciones con queratinocitos y sebocitos, que desencadena respuestas inflamatorias; y 4) asociaciones con la mitigación del estrés oxidativo por la producción de la oxigenasa radical (RoxP), que presenta actividad antioxidante contra especies reactivas de oxígeno (ROS) (16).

*C. acnes* se considera microbiota dominante en la piel y presenta múltiples beneficios en este órgano, esta bacteria se ha identificado en la microbiota gástrica de sujetos sanos. Sin embargo, aún no se han definido sus funciones en este microambiente, ya que, se ha encontrado en abundancias relativas dominantes en pacientes con diferentes enfermedades gástricas en ausencia de *H. pylori*, como gastritis linfocítica, gastritis crónica cuerpo-dominante y cáncer gástrico (17).

El diagnóstico de *C. acnes* en enfermedades de la piel se basa en evidencia clínica y estudio microbiológico, esto proporciona un diagnóstico confiable. Sin embargo, también presenta desventajas, como el tiempo de cultivo prolongado (hasta siete días) con posibilidad de contaminación principalmente por arrastre de microbiota nativa órgano-específica y malas prácticas de manipulación de muestras biológicas e instrumental de laboratorio. Por ello, se han desarrollado nuevas técnicas para apoyar el diagnóstico clínico, entre los cuales destacan los métodos moleculares. Estos métodos muestran una mayor sensibilidad, adicional a la reducción de tiempos de diagnóstico y una posibilidad menor de contaminación (18).

### **2.3 Técnicas de biología molecular**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las técnicas moleculares aplicables para diagnóstico clínico, que permite amplificar millones de veces una secuencia nucleotídica de una región particular de DNA conocida a partir de un número de ciclos determinados (19).

Para realizar una PCR se requieren distintos elementos: el templado de DNA, cebadores complementarios a una región específica del DNA para generación de amplicones de tamaño específico; desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs); una solución reguladora para estabilizar la reacción enzimática; y una DNA polimerasa obtenida de *Thermus aquaticus*, termoestable a 94-96°C con actividad enzimática a 72°C (19).

La reacción enzimática se lleva a cabo en tres etapas:

- 1) Desnaturalización.** El DNA de doble cadena se desnaturaliza por calor para obtener cadenas separadas.

- 2) **Hibridación.** Los cebadores se alinean al extremo 3' del templado previamente separado.
- 3) **Extensión.** La *Taq* polimerasa actúa sobre el complejo templado-iniciadores catalizando la síntesis de la cadena complementaria de DNA por la adición de dNTP's complementarios al templado de DNA (19).

Para analizar los productos de PCR (amplicones) se emplea la electroforesis de ácidos nucleicos. La electroforesis es una técnica de separación que se fundamenta en el tamaño y carga de las moléculas que se desean separar. La ubicación de las bandas de DNA en el gel se detecta con la adición de colorantes y las bandas finalmente son detectadas mediante la exposición del gel a luz ultravioleta (UV). Este fenómeno ocurre entre los agentes intercalantes que tienen afinidad por el DNA al excitarse con la luz UV y emiten fluorescencia (20).

Con el avance de los métodos moleculares para fines de investigación y diagnóstico, se han desarrollado variantes de la PCR, como la RT-qPCR.

### **2.3.1 PCR cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR)**

La PCR cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR) permite la detección y cuantificación de la expresión génica en tiempo real que se basa en la intensidad de la fluorescencia generada por un fluoróforo o agente intercalante que se une a este templado durante la extensión y emite una señal de fluorescencia a una longitud de onda  $\lambda = 520$  nm cuando se une al DNA de doble cadena. A medida que se forman las nuevas hebras de DNA durante la extensión, el fluoróforo se intercala en el DNA de doble cadena y la señal de fluorescencia aumenta (2).

La RT-qPCR es utilizada ampliamente para estudios de expresión génica, determinación relativa de RNA mensajeros (mRNAs), detección molecular de genes y cuantificación absoluta y relativa de número de copias de un gen específico. Su alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, lo que la ha llevado a utilizarse para fines diagnósticos y de investigación (21).

Esta técnica generalmente implica un procedimiento de dos pasos:

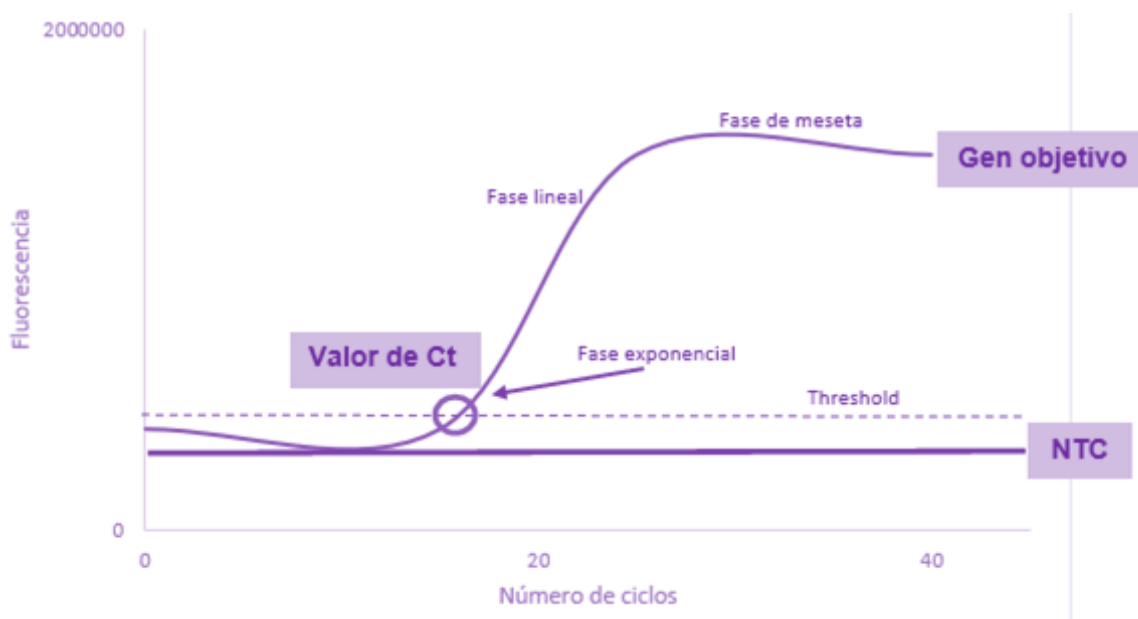


### a) Síntesis de cDNA a partir de RNA

La síntesis de DNA complementario (cDNA) se lleva a cabo por medio de retrotranscripción, reacción enzimática en la que la transcriptasa inversa sintetiza una cadena de cDNA a partir de una cadena de RNA. En esta reacción se pueden emplear cebadores 1) oligo(dT), los cuales se unen a la cola de poliA que presenta el mRNA para que la transcripción se lleve a cabo por el extremo 3', lo que enriquece la síntesis de cDNA a partir de mRNA; y/o 2) hexámeros aleatorios que se unen al azar a lo largo de la cadena de RNA, lo cual favorece la síntesis de cDNA a partir de RNA total (2).

### b) Detección de la fluorescencia

Durante la reacción, las señales de emisión de luz se generan a través de la incorporación de un agente intercalante (SYBR Green) que se inserta en el surco menor de la doble hebra de DNA. Estas señales se detectan en cada ciclo de la reacción. Los valores de ciclo threshold (Ct), que indican el ciclo en el cual se detectó la fluorescencia, se procesan para la generación de curvas de amplificación, que son una representación gráfica del número de ciclos contra la intensidad de la fluorescencia (Figura 2) (2).



**Figura 2.** Figura de amplificación obtenida en RT-qPCR.

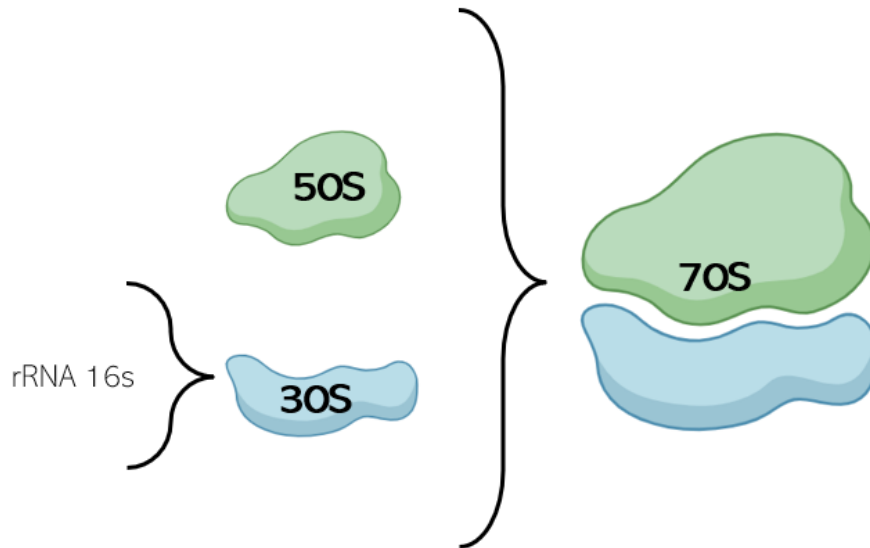
La curva de amplificación obtenida en una RT-qPCR consta de múltiples etapas y componentes.

- **Línea base.** Se presenta en ciclos tempranos de la reacción, regularmente del 3 al 15, donde no es detectable la fluorescencia por los productos de amplificación.
- **Fase exponencial.** El número de copias generadas a partir del templado de cDNA generan fluorescencia suficiente para detectarse.
- **Fase lineal.** Comienza a presentarse un decremento en la actividad enzimática.
- **Fase de meseta.** Representa el final de la amplificación debido a que los componentes de la reacción se han agotado.
- **Threshold.** Punto en el que la amplificación comienza. Este puede ser ajustado en la región lineal de la curva de amplificación, la cual representa el rango logarítmico lineal detectable de la PCR.
- **Valor de Ct.** Es el ciclo en el cual hay un aumento significativo de la fluorescencia.
- **NTC (No Template Control).** Control el cual contiene todos los componentes de la reacción a excepción del templado de cDNA, es decir es un control que no contiene muestra (2).

Para la identificación de bacterias de interés clínico a través de RT-qPCR como apoyo para el diagnóstico clínico, usualmente se emplean genes constitutivos, entre los cuales destaca el gen 16S rRNA.

### 2.3.1.1 Gen 16S rRNA

El ribosoma es un orgánulo esencial cuya función es la síntesis de proteínas. Los microorganismos presentan aproximadamente entre 10 000 a 20 000 ribosomas (22). El ribosoma bacteriano (70S) consiste en dos subunidades: 50S (subunidad grande) y 30S (subunidad pequeña), presenta un coeficiente de sedimentación de 70S, distinto al de los organismos eucariotes (80S). La subunidad 30S contiene el 16S rRNA y la subunidad 50S contiene el 5S y 23S rRNA (Figura 3) (2).



**Figura 3.** Componentes del ribosoma bacteriano. Se observa al ribosoma bacteriano (70S) y las subunidades que la conforman (30S y 50S) (2)

El gen 16S rRNA bacteriano consiste en nueve regiones hipervariables (V1-V9) flanqueadas por secuencias conservadas, las cuales presentan tasas de evolución bajas, empleándose para el diseño de cebadores especie-específicos. Estas características permiten una considerable diversidad de secuencias entre diferentes especies bacterianas, haciéndolo un gen candidato para identificación de especies bacterianas y desarrollo de estudios taxonómicos (23).

Las características moleculares que presenta el gen 16S rRNA se pueden emplear para la detección de diferentes especies en un mismo órgano. Esto significa que pueden ser identificados *C. acnes* y *H. pylori* en el estómago de pacientes con enfermedades gástricas, evaluar su actividad metabólica y determinar una posible asociación entre su presencia con el desarrollo de enfermedades gástricas.

### 3.Planteamiento del problema

*Helicobacter pylori* representa uno de los agentes etiológicos de infecciones gástricas más recurrentes a nivel mundial. Esta bacteria induce múltiples enfermedades gástricas crónicas. Sin embargo, estudios metagenómicos recientes

han reportado la posible asociación entre bacterias del estómago y el inicio y desarrollo de enfermedades gástricas en ausencia de *H. pylori*, como es caso de *Cutibacterium acnes*. Se ha aislado e identificado a *C. acnes* en el tracto gastrointestinal de sujetos sanos y, recientemente, en pacientes con infecciones asociadas a la atención de la salud y enfermedades gástricas.

Entonces, ¿cuál es la relación entre la presencia de *C. acnes* y el inicio o desarrollo de enfermedades gástricas de pacientes diagnosticados con enfermedades gástricas con etiología aparente a infección por *H. pylori*?

## 4. Hipótesis

---

Si *H. pylori* no es identificado en pacientes con enfermedades gástricas inicialmente diagnosticados con este agente etiológico, entonces se esperaría encontrar abundancias relativas dominantes de *C. acnes* en las muestras clínicas de estos pacientes.

## 5. Objetivos

---

### 5.1 General

- Analizar la correlación entre *Helicobacter pylori* y *Cutibacterium acnes* en biopsias de pacientes con diferentes enfermedades gástricas.

### 5.2 Particulares

- Determinar la viabilidad de *H. pylori* y *C. acnes* en las muestras analizadas.
- Relacionar la presencia de *C. acnes* con el tipo de enfermedad gástrica en la que se presenta.

# 6. Material y métodos

## 6.1 Diseño de estudio

Estudio retrospectivo transversal y descriptivo. Con el empleo de ácidos nucleicos obtenidos a partir de biopsias gástricas parafinadas de pacientes con distintas enfermedades gástricas.

## 6.2 Universo

Las biopsias gástricas parafinadas en este estudio provienen de 40 pacientes con distintas enfermedades gástricas, cuyos diagnósticos se detallan en la Tabla 1.

**Tabla 2.** Diagnóstico clínico de pacientes con enfermedad gástrica inicialmente diagnosticados con infección por *H. pylori*

| Paciente | Diagnóstico   |
|----------|---|
| 1        | Gastritis   |
| 2        | Gastritis crónica leve en fondo y cuerpo<br>Gastritis nodular en antro              |
| 3        | Gastritis folicular inactiva sin atrofia  |
| 4        | Gastritis   |
| 5        | Gastritis leve  |
| 6        | Gastritis crónica leve sin atrofia  |
| 7        | Gastropatía reactiva en antro por reflujo biliar                                    |
| 8        | Fondo cuerpo y antro sin alteraciones   |
| 9        | Gastritis crónica leve sin atrofia  |
| 10       | Gastritis superficial en fondo y cuerpo<br>Gastritis leve con atrofia leve en antro |
| 11       | Gastritis superficial sin atrofia en fondo, cuerpo y antro                          |
| 12       | Gastritis mínima en antro   |

|    |  |
|----|--|
| 13 | Gastritis en antro con actividad moderada<br>Gastritis superficial en cuerpo sin actividad                               |
| 14 | Gastritis sin atrofia en antro con actividad moderada  |
| 15 | Gastritis crónica con actividad moderada asociada a infección por <i>H. pylori</i> sin atrofia                           |
| 16 | Gastritis crónica superficial sin actividad en fondo, cuerpo y antro   |
| 17 | Gastritis con atrofia leve en antro  |
| 18 | Gastritis leve sin actividad en cuerpo y fondo<br>Gastritis folicular con actividad asociada a <i>H. pylori</i> en antro |
| 19 | Cambios mínimos en fondo, cuerpo y antro   |
| 20 | Esofagitis   |
| 21 | Antro con cambios mínimos  |
| 22 | Enteropatía  |
| 23 | Gastritis crónica folicular inactiva asociada a <i>H. pylori</i>   |
| 24 | Gastropatía folicular en cuerpo  |
| 25 | Pangastropatía folicular   |
| 26 | Gastropatía folicular en cuerpo  |
| 27 | Gastropatía folicular en cuerpo  |
| 28 | Pangastropatía folicular   |
| 29 | Pangastropatía folicular   |
| 30 | Metaplasia   |
| 31 | Metaplasia   |
| 32 | Metaplasia   |
| 33 | Metaplasia   |
| 34 | Metaplasia   |
| 35 | Metaplasia   |
| 36 | Metaplasia   |
| 37 | Metaplasia   |
| 38 | Metaplasia   |

|    |            |
|----|------------|
| 39 | Metaplasia |
| 40 | Metaplasia |

### 6.3 Materiales

En las siguientes tablas, se enlistan los materiales empleados para cada proceso en biología molecular.

**Tabla 3.** Material para desparafinación de tejidos

| Material biológico   | Reactivos  | Equipo e instrumentos  |
|--|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Biopsias gástricas parafinadas</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Xilol</li> <li>• Etanol absoluto grado biología molecular (Sigma-Aldrich ®, EUA)</li> <li>• Agua libre de nucleasas o agua tratada con DEPC</li> <li>• Proteinasa K (20 mg/mL)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Parrilla de calentamiento (IKA ®)</li> <li>• Agitador Vortex Genie II Mixer (Scientific Industries ®, EUA)</li> <li>• Thermoblock (Boekel Scientific ®, EUA)</li> </ul> |

**Tabla 4.** Material para extracción de ácidos nucleicos

| Material biológico   | Reactivos   | Equipo e instrumentos   |
|--|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aislados puros de <i>Cutibacterium acnes</i></li> <li>• Aislados puros de <i>Helicobacter pylori</i></li> <li>• Biopsias gástricas parafinadas</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Solución monofásica TRIzol Reagent (ambion ®, EUA)</li> <li>• Cloroformo grado biología molecular (J.T.Baker, EUA)</li> <li>• Isopropanol grado biología molecular (Sigma-Aldrich ®, EUA)</li> <li>• Etanol absoluto grado biología molecular (Sigma-Aldrich ®, EUA)</li> <li>• Citrato de sodio 0.1 M en etanol al 10%</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agitador Vortex Genie II Mixer (Scientific Industries ®, EUA)</li> <li>• Microcentrifuga (Heraeus, Alemania)</li> <li>• Thermoblock (Boekel Scientific ®, EUA)</li> <li>• Ultracongelador</li> <li>• Lector de microplacas para absorbancia Epoch (BioTek ®, EUA)</li> </ul> |

- Agua libre de nucleasas o agua tratada con DEPC

**Tabla 5.** Material para síntesis de cDNA

| Material biológico   | Reactivos   | Equipo e instrumentos   |
|--|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• RNA aislado y purificado</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• DNAsa I (ThermoFisher Scientific®, EUA)</li> <li>• Agua libre de nucleasas o tratada con DEPC</li> <li>• Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (ThermoFisher Scientific®, EUA)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Termociclador digital (Axygen®, EUA).</li> </ul> |

**Tabla 6.** Material para PCR punto final

| Material biológico   | Reactivos   | Equipo e instrumentos  |
|--|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• cDNA de cada parafinado</li> <li>• cDNA de <i>Cutibacterium acnes</i></li> <li>• cDNA de <i>Helicobacter pylori</i></li> <li>• Cebadores para el gen 16S de <i>Cutibacterium acnes</i> y <i>Helicobacter pylori</i>*</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agua tratada con DEPC</li> <li>• PCR Master Mix (Promega®, EUA)</li> <li>• Agarosa</li> <li>• Marcador de peso molecular de 10 pb</li> <li>• Amortiguador de carga</li> <li>• Tris-Borato-EDTA (0.5X)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Termociclador digital (Axygen®, EUA).</li> <li>• Microondas</li> <li>• Fuente de energía para electroforesis</li> <li>• Cámara de electroforesis</li> </ul> |

**Tabla 7.** Material para RT-qPCR

| Material biológico  | Reactivos  | Equipo e instrumentos   |
|---|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• cDNA de <i>Helicobacter pylori</i>, <i>Cutibacterium acnes</i> y de biopsias parafinadas</li> <li>• Cebadores para el gen 16S de <i>Cutibacterium acnes</i> y <i>Helicobacter pylori</i>*</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• qPCR SybrMaster highROX (Jena Bioscience®, Alemania)</li> <li>• Agua libre de nucleasas o tratada con DEPC</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Termociclador de tiempo real Agilent AriaMx (Agilent Technologies®, EUA)</li> <li>• Microcentrífuga</li> </ul> |



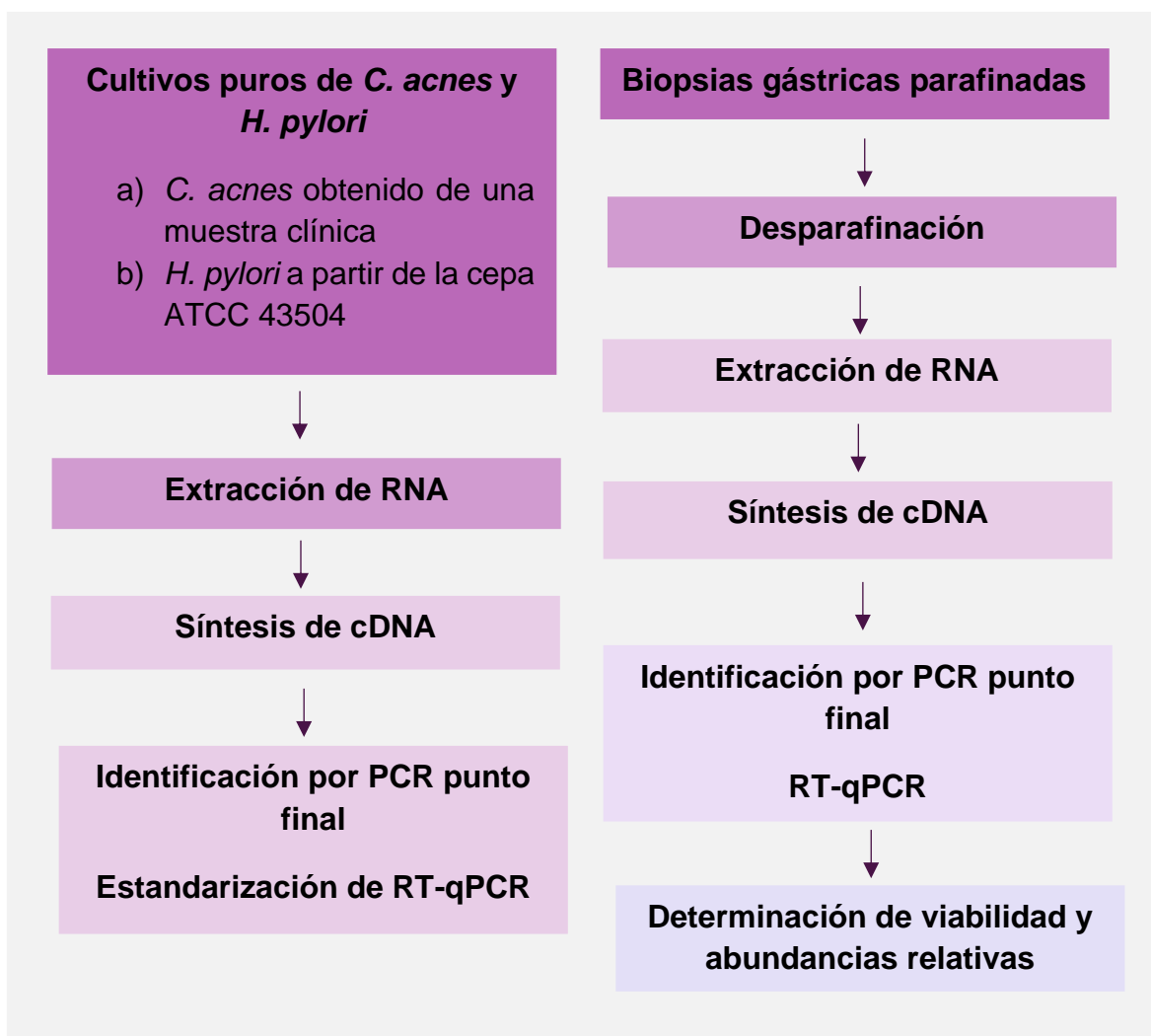
\*Los cebadores para el gen 16S rRNA de *C. acnes* y *H. pylori* se indican en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Cebadores para *Cutibacterium acnes* y *Helicobacter pylori*

| Gen                               | Secuencia (5'-3')             | Longitud | %GC   | Tamaño del amplicón |
|-----------------------------------|-------------------------------|----------|-------|---------------------|
| 16S rRNA de <i>C. acnes</i> (24)  | F: GCGTGAGTGACGGTAATGGGTA     | 22       | 54.5  | 131 pb              |
|                                   | R: TTCCGACGCGATCAACCA         | 18       | 55.6  |                     |
| 16S rRNA de <i>H. pylori</i> (25) | F: TCGGAATCACTGGGCGTAA        | 19       | 52.6  | 76 pb               |
|                                   | R: TTCTATGGTTAAGCCATAGGATTTAC | 27       | 37.03 |                     |

## 6.4 Métodos

### 6.4.1 Diagrama general de trabajo



#### **6.4.2 Cultivo de *Cutibacterium acnes***

A partir de un cultivo de *C. acnes* aislado de un sujeto sano y previamente identificado por métodos moleculares, se sembraron tres placas con agar Columbia suplementado con sangre de carnero desfibrinada por la técnica de estría cruzada. Las placas se incubaron a 37°C durante 5 días en condiciones de anaerobiosis. La biomasa se colectó y resuspendió en tubos de microcentrífuga con 500 µL de TRIzol® para extracción y purificación de ácidos nucleicos.

#### **6.4.3 Cultivo de *Helicobacter pylori***

A partir de un cultivo de *H. pylori* ATCC 43504 conservado en caldo Brucella a -70°C, se sembraron dos placas con agar Columbia suplementado con sangre de carnero desfibrinada con la técnica de goteo. Las placas se incubaron a 37°C en condiciones de microaerofilia (5% de CO<sub>2</sub>) por 3 días. Las colonias puntiformes se resembraron en cuatro placas con agar Columbia suplementado con sangre de carnero desfibrinada: dos placas se sembraron por estría cruzada y dos placas por siembra masiva. La biomasa se recolectó y resuspendió en tubos de microcentrífuga con 500 µL de TRIzol® para extracción y purificación de ácidos nucleicos.

#### **6.4.4 Desparafinación de biopsias gástricas**

Por cada biopsia gástrica parafinada se seleccionaron 2 cortes con un grosor de 10 µm cada uno, los cuales se colocaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. A cada tubo conteniendo los cortes parafinados se adicionaron 700 µL de xilol precalentado a 50°C. Los tubos fueron homogeneizados con vortex durante 15 s. Los tubos se incubaron a 50°C durante 5 min y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 3 min. El sobrenadante se retiró con micropipeta. La metodología se repitió una vez más para asegurar una correcta desparafinación.

Después de retirar el sobrenadante de xilol, se adicionaron 700 µL de etanol absoluto grado biología molecular. Los tubos se homogeneizaron con vortex durante 12 s, después se centrifugaron a 10,000 rpm durante 3 min; el etanol se retiró con micropipeta. La metodología se repitió una vez más.

Después de retirar el sobrenadante, los tubos se incubaron a 50°C para eliminar remanentes de etanol de las muestras. Una vez que los tejidos estuvieron completamente secos se rehidrataron con 150 µL de agua tratada con dietilpicrocarbonato (DEPC). Al tejido rehidratado se le adicionaron 10 µL de proteinasa K (20 mg/mL) y se incubaron a 50°C durante 5 min. Los tubos se incubaron por segunda ocasión a 80°C durante 15 min más. Los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente para adicionar 40 µL de agua tratada con DEPC. A cada tejido rehidratado se le adicionaron 500 µL de TRIzol ® para extracción y purificación de ácidos nucleicos.

#### **6.4.5 Extracción de RNA**

Los tubos con TRIzol ® se homogeneizaron con vortex durante 15 s y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Se adicionaron 120 µL de cloroformo. Los tubos se homogeneizaron hasta formar una emulsión e incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 min. La fase acuosa se recuperó con micropipeta en 500 µL de isopropanol frío y se incubó a -70°C durante 1 hora. Posterior a la incubación, los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se retiró con micropipeta. A cada tubo se adicionaron 500 µL de etanol absoluto grado biología molecular. Los tubos se mezclaron gentilmente con vortex y los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 min. Posteriormente, se retiró el etanol con micropipeta. Los tubos se incubaron durante 15 min a 50°C para evaporar el excedente de etanol en la muestra, evitando secar completamente el pellet de RNA. Finalmente, los pellets de RNA se rehidrataron con 50 µL de agua tratada con DEPC.

La cuantificación del material genético fue realizada en un lector de microplacas para absorbancia Epoch (BioTek ®). Los resultados se reportaron en ng/µL, adicional a la calidad del RNA obtenido de acuerdo con el índice de absorbancia 260/280.

### 6.4.6 Síntesis de cDNA

El RNA purificado de cada muestra fue tratado para remoción de DNA de doble cadena de acuerdo con las instrucciones del fabricante señaladas en la Tabla 9:

**Tabla 9.** Reacción para el tratamiento de RNA con DNAsa I (Thermo Scientific ®)

| Componente                         | Cantidad               |
|------------------------------------|------------------------|
| RNA                                | 1 µg                   |
| Amortiguador con MgCl <sub>2</sub> | 1 µL                   |
| DNAsa I                            | 1 µL                   |
| Agua tratada con DEPC*             | V <sub>F</sub> = 10 µL |

\* DEPC: Dietilpolicarbonato

Los tubos se incubaron a 37°C durante 30 min. Después de la incubación, a cada tubo se adicionó 1 µL de EDTA 50 mM como agente quelante de los iones Mg<sup>2+</sup>, los cuales son usados como cofactores de la DNAsa. La mezcla se homogeneizó gentilmente con micropipeta y se incubó a 65°C por 10 min más.

El RNA tratado con DNAsa I se utilizó para la síntesis de cDNA con el kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (ThermoFisher Scientific ®), siguiendo las instrucciones del fabricante señaladas en la Tabla 10:

**Tabla 10.** Componentes de la mezcla de reacción para la síntesis de cDNA

| Componente             | Cantidad (µL)         |
|------------------------|-----------------------|
| Mezcla de reacción     | 4                     |
| Enzima                 | 2                     |
| Agua tratada con DEPC* | V <sub>F</sub> =20 µL |

\* DEPC: Dietilpolicarbonato

Los tubos se incubaron 10 minutos a 25°C seguido de 15 minutos a 50°C, para finalmente incubar 5 minutos a 85°C.

#### 6.4.7 Identificación por PCR punto final

La PCR punto final se realizó con la mezcla de reacción de Promega Master Mix (Promega®, EUA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las condiciones utilizadas en la PCR punto final se indican en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Componentes de la mezcla de reacción PCR para *Cutibacterium acnes* y *Helicobacter pylori*

| Componente              | Cantidad o concentración |
|-------------------------|--------------------------|
| PCR Master Mix Promega® | 10 µL                    |
| <b>Iniciadores</b>      |                          |
| (F)                     | 4 pmol/µL                |
| (R)                     | 4 pmol/µL                |
| Agua tratada con DEPC   | V <sub>F</sub> = 20 µL   |

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Axygen (Agilent Technologies®, EUA) de acuerdo con las condiciones de reacción (Tabla 12):

**Tabla 12.** Perfil térmico para PCR punto final para identificación de *Cutibacterium acnes* y *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas parafinadas de pacientes con enfermedades gástricas

| Paso                      | Temperatura | Tiempo | Número de ciclos |
|---------------------------|-------------|--------|------------------|
| Desnaturalización inicial | 95°C        | 3 min  | 1                |
| Desnaturalización         | 95°C        | 30 s   |                  |
| Alineamiento              | 60°C        | 30 s   | 30               |
| Extensión                 | 72°C        | 20 s   |                  |
| Extensión final           | 72°C        | 3 min  | 1                |

Después del proceso de amplificación, se realizó la electroforesis de ácidos nucleicos. Se preparó una solución de agarosa al 4% en TBE 0.5X a la cual se adicionó 1 µL de Midori Green por cada 10 mL de gel preparado, la cual se vertió y solidificó en una platina para electroforesis con peine para la formación de pozos.

El gel de agarosa se colocó en una cámara para electroforesis con TBE 0.5X. En el primer pozo se colocó marcador de peso molecular de 10 pb. En los siguientes pozos se colocó 1  $\mu$ L de amortiguador de carga + 10  $\mu$ L de cada amplicón.

Las condiciones para el corrimiento del gel fueron las siguientes: 400 mA, 80 V por 40 minutos.

#### 6.4.8 Estandarización de RT-qPCR

La PCR cuantitativa se corrió con la mezcla de reacción qPCR SybrMaster highROX (Jena Bioscience ®), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando los iniciadores indicados en la Tabla 10.

Las condiciones de la mezcla de reacción fueron estandarizadas, como se muestra en las tablas 13 y 14:

**Tabla 13.** Componentes de la mezcla de reacción RT-qPCR para *Cutibacterium acnes*

| Componente            | Cantidad o concentración       |
|-----------------------|--------------------------------|
| SybrMaster highROX    | 7.5 $\mu$ L                    |
| <b>Iniciadores</b>    |                                |
| (F)                   | 0.75 pmol/ $\mu$ L (1 $\mu$ L) |
| (R)                   | 0.75 pmol/ $\mu$ L (1 $\mu$ L) |
| DMSO                  | 8.75%                          |
| Agua tratada con DEPC | V <sub>F</sub> = 15 $\mu$ L    |

**Tabla 14.** Componentes de la mezcla de reacción RT-qPCR para *Helicobacter pylori*

| Componente         | Cantidad o concentración    |
|--------------------|-----------------------------|
| SybrMaster highROX | 7 $\mu$ L                   |
| <b>Iniciadores</b> |                             |
| (F)                | 4 pmol/ $\mu$ L (1 $\mu$ L) |
| (R)                | 4 pmol/ $\mu$ L (1 $\mu$ L) |

---

Agua tratada con DEPC

---

V<sub>F</sub>=14 µL

---

Las reacciones fueron ejecutadas en un termociclador Agilent AriaXMX de acuerdo con las condiciones de reacción (Tabla 15):

**Tabla 15.** Perfil térmico para RT- qPCR

| Paso                                      | Temperatura | Tiempo | Número de ciclos para <i>C. acnes</i> | Número de ciclos para <i>H. pylori</i> |
|---|-------------|--------|---------------------------------------|--|
| Activación de la polimerasa               | 95°C        | 2 min  | 1                                     | 1                                      |
| Desnaturalización                         | 95°C        | 15 s   |                                       |  |
| Alineamiento                              | 60°C        | 20 s   | 40                                    | 30                                     |
| Extensión (detección de la fluorescencia) | 72°C        | 10 s   |                                       |  |
| Extensión final                           | 95°C        | 30 s   | 1                                     | 1                                      |
|   | 60°C        | 30 s   |                                       |  |
|   | 95°C        | 30 s   |                                       |  |

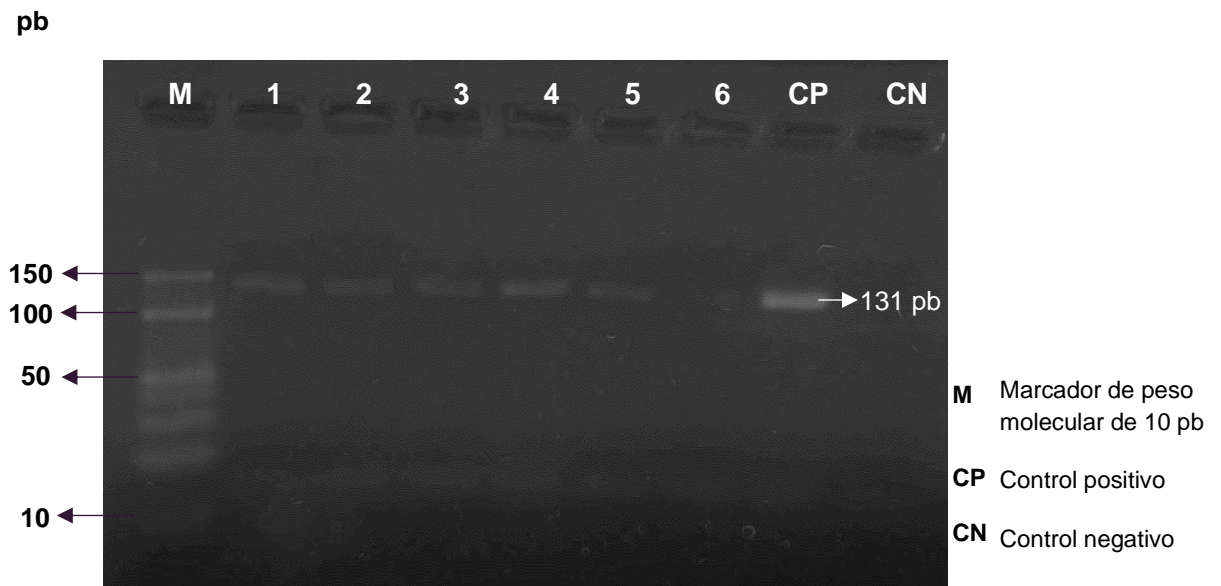
---

## 7. Resultados

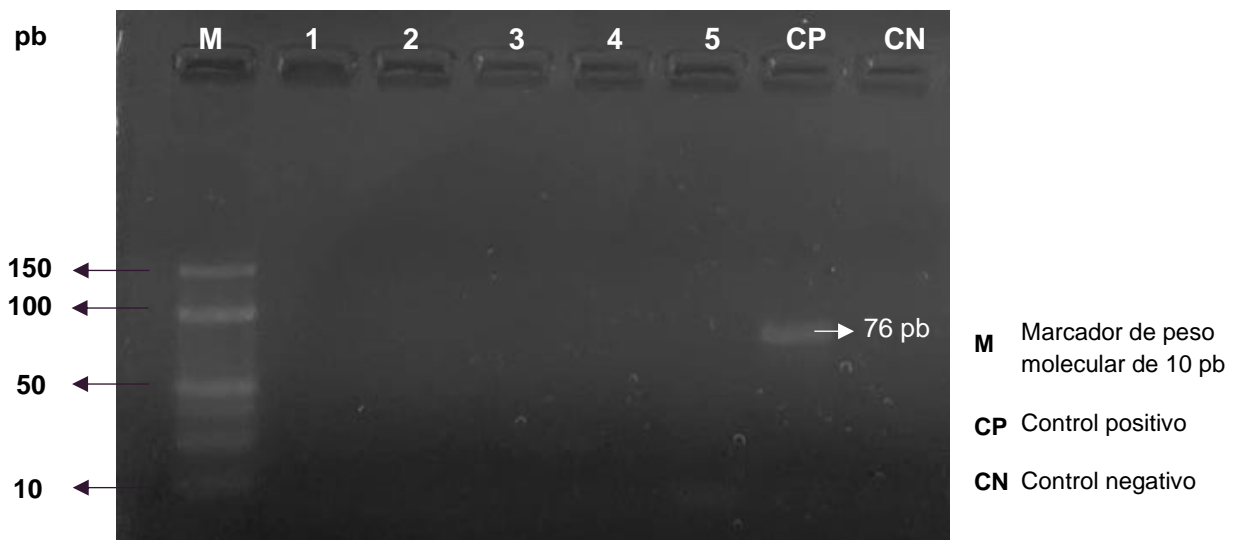
---

### 7.1 PCR punto final

Los productos de PCR fueron se analizaron en un gel de agarosa al 4%, observándose un bandeo a 131 pb para *C. acnes* y 76 pb para *H. pylori*, como se observa en la figura 4 y 5 respectivamente. Para cada validación de las determinaciones moleculares se utilizaron controles positivos y negativos.



**Figura 4.** Presencia y viabilidad de *C. acnes* en biopsias gástricas parafinadas de pacientes con enfermedades gástricas. El gel representativo muestra los amplicones correspondientes al fragmento amplificado del gen 16S rRNA de *C. acnes* (131 pb) en los pacientes de estudio. Gel de agarosa al 4% con Midori Green. **Carril 1.** Paciente 7. **Carril 2.** Paciente 9. **Carril 3.** Paciente 10. **Carril 4.** Paciente 11. **Carril 5.** Paciente 12. **Carril 6.** Paciente 14. **CP.** Cultivo puro de *C. acnes* (150 ng/ $\mu$ L). **CN.** Control negativo.

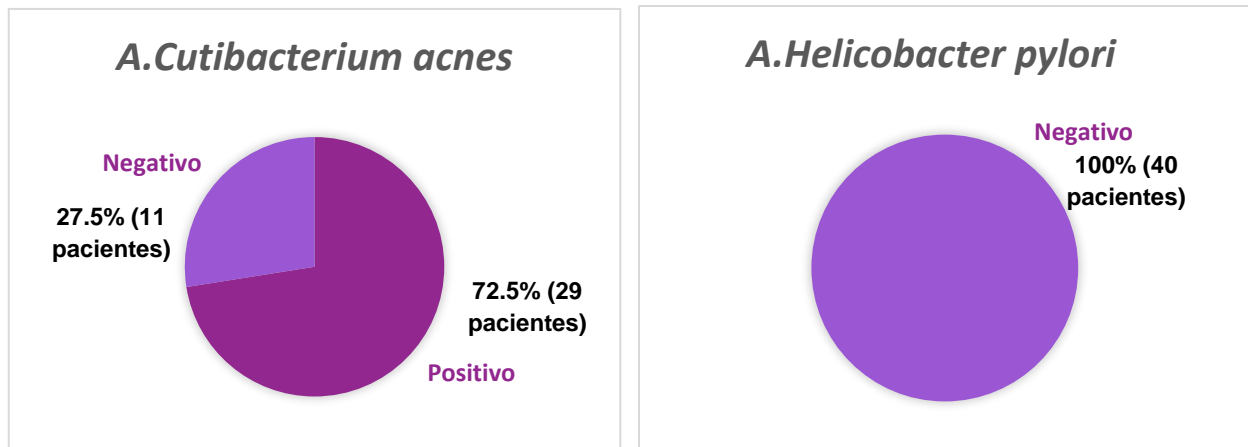


**Figura 5.** Presencia y viabilidad de *H. pylori* en biopsias gástricas parafinadas de pacientes con enfermedades gástricas. El gen representativo muestra los amplicones correspondientes fragmento amplificado del gen 16S rRNA de *H. pylori* (76 pb) en los pacientes de estudio. Gel de agarosa al



4% con Midori Green. **Carril 1.** Paciente 17. **Carril 2.** Paciente 19. **Carril 3.** Paciente 20. **Carril 4.** Paciente 21. **Carril 5.** Paciente 22. **CP.** Cultivo puro de *H. pylori* (150 ng/μL). **CN.** Control negativo

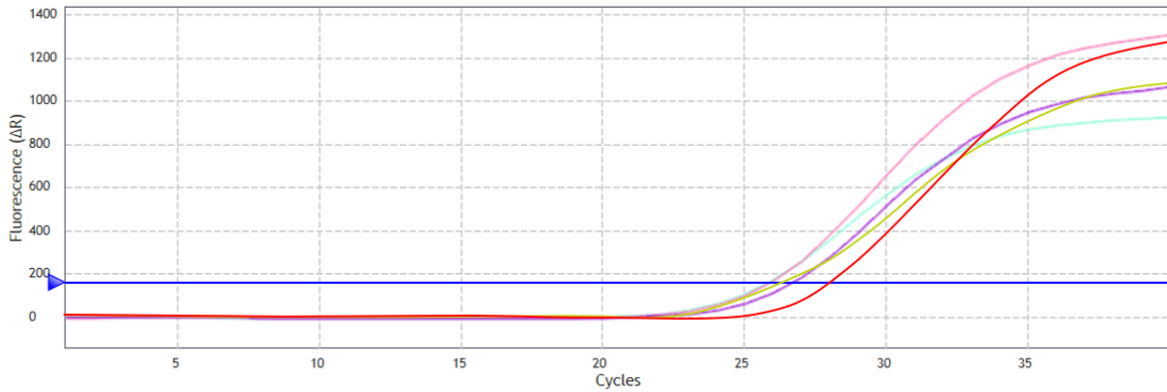
*C. acnes* estuvo presente en 72.5% de las muestras analizadas por PCR punto final. Por otro lado, *H. pylori* se encontró ausente en el 100% de estas muestras (Figura 6).



**Figura 6.** Frecuencia de *C. acnes* y *H. pylori* en biopsias gástricas parafinadas de pacientes con enfermedades gástricas. El gráfico muestra A muestra la frecuencia de *C. acnes* en las muestras de este estudio. El gráfico B muestra ausencia de *H. pylori* en todos los pacientes analizados en este estudio.

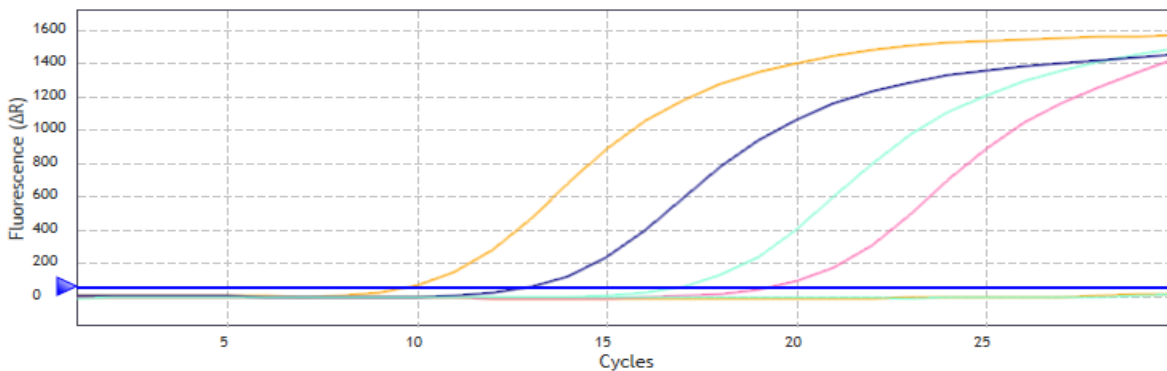
## 7.2 RT-qPCR

A partir de 5 concentraciones específicas de cDNA (Tabla 18), se obtuvieron las siguientes curvas de amplificación (Figura 7), donde se identifica el inicio de la fluorescencia en ciclos específicos y así obtener el Ct correspondiente a cada concentración.



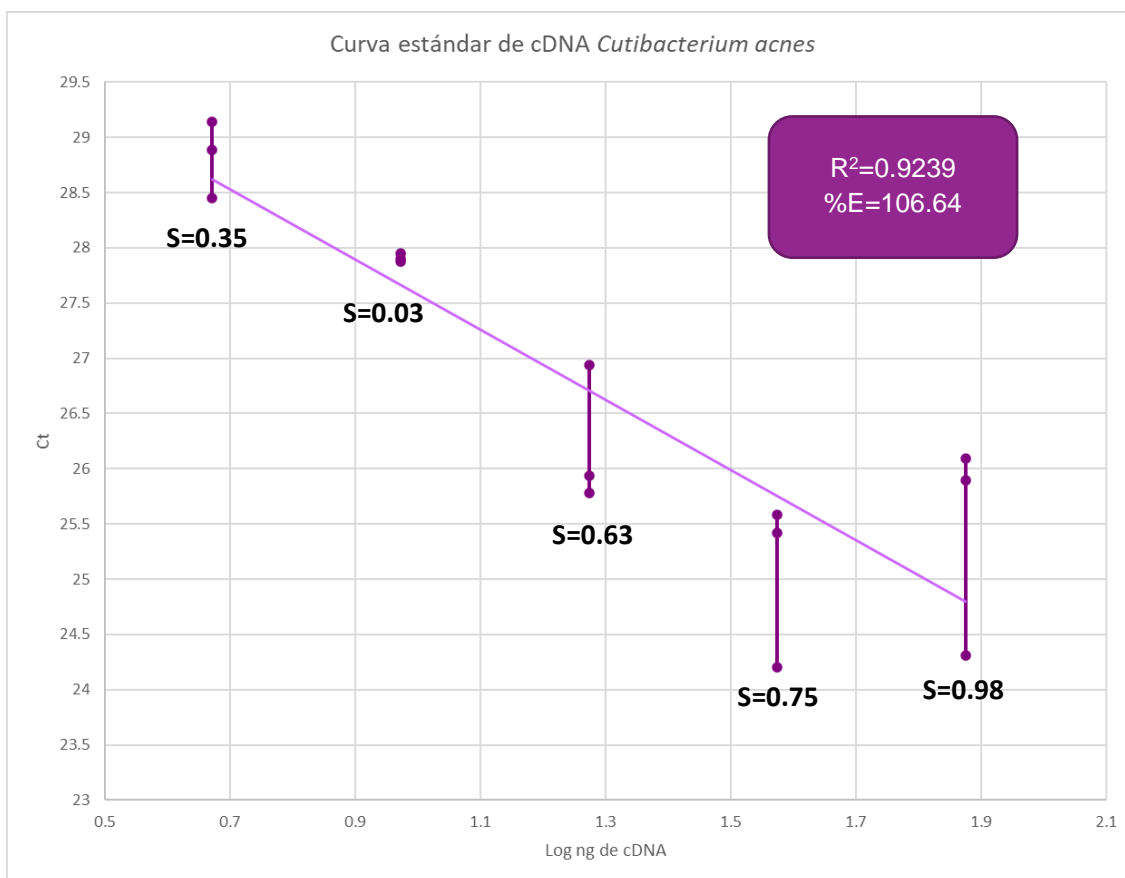
**Figura 7.** Curvas de amplificación obtenidas con cDNA de *C. acnes*. Cada concentración se muestra por triplicado. **A.** 75 ng/μL **B.** 37.5 ng/μL **C.** 18.75 ng/μL **D.** 9.375 ng/μL **E.** 4.6875

A partir de 4 concentraciones específicas de cDNA de *H. pylori* se obtuvieron las siguientes curvas de amplificación:

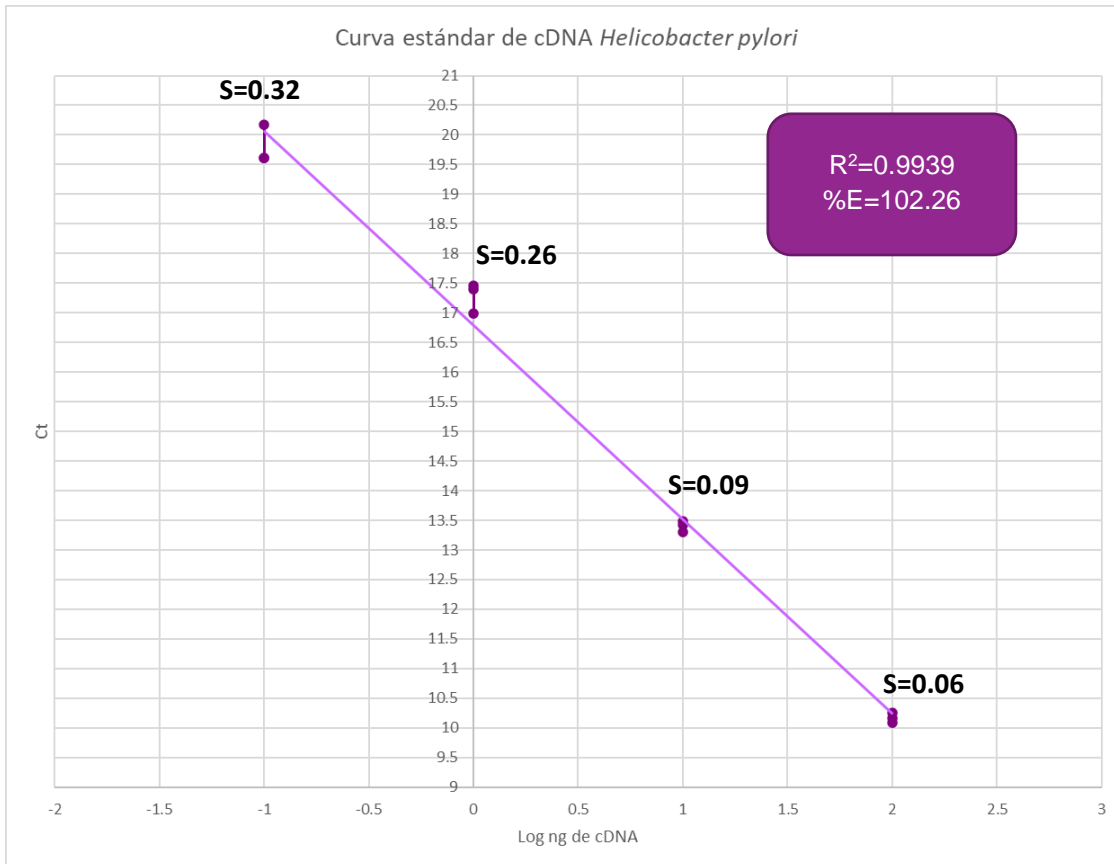


**Figura 8.** Curvas de amplificación obtenidas con cDNA de *H. pylori*. Cada concentración se muestra por triplicado. **A.** 100 ng/μL **B.** 10 ng/μL **C.** 1 ng/μL **D.** 0.1 ng/μL

Cada reacción de RT-qPCR fue realizada por triplicado, se obtuvieron tres valores de Ct por concentración empleada (Figura 9). En la figura se detallan los valores de desviación estándar por punto a graficar para detectar tendencias de dispersión a medida que las concentraciones aumenten o disminuyan. Cada Ct obtenido fue graficado contra el logaritmo de la concentración de cDNA empleada para la construcción de curvas estándar para cada microorganismo.



**Figura 9.** Curva estándar de *Cutibacterium acnes*. Construcción de la curva estándar de *C. acnes* por qRT-PCR. Se emplearon cinco concentraciones con factor de dilución 1:2 (75, 37.5, 18.75, 9.375, 4.6875 ng/ $\mu$ L).



**Figura 10.** Curva estándar de *Helicobacter pylori*. Construcción de la curva estándar de *H. pylori* por qRT-PCR. Se emplearon cuatro concentraciones con factor de dilución 1:10 (100,10,1, 0.1 ng/ $\mu$ L).

Después de construir las curvas estándar, se obtuvieron las ecuaciones de la recta correspondientes para cada microorganismo, para evaluar la eficiencia (E) de cada una de las reacciones, de acuerdo con la fórmula 1:

$$E = 10^{-1/m} \quad (1)$$

Donde:

E=eficiencia de la reacción

m=pendiente de la curva estándar

Las ecuaciones de la recta correspondientes a cada microorganismo son las correspondientes a la 2 y 3.

- *Cutibacterium acnes*  $y = -3.5734x + 31.208$  (2)

Donde:

y=Ct

x=Log de ng de cDNA de *C. acnes*

- *Helicobacter pylori*  $y = -3.269x + 16.792$  (3)

Donde:

y=Ct

x=Log de ng de cDNA de *H. pylori*

A partir de las ecuaciones 2 y 3 se obtuvieron los valores del log de la concentración de cDNA en ng/μL del microorganismo correspondiente, posterior a ello se realizó el tratamiento matemático correspondiente (Tabla 23) para obtener el número de copias por μL (Tabla 16) utilizando la ecuación número 4.

$$E^{Ct} \quad (4)$$

Donde:

E=Eficiencia de la reacción

**Tabla 16.** Número de copias de cDNA por microorganismo en pacientes con enfermedad gástrica





| Paciente | <i>Cutibacterium acnes</i> |               |           | <i>Helicobacter pylori</i> |               |           |
|----------|----------------------------|---------------|-----------|----------------------------|---------------|-----------|
|          | Ct                         | ng/μL de cDNA | Copias/μL | Ct                         | ng/μL de cDNA | Copias/μL |
| 1        | 27.21                      | 13.0485       | 9.46E+07  | N/A                        | N/A           | N/A       |
| 2        | 29.33                      | 2.8009        | 3.95E+08  | N/A                        | N/A           | N/A       |
| 3        | 24.85                      | 72.3562       | 1.92E+07  | N/A                        | N/A           | N/A       |
| 4        | 29.88                      | 1.8790        | 5.73E+08  | N/A                        | N/A           | N/A       |
| 5        | 28.52                      | 5.0422        | 2.29E+08  | N/A                        | N/A           | N/A       |
| 6        | 27.97                      | 7.5161        | 1.58E+08  | N/A                        | N/A           | N/A       |
| 7        | 25.04                      | 63.0353       | 2.19E+07  | N/A                        | N/A           | N/A       |
| 8        | 29.01                      | 3.5332        | 3.19E+08  | N/A                        | N/A           | N/A       |
| 9        | 27.11                      | 14.0308       | 8.84E+07  | N/A                        | N/A           | N/A       |
| 10       | 25.63                      | 41.0776       | 3.26E+07  | N/A                        | N/A           | N/A       |

|    |       |          |          |       |         |          |
|----|-------|----------|----------|-------|---------|----------|
| 11 | 25.57 | 42.9060  | 3.13E+07 | N/A   | N/A     | N/A      |
| 12 | 28.79 | 4.1449   | 2.75E+08 | N/A   | N/A     | N/A      |
| 13 | 27.3  | 12.2233  | 1.00E+08 | N/A   | N/A     | N/A      |
| 14 | 28.87 | 3.9111   | 2.90E+08 | N/A   | N/A     | N/A      |
| 15 | 28.78 | 4.1751   | 2.73E+08 | N/A   | N/A     | N/A      |
| 16 | 28.53 | 5.0058   | 2.30E+08 | N/A   | N/A     | N/A      |
| 17 | 27.26 | 12.5834  | 9.78E+07 | N/A   | N/A     | N/A      |
| 18 | 28.53 | 5.0058   | 2.30E+08 | N/A   | N/A     | N/A      |
| 19 | 28.53 | 5.0058   | 2.30E+08 | N/A   | N/A     | N/A      |
| 20 | 28.28 | 6.0017   | 1.95E+08 | N/A   | N/A     | N/A      |
| 21 | 28.34 | 5.7460   | 2.03E+08 | N/A   | N/A     | N/A      |
| 22 | 28.47 | 5.2286   | 2.21E+08 | N/A   | N/A     | N/A      |
| 23 | 27.95 | 7.6260   | 1.56E+08 | N/A   | N/A     | N/A      |
| 24 | 26.21 | 26.9636  | 4.82E+07 | 13.44 | 10.6021 | 1.29E+04 |
| 25 | 25.8  | 36.3093  | 3.65E+07 | 13.75 | 8.5224  | 1.61E+04 |
| 26 | 24.25 | 111.8425 | 1.28E+07 | 12.53 | 20.1262 | 6.81E+03 |
| 27 | 24.66 | 83.0552  | 1.69E+07 | 13    | 14.4540 | 9.48E+03 |
| 28 | 23.62 | 176.6829 | 8.38E+06 | 13.26 | 12.0352 | 1.14E+04 |
| 29 | N/A   | N/A      | N/A      | 13.4  | 10.9050 | 1.26E+04 |
| 30 | 30.69 | 1.0438   | 9.90E+08 | N/A   | N/A     | N/A      |
| 31 | N/A   | N/A      | N/A      | N/A   | N/A     | N/A      |
| 32 | N/A   | N/A      | N/A      | N/A   | N/A     | N/A      |
| 33 | N/A   | N/A      | N/A      | N/A   | N/A     | N/A      |
| 34 | N/A   | N/A      | N/A      | N/A   | N/A     | N/A      |
| 35 | N/A   | N/A      | N/A      | N/A   | N/A     | N/A      |
| 36 | N/A   | N/A      | N/A      | N/A   | N/A     | N/A      |
| 37 | N/A   | N/A      | N/A      | N/A   | N/A     | N/A      |
| 38 | N/A   | N/A      | N/A      | N/A   | N/A     | N/A      |
| 39 | N/A   | N/A      | N/A      | N/A   | N/A     | N/A      |
| 40 | N/A   | N/A      | N/A      | N/A   | N/A     | N/A      |

**Ct:** Ciclo threshold

**cDNA:** DNA complementario

**N/A:** No aplica

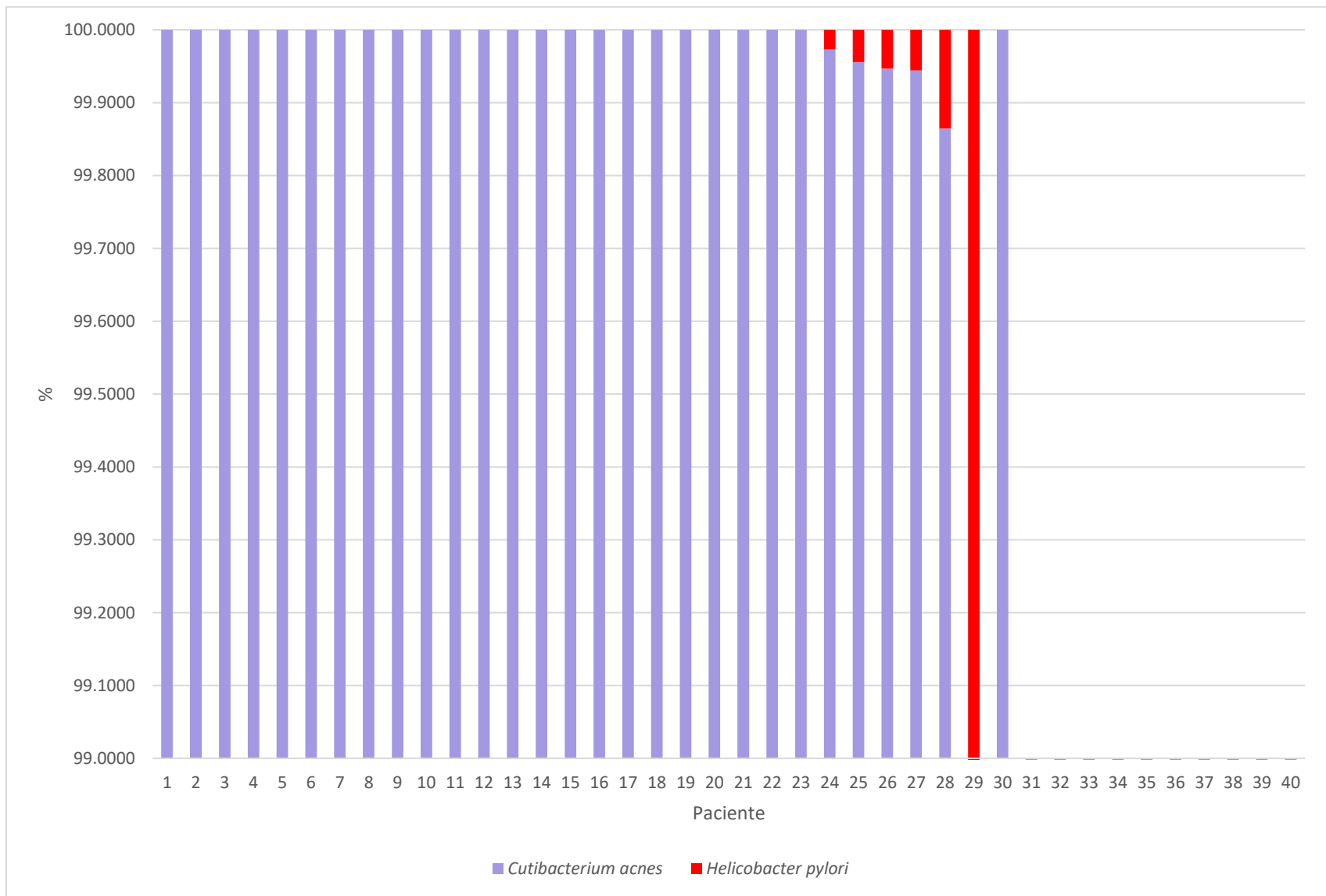
|  |                                |
|--|--------------------------------|
|  | Gastritis                      |
|  | Gastropatías                   |
|  | Alteraciones no significativas |
|  | Metaplasia                     |

Con base al número de copias obtenido de cada microorganismo, considerando como el 100% a la suma de ambas se obtuvieron las abundancias relativas de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Número de copias de } C. \text{ acnes}}{\text{Número de copias de } C. \text{ acnes} + \text{Número de copias de } H. \text{ pylori}} \times 100\% \\ = \text{Abundancia relativa de } C. \text{ acnes}$$

$$\frac{\text{Número de copias de } H. \text{ pylori}}{\text{Número de copias de } C. \text{ acnes} + \text{Número de copias de } H. \text{ pylori}} \times 100\% \\ = \text{Abundancia relativa de } H. \text{ pylori}$$

En la Figura 11 se observa la abundancia relativa del número de copias observadas para los microorganismos de estudio. Donde hay una sobreabundancia de *C. acnes* aún en los pacientes 26-28, donde hay presencia de *H. pylori*.



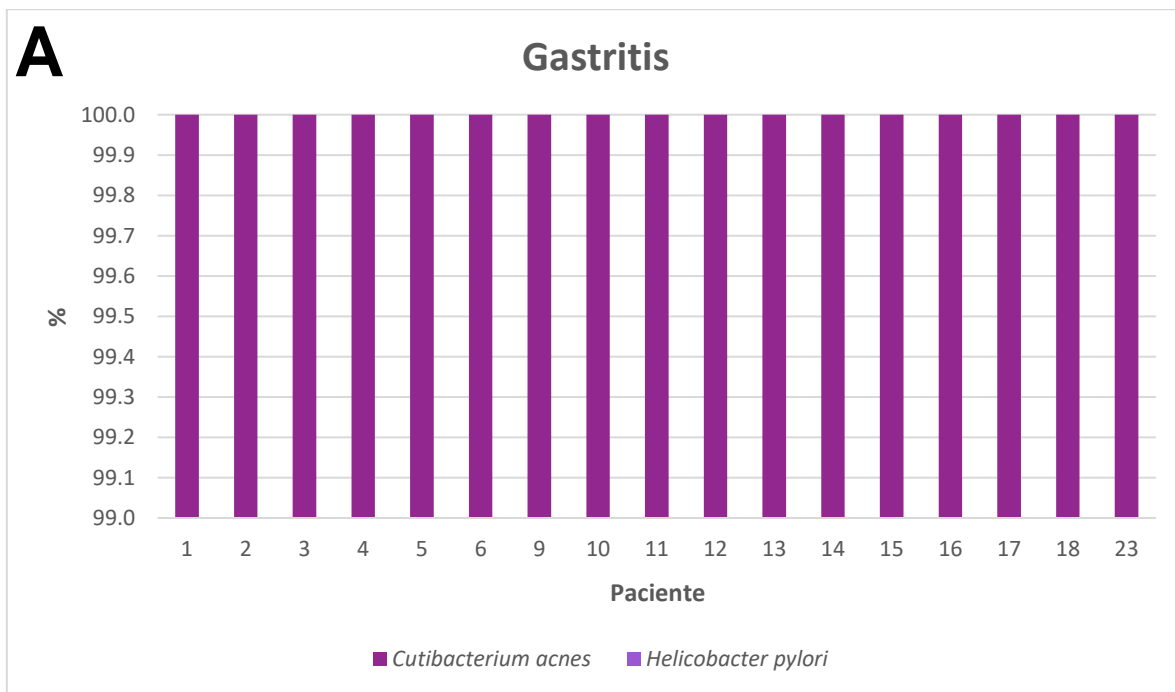
**Figura 11.** Abundancia relativa de *C. acnes* y *H. pylori* en pacientes con enfermedades gástricas. En pacientes (24-29) con gastropatías se observa la presencia de ambos microorganismos. Mientras que en los pacientes 1- 23 se observan abundancias relativas dominantes de *C. acnes*. En pacientes con metaplasia (30-40) no se observa la presencia de ninguno de los microorganismos estudiados.

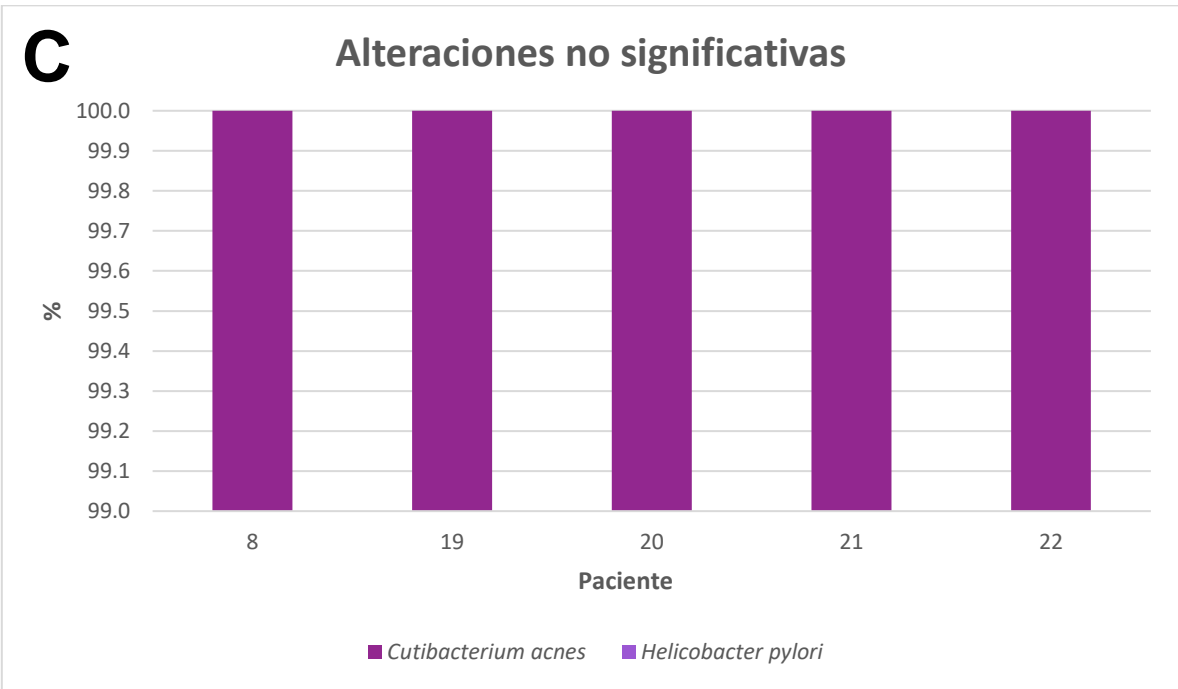
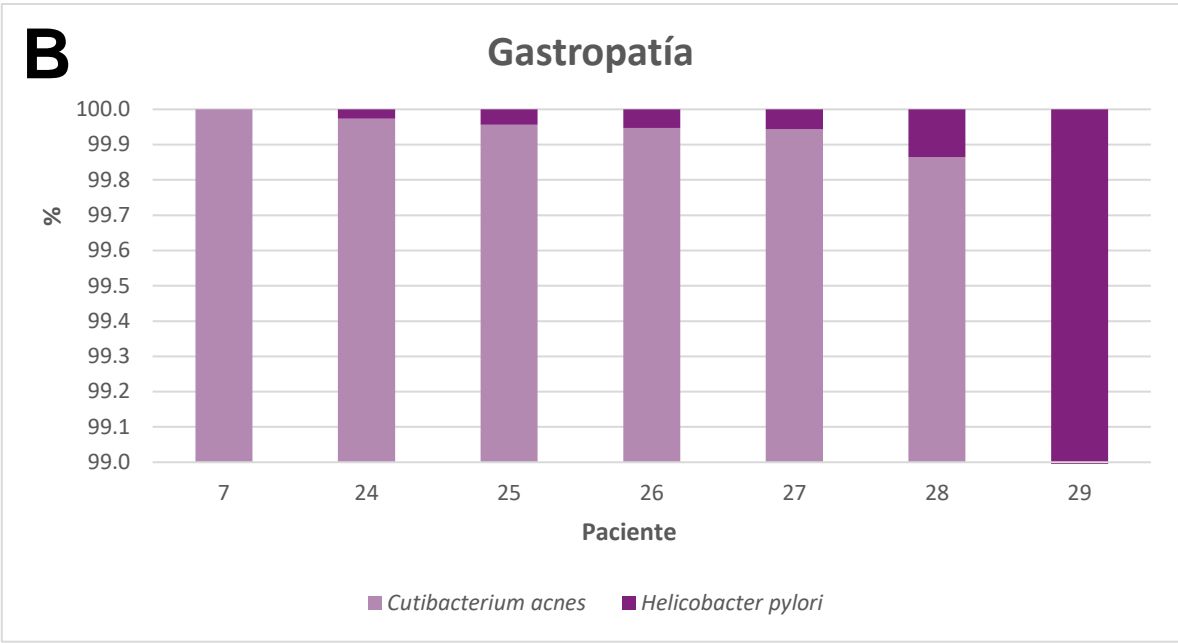


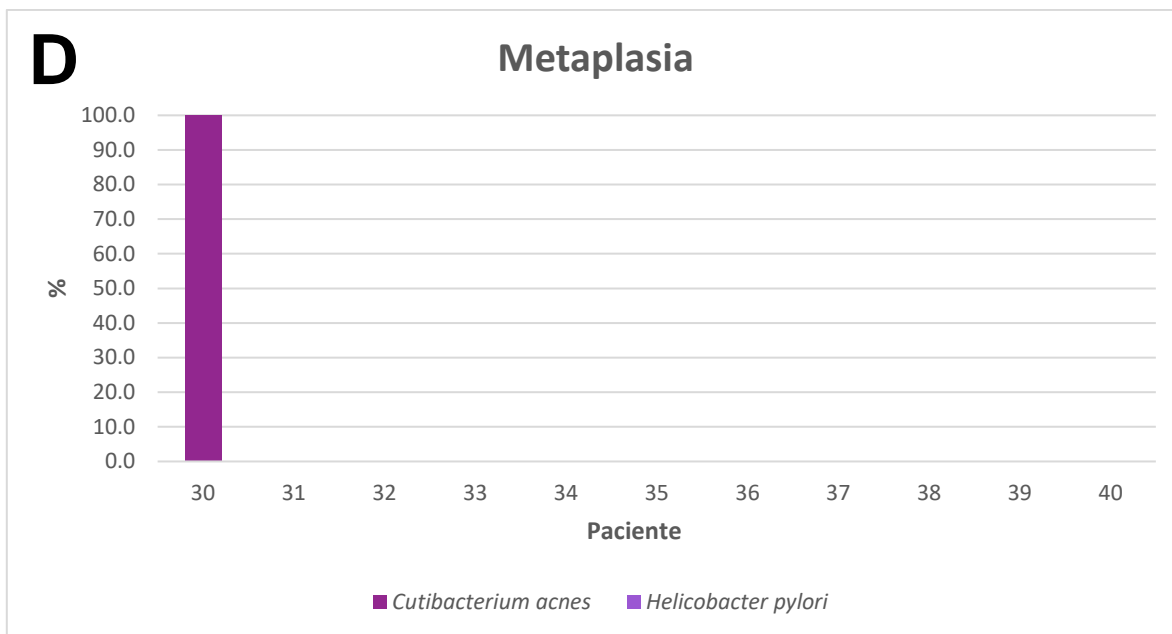
La Figura 12 presentan las abundancias relativas por enfermedad. La Figura 12A detalla la presencia exclusiva de *C. acnes* en gastritis. Como se observa en la misma figura, no se encontraron secuencias representativas de *H. pylori*. Caso similar se presentó en los pacientes con alteraciones no significativas observado en la Figura 12C.

Por el contrario, ambos microorganismos se encontraron en los pacientes con gastropatías (Figura 12B). Sin embargo, el número de copias de *H. pylori* fue determinado <1%, en comparación con *C. acnes*, que presentó abundancias relativas >99%.

Finalmente, en los pacientes con metaplasia intestinal (Figura 12D) no se observó la presencia de ninguno de los microorganismos estudiados a excepción del paciente 30, con presencia exclusiva de *C. acnes*.







**Figura 12.** Abundancias relativas de *C. acnes* y *H. pylori* ordenadas por enfermedad. **A.** Pacientes con gastritis con diferentes niveles de daño; se observa una total dominancia de *C. acnes*, así como total ausencia de *H. pylori*. **B.** Pacientes con gastropatía en diferentes ubicaciones del estómago; se observa presencia de *H. pylori* pero aún con una abundancia dominante de *C. acnes*. **C.** Pacientes con diferentes niveles de daño en tejido gástrico, se observa una abundancia dominante solo de *C. acnes*. **D.** Pacientes con metaplasia; se observa solo abundancia dominante total de *C. acnes* en el paciente 30, en los pacientes restantes hay una ausencia total de ambos microorganismos.

### 7.3 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 25. Se realizó un análisis para obtener el tipo de distribución de los datos de estudio, a través de la prueba de Shapiro-Wilk (Tabla 17).

**Tabla 17.** Significancia para la prueba de Shapiro-Wilk

|  | Estadístico | Significancia |
|--|-------------|---------------|
| Número de copias de <i>Cutibacterium acnes</i> | 0.713       | 0.000         |

|   |       |       |
|---|-------|-------|
| Número de copias de<br><i>Helicobacter pylori</i> | 0.452 | 0.000 |
|---|-------|-------|

Al tener una  $p < 0.05$  se concluyó que los datos no siguen una distribución normal.

La relación de los valores de número de copias por microorganismo de estudio se analizó con la prueba de Mann Whitney (U) bajo un intervalo de confianza del 95%. Al presentar un valor  $p < 0.05$  (Tabla 18), se rechaza la hipótesis de que número de copias es similar para ambos microorganismos. Por lo que se acepta que existe una diferencia estadísticamente significativa entre el número de copias entre *C. acnes* y *H. pylori*.

Por lo tanto, la diferencia entre el número de copias de ambos microorganismos es mayor de lo esperado y hay factores que influyen en dicha diferencia.

**Tabla 18.** Significancia del número de copias de *C. acnes* y *H. pylori* por la prueba de Mann Whitney (U).

| Metrica        | Microorganismo             |                            |
|----------------|----------------------------|----------------------------|
|                | <i>Cutibacterium acnes</i> | <i>Helicobacter pylori</i> |
| <b>n</b>       | 29                         | 6                          |
| <b>Mediana</b> | 157,942,606.40             | 11,973.67                  |
| <b>P25</b>     | 36,511,873.51              | 9478.76                    |
| <b>P75</b>     | 230,486,322.70             | 12,922.57                  |
| <b>p</b>       | <0.001                     |                            |

*n*= tamaño de muestra

*p*= valor de *p*

P25= percentil 25

P75= percentil 75

## Pacientes con gastropatía

Por otro lado, *H. pylori* presentó secuencias representativas en pacientes con gastropatías. Por ello también se determinó la significancia de la presencia de ambos transcritos en pacientes con gastropatía, a través de la prueba de Mann-Whitney (Tabla 19). Al presentar un valor  $p < 0.05$  se determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa entre el número de copias entre *C. acnes* y *H. pylori* a pesar de la presencia de ambos microorganismos en el grupo de pacientes con gastropatías. Con una presencia dominante de *C. acnes*.

**Tabla 19.** Significancia para la prueba de U de Mann Whitney del número de copias de *C. acnes* y *H. pylori* en el grupo de pacientes diagnosticados con gastropatía.

| Medida   | Microorganismo             |                            |
|----------|----------------------------|----------------------------|
|          | <i>Cutibacterium acnes</i> | <i>Helicobacter pylori</i> |
| Mediana  | 16,915,313.11              | 11,383.78                  |
| P25      | 8,383,738.74               | 6807.32                    |
| P75      | 36,511,872.51              | 12,922.57                  |
| <i>p</i> | 0.017                      |                            |

*n*= tamaño de muestra

*p*= valor de *p*

P25= percentil 25

P75= percentil 75

## Número de copias de *C. acnes* por enfermedad

Finalmente, se determinó la significancia estadística de la presencia de *C. acnes* y *H. pylori* en las enfermedades de estudio, a través de la prueba de Kruskal-Wallis (Tabla 20). Al tener una  $p < 0.05$  se determinó una diferencia estadísticamente significativa entre el número de copias de *C. acnes* en las 4 enfermedades gástricas, en comparación con la presencia de *H. pylori*.

**Tabla 20.** Significancia para la prueba de Kruskal-Wallis del número de copias de C. acnes en enfermedades gástricas.

| Medida         | Enfermedad     |               |                                |            |
|----------------|----------------|---------------|--------------------------------|------------|
|                | Gastritis      | Gastropatías  | Alteraciones no significativas | Metaplasia |
| <b>Mediana</b> | 157,942,606.40 | 19,388,023.30 | 221,339,080.30                 | <1         |
| <b>P25</b>     | 94,564,890.45  | 12,826,312.73 | 202,746,241.91                 | <1         |
| <b>P75</b>     | 272,850,376.48 | 36,511,872.51 | 230,486,321.70                 | <1         |
| <b>p</b>       | <0.001         |               |                                |            |

*p*= valor de *p*

*P25*= percentil 25

*P75*= percentil 75

## 8. Discusión

---

*Helicobacter pylori* es un bacilo Gram negativo asociado a enfermedades gástricas. Sin embargo, dichas enfermedades van más allá de la relación con un solo agente etiológico. Por otra parte, *Cutibacterium acnes* es un bacilo Gram positivo que, a pesar de presentar múltiples beneficios en la piel, es conocido por ocasionar acné bajo condiciones disbióticas y que recientemente ha sido encontrado en pacientes con enfermedades gástricas, como gastritis, gastropatía, metaplasia y cáncer gástrico.

En el presente trabajo, todos los pacientes estudiados fueron diagnosticados con distintas enfermedades gástricas y alteraciones histológicas no significativas, con base en la clasificación de Sydney. Aunque varios estudios han determinado una asociación de la infección por *H. pylori* con el desarrollo de las enfermedades anteriormente mencionadas (26), en los resultados obtenidos, *C. acnes* presentó abundancias relativas dominantes en pacientes con gastritis y alteraciones no significativas. Sin embargo, *H. pylori* fue determinado como ausente en pacientes con estas alteraciones histológicas, con excepción de los pacientes diagnosticados con gastropatías. A pesar de ser negativos a infección por *H. pylori*, algunos pacientes se habían diagnosticado con esta infección. Por ello, se sugiere considerar las diferentes técnicas para identificación de esta bacteria y facilitar su diagnóstico.

La identificación de *H. pylori* para el apoyo en el diagnóstico clínico puede realizarse por varios métodos. El uso de estos métodos depende del entorno clínico de cada paciente, ya que cada una de las pruebas presenta variaciones en sensibilidad y especificidad, principalmente asociadas al grado de invasión para el paciente. El desarrollo de diferentes métodos para el diagnóstico de *H. pylori* puede representar ventajas y desventajas. La mayoría de estos métodos presentan índices de falsos positivos y/o negativos. La prueba de aliento para urea, considerada no invasiva, ha mostrado un índice alto de falsos negativos. En el estudio realizado por Best LMJ, *et al* (27), determinaron una incidencia entre 52 a 146 falsos negativos por cada

1000 pacientes de estudio. Estos resultados pueden deberse al uso y abuso en el consumo de inhibidores de la bomba de protones (IBPs), antimicrobianos y en aquellos que presentan gastritis cuerpo-predominante, estos fármacos inhiben la secreción de ácido y la actividad de la ureasa, considerada un factor de virulencia necesario para el establecimiento de esta bacteria en el microambiente gástrico. Por otro lado, la acción de los IBPs induce un ambiente disbiótico, lo que, resulta en la reducción de la carga microbiana en el órgano, aumentando la posibilidad de falsos negativos y la no detección de infecciones activas. La prueba rápida de ureasa (RUT), que detecta esta enzima a partir de biopsias gástricas, presenta falsos positivos, aunque los tejidos analizados estén libres de *H. pylori* se ha reportado microbiota gastrointestinal con actividad urealítica, como *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter cloacae* (28). Adicionalmente, también se han reportado falsos negativos principalmente asociados a una carga microbiana significativamente baja por el abuso de antibióticos e IBPs (29).

La prueba de antígeno en heces también se ve influenciada por factores endógenos, como la presencia de úlceras sangrantes y factores ambientales, como el abuso de IBPs y manipulación de las muestras de heces, ya que si esta no es la adecuada puede afectar a la integridad de la muestra ocasionando falsos negativos. Las pruebas de detección de anticuerpos presentan la ventaja de no verse afectadas por los factores anteriormente mencionados. aspectos gastrointestinales o el uso de medicamentos IBPs y antimicrobianos. Sin embargo, estas pruebas no presentan la sensibilidad y/o especificidad necesaria para diferenciar entre una infección aguda o crónica (29).

Los exámenes histopatológicos permiten, a través de un estudio endoscópico, la clasificación de daño histológico. Estos estudios complementan el diagnóstico clínico de enfermedades infecciosas gástricas en las que la presencia de *H. pylori* se considera como agente etiológico autolimitante. La detección de esta bacteria se realiza por tinciones de rutina (como hematoxilina y eosina, Giemsa, azul de toluidina, naranja de acridina, McMullen, Romanowski e inmunohistoquímica)



gracias a su alta sensibilidad y especificidad. Sin embargo, en ocasiones *H. pylori* suele no ser identificado por estas pruebas diagnósticas invasivas, lo cual ha permitido cuestionar el papel de la microbiota nativa en el inicio y desarrollo de estas enfermedades. A pesar de que *H. pylori* es considerado un microorganismo de alta prioridad por la OMS, recientemente se ha descartado su papel como patógeno en pacientes diagnosticados con enfermedades gástricas y libres de la infección con este microorganismo (30).

A través de evaluación histopatológica, que es considerada estándar de oro para diagnóstico de *H. pylori*, todos los sujetos de estudio presentaron sintomatología y alteraciones histológicas asociadas a infección por *H. pylori*, sin embargo, fueron determinados *H. pylori* negativos por PCR en tiempo real. A pesar de que la identificación de inflamación inespecífica de la mucosa gástrica está directamente relacionada a la presencia de *H. pylori* muchas veces el diagnóstico presenta una baja especificidad, como la identificación género o especie-específica de formas bacilares de *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* y *Proteus mirabilis*, que pueden ser fácilmente confundidas con *H. pylori* (31). Por ello, es necesario estandarizar técnicas que demuestren un alto porcentaje de sensibilidad y especificidad para interpretar los resultados obtenidos y complementar el diagnóstico clínico, como la RT-qPCR (29).

A pesar de que la detección de *H. pylori* por PCR en tiempo real es un método invasivo, ya que involucra el uso de muestras biológicas gástricas ha demostrado una especificidad y sensibilidad cercana al 100%, con la capacidad para detectar infecciones ocultas (29).

La cuantificación de material genético por RT-qPCR es una técnica ampliamente utilizada en la que puede emplearse DNA o RNA. Sin embargo, el uso de DNA presenta algunas desventajas, como: 1) la eficiencia de la reacción, dependiente del tipo de extracción utilizado, ya que una mala extracción puede resultar en posibles falsos negativos; 2) contaminaciones, el uso de muestras biológicas para diagnóstico clínico involucra el arrastre de microbiota nativa, adicional a los protocolos de esterilización de material quirúrgico para endoscopia, que si no se

procesa adecuadamente, inducen contaminación cruzada inter-sujeto, lo que influye de manera directa en el diagnóstico clínico del paciente (32); 3) la no distinción de organismos metabólicamente activos durante la toma de muestra (33). Para definir la presencia y actividad metabólica de *C. acnes* y *H. pylori* durante el estado de enfermedad y sintomatología de los pacientes de estudio, se empleó RNA total. Se ha observado en estudios metagenómicos que el empleo de DNA no garantiza que los perfiles microbianos correspondan a células metabólicamente activas. Por tal motivo, al emplear RNA, se está determinando el número de transcritos de un microorganismo específico, lo que puede ser interpretado como sinónimo de actividad metabólica presente durante un proceso infeccioso (33).

Durante un estudio endoscópico para evaluación histopatológica, se pueden presentar alteraciones no significativas, que pueden incluir cambios mínimos en el tejido gástrico del fondo y cuerpo del estómago. Estas alteraciones histológicas son consideradas reversibles debido al nivel de daño. *C. acnes* fue considerado dominante en pacientes con estas alteraciones, sugiriendo que su presencia en estadios tempranos de la enfermedad puede contribuir al completo desarrollo de la enfermedad.

La gastritis, tanto aguda como crónica, por años ha sido atribuida a la infección por *H. pylori*. Los pacientes incluidos en el estudio actual presentan diferentes tipos de gastritis (folicular, nodular, atrófica y no atrófica), las cuales presentan alteraciones histológico-específicas, como infiltrados celulares (monocitos y linfocitos), formación de folículos linfoides con centro en la mucosa gástrica (34), pérdida de glándulas e inflamación crónica. Estas alteraciones inducen cambios significativos en el microambiente gástrico, incluyendo las comunidades bacterianas nativas órgano-específicas (35, 36).

Las comunidades bacterianas gástricas presentan dominancia por los filos Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y Fusobacteria, que principalmente presentan funciones relacionadas con la regulación del crecimiento bacteriano. Sin embargo, se ha reportado que, en un microambiente no regulado, como un órgano bajo un estado disbiótico por cambios en la acidez del estómago y

moco gástrico (5), generalmente hay eventos de colonización en el tejido gástrico por microorganismos que inicialmente no sobrevivirían en un entorno regulado, como especies de los géneros *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y la especie recientemente descrita en estómago *Cutibacterium acnes* (37).

*C. acnes* presenta múltiples características que le permiten adaptarse a su entorno. Estas características incluyen a la formación de biopelícula, capacidad de crecer y tolerar cantidades limitadas de oxígeno (38). También se ha demostrado la capacidad de esta bacteria como productora de nitrato reductasa, para formación de N-nitrosaminas (N-NA), producto involucrado en el inicio y desarrollo de enfermedades gástricas (37). Los nitratos se encuentran presentes en los alimentos que se consumen de manera cotidiana. Son utilizados como aditivos en carnes procesadas, por lo que este compuesto puede encontrarse fácilmente en el estómago (39). Las bacterias reductoras de nitratos como *C. acnes* reducen el sustrato por acción de la enzima nitrato reductasa. *C. acnes* emplea el nitrato como aceptor final de electrones para producción de nitritos y ATP (40). El nitrito reacciona con aminas secundarias para finalmente formar N-nitrosaminas (N-NA), factor importante para el desarrollo de enfermedades gástricas, especialmente cáncer gástrico. Por ello, se sugiere en este estudio la posible contribución del metabolismo de *C. acnes* en el avance de la enfermedad gástrica, adicional al estilo de vida del hospedero (41).

*C. acnes* produce citocinas proinflamatorias como la interleucina 15 (IL-15), que está presente en altas concentraciones en la mucosa gástrica de pacientes con gastritis (17). Este biomarcador se ha identificado en altos niveles en presencia de *C. acnes*, sugiriendo a esta bacteria como posible agente causal de gastritis. Por lo tanto, en el estudio actual *C. acnes* puede contribuir al desarrollo de la gastritis aún en ausencia de *H. pylori* (42).

Los pacientes diagnosticados con gastropatías también presentan daño en la mucosa gástrica, pero sin los componentes inflamatorios característicos de la gastritis además de la presencia de tejido regenerativo. Esta enfermedad, a pesar

de no ser 100% atribuible a la presencia de *H. pylori*, es considerada un riesgo para el establecimiento y colonización por esta bacteria para desarrollo de ulceraciones (43).

De acuerdo con los resultados, la presencia de *C. acnes* y *H. pylori* fue positiva pero variable, ya que *C. acnes* presentó una sobreabundancia >99%. A pesar de que la presencia de *H. pylori* en los pacientes con gastropatía implica una alteración de la composición y función de la microbiota gástrica al presentar abundancias relativas >90%, el estudio actual demuestra que *C. acnes* es capaz de sobrecrecer en un entorno disbiótico (44).

Existe evidencia de que en pacientes *H. pylori* positivos, la abundancia relativa de *C. acnes* presenta un máximo de 3.1% en comparación con pacientes *H. pylori* negativos donde se han determinado > 46.8%. En el presente estudio, los pacientes con gastropatías presentaron presencia de ambos microorganismos, sin embargo, la diferencia entre las abundancias relativas de *C. acnes* de pacientes *H. pylori* negativos y *H. pylori* positivos no fue significativa, ya que, el número de copias determinado para *C. acnes* fue similar en ambos casos, por lo que la presencia de *C. acnes* no se ve directamente relacionada con la presencia de *H. pylori* (45).

El tejido regenerativo, de acuerdo con la cascada de Correa suele transicionar a tejido metaplásico intestinal. Esta transición involucra un cambio histológico importante, ya que, hay reemplazo de tejido mucosal gástrico por tejido epitelial intestinal. Los pacientes con metaplasia presentan ausencia de *C. acnes* y *H. pylori* (46).

Durante la transición de epitelio gástrico sano a tejido metaplásico se presenta pérdida de células parietales, y ausencia de células secretoras de enzimas digestivas. Las células metaplásicas también expresan un polipéptido espasmódico (SPEM) (47) con sobreproducción de moco que contiene mucina 6 (Muc6) y el péptido TFF2. (48) La interacción de estas moléculas permite la estabilización de la mucosa gástrica, mientras que disminuye la capacidad de colonización por *H. pylori*

debido a que la mucina tiene un efecto contra *H. pylori*. En concentraciones habituales de Muc6, *H. pylori* puede inhibir la producción de esta molécula debido a la liberación de ureasa al medio extracelular. La liberación de esta enzima basicifica el pH del microambiente gástrico, induciendo la licuefacción de la mucina. Esta situación no sucede en un entorno de metaplasia, lo que explica la ausencia de *H. pylori* en las muestras de los pacientes con esta enfermedad (49).

El estudio comparativo de Li Q *et al*, determinó las características entre comunidades microbianas de sujetos sanos y pacientes con cáncer gástrico. Los autores determinaron una sobreabundancia de *C. acnes* en pacientes con esta enfermedad, especialmente en pacientes con cáncer gástrico *H. pylori* negativos. Sin embargo, *C. acnes* estuvo ausente en casi todos los pacientes con metaplasia al igual que los pacientes de este estudio (14).

Esta ausencia puede deberse a las alteraciones microambientales en tejido metaplásico, que pueden disminuir la diversidad y riqueza de especies, incluso inhibir el crecimiento de algunos microorganismos de acuerdo con el avance en la enfermedad (50).

Actualmente, existen reportes escasos de enfermedades gástricas inducidas por bacterias no *H. pylori*. La información de estos microorganismos y sus posibles mecanismos asociados a daño histológico son limitados. Por ello, es importante elucidar las características de *C. acnes* bajo el estado de salud/enfermedad del hospedero, para determinar su papel en el microbioma humano.

## 9. Conclusiones

---

En conclusión, los resultados obtenidos indican lo siguiente:

- La presencia de *C. acnes* en el estómago no es dependiente de la presencia de *H. pylori*.
- Se demostró una correlación entre la presencia de *C. acnes* y el desarrollo de enfermedades gástricas.

- El microambiente gástrico específico en cada enfermedad gástrica es determinante para los microorganismos que se encuentran presentes.

## 10. Perspectivas

---

El papel de *H. pylori* en las enfermedades gástricas ha sido investigado desde el descubrimiento de esta bacteria. Sin embargo, la presencia de otras bacterias en el estómago y su papel como patógenos no ha sido tan ampliamente estudiada.

*Cutibacterium acnes* es una bacteria estudiada por su importancia en la microbiota de la piel, pero su presencia no se limita a este órgano. Debido a sus características, es un microorganismo que puede verse involucrado en la patogenicidad en el sitio anatómico donde se encuentre. Es por eso de la importancia del estudio de su comportamiento; esta investigación puede continuarse utilizando las mismas técnicas de biología molecular, empleando genes que codifiquen para los factores de virulencia que posee el microorganismo. De esta manera, si estos genes son expresados en el estómago, se tendría una visión más completa acerca del papel de *C. acnes* en las distintas enfermedades gástricas.

# 11. Referencias

---

1. Cristina Moreno del Castillo M, Valladares-García J, Halabe-Cherem J. Microbioma humano. 2018; 61.
2. Clark DP, Pazdernik NJ, McGehee MR. Molecular biology. Mol Biol; 1–1006.
3. Alarcón T, Llorca L, Perez-Perez G. Impact of the Microbiota and Gastric Disease Development by *Helicobacter pylori*. Curr Top Microbiol Immunol. 2020;400:253–75.
4. Dagnelie MA, Corvec S, Khammari A, Dréno B. Update on *Cutibacterium acnes*. Updates in Clinical Dermatology. Springer. 2021.
5. Huether SE. Estructura y función del aparato digestivo. En: Fisiopatología Bases biológicas de la enfermedad en adultos y niños. 8a ed. México: Editorial Medica Panamericana; 2020. p. 1293–315.
6. Gravina AG, Zagari RM, De Musis C, Romano L, Loguercio C, Romano M. *Helicobacter pylori* and extragastric diseases: A review. World J Gastroenterol. 2018; 24(29):3204–21.
7. De Brito BB, Da Silva FAF, Soares AS, Pereira VA, Cordeiro Santos ML, Sampaio MM, et al. Pathogenesis and clinical management of *Helicobacter pylori* gastric infection. World J Gastroenterol. 2019;25(37):5578.
8. Jiang I, Yong PJ, Allaire C, Bedaiwy MA. Intricate Connections between the Microbiota and Endometriosis. Int J Mol Sci. 2021;22(11).
9. Otuya DO, Verma Y, Farrokhi H, Higgins L, Rosenberg M, Damman C, et al. Non-endoscopic biopsy techniques: a review. Expert review of Gastroenterology & Hepatology. 2017;12(2):109–17.
10. Sipponen P, Price AB. The Sydney System for classification of gastritis 20 years ago. Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia). 2011;26(SUPPL. 1):31–4.



11. Şenocak Taşçı E, Akbaş T, Taşçı EŞ. The Relationship between the Sydney Classification and the First-Line Treatment Efficacy in Helicobacter-Associated Gastritis Highlights of the Study. *Clínica Médica Princ.* 2020; 29(6):551-557.
12. Rollán A, Cortés P, Calvo A, Araya R, Bufadel E, González R, et al. Diagnóstico precoz de cáncer gástrico. Propuesta de detección y seguimiento de lesiones premalignas gástricas: protocolo ACHED Recommendations of the Chilean association for digestive endoscopy for the management of gastric pre-malignant lesions. *Rev Med Chile.* 2014;142:1181–92.
13. Villalobos Pérez J de J. Principios de Gastroenterología. 4a ed. México: Méndez Editores; 2015.
14. Li Q, Wu W, Gong D, Shang R, Wang J, Yu H. *Propionibacterium acnes* overabundance in gastric cancer promote M2 polarization of macrophages via a TLR4/PI3K/Akt signaling. *Gastric Cancer.* 2021;24(6):1242–53.
15. Brüggemann H, Salar-Vidal L, Gollnick HPM, Lood R. A Janus-Faced Bacterium: Host-Beneficial and -Detrimental Roles of *Cutibacterium acnes*. *Front Microbiol.* 2021;12.
16. Rozas M, Hart De Ruijter A, Fabrega MJ, Zorgani A, Guell M, Paetzold B, et al. From Dysbiosis to Healthy Skin: Major Contributions of *Cutibacterium acnes* to Skin Homeostasis. *Microorganisms.* 2021; 9(3):628.
17. Neranjan Gunathilake M, Lee J, Choi J, Kim YI, Ahn Y, Kim J. Association between the relative abundance of gastric microbiota and the risk of gastric cancer: a case-control study. *Sci Rep.* 2021; 11: 21669.
18. Boisrenoult P. *Cutibacterium acnes* prosthetic joint infection: Diagnosis and treatment. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research.* 2018; 104:19–24.

19. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en discapacidad. 2013;2(2):70–8.
20. Green MR, Sambrook J. Analysis of DNA by Agarose Gel Electrophoresis. Cold Spring Harb Protoc. 2019; (1):6–15.
21. Rocha DJPG, Castro TLP, Aguiar ERGR, Pacheco LGC. Gene Expression Analysis in Bacteria by RT-qPCR. Methods Mol Biol. 2020;2065:119–37.
22. Martín A, Bejar V, Gutierrez JC, Llagostera M, Quesada E. Microbiología esencial. Madrid, España: Editorial Medica Panamericana; 2019.
23. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. J Microbiol Methods. 2007;69(2):330–9.
24. Miura Y, Ishige I, Soejima N, Suzuki Y, Uchida K, Kawana S, et al. Quantitative PCR of *Propionibacterium acnes* DNA in samples aspirated from sebaceous follicles on the normal skin of subjects with or without acne. J Med Dent Sci. 2010;57(1):65–74.
25. Roshdy T, Saleh SA, Abass N, Bassiouny K, Khalil H. Disturbing intracellular replication of *Helicobacter pylori* by sorafenib treatment in-vitro. African Journal of Biological Sciences. 2021;17(1):285–95.
26. Wang F, Meng W, Wang B, Qiao L. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. Cancer Lett. 2014;345(2):196–202.
27. Best LMJ, Takwoingi Y, Siddique S, Selladurai A, Gandhi A, Low B, et al. Non-invasive diagnostic tests for *Helicobacter pylori* infection. Cochrane Database Syst Rev. 2018;2018(3).
28. Osaki T, Mabe K, Hanawa T, Kamiya S. Urease-positive bacteria in the stomach induce a false-positive reaction in a urea breath test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. J Med Microbiol. 2008;57(7):814–9.

29. Ansari S, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* Infection, Its Laboratory Diagnosis, and Antimicrobial Resistance: a Perspective of Clinical Relevance. Clin Microbiol Rev. 2022;35(3).
30. Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. [citado el 3 de noviembre de 2023]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms>
31. Skrebinska S, Megraud F, Daugule I, Santare D, Isajevs S, Liepniece-Karele I, et al. Who Could Be Blamed in the Case of Discrepant Histology and Serology Results for *Helicobacter pylori* Detection?. Diagnostics. 2022;12(1):133.
32. Lima A, França A, Muzny CA, Christopher ., Taylor M, Cerca N. MINI-REVIEW DNA extraction leads to bias in bacterial quantification by qPCR. Appl Microbiol Biotechnol. 2023;1:3.
33. Xaio H, Gillespie SH. Using RT qPCR for Quantifying *Mycobacteria marinum* from In Vitro and In Vivo Samples. Methods Mol Biol. 2018;1736:137–45.
34. Relación entre Histología y Prueba de Aliento Cuantitativa en Gastritis Folicular (*Helicobacter pylori*). Gen. 2012; 66(3): 166-170.
35. Okamoto K, Kodama M, Mizukami K, Okimoto T, Abe H, Ogawa R, et al. Immunohistochemical differences in gastric mucosal damage between nodular and non-nodular gastritis caused by *Helicobacter pylori* infection. J Clin Biochem Nutr. 2021;69(2):216.
36. Rodriguez-Castro KI, Franceschi M, Noto A, Miraglia C, Nouvenne A, Leandro G, et al. Clinical manifestations of chronic atrophic gastritis. Acta Bio Medica.2018; 89(Suppl 8):88.
37. Stewart OA, Wu F, Chen Y. The role of gastric microbiota in gastric cancer. Gut Microbes. 2020; 11(5): 1220-1230.

38. Mayslich C, Grange PA, Dupin N, Brüggemann H. *Cutibacterium acnes* as an Opportunistic Pathogen: An Update of Its Virulence-Associated Factors. *Microorganisms*. 2021; 9(2):303.
39. Song P, Wu L, Guan W. Dietary Nitrates, Nitrites, and Nitrosamines Intake and the Risk of Gastric Cancer: A Meta-Analysis. *Nutrients*. 2015; 7(12):9872-95.
40. Altemani F, Barrett HL, Callaway LK, McIntyre HD, Nitert MD. Reduced Abundance of Nitrate-Reducing Bacteria in the Oral Microbiota of Women with Future Preeclampsia. *Nutrients*. 2022; 14(6): 1139.
41. Shpaizer A, Nussinovich A, Kanner J, Tirosh O. S-Nitroso-N-acetylcysteine Generates Less Carcinogenic N-Nitrosamines in Meat Products than Nitrite. *J Agric Food Chem*. 2018;66(43):11459–67.
42. Montalban-Arques A, Wurm P, Trajanoski S, Schauer S, Kienesberger S, Halwachs B, et al. *Propionibacterium acnes* overabundance and natural killer group 2 member D system activation in corpus-dominant lymphocytic gastritis. *J Pathol*. 2016;240(4):425.
43. Roldán MV. Gastritis y Gastropatías. *Rev Gastroenterol*. 2011; 31-1:38-48.
44. Gundogdu O, Velazquez-Guadarrama N, Gómez Children F, of México H, Kathryn Haley M, Zhao M, et al. Gastric microbiota dysbiosis and *Helicobacter pylori* infection. *Front Microbiol*. 2023;14:1153269.
45. Liatsos C, Papaefthymiou A, Kyriakos N, Galanopoulos M, Doulberis M, Giakoumis M, et al. *Helicobacter pylori*, gastric microbiota and gastric cancer relationship: Unrolling the tangle. *World J Gastrointest Oncol*.2022;14(5):959.
46. Burkitt MD, Duckworth CA, Williams JM, Pritchard DM. *Helicobacter pylori*-induced gastric pathology: insights from in vivo and ex vivo models. *Dis Model Mech*. 2017; 10(2):89-104.
47. Giroux V, Rustgi AK. Metaplasia: tissue injury adaptation and a precursor to the dysplasia-cancer sequence. *Nature*. 2017; 594-604.

48. Meyer AR, Goldenring JR, Barrett K, Petersen O, Meyer AR, Goldenring JR. The Journal of Physiology Injury, repair, inflammation and metaplasia in the stomach Epithelial damage SPEM formation Mucus hypersecretion Alternative macrophage activation. The Authors The Journal of Physiology C. 2018;596:17.
49. Niv Y. Helicobacter pylori and gastric mucin expression: A systematic review and meta-analysis Yaron Niv Niv Y. *H. pylori* and gastric mucin. World J Gastroenterol. 2015 ;21(31):9430–6.
50. Jonaitis P, Kupcinskas L, Kupcinskas J. Molecular Alterations in Gastric Intestinal Metaplasia. Int J Mol Ciencia. 2021;22(11).

## 12. Anexos

### 12.1 Valores para construcción de curvas estándar por RT-qPCR

Para la construcción de la curva estándar para *Cutibacterium acnes* y *Helicobacter pylori* se tomaron en cuenta los Ct obtenidos por triplicado, en las tablas se presentan los valores obtenidos para la construcción de estas curvas.

**Tabla 21.** Valores de curva estándar para *Cutibacterium acnes*

| Concentración de cDNA (ng/μL) | Réplica | Log concentración de cDNA | Ct    | Desviación estándar |
|-------------------------------|---------|---------------------------|-------|---------------------|
| 75                            | 1       | 1.875061263               | 26.09 | 0.9774627           |
|                               | 2       | 1.875061263               | 24.31 |                     |
|                               | 3       | 1.875061263               | 25.9  |                     |
| 37.5                          | 1       | 1.574031268               | 25.58 | 0.75480682          |
|                               | 2       | 1.574031268               | 25.42 |                     |
|                               | 3       | 1.574031268               | 24.2  |                     |
| 18.75                         | 1       | 1.273001272               | 26.94 | 0.62864935          |
|                               | 2       | 1.273001272               | 25.94 |                     |
|                               | 3       | 1.273001272               | 25.78 |                     |
| 9.375                         | 1       | 0.971971276               | 27.9  | 0.03605551          |
|                               | 2       | 0.971971276               | 27.88 |                     |
|                               | 3       | 0.971971276               | 27.95 |                     |
| 4.6875                        | 1       | 0.670941281               | 28.89 | 0.3493327           |
|                               | 2       | 0.670941281               | 29.14 |                     |

|  |   |             |       |
|--|---|-------------|-------|
|  | 3 | 0.670941281 | 28.45 |
|--|---|-------------|-------|

**Tabla 22.** Valores de curva estándar para *Helicobacter pylori*

| Concentración de cDNA (ng/μL) | Réplica | Log concentración de cDNA | Ct    | Desviación estándar |
|-------------------------------|---------|---------------------------|-------|---------------------|
| <b>100</b>                    | 1       | 2                         | 10.26 | 0.08544004          |
|                               | 2       | 2                         | 10.09 |                     |
|                               | 3       | 2                         | 10.16 |                     |
| <b>10</b>                     | 1       | 1                         | 13.42 | 0.09073772          |
|                               | 2       | 1                         | 13.49 |                     |
|                               | 3       | 1                         | 13.31 |                     |
| <b>1</b>                      | 1       | 0                         | 17.4  | 0.2557994           |
|                               | 2       | 0                         | 16.99 |                     |
|                               | 3       | 0                         | 17.46 |                     |
| <b>0.1</b>                    | 1       | -1                        | 20.17 | 0.31754265          |
|                               | 2       | -1                        | 19.62 |                     |
|                               | 3       | -1                        | 19.62 |                     |

## 12.2 Determinación de número de copias y abundancia relativa de *C. acnes* y *H. pylori*

**Tabla 23.** Detalles en la obtención de número de número de copias de *Cutibacterium acnes* y *Helicobacter pylori*.





| Paciente | <i>Cutibacterium acnes</i> |                |               |           | <i>Helicobacter pylori</i> |                |               |           | Suma de número de copias | AR <i>C. acnes</i> | AR <i>H. pylori</i> |
|----------|----------------------------|----------------|---------------|-----------|----------------------------|----------------|---------------|-----------|--------------------------|--------------------|---------------------|
|          | Ct                         | Log ng de cDNA | ng/μL de cDNA | Copias/μL | Ct                         | Log ng de cDNA | ng/μL de cDNA | Copias/μL |                          |                    |                     |
| 1        | 27.21                      | 1.1156         | 13.0485       | 9.46E+07  | N/A                        | N/A            | N/A           | N/A       | 9.4565E+07               | 100.0000           | 0.0000              |
| 2        | 29.33                      | 0.4473         | 2.8009        | 3.95E+08  | N/A                        | N/A            | N/A           | N/A       | 3.9549E+08               | 100.0000           | 0.0000              |
| 3        | 24.85                      | 1.8595         | 72.3562       | 1.92E+07  | N/A                        | N/A            | N/A           | N/A       | 1.9230E+07               | 100.0000           | 0.0000              |
| 4        | 29.88                      | 0.2739         | 1.8790        | 5.73E+08  | N/A                        | N/A            | N/A           | N/A       | 5.7326E+08               | 100.0000           | 0.0000              |
| 5        | 28.52                      | 0.7026         | 5.0422        | 2.29E+08  | N/A                        | N/A            | N/A           | N/A       | 2.2894E+08               | 100.0000           | 0.0000              |
| 6        | 27.97                      | 0.8760         | 7.5161        | 1.58E+08  | N/A                        | N/A            | N/A           | N/A       | 1.5794E+08               | 100.0000           | 0.0000              |
| 7        | 25.04                      | 1.7996         | 63.0353       | 2.19E+07  | N/A                        | N/A            | N/A           | N/A       | 2.1861E+07               | 100.0000           | 0.0000              |
| 8        | 29.01                      | 0.5482         | 3.5332        | 3.19E+08  | N/A                        | N/A            | N/A           | N/A       | 3.1867E+08               | 100.0000           | 0.0000              |
| 9        | 27.11                      | 1.1471         | 14.0308       | 8.84E+07  | N/A                        | N/A            | N/A           | N/A       | 8.8393E+07               | 100.0000           | 0.0000              |
| 10       | 25.63                      | 1.6136         | 41.0776       | 3.26E+07  | N/A                        | N/A            | N/A           | N/A       | 3.2554E+07               | 100.0000           | 0.0000              |
| 11       | 25.57                      | 1.6325         | 42.9060       | 3.13E+07  | N/A                        | N/A            | N/A           | N/A       | 3.1262E+07               | 100.0000           | 0.0000              |
| 12       | 28.79                      | 0.6175         | 4.1449        | 2.75E+08  | N/A                        | N/A            | N/A           | N/A       | 2.7470E+08               | 100.0000           | 0.0000              |
| 13       | 27.3                       | 1.0872         | 12.2233       | 1.00E+08  | N/A                        | N/A            | N/A           | N/A       | 1.0049E+08               | 100.0000           | 0.0000              |
| 14       | 28.87                      | 0.5923         | 3.9111        | 2.90E+08  | N/A                        | N/A            | N/A           | N/A       | 2.8994E+08               | 100.0000           | 0.0000              |
| 15       | 28.78                      | 0.6207         | 4.1751        | 2.73E+08  | N/A                        | N/A            | N/A           | N/A       | 2.7285E+08               | 100.0000           | 0.0000              |
| 16       | 28.53                      | 0.6995         | 5.0058        | 2.30E+08  | N/A                        | N/A            | N/A           | N/A       | 2.3049E+08               | 100.0000           | 0.0000              |
| 17       | 27.26                      | 1.0998         | 12.5834       | 9.78E+07  | N/A                        | N/A            | N/A           | N/A       | 9.7811E+07               | 100.0000           | 0.0000              |



|    |       |        |          |          |       |        |         |          |            |          |          |
|----|-------|--------|----------|----------|-------|--------|---------|----------|------------|----------|----------|
| 18 | 28.53 | 0.6995 | 5.0058   | 2.30E+08 | N/A   | N/A    | N/A     | N/A      | 2.3049E+08 | 100.0000 | 0.0000   |
| 19 | 28.53 | 0.6995 | 5.0058   | 2.30E+08 | N/A   | N/A    | N/A     | N/A      | 2.3049E+08 | 100.0000 | 0.0000   |
| 20 | 28.28 | 0.7783 | 6.0017   | 1.95E+08 | N/A   | N/A    | N/A     | N/A      | 1.9470E+08 | 100.0000 | 0.0000   |
| 21 | 28.34 | 0.7594 | 5.7460   | 2.03E+08 | N/A   | N/A    | N/A     | N/A      | 2.0275E+08 | 100.0000 | 0.0000   |
| 22 | 28.47 | 0.7184 | 5.2286   | 2.21E+08 | N/A   | N/A    | N/A     | N/A      | 2.2134E+08 | 100.0000 | 0.0000   |
| 23 | 27.95 | 0.8823 | 7.6260   | 1.56E+08 | N/A   | N/A    | N/A     | N/A      | 1.5582E+08 | 100.0000 | 0.0000   |
| 24 | 26.21 | 1.4308 | 26.9636  | 4.82E+07 | 13.44 | 1.0254 | 10.6021 | 1.29E+04 | 4.8165E+07 | 99.9732  | 0.0268   |
| 25 | 25.8  | 1.5600 | 36.3093  | 3.65E+07 | 13.75 | 0.9306 | 8.5224  | 1.61E+04 | 3.6528E+07 | 99.9560  | 0.0440   |
| 26 | 24.25 | 2.0486 | 111.8425 | 1.28E+07 | 12.53 | 1.3038 | 20.1262 | 6.81E+03 | 1.2833E+07 | 99.9470  | 0.0530   |
| 27 | 24.66 | 1.9194 | 83.0552  | 1.69E+07 | 13    | 1.1600 | 14.4540 | 9.48E+03 | 1.6925E+07 | 99.9440  | 0.0560   |
| 28 | 23.62 | 2.2472 | 176.6829 | 8.38E+06 | 13.26 | 1.0805 | 12.0352 | 1.14E+04 | 8.3951E+06 | 99.8644  | 0.1356   |
| 29 | N/A   | N/A    | N/A      | N/A      | 13.4  | 1.0376 | 10.9050 | 1.26E+04 | 1.2564E+04 | 0.0000   | 100.0000 |
| 30 | 30.69 | 0.0186 | 1.0438   | 9.90E+08 | N/A   | N/A    | N/A     | N/A      | 9.9033E+08 | 100.0000 | 0.0000   |
| 31 | N/A   | N/A    | N/A      | N/A      | N/A   | N/A    | N/A     | N/A      | 0.0000E+00 | 0.0000   | 0.0000   |
| 32 | N/A   | N/A    | N/A      | N/A      | N/A   | N/A    | N/A     | N/A      | 0.0000E+00 | 0.0000   | 0.0000   |
| 33 | N/A   | N/A    | N/A      | N/A      | N/A   | N/A    | N/A     | N/A      | 0.0000E+00 | 0.0000   | 0.0000   |
| 34 | N/A   | N/A    | N/A      | N/A      | N/A   | N/A    | N/A     | N/A      | 0.0000E+00 | 0.0000   | 0.0000   |
| 35 | N/A   | N/A    | N/A      | N/A      | N/A   | N/A    | N/A     | N/A      | 0.0000E+00 | 0.0000   | 0.0000   |
| 36 | N/A   | N/A    | N/A      | N/A      | N/A   | N/A    | N/A     | N/A      | 0.0000E+00 | 0.0000   | 0.0000   |
| 37 | N/A   | N/A    | N/A      | N/A      | N/A   | N/A    | N/A     | N/A      | 0.0000E+00 | 0.0000   | 0.0000   |
| 38 | N/A   | N/A    | N/A      | N/A      | N/A   | N/A    | N/A     | N/A      | 0.0000E+00 | 0.0000   | 0.0000   |
| 39 | N/A   | N/A    | N/A      | N/A      | N/A   | N/A    | N/A     | N/A      | 0.0000E+00 | 0.0000   | 0.0000   |
| 40 | N/A   | N/A    | N/A      | N/A      | N/A   | N/A    | N/A     | N/A      | 0.0000E+00 | 0.0000   | 0.0000   |

**Ct:** *Ciclo threshold*

**cDNA:** *DNA complementario*

|   |                                |
|---|--------------------------------|
|  | Gastritis                      |
|  | Gastropatías                   |
|  | Alteraciones no significativas |
|  | Metaplasia                     |

***N/A:*** No aplica debido a que se obtuvo un Ct similar al NTC

***AR:*** Abundancia relativa