



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y
AGRICULTURA**

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA
OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:**

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

**TEMA: " IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DE
VIRULENCIA *vacA*, *cagA* Y *oipA* MEDIANTE PCR
MULTIPLEX DE *Helicobacter pylori* EN PACIENTES
POSITIVOS DE LA CLÍNICA AXXIS DE LA CIUDAD
DE QUITO"**

AUTOR: ALBÁN PACCHA ANA CAROLINA

DIRECTOR: TORRES MARBEL, Ph.D.

SANGOLQUÍ

2016



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Que el trabajo titulado "IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DE VIRULENCIA *vacA*, *cagA* Y *oipA* MEDIANTE PCR MULTIPLEX DE *Helicobacter pylori* EN PACIENTES POSITIVOS DE LA CLÍNICA AXXIS DE LA CIUDAD DE QUITO", realizado por ANA CAROLINA ALBÁN PACCHA ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teórico, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la señorita ANA CAROLINA ALBÁN PACCHA para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, abril del 2016.

Marbel Torres, Ph.D.

DIRECTORA



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **ANA CAROLINA ALBÁN PACCHA**, con cedula de identidad N° 1721291597 declaro que este trabajo de titulación “**IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DE VIRULENCIA *vacA*, *cagA* Y *oipA* MEDIANTE PCR MULTIPLEX DE *Helicobacter pylori* EN PACIENTES POSITIVOS DE LA CLÍNICA AXXIS DE LA CIUDAD DE QUITO**”, ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existente, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográfica.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, abril del 2016.

Una firma manuscrita en tinta azul que dice 'Ana Carolina Albán'.

Ana Carolina Albán



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **ANA CAROLINA ALBÁN PACCHA**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación, "**IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DE VIRULENCIA *vacA*, *cagA* Y *oipA* MEDIANTE PCR MULTIPLEX DE *Helicobacter pylori* EN PACIENTES POSITIVOS DE LA CLÍNICA AXXIS DE LA CIUDAD DE QUITO**", cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, abril del 2016.

Ana Carolina Albán

DEDICATORIA

A mi súper heroína, la mujer más fuerte y buena que he conocido, mi ejemplo, mi todo, mi madre.

AGRADECIMIENTO

La paz de Dios sobrepasa todo entendimiento, cuida nuestros corazones y pensamientos.

Filipenses 4:6-7

A mi familia, en especial a mi pequeña hermana por su apoyo y confianza.

A mis profesores, que han sabido inculcar en mí el amor por la ciencia, en especial aquellos que fueron más que profesores y son un ejemplo de personas.

A mis tutoras, mujeres excepcionales; Jennifer García y Marbel Torres.

A mis amigos, en especial a la que siempre es una constante en mi vida, mi apoyo y cómplice, Sandy Escudero.

A mis compañeros de laboratorio, Silvana Quevedo y especialmente a la que gracias a esta hermosa experiencia pude llegar a conocer; Patricia Guevara.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, a sus docentes Alejandro Cabrera, Bernardo Castro y Germán Burgos.

A Cesar Paz y Miño por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo en su laboratorio.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN.....	ii
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN.....	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO	vii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
LISTADO DE ABREVIATURAS	xiv
ABSTRACT.....	xvi
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	2
1.3. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN	3
1.3.1. Objetivo general.....	3
1.3.2. Objetivos específicos	3
1.4. MARCO TEÓRICO	4
1.4.1. <i>Helicobacter pylori</i>	4
1.4.2. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN.....	5
1.4.2.1. Transmisión oral-oral	5
1.4.2.2. Transmisión gastro-oral	6
1.4.2.3. Transmisión feco-oral.....	7
1.4.3. PATOGENÉISIS	7
1.4.4. PATOLOGÍAS GÁSTRICAS RELACIONADAS CON <i>Helicobacter pylori</i>	9

1.4.5. CÁNCER GÁSTRICO	11
1.4.6. GENES DE VIRULENCIA	11
1.4.6.1. <i>VacA</i>	12
1.4.6.2. <i>CagA</i>	14
1.4.6.3. <i>OipA</i>	15
1.4.7. TRATAMIENTO	16
1.4.7.1. Terapia triple	17
1.4.7.2. Terapia cuádruple	17
1.4.7.3. Resistencia a antibióticos	18
1.4.7.4. Vacunas	20
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	21
2.2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN	21
2.3. CUANTIFICACIÓN DE ADN	23
2.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	24
2.5. ELECTROFORESIS	29
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	34
3.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA EL DIAGNÓSTICO DE <i>Helicobacter pylori</i>	36
3.5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL GEN <i>oipA</i>	38
3.6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES <i>vacA</i> y <i>cagA</i>	40
3.7. SECUENCIACIÓN	47
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	50
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	55
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES	56

CAPÍTULO 8: ANEXOS 63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fármacos eficaces en el tratamiento contra <i>H. pylori</i>	18
Tabla 2. Genes implicados en las mutaciones puntuales u otros eventos genéticos que conducen a la resistencia a los antibióticos en <i>Helicobacter pylori</i>	19
Tabla 3: Primers empleados para la amplificación de los genes 16S, <i>vacA</i> , <i>cagA</i> y <i>oipA</i>	24
Tabla 4. Componentes de la MasterMix para la amplificación del gen 16S.	25
Tabla 5. Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación del gen 16S.	25
Tabla 6. Componentes de la MasterMix para la amplificación del gen <i>oipA</i>	26
Tabla 7. Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación del gen <i>oipA</i>	27
Tabla 8. Componentes de la MasterMix para la PCR multiplex utilizadas para la amplificación de los genes <i>vacA</i> y <i>cagA</i>	28
Tabla 9. Condiciones de PCR multiplex para el gen <i>vacA</i> y <i>cagA</i>	28
Tabla 10. Componentes de la MasterMix para la PCR de secuenciación..	31
Tabla 11. Condiciones de PCR de secuenciación.....	32
Tabla 12. Frecuencia de patologías gástricas observadas en el diagnóstico histopatológico.	35
Tabla 13. Frecuencia del gen 16S asociado con el género de los pacientes con <i>Helicobacter pylori</i>	37
Tabla 14. Frecuencia del gen 16S asociado con el género de los pacientes.....	37
Tabla 15. Frecuencia de cada patología gástrica en las muestras con <i>Helicobacter pylori</i>	38
Tabla 16. Estatus del gen <i>oipA</i> en las muestras infectadas con <i>Helicobacter pylori</i>	39
Tabla 17. Odds ratio para el gen <i>oipA</i> y las patologías gástricas.....	40
Tabla 18. Distribución de genotipos del gen <i>vacA</i>	42
Tabla 19. Odds ratio para el gen <i>vacA</i> y las patologías gástricas	43

Tabla 20. Frecuencia del gen <i>vacA</i> asociado con el género de los pacientes con <i>Helicobacter pylori</i>	43
Tabla 21. Frecuencia del gen <i>vacA</i> asociado con la edad de los pacientes con <i>Helicobacter pylori</i>	44
Tabla 22. Estatus del gen <i>cagA</i> en las muestras infectadas con <i>Helicobacter pylori</i>	45
Tabla 23. Odds ratio para el gen <i>cagA</i> y las patologías gástricas	45
Tabla 24. Relación entre los genotipos de <i>vacA</i> y el estatus de <i>cagA</i> en las muestras de <i>Helicobacter pylori</i>	46
Tabla 25. Relación entre el gen <i>oipA</i> y el estatus de <i>cagA</i> en las muestras de <i>Helicobacter pylori</i>	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia mundial de la infección de <i>Helicobacter pylori</i>	5
Figura 2. Mecanismos de transmisión de <i>Helicobacter pylori</i>	6
Figura 3. Mecanismos de virulencia de <i>Helicobacter pylori</i> , se muestra la presencia de flagelos de movilidad y síntesis de ureasa que mantiene un pH neutro y hasta alcalino entorno a la bacteria.	8
Figura 4. Factores de virulencia de <i>H. pylori</i> y su respectiva respuesta inmune.	9
Figura 5. Estructura de mosaico del gen <i>vacA</i> que comprende las regiones variables s y m	13
Figura 6. Polimorfismo estructural en <i>cagA</i>	15
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de las muestras de ADN extraídas de biopsias gástricas en parafina.	35
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la PCR para la detección de <i>H. pylori</i> , amplificación del fragmento correspondiente al gen 16s rRNA	36
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la amplificación del gen <i>oipA</i>	39
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes <i>vacA</i> y <i>cagA</i>	41
Figura 11. Electroferograma de la secuencia reverse del gen <i>vacA</i> m.	47
Figura 12. Electroferograma de la secuencia reverse del gen <i>vacA</i> s1.	48
Figura 13. Electroferograma del gen <i>cagA</i> , se observan las secuencias forward, reverse y la secuencia consenso.	48
Figura 14. Electroferograma del gen <i>oipA</i> se observan las secuencias forward, reverse y la secuencia consenso.	49

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Alineación de la secuencia de nucleótidos del gen vacA, genotipos s1 y s2.....	63
Anexo 2. Alineación de la secuencia de nucleótidos del gen vacA, genotipos m1 y m2.....	63
Anexo 3. BLAST de los fragmentos obtenidos por secuenciación: A, del gen vacA m1; B, del gen vacA s1; C, del gen cagA; D, del gen oipA.....	64
Anexo 4. Certificado de donación de muestras parafinadas del Hospital AXXIS para el IIB con el objetivo de realizar esta investigación .	67
Anexo 5. Cuantificación de ADN de las biopsias gástricas pertenecientes a los pacientes de la clínica AXXIS de Quito.	68

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribo Nucleico
ARN	Ácido Ribo Nucleico
<i>cagA</i>	Gen asociado a la citotoxina
<i>cagPAI</i>	Isla de patogenicidad <i>cag</i>
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
IARC	Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer
IIB	Instituto de Investigaciones Biomédicas
IL-8	Interleucina 8
INEC	Instituto Nacional de Estadísticas y Censos del Ecuador
m/V	Masa/Volumen
MALT	Linfoma del Tejido Linfoide Asociado a las Mucosas
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
<i>oipA</i>	Proteína proinflamatoria de membrana externa
OMPs	Proteínas de membrana externa
OR	Odds ratio
pb	Par de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
TA	Temperatura ambiente
TBE	Solución tampón Tris/Borato/EDTA
T _m	Temperatura de Melting
uL	Microlitro
uM	Micromolar
UV-Vis	Ultra violeta visible
V/V	Volumen/Volumen
V	Voltios
<i>vacA</i>	Gen asociado a la vacuolización

RESUMEN

El cáncer de estómago es uno de los cánceres con mayores tasas de mortalidad en Ecuador. *Helicobacter pylori* es el agente causal comprobado de la enfermedad y se conoce que tiene una prevalencia del 50% en la población mundial. Cada cepa de la bacteria se diferencia por la expresión de sus factores de virulencia, entre ellos factores de adhesión, enzimas y toxinas, los mismos que le han permitido adaptarse al estómago y causar un daño importante a las células estomacales. Se estudiaron 211 muestras de biopsias gástricas parafinadas de las cuales se extrajo el ADN y se determinó la presencia de *H. pylori* (55,9%), además de los genes de virulencia *oipA* (83%), *vacA* (68.6%) y *cagA* (44%). Estos genes han sido estudiados por su relación con la presencia de las diferentes patologías gástricas; gastritis crónica no atrófica, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal y displasia, que conllevan al cáncer gástrico. Los resultados sugieren que los genes *vacA*, *cagA* y *oipA* y sus respectivos genotipos por si solos no se asocian ni aumentan el riesgo de presencia de las patologías gástricas, mientras que sólo la combinación *vacA* m1/s1 se asocia con la presencia del estado activo de *cagA*+, en las muestras estudiadas.

PALABRAS CLAVE:

- **GASTRITIS CRÓNICA NO ATRÓFICA**
- **GASTRITIS CRÓNICA ATRÓFICA**
- **METAPLASIA INTESTINAL**
- **DISPLASA**
- **CÁNCER GÁSTRICO**

ABSTRACT

Stomach cancer is one of the cancers with higher mortality rates in Ecuador. *Helicobacter pylori* is the main causative agent of the disease and has been found to have a prevalence of 50% in the world population. Each strain can be distinguished by the expression of virulence factors, including adhesion factors, enzymes and toxins that have allowed them to adapt to the stomach and cause significant damage to the stomach cells. 211 gastric biopsy samples embedded in paraffin were used in order to extract DNA and determine the presence of *H. pylori* (55.9%), along with the virulence genes *oipA* (83%), *vacA* (68.6%) and *cagA* (44%). These genes have been studied for their relationship with different gastric pathologies; such as non-atrophic chronic gastritis, chronic atrophic gastritis, intestinal metaplasia and dysplasia, which lead to gastric cancer. The results suggest that the *vacA*, *cagA* and *oipA* genes and their respective genotypes are not associated or increase the risk of gastric diseases by themselves, while only *vacA* m1/s1 genotype is associated with the presence of active status *cagA*+, in the studied samples.

KEYWORDS:

- **NON-ATROPHIC CHRONIC GASTRITIS**
- **CHRONIC ATROPHIC GASTRITIS**
- **INTESTINAL METAPLASIA**
- **DYSPLASIA**
- **GASTRIC CANCER**

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) reconoció en 1994 la relación entre *Helicobacter pylori* con el cáncer gástrico y también la declaró como carcinógeno del grupo 1 (IARC, 2013). La bacteria *Helicobacter pylori* está presente en más del 50% del total de la población, siendo mucho mayor su incidencia en países del tercer mundo. Su importancia ha crecido sustancialmente en la últimas décadas desde su descubrimiento, siendo así que en este momento se conoce la secuencia de su genoma y una gran variedad de sus factores de virulencia (Rivas-Traverso & Hernández, 2000). La presencia de estos factores ha sido relacionada con el desarrollo de otras patologías gástricas menos severas, entre ellas gastritis, gastritis atrófica y úlceras peptídicas (Panayotopoulou, et al., 2007).

Es de importancia considerar que a pesar de su gran incidencia, no todos los infectados por *Helicobacter pylori* desarrollan una enfermedad grave. La diversidad genética entre individuos, los factores ambientales; como el nivel socioeconómico, edad de la primera infección y los factores de virulencia específicos, son algunas de las posibles variables que influyen en el desarrollo o no de las patologías (Kato, et al., 2004).

Dado que se ha identificado a *Helicobacter pylori* como el agente causal se han realizado varias investigaciones sobre los factores de virulencia y su relación con el huésped. Entre los más estudiados se encuentran los genes *cagA*, *babA* y *vacA* (Ganten, et al., 2007). Según Cover & Blaser (1992), los factores *vacA* y *cagA* son la principal causa de úlcera péptica y están estrechamente relacionados con el cáncer gástrico.

A pesar de toda esta información, en Ecuador no se reportan estrategias de prevención contra el cáncer gástrico, a diferencia de otros países Suramericanos como Argentina, Chile y Colombia. La incidencia del cáncer gástrico en el Ecuador es mayor en comparación con otros países, se estima que es de 29 de cada cien mil personas al año (Debets, et al., 2002).

1.2. JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

La evolución de las lesiones estomacales sigue el siguiente orden; de la mucosa normal hacia la atrofia gástrica, posteriormente a metaplasia intestinal y por último la displasia que aparece previo al cáncer de estómago (Hanna, 2010). En los índices mundiales entre las muertes por cáncer, el cáncer gástrico ocupa la cuarta posición. Entre los países con alto índice de riesgo de sufrir cáncer gástrico están Corea, Japón, Colombia y también Ecuador (Otero, 2008).

Entre todas las regiones, las poblaciones con más alto riesgo se encuentran en zonas volcánicas dentro de la Cordillera de los Andes. Entre estos países se encuentran Chile, donde la tasa de mortalidad es de 19,6 por cada cien mil habitantes, Perú de 15,6 (Correa, 2003) y Ecuador de 29 (Debets, et al., 2002).

Del Instituto Nacional de Estadística y Censos del Ecuador (INEC) en el Anuario de estadísticas vitales publicado en el 2013, se observan las estadísticas de muerte por provincia. Estos datos colocan a la muerte por neoplasia maligna de estómago con un porcentaje de 2,7 para la provincia de Pichincha. Si se compara este porcentaje con provincias de la costa como Guayas (2,4) y Manabí (2,5) este porcentaje es mayor (INEC, 2013).

Las estadísticas no hacen distinción de sexo, este cáncer afecta tanto a hombres como a mujeres. Sin embargo, se presenta una distinción de acuerdo a la edad, la prevalencia incrementa a partir de la edad de 65 años

(INEC, 2013). Es importante destacar otros factores como los esquemas culturales y los entornos medioambientales. En las regiones altas a diferencia de las regiones de los valles y costeras tienden a crecer los índices de mortalidad.

Se han realizado estudios que caracterizan los factores como la alimentación en relación con la aparición del cáncer. En Colombia se destaca un estudio que correlaciona el tipo de dieta con la incidencia de cáncer gástrico en poblaciones de alto y bajo riesgo. Estos han mostrado diferencias importantes entre el alto consumo de sal y habas en poblaciones con alto riesgo, y por el contrario, de vegetales y frutas frescas en poblaciones de bajo riesgo (ESE & IGAC, 2010).

El factor de riesgo más significativo dentro de todos los estudiados es la presencia de la bacteria *Helicobacter pylori*, que al ser determinante en los casos de cáncer gástrico ha sido el motivo de esta investigación. El estudio de los factores de virulencia en la bacteria proporcionará datos que ayudarán a crear en un futuro terapias más personalizadas y así contrarrestar los altos índices de lesiones estomacales que desencadenan en cáncer en nuestro país.

1.3. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

1.3.1. Objetivo general

Identificar la presencia de los genes de virulencia *vacA*, *cagA* y *oipA* mediante PCR multiplex de *Helicobacter pylori* en muestras positivas en parafina provenientes de pacientes de la clínica AXXIS de la ciudad de Quito

1.3.2. Objetivos específicos

- Optimizar la extracción de ADN para muestras de biopsias gástricas parafinadas y estandarizar la amplificación de los genes *vacA*, *cagA* y *oipA* mediante PCR.
- Definir la relación de los genes *vacA*, *cagA* y *oipA* y sus respectivos genotipos con la presencia de las patologías gástricas como gastritis crónica no atrófica, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia y cáncer gástrico en las muestras de pacientes de la ciudad de Quito.

1.4. MARCO TEÓRICO

1.4.1. *Helicobacter pylori*

Los ganadores del Nobel de Medicina y Fisiología del 2005 Robin Warren y Barry Marshall, se hicieron acreedores del premio por el descubrimiento de la bacteria *Helicobacter pylori*. Los investigadores reportaron en 1983 a una bacteria similar a *Campylobacter* que se encontraba en biopsias estomacales de personas con inflamación del estómago (gastritis), así como con úlcera de estómago y duodeno (úlceras pépticas), pero no se hallaba en personas sanas. Hoy en día, la gastritis y la úlcera péptica son calificadas como enfermedades infecciosas, para su diagnóstico se utiliza la detección de la bacteria y para su tratamiento se utilizan antibióticos (Pajares & Gisbert, 2006).

Helicobacter pylori está expuesto en su hábitat el estómago, al estrés oxidativo y al ácido. Esto causa daño en su ADN que provoca un alto índice de recombinación (Wang, Olczak, Forsberg, & Maier, 2009). La mayoría de los genes de *H. pylori* muestran una variación de entre el 3-5%, que deriva en varias mutaciones puntuales y diferente organización de los genes lo que se evidencia en la microdiversidad y macrodiversidad de la bacteria (Gamer

& Cover, 1995).

La epidemiología de la enfermedad ha definido que la transmisión de *Helicobacter pylori* se da de persona a persona. Las principales rutas son la: oral-oral (a través de vómito o posiblemente saliva) y la vía fecal-oral. Además, se ha observado que la infección es adquirida durante la niñez y posiblemente se deba a contagios en las instituciones educativas (Marrón, 2000). La Figura 1. muestra el porcentaje de infección por *Helicobacter pylori* en los diferentes continentes.

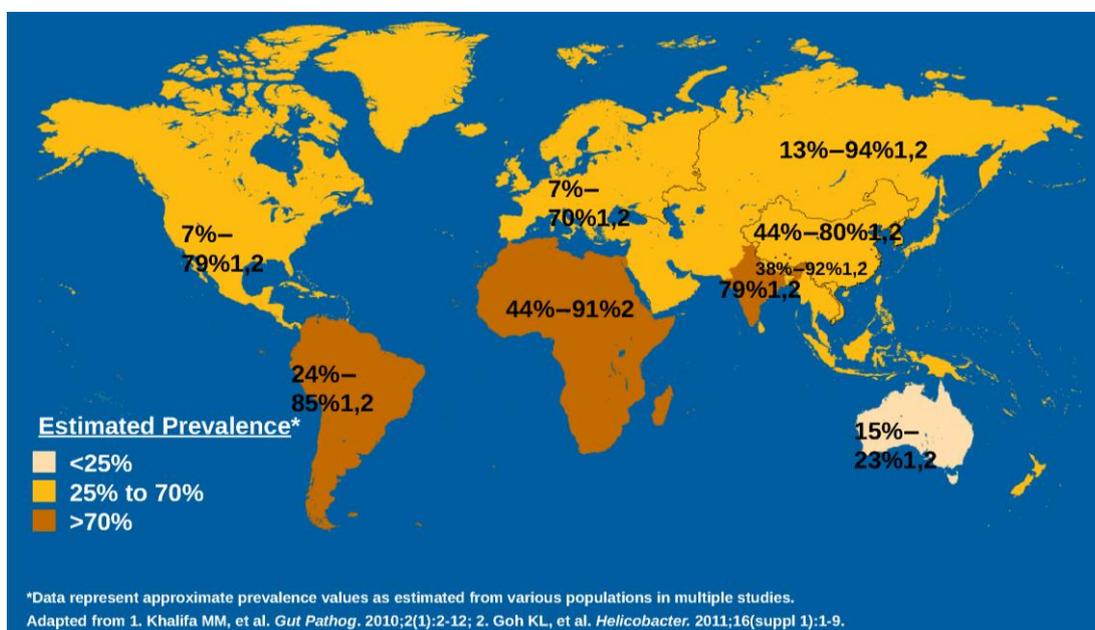


Figura 1. Prevalencia mundial de la infección de *Helicobacter pylori*.
Fuente: Stollman, 2013.

1.4.2. MECANISMOS DE TRANSMISIÓN

1.4.2.1. Transmisión oral-oral

Helicobacter pylori ha sido aislada de la cavidad bucal y de saliva, sin embargo muy pocos profesionales odontólogos registran infecciones en pacientes. La posible transmisión oral-oral que se ha investigado ha sido en alimentos premasticados entre algunos grupos étnicos, el uso de la misma

cuchara por la madre y el niño, el contacto íntimo oral-oral, y la aspiración del vómito (Van Duynhoven & De Jonge, 2001).

Las infecciones intrafamiliares y la mayor prevalencia encontrada en poblaciones institucionalizadas puede indicar que el contacto de persona a persona es una vía de transmisión, sin embargo no necesariamente el mecanismo de transmisión sea oral-oral, pero sí indica que se ha producido una fuente común de transmisión (Van Duynhoven & De Jonge, 2001).

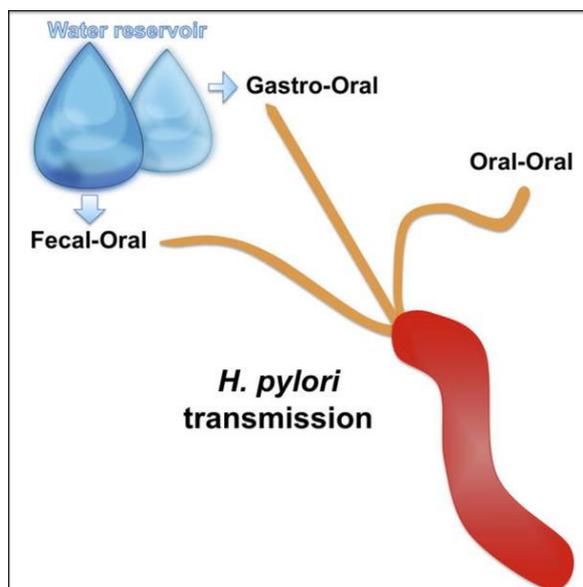


Figura 2. Mecanismos de transmisión de Helicobacter pylori.
Fuente: Ramy, Mohammed, & Radwa, 2015.

1.4.2.2. Transmisión gastro-oral

También llamada transmisión iatrogénica, se produce cuando la infección está asociada con la inadecuada desinfección y manejo de gastroscopios. Se ha encontrado casos de infección por el uso de endoscopios que se han utilizado para un paciente y se utilizan para otro. Infecciones de origen ocupacional también se han reportado, por lo general la infección se transmite de un paciente al personal, se ha encontrado especialmente entre los endoscopistas y gastroenterólogos (Akamatsu, Tabata, Hirong, Kawakami, & Uyeda, 1996).

1.4.2.3. Transmisión feco-oral

Es la vía más importante a nivel mundial ya que revelaría que el agua y alimentos están contaminados con la bacteria. Se ha descubierto ADN de la bacteria en agua potable y algunos de los estudios epidemiológicos muestran una asociación entre en agua de consumo así como el consumo de vegetales crudos con la infección de *Helicobacter pylori*. Estudios en Gambia y Gran Bretaña han conseguido aislar el patógeno de muestras frescas de heces humanas, lo que demostraría que el patógeno tiene una corta supervivencia en los excrementos pero desconociéndose si este es eliminado continua o esporádicamente vía fecal por el infectado (Mancenlle, 2007).

En Perú se ha realizado un estudio epidemiológico en donde se muestra una diferencia en la prevalencia de la bacteria en niños que consumen agua municipal a diferencia de los que consumen agua de pozo. Estudios similares se han realizado en Colombia y México donde se ha detectado ADN de *Helicobacter pylori* en agua de consumo humano. La sobrevivencia de la bacteria en agua bajo diferentes condiciones se ha determinado que puede llegar a 16 días y otros estudios han demostrado ADN de *H. pylori* en muestras de agua de mar, sugiriendo igualmente que el mar podría actuar como reservorio de la infección (Mancenlle, 2007).

1.4.3. PATOGÉNESIS

La preocupación de la comunidad científica hoy en día está en resolver cómo *Helicobacter pylori* infecta, invade y coloniza la mucosa, desarrollando así las enfermedades gastroduodenales y cómo esta misma bacteria produce patologías diferentes en distintas personas. Algunos de los mecanismos que utiliza *Helicobacter pylori* para colonizar el estómago son muy complejos y combinan algunos factores que actúan simultáneamente (Akamatsu, Tabata, Hironaga, Kawakami, & Uyeda, 1996).

Helicobacter pylori puede crecer y proliferar a pH ácido, a diferencia de la mayoría de bacterias, lo que le permite permanecer en su huésped durante muchos años. Para colonizar su hábitat, el estómago, la bacteria debe atravesar la capa de moco y adherirse al epitelio de la mucosa gástrica. La fisiología de la bacteria hace posible atravesar la mucosa, primero por su gran movilidad impulsada por sus flagelos y su forma en espiral y segundo porque los flagelos están recubiertos por una lipoproteína que los protege del ácido gástrico (González & Rodríguez, 2011).

La evolución de *Helicobacter pylori* es evidente, tiene la capacidad de sintetizar ureasa que la utiliza en la hidrólisis de la úrea del jugo gástrico en amonio y bicarbonato (Figura 3). Los productos de la hidrólisis son utilizados para subir el pH, evadir propiedades bactericidas y aumentar el daño celular. El amonio también incrementa la retrodifusión de los iones hidrógeno y se ha reportado que inactiva al sistema inmune del huésped (Velarde, 1996).

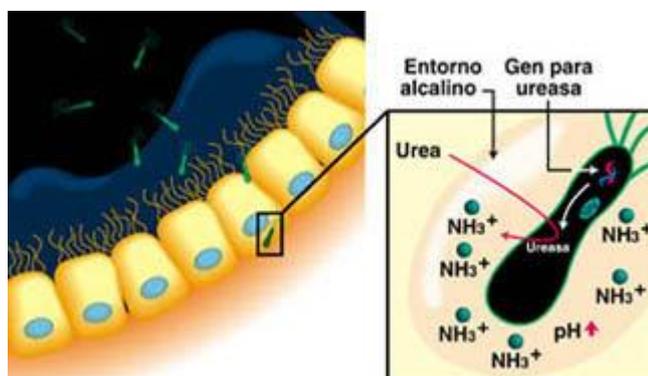


Figura 3. Mecanismos de virulencia de Helicobacter pylori, se muestra la presencia de flagelos de movilidad y síntesis de ureasa que mantiene un pH neutro y hasta alcalino entorno a la bacteria.
Fuente: Fochesatto, Guayán, & Moran, 2004.

Los factores que completan la virulencia de *Helicobacter pylori* son: las adhesinas bacterianas importantes en la colonización bacteriana, hemaglutininas que provocan auto-anticuerpos como sucede con los antígenos de la sangre y por último la presencia de genes asociados a la vacuolización y a la citotoxicidad, *vacA* y *cagA* respectivamente (Rivas-Traverso & Hernández, 2000).

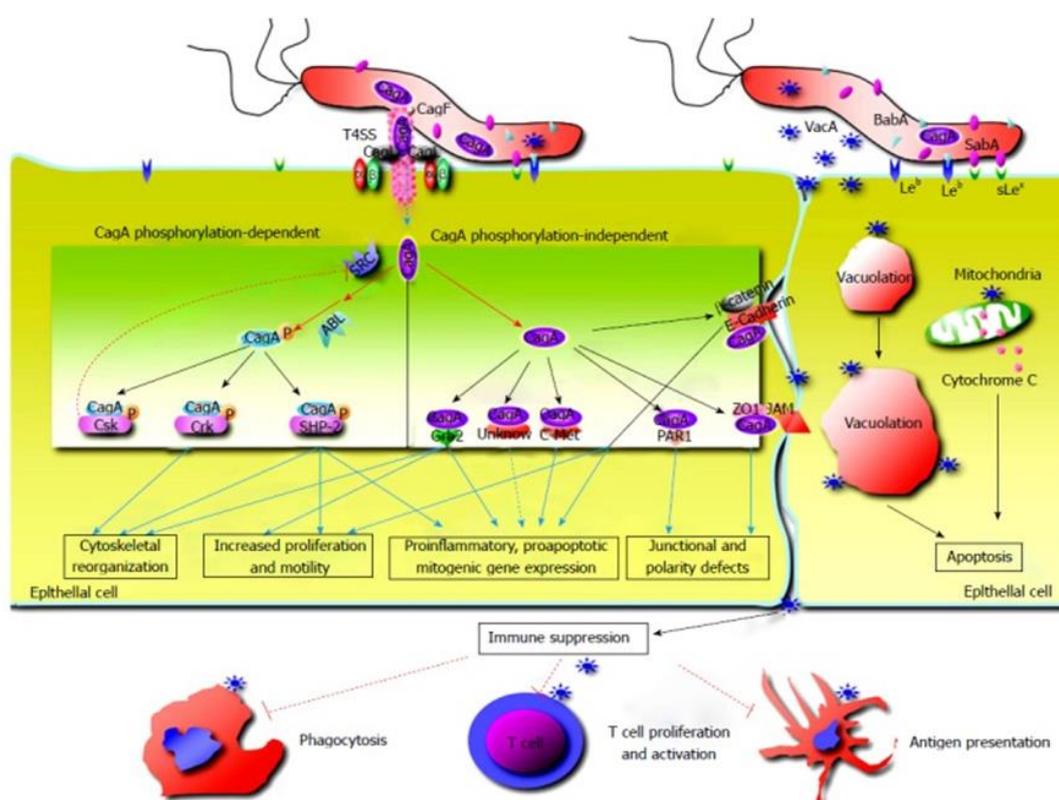


Figura 4. Factores de virulencia de *H. pylori* y su respectiva respuesta inmune.

Fuente: Zhang, Duan, Fan, & Chen, 2016

1.4.4. PATOLOGÍAS GÁSTRICAS RELACIONADAS CON *Helicobacter pylori*

La infección con *Helicobacter pylori* se ha comprobado que es el agente causal del 70% de los casos de gastritis crónica activa, de hasta un 95% de las úlceras duodenales y de un 60% de los casos de cáncer (Rivas-Traverso & Hernández, 2000).

Se ha demostrado el rol de *Helicobacter pylori* en la úlcera gástrica, ya que después del tratamiento para su erradicación la recurrencia es mínima. Si se compara con los casos en donde se cicatrizaba la úlcera sin erradicar la bacteria, el porcentaje de recurrencia alcanzaba el 60% al año. Otra de las neoplasias gástricas atribuidas a *Helicobacter pylori* es el linfoma tipo MALT. Esta enfermedad sufre regresiones a las formas leves después de que se ha eliminado a la bacteria, y se estima que un 60% experimenta una eliminación total de la enfermedad (Hanna, 2010; Prinz, Schwendy, & Voland, 2013).

Luego de que la bacteria sea clasificada como carcinógena del grupo 1, se ha especulado que produce sustancias carcinogénicas o mutagénicas. La acción de *Helicobacter pylori* es contribuir en la inflamación crónica y progresiva de la mucosa gástrica, lo que desencadena en la gastritis atrófica que es la enfermedad que antecede al cáncer. Aproximadamente, el 1% de las personas que muestran una gastritis generan cáncer gástrico, precedido por otros cambios histológicos como atrofia intestinal, metaplasia y displasia (Ramírez, 2014). El cáncer gástrico se clasifica en dos tipos histológicos: el intestinal y el difuso. En poblaciones de alto riesgo de prevalencia de cáncer es el del primer tipo, y se presenta en personas con edad avanzada. Menos común es el tipo difuso, se presenta en poblaciones jóvenes con menor riesgo, y las lesiones precancerosas no están tan bien definidas (Rivas-Traverso & Hernández, 2000).

Muchos estudios han demostrado que la gastritis crónica atrófica no es una enfermedad única de edades avanzadas, se ha reportado la prevalencia de la enfermedad en personas jóvenes. La conclusión a la que se ha llegado es que es una lesión progresiva producida directamente por *Helicobacter pylori*. La infección por esta bacteria se contrae desde la infancia y permanece toda la vida, hasta que al unirse con los demás factores de riesgo se desarrollan las enfermedades estomacales y de

duodeno. Esta infección es lenta y toma un gran periodo de tiempo, haciéndotela única en el campo de las enfermedades infecciosas causadas por bacterias (Ramírez, 2014).

1.4.5. CÁNCER GÁSTRICO

Después de que en 1994 la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasificara a la bacteria *H. pylori* como un carcinógeno del grupo 1, una cantidad considerable de evidencia confirmatoria se ha acumulado. Sin embargo el informe de la IARC se basa totalmente en evidencia epidemiológica y se indica explícitamente que era necesaria la evidencia experimental. El primer ensayo exitoso de la inducción de cáncer por *H. pylori* se hizo en gerbillios de Mongolia donde se demostró la importancia de la virulencia de la cepa infectante para el desarrollo del cáncer (Correa & Houghton, 2007).

Otro factor por el cual se relaciona a *Helicobacter pylori* como agente causal para el cáncer gástrico son los resultados de los estudios de intervención, que muestran que la erradicación de *H. pylori* puede reducir el riesgo de cáncer y prevenir el desarrollo de lesiones pre-cancerosas en los seres humanos y en animales de experimentación. Así, se dice que no sólo es necesaria la presencia de la bacteria para desarrollar cáncer gástrico, además es necesaria la confluencia de una serie de factores que juntos aumentan el riesgo, entre ellos una inflamación gástrica crónica, factores específicos del huésped y factores ambientales (Matysiak & Mégraud, 2006).

1.4.6. GENES DE VIRULENCIA

Helicobacter pylori tiene una gran variedad genética, que desemboca en la existencia de una relación entre esta variación y la incidencia mundial de cáncer. Cada cepa de la bacteria se diferencia por la expresión de sus factores de virulencia, entre ellos factores de adhesión, enzimas y toxinas,

los mismos que le han permitido adaptarse al estómago y causar un daño importante a las células estomacales (Ramírez & Sánchez, 2008).

Entre los principales factores de virulencia de *Helicobacter pylori* se encuentran los genes de virulencia, que se han clasificado en tres grupos (González & Rodríguez, 2011).

- Los genes cepa-específicos, como los del islote de patogenicidad *cag(cagPAI)* y los localizados en las regiones de plasticidad (*jhp0947* y *dupA*)
- Los genes de fase variable (*babA*, *oipA*, *sabA* y *hopZ*)
- Los genes de estructura variable (*vacA* y la región hipervariable del gen *cagA*).

Dentro de los factores de patogenicidad de *H. pylori*, aquellos que aparecen y se expresan diferencialmente en las cepas más patogénicas son los que han llamado más la atención. Entre estos, los más estudiados han sido los genes de estructura variable que producen las proteínas *cagA* y *vacA*; y los genes de fase variable que producen las diferentes OMPs (proteínas de membrana externa) que contribuyen a la virulencia de la bacteria (González & Rodríguez, 2011).

1.4.6.1. VacA

Helicobacter pylori tiene la capacidad de inducir la formación de vacuolas en muchos tipos de células. En un principio, no se le otorgó un carácter tóxico a estas vacuolas, pues esta acción no era neutralizada por antitoxinas bacterianas. Asimismo, un daño similar puede producirse por el amonio liberado por la bacteria al producir ureasa. Finalmente, se logró aislar la toxina responsable de esta acción y se la denominó “toxina vacuolizante”, ya que es la responsable de la formación de vacuolas en las células afectadas (Yamaoka, 2010).

Después de encontrar la toxina responsable de la formación de vacuolas se pudo identificar el gen responsable, denominado *vacA* (“vacuolization associated gene”). Este gen ha sido clonado y analizado, y se ha visto que codifica una proteína que posee una señal amino terminal corta y una carboxi terminal. La primera señal es escindida para permitir su paso a través de la membrana citoplasmática y la segunda de 45kDa actúa como poro (Rivas-Traverso & Hernández, 2000).

Dentro del gen *vacA* existen dos regiones polimórficas que desembocan en dos diferentes genotipos, la primera región polimórfica se encuentra en la región N-terminal (s1 o s2) y la otra en la región central (m1 o m2) (Anexos 1 y 2). Se han realizado estudios de las combinaciones genotípicas de estas regiones y se las ha relacionado con la aparición de las diferentes enfermedades (Rivas-Traverso & Hernández, 2000).

Pese a que todas las cepas de *Helicobacter pylori* contienen el gen *vacA*, no todas las cepas producen la proteína vacuolizante. Se ha revelado que el genotipo *vacA* s1 es más patógeno que las cepas *vacA* s2. Las cepas *vacA* m1 están asociadas con un mayor daño en el epitelio gástrico que las cepas *vacA* m2. Las combinaciones resultan en mosaicos, el genotipo s1m1 es más virulento que el s1m2, mientras que los genotipos s2m2 y s2m1 no son virulentos y raramente se presentan (Figura 5.) (van Doorn, et al., 1998).

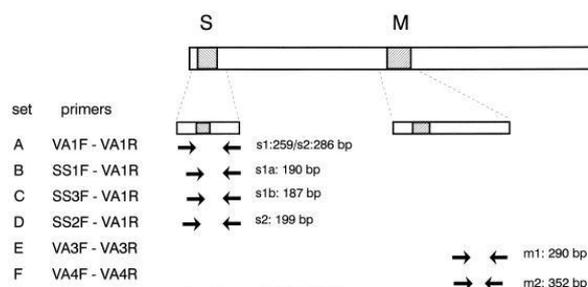


Figura 5. Estructura de mosaico del gen *vacA* que comprende las regiones variables s y m. Se muestran las ubicaciones de los diversos sitios diana de los primers con flechas, y los tamaños esperados de los amplicones. Los conjuntos de primers A - F fueron descritos por Atherton et al.

Fuente: van Doorn, et al., 1998.

1.4.6.2. *CagA*

Helicobacter pylori presenta una enorme variación genética, dada la amplia recombinación entre cepas es una de bacterias más vastamente descrita. En la búsqueda de la respuesta para la toxicidad de las vacuolas producidas por *vacA* se encontró el gen *cagA* ("cytotoxin associated gene") cuya presencia está relacionada con la presencia y citotoxicidad del gen *vacA* (Rivas-Traverso & Hernández, 2000).

El gen *cagA* codifica para la proteína con el mismo nombre, se encuentra dentro de un segmento de 40Kb llamado región *cag*. Este gen es indicador de la isla de patogenicidad *cagPAI* constituida por más de 30 genes, que no se presenta en todas las cepas de *H. pylori* pero proporcionan mayor agresividad a las cepas que la poseen, ya que codifican a las proteínas del sistema de secreción tipo IV que introduce a la proteína *cagA* dentro de las células del epitelio gástrico. *CagA* es el factor de virulencia más estudiado de los factores de *H. pylori*, este divide a las cepas en *cagA* productores (*cagA+*) y *cagA* no productores (*cagA-*) (Arévalo, Trespalacios, & Otero, 2009).

Una vez en el interior del epitelio gástrico, *cagA* es fosforilada por quinasas celulares de la familia de las SRC-quinasas, específicamente en sitios denominados EPIYA, denominados así por la secuencia de aminoácidos que posee (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala). Existen variantes de estos motifs según los aminoácidos que los flanquean, estos son: EPIYA-A, B, C y D (Panayotopoulou, et al., 2007).

Los estudios anteriores demuestran que las cepas occidentales de Asia contienen típicamente los motifs EPIYA-A, EPIYA-B seguidos de 1 a 3 repeticiones del motif EPIYA-C, mientras que las cepas del oriente también contienen los motif A, B pero varían porque tienen un motif EPIYA-D en vez

de un EPIYA-C (Figura 6.). *CagA* fosforilada interactúa con proteínas específicas que poseen dominios de unión a tirosinas fosforiladas, una de ellas es la tirosin-fosfatasa (SHP-2). Esta interacción, activa diferentes cascadas de señalización, que en un momento dado pueden alterarse y provocar cambios como la apoptosis o el crecimiento y proliferación anormal de las células epiteliales (Panayotopoulou, et al., 2007).

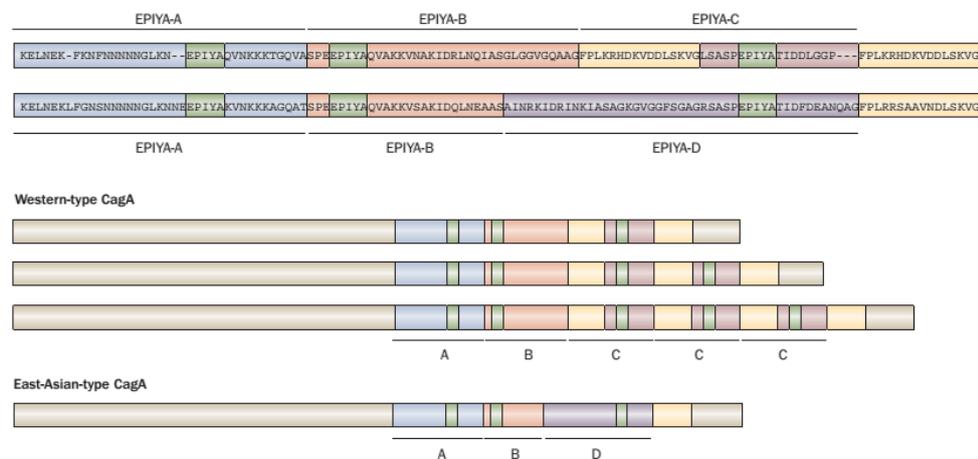


Figura 6. Polimorfismo estructural en *cagA*. *CagA* de tipo occidental contiene los segmentos EPIYA -A, EPIYA -B, y EPIYA -C. Por el contrario, *cagA* de tipo Asia oriental contiene la EPIYA -A, EPIYA -B y segmentos EPIYA -D, pero no el segmento EPIYA -C. El motivo EPIYA en cada segmento (en verde) representa los sitios de fosforilación de la tirosina de *cagA*

Fuente: Yamaoka , 2010.

Análisis de las regiones de repetición de *cagA* han demostrado que, aunque poco frecuentes, algunas cepas de Asia Oriental tienen la secuencia de tipo occidental de *cagA*, especialmente cepas aisladas de Okinawa y las islas del sur de Japón. Por el contrario, de las cepas occidentales, ninguna de ellas tiene la secuencia del tipo Este Asiático de *cagA* (Yamaoka, 2010).

1.4.6.3. *OipA*

Uno de los principales pasos en la colonización del estómago por *Helicobacter pylori* es la adherencia a la mucosa gástrica. Los análisis realizados al genoma de la bacteria y sus diferentes cepas han ubicado que

un 4% del total del genoma sintetiza 5 grandes familias de proteínas de membrana externa (OMPs) (Quiroga, Cittelly, & Bravo, 2005).

Entre el numeroso grupo de proteínas que conforman esta familia se encuentran: la proteína de adhesión a los antígenos de Lewis B (*babA*), la adhesina de unión a ácido siálico (*sabA*), la lipoproteína asociada a la adherencia (*alpA* y *alpB*) y la proteína inflamatoria de membrana externa (*oipA*). Estas diferentes proteínas intervienen en el tropismo de *H. pylori* por la adherencia al tejido gástrico (Kato, et al., 2004).

OipA por sus siglas en inglés “outer membrane inflammatory protein” está involucrada en los mecanismos de respuesta inflamatoria inducidos por la presencia de *Helicobacter pylori*, esta proteína es codificada por el gen del mismo nombre. El estado funcional de *oipA* está regulado por medio de un mecanismo dependiente del número de repeticiones del dinucleótido CT presentes en la región 5' del gen, dividiendo a las cepas en *oipA* “on” y *oipA* “off” dependiendo si el gen es funcional o no respectivamente (Yamaoka, 2010).

Se ha establecido una relación directa entre el alelo activo del gen y el desarrollo de patologías como la úlcera duodenal y el cáncer gástrico (Arévalo, Trespalacios, & Otero, 2009). Otros estudios realizados *in vitro* con mutantes isogénicas del gen y células epiteliales gástricas reportaron un decremento de los niveles de secreción de IL-8, correlacionando al gen con la inflamación (González & Rodríguez, 2011).

1.4.7. TRATAMIENTO

Helicobacter pylori es sensible a una variedad de fármacos *in vitro*, sin embargo aplicados en la clínica no han demostrado eficacia en la erradicación. El tratamiento entonces consiste en la administración de

múltiples combinaciones de uno o más fármacos que han resultado ser eficaces.

1.4.7.1. Terapia triple

Desde la década de los ochenta la propuesta para erradicación de *H. pylori* consiste en la llamada “terapia triple”, esta contiene un inhibidor de la bomba de protones (IBP), claritromicina y amoxicilina o metronidazol. Este tratamiento demostró curar úlceras peptídicas y se convirtió en el tratamiento estándar contra *Helicobacter pylori*. Esta terapia dura siete días y tiene un nivel bajo de efectos secundarios, la desventaja de este tratamiento es que existe un alto porcentaje de cepas resistentes a la claritromicina (Sitas, 2015).

Una nueva variante de la terapia triple sustituye el IBP por ranitidina-citrato de bismuto. Cuando se utiliza el complejo de bismuto se ha demostrado que puede prevenirse la inducción de resistencias bacterianas y la tasa de curación es algo mayor en los pacientes con cepas resistentes a las obtenidas cuando se utiliza la combinación con IBP. Las tasas de curación con esta variante de terapia triple están en alrededor del 85% (Boixeda & Martin, 2000).

1.4.7.2. Terapia cuádruple

Esta combina un IBP con tetraciclina, metronidazol y un compuesto de bismuto, el tratamiento tiene una duración de entre 7 y 14 días. Los antibióticos pueden ser sustituidos por amoxicilina y claritromicina, respectivamente. En este tratamiento se han reportado tasas de curación muy elevadas, que llegan a ser superiores al 90% (Sitas, 2015).

Anteriormente, se usaban las terapias dobles, quedando abandonadas por su baja eficacia. Sin embargo, la administración de ranitidina-citrato de

bismuto con claritromicina durante 14 días ha demostrado ser efectiva y con pocos efectos secundarios. Esta combinación suele utilizarse en pacientes alérgicos a la penicilina, sin embargo, hay que hacer notar que este tratamiento es en realidad un tratamiento triple pues combina tres fármacos, ranitidina, bismuto y claritromicina. En la Tabla 1. se muestran los 3 grupos de fármacos utilizados en el tratamiento contra *H. pylori* en las diferentes terapias indicadas (Boixeda & Martin, 2000).

Tabla 1.

Fármacos eficaces en el tratamiento contra *H. pylori* (Boixeda & Martin, 2000).

Tipo	Fármaco
Inhibidores de la Bomba de Protones	Omeprazol Lansoprazol Pantoprazol
Compuestos de Bismuto	Subsalicilato de bismuto Ranitidina-citrato de bismuto
Antibióticos	Amoxicilina Macrólidos: claritromicina Nitroimidazoles: metronidazol y tinidazol Tetraciclina

1.4.7.3. Resistencia a antibióticos

Como se explicó anteriormente, la terapia triple puede fallar por varias razones, se ha encontrado que la razón principal para el fracaso de la terapia es la resistencia de *H. pylori* a uno de los antibióticos que se utilizan, la claritromicina. Asimismo, se reporta resistencia al metronidazol así como también para la tetraciclina, aunque en menor medida, lo que convierte a la resistencia en un tema emergente (Mégraud, 2004). Por otro lado, se han encontrado cepas con doble resistencia, estas sin embargo, tienen una baja prevalencia en países de Europa (0,8-9,1%) y Asia (2-3%), pero mucho mayor en los países en desarrollo, como México (18%) (Heep, Kist, Strobel, Beck, & Lehn, 2000).

En el estudio de Mégraud (2004) donde recopila datos de 20 autores, encontró una gran diferencia en las tasas de erradicación de *Helicobacter pylori*, un 87,8% cuando las cepas fueron susceptibles a la claritromicina en comparación con el 18,3% cuando las cepas fueron resistentes. Estos estudios demuestran la importancia de la resistencia de las cepas de *H. pylori* a la claritromicina.

La resistencia a los antibióticos en *H. pylori* se debe esencialmente a mutaciones cromosómicas. Una consecuencia importante de este hallazgo es que la transmisión se produce esencialmente verticalmente desde el organismo en el que la mutación aparece a sus descendientes, y por lo tanto se observa un aumento progresivo. Los estudios *in vitro* han demostrado, también, que la resistencia a metronidazol podría transmitirse por transformación (Jie, Z, Keng, Mar, & Bow, 1998).

Los genes implicados en las mutaciones han sido identificados fácilmente, estos se resumen en la Tabla 2. En la mayoría de los casos hay un número limitado de mutaciones puntuales que permite el desarrollo de métodos moleculares para su detección. Sin embargo, todavía el más ampliamente utilizado es el de difusión en disco. Este es sencillo y barato, por eso su amplia utilización (Mégraud, 2004).

Tabla 2.

Genes implicados en las mutaciones puntuales u otros eventos genéticos que conducen a la resistencia a los antibióticos en *Helicobacter pylori* (Mégraud, 2004).

Grupo de antibiótico	Gen asociado
Macrólidos	23S rRNA
Metronidazol	rdxA, frxA
Quinolonas	gyrA
Rifamicinas	<i>rpoB</i>
Amoxicilina	pbp-1A
Tetraciclina	16S rRNA

1.4.7.4. Vacunas

Con el afán de prevenir las patologías asociadas con *H. pylori* se han realizado esfuerzos en dirección a producir una vacuna. Estas vacunas deben contener componentes bacterianos que intervengan directamente en el proceso de patogénesis y cuya función pueda ser bloqueada por una respuesta inmune inducible. Además, que sean producidas por todas las cepas de *H. pylori* o por aquellas que estén asociadas a las patologías gástricas más graves (García, 2002).

Con este objetivo algunos ensayos con animales han sido realizados, donde se han utilizado componentes bacterianos como la enzima ureasa y sus subunidades (UreA y UreB), la proteína CagA, la toxina vacuolizante *vacA* y las proteínas de choque térmico *HspA* y *HspB*, entre otros. El modelo animal más utilizado ha sido el murino y se han utilizado las bacterias *Helicobacter pylori* y *Helicobacter felis*, la principal vía de administración ha sido la orogástrica, aunque también se han probado rutas nasales y subcutáneas (Pappo, Czinn, & Nedrud, 2001).

Ensayos humanos se han llevado a cabo, uno de los más representativos es la inmunización oral con una vacuna recombinante de *H. pylori* que contenía la enzima ureasa y la toxina termolábil como adyuvante. Este ensayo fue un doble ciego, controlado con placebo en adultos con infección por *H. pylori*. El esquema de vacunación se parecía al utilizado en el ensayo para ratones y resultó en la inducción de células secretoras de anticuerpos IgA, pero sólo una baja reducción de la carga bacteriana en algunos sujetos del estudio. Además, aproximadamente dos tercios de los voluntarios experimentaron diarrea significativa atribuible a la administración LT como efecto secundario (Pappo, Czinn, & Nedrud, 2001).

Futuros ensayos clínicos son elementos aún necesarios para lograr una vacuna eficaz contra *H. pylori* y, eventualmente, las patologías gástricas asociadas a la infección.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

En este estudio retrospectivo se analizaron 211 muestras de biopsias gástricas fijadas en parafina que se obtuvieron del Hospital AXXIS de Quito mediante un convenio entre el Instituto de Investigaciones Biomédicas y el Hospital AXXIS, las muestras fueron tratadas bajo las normas bioéticas según la aprobación del Comité de Bioética 2015-0401 (Anexo 4.).

Las muestras corresponden a mujeres y hombres con edades entre 17 y 88 años que presentaron patologías gástricas. Las patologías fueron determinadas por el Hospital AXXIS mediante histopatología conforme el Sistema de Sidney para el reporte de gastritis, donde se describen 5 estadios dependiendo de la gravedad del más leve al más grave: gastritis crónica no atrófica, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia y cáncer gástrico (Dixon, Genta, Yardley, & Correa, 1997).

Los controles positivos y negativos fueron proporcionados de los bancos de muestras de la Universidad San Francisco de Quito y del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de las Américas, respectivamente.

2.2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN

Se utilizó kit de extracción High Pure PCR Template Preparation Kit de Roche, siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante para la extracción de ADN a partir de muestras fijadas en parafina. Se realizaron algunas modificaciones por el laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de las Américas y por la autora.

Previo a comenzar se calentó el Baño María a 55°C y se colocó el Tampón de Elución (Roche) en la estufa a +70°C. Para la obtención de muestra de biopsia se realizaron aproximadamente 7 micro-cortes de 5 µm de espesor de cada muestra con la ayuda de un micrótopo semiautomático, aproximadamente 50 mg, y se colocaron en un tubo eppendorf estéril. Se añadió 1 mL de xylol al tubo que contenía la muestra y se mezcló con vórtex durante 2 minutos, se incubó a 55°C por 5 minutos. Posteriormente, se centrifugó durante 3 minutos a 15000 rpm y el sobrenadante fue desechado.

Se repitió todos los pasos del lavado con xylol y luego se añadió 1mL de alcohol etílico absoluto 100% (V/V) a temperatura ambiente (TA) en la muestra. Se mezcló con vórtex durante 30 segundos, se centrifugó durante 3 minutos a 15000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se repitió todos los pasos del lavado con alcohol etílico 100% (V/V) a TA. Se colocó las muestras con la tapa abierta durante 15 minutos en la estufa a 37°C.

Una vez completamente secas las muestras se rehidrataron con 10 uL de agua bidestilada por 10 segundos antes de la digestión. Se añadió 200 uL de Tampón de Lisis (Roche) y 40 uL de proteinasa K (Roche) y se mezcló con vórtex durante 1 minuto. Luego, se incubó las muestras en el Baño María a 37°C durante toda la noche.

Al día siguiente se añadió 20 uL más de proteinasa K (Roche) y se mezcló con vórtex durante 1 minuto. Se incubó las muestras dos horas más, en Baño María a 55°C. Después, se añadió 200 uL del Tampón de Unión (Roche), se mezcló con vórtex y se incubó por 10 minutos a 70°C. Luego, se añadió 100 uL de isopropanol y se mezcló brevemente con vórtex para posteriormente centrifugar a 10000 rpm durante 1 minuto a TA.

Se colocó el sobrenadante, aproximadamente 550 uL, en la columna de purificación sobre el tubo de colección. Se centrifugó a 8000 rpm durante

1 minuto a TA. Posteriormente, se desechó el tubo de colección y se colocó uno nuevo bajo la columna.

Se colocó 500 uL de Tampón Removedor de Inhibidores (Roche) sobre la columna de purificación, se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto a TA para luego desechar el tubo de colección y colocar la columna de purificación en un nuevo tubo de colección. Por último, se añadió 500 uL de Tampon de Lavado (Roche) en la columna de purificación, se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto a TA y se descartó solo el líquido del tubo de colección.

Se centrifugó nuevamente 10 segundos a máxima velocidad y se descartó el tubo de colección. Para la Elusión, se colocó la columna de purificación sobre un tubo eppendorf de 1,5 mL y se añadió 30 uL de Tampón de Elusión (Roche) en la columna dejándolo reposar durante 1 minuto a TA. Luego de centrifugar la columna a 8000 rpm durante 1 minuto a TA fue desechada. Finalmente, en el tubo eppendorf se colectó ADN purificado el cual se almacenó en congelación a -20°C .

2.3. CUANTIFICACIÓN DE ADN

Cuando el ADN se encuentra en solución acuosa, como es el caso, se puede cuantificar por medio de espectrofotometría, midiendo la absorbancia (A) o densidad óptica (DO). Se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (ThermoScientific), se blanqueó el equipo con el Buffer de Elusión (Roche) y se utilizó 2 uL de cada muestra para cuantificarla.

Según Somma (2015) la interferencia de contaminantes en las muestras medidas en el espectrofotómetro se puede calcular mediante el coeficiente A_{260}/A_{280} . Una medición entre 1,8 y 2,0 de este coeficiente nos indica que la muestra está libre de contaminantes como proteínas u otras sustancias. El espectrofotómetro utilizado nos indicó este coeficiente y de

acuerdo a este se descartaron las muestras que no cumplían con el criterio de buena calidad por presencia de contaminantes.

2.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Los primers utilizados en la PCR fueron reconstituidos con agua miliQ destilada y llevados a una concentración de 100 μ M. Las secuencias de los primers, tamaño del amplificado, temperatura de hibridación y referencia se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3.

Primers empleados para la amplificación de los genes 16S, *vacA*, *cagA* y *oipA*.

Regiones del ADN amplificadas	Nombre del primer	Secuencia del primer (5' a 3')	Temperatura de hibridación (°C)	Tamaño de los amplificadas (pb)	Referencia
16S rRNA	16S-F	GCTAAGAGATCAGCCTATGTCC	57	522	Cabrera-Andrade, et al., (2013).
	16S-R	TGGCAATCAGCGTCAGGTAATG	65		
<i>oipA</i>	<i>oipA</i> 1	CAAGCGCTTAACAGATAGGC	60.4	430	Torres, et al., (2014).
	<i>oipA</i> 2	AAGGCGTTTTCTGCTGAAGC	60.4		
<i>vacA</i> s1/ <i>vacA</i> s2	VAI-F	ATGGAATACAACAACACAC	54.8	259/2	Chattoadhyay, et al., (2004).
	VAI-R	CTGCTTGAATGGCCAAAC	60.2	86	
<i>vacA</i> m1/ <i>vacA</i> m2	VAG-F	CAATCTGTCCAATCAAGCGAG	60.6	567/6	Chattoadhyay, et al., (2004).
	VAG-R	GCGTCAAAATAATTCCAAGG	56.3	42	
<i>cagA</i>	<i>cag5c</i> -F	GTTGATAACGCTGTCGCTTC	59	350	
	<i>cag3c</i> -R	GGGTTGTATGATATTTCCATA A	55		

Para determinar la presencia de *Helicobacter pylori* se realizó la PCR para el gen 16S rRNA. Cada PCR se llevó a un volumen final de 25 μ L, las concentraciones utilizadas de cada reactivo se detallan en la Tabla 4. Se utilizó la enzima Platinum® *Taq* DNA polymerase (Promega) y nucleótidos de dNTP Set (100 mM, Invitrogen).

Tabla 4.

Componentes de la MasterMix para la amplificación del gen 16S.

Componente	Stock	Disolución	Concentración Final	Volumen X 1 (μL)
Agua mQ				16.7
Buffer	5X		1X	2.5
MgCl ₂	50 mM		1.5 mM	0.8
dNTPs (Total)	100 mM	10 mM	0,2 mM	0,5
Primer Forward	100 μM	10 μM	0,4 μM	1
Primer Reverse	100 μM	10 μM	0,4 μM	1
Taq	5 U/ μL		0,1 U/ μL	0,5
ADN			30 ng/ μL aprox.	2
Volumen final de reacción				25

Para la amplificación se utilizó el termociclador MultiGene™ OptiMax (Labnet international). En la Tabla 5. se muestran las condiciones utilizadas según Cabrera-Andrade, et al., (2013).

Tabla 5.

Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación del gen 16S.

Paso	Ciclos	Tiempo (min)	T (°C)
Desnaturalización inicial	1	5:00	94
Desnaturalización		1:00	94
Anillamiento	42	1:00	T _m
Elongación		2:00	72
Elongación Final	1	7:00	2

La temperatura de annealing empleada para cada par de primers fue estandarizada en base a los datos que el fabricante indicó. La estandarización se realizó a través de un gradiente de temperatura partiendo

del promedio de las temperaturas de annealing de los primers forward y reverse menos 5°C. La temperatura se varió desde la temperatura de partida, dos grados inferiores y dos superiores (± 2 °C).

Para determinar la presencia del gen *oipA* en las muestras positivas para *Helicobacter pylori*, se realizó una PCR con un volumen final de 25 μ L. Las concentraciones utilizadas de cada reactivo se detallan en la Tabla 6. Se utilizó la enzima Platinum® *Taq* DNA polymerase (Promega) y nucleótidos de dNTP Set (100mM, Invitrogen).

Tabla 6.

Componentes de la MasterMix para la amplificación del gen *oipA*.

Componente	Stock	Disolución	Concentración Final	Volumen x 1 (μ L)
Agua mQ				16
Buffer	5X		2X	5
MgCl ₂	50 mM		1.5 mM	0.8
dNTPs (Total)	100 mM	10 mM	0,2 mM	0,5
Primer Forward	100 μ M	10 μ M	0,08 μ M	0,2
Primer Reverse	100 μ M	10 μ M	0,08 μ M	0.2
Taq	5 U/ μ L		0,06 U/ μ L	0,3
ADN			30 ng/ μ L aprox.	2
Volumen final de reacción				25

Para la amplificación se utilizó el termociclador Mini Personal Multigene™ (Labnet international). En la Tabla 7. se muestran las condiciones utilizadas según Torres, et al., (2014).

Tabla 7.

Condiciones de PCR utilizadas para la amplificación del gen *oipA*.

Paso	Ciclos	Tiempo (min)	T (°C)
Desnaturalización inicial	1	3:00	94
Desnaturalización		0:30	94
Anillamiento	35	0:45	Tm
Elongación		0:45	72
Elongación Final	1	5:00	72

Para determinar la presencia de los genes *vacA* y *cagA*, además de la frecuencia de los diferentes genotipos *vacA s1/vacA s2* y *vacA m1/vacA m2* en las muestras positivas para *Helicobacter pylori*, se realizó una PCR multiplex para la amplificación de ambos genes. Cada PCR se llevó a un volumen final de 25 uL, las concentraciones utilizadas de cada reactivo se detallan en la Tabla 8. Se utilizó la enzima Platinum® *Taq* DNA polymerase (Promega) y nucleótidos de dNTP Set (100mM, Invitrogen).

Tabla 8.

Componentes de la MasterMix para la PCR multiplex utilizadas para la amplificación de los genes *vacA* y *cagA*.

Componente	Stock	Disolución	Concentración Final	Volumen X 1 (µL)
Agua mQ.				12.9
Buffer	5X		2X	5
MgCl ₂	50 mM		1.5 mM	0.8
dNTPs (Total)	100 mM	10 mM	0,2 mM	0,5
Primer Forward (VAI-F)	100 µM	10 µM	0,08 µM	0,2
Primer Reverse (VAI-R)	100 µM	10 µM	0,08 µM	0.2
Primer Forward (VAG-F)	100 µM	10 µM	0,08 µM	0,2
Primer Reverse (VAG-R)	100 µM	10 µM	0,08 µM	0.2
Primer Forward (cag5c-F)	100 µM	10 µM	0,4 µM	1
Primer Reverse (cag3c-R)	100 µM	10 µM	0,4 µM	1
Taq	5 U/µL		0,1 U/µL	0,5
ADN			30 ng/µL aprox.	2,5
Volumen final de reacción				25

Para la amplificación se utilizó el termociclador MultiGene™ OptiMax (Labnet international). En la Tabla 9. se muestran las condiciones utilizadas según Chattopadhyay, et al., (2004).

Tabla 9.

Condiciones de PCR multiplex para el gen *vacA* y *cagA*.

Paso	Ciclos	Tiempo (min)	T (°C)
Desnaturalización inicial	1	3:00	94
Desnaturalización		1:00	94
Anillamiento	35	1:00	Tm
Elongación		1:00	72
Elongación Final	1	10:00	72

La temperatura de alineamiento en esta PCR fue muy importante, la temperatura empleada para cada par de primers fue estandarizada en base a los datos que el fabricante especificó. La estandarización se realizó a través de un gradiente de temperatura partiendo del promedio de las temperaturas de melting de todos los primers forward y reverse, a cada promedio se le resto 5°C y se hizo un nuevo promedio. La temperatura se varió desde la temperatura de partida, con dos grados inferiores y dos superiores (± 2 °C).

2.5. ELECTROFORESIS

La técnica de electroforesis en geles de agarosa permite visualizar los fragmentos de ADN de acuerdo a su peso, carga y tamaño, además es una técnica sencilla y de bajo costo (Ahmed, 2009). Se utilizó esta técnica para evaluar la calidad del ADN extraído, para verificar la concentración de primers y para visualizar los productos de cada PCR.

Para el ADN extraído se utilizaron geles de agarosa al 1%(m/v), para los primers al 4%(m/v) y para productos de PCR se utilizaron al 2%(m/v). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio 10mg/ml en proporción de 1 uL por cada 20 mL de gel, que fue colocado antes de su gelificación en la mezcla de agarosa y TBE (1X). Junto con los fragmentos de ADN se empleó 1 uL de marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

Para la electroforesis del ADN se utilizó un voltaje de 100 V durante 2 horas al igual que para los productos de PCR, para los primers se utilizó un voltaje de 90 V durante un tiempo de 1 hora luego de los cuales se visualizó bajo luz UV en un transiluminador.

2.6. SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La secuenciación se realizó para verificar la correspondencia entre los productos de PCR visualizados en el gel con su respectiva secuencia. El protocolo para la secuenciación consta de una purificación de los productos de PCR, PCR de secuencia, purificación de los productos de PCR de secuencia y la electroforesis capilar.

2.6.1. Purificación de amplificados

Se siguió la técnica utilizada por IIB para la purificación de los productos de PCR mediante el reactivo Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter), esta técnica se basa en el sistema de separación magnético SPRI® (Solid Phase Reverse Immobilization), el protocolo que se utilizó se describe a continuación.

Se colocó el reactivo de AMPure a temperatura ambiente y se homogenizó con vórtex, se colocó 10ul de AMPure por cada 10ul de PCR en un tubo de 0.2mL. La mezcla se homogenizó por vórtex durante 5 segundos y se incubó durante 5 minutos. Después, se colocó los tubos en una placa magnética y se esperó que reposen durante 10 minutos hasta que se formó un halo de color café, que contenía los amplicones unidos a las perlas magnéticas, y el líquido quedó totalmente claro.

Con una micropipeta se aspiró el líquido procurando no tocar el halo que se formó en la pared del tubo. Se adicionó 200ul de etanol al 70% y se incubó durante 30 segundos, se eliminó el etanol por inversión de la placa magnética sobre papel absorbente hasta que se eliminó el etanol. Se repitió el lavado con etanol y se descartó el remanente de etanol de cada uno de los tubos con la ayuda de una micropipeta. Para eliminar completamente los restos de alcohol se colocó la placa magnética en la estufa a 37°C durante 15 minutos.

Se retiraron los tubos de la placa magnética para resuspender, se colocaron 40ul de Agua miliQ y se homogenizó por vórtex durante 5 segundos. Finalmente, se colocaron los tubos nuevamente en la placa y se transfirió el líquido sin tocar el halo a nuevos microtubos de 0.2 mL.

2.6.2. PCR de secuenciación

Para la PCR de secuencia se siguió el protocolo utilizado por el IIB, en esta técnica se utiliza el kit BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing (Applied Biosystems). Cada PCR se llevó a un volumen final de 6 uL, las concentraciones utilizadas de cada reactivo se detallan en la Tabla 10., se realizó la MasterMix en oscuridad ya que los reactivos son sensibles a la luz.

Tabla 10.

Componentes de la MasterMix para la PCR de secuenciación

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen X 1 (uL)
Agua mQ			1.5
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100			0,5
BigDye Terminator Sequencing Buffer	5X	0.75 X	0.9
Primer Forward/Reverse (Frío)	1 uM	0,27 uM	1,6
PCR (ADN amplificado)			1,5
Volumen Final de Reacción			6

Para la amplificación se utilizó el termociclador MultiGene™ OptiMax (Labnet international). En la Tabla 11. se muestran las condiciones utilizadas según el IIB-UDLA.

Tabla 11.
Condiciones de PCR de secuenciación.

Paso	Ciclos	Tiempo (min)	T (°C)
Desnaturalización inicial	1	3:00	96
Desnaturalización		0:10	96
Anillamiento	35	0:05	50.5
Elongación		4:00	60
Ciclo Final	1	10:00	4

2.6.3. Purificación de PCR de secuencia

En la PCR de secuencia se obtuvieron los amplificadores marcados, sin embargo fue necesario purificarlos mediante la utilización del reactivo Agencourt CleanSEQ (Beckman Coulter). El sistema Agencourt CleanSEQ está basado en la tecnología de inmovilización reversible en fase sólida (SPRI) y se encarga de la eliminación del tinte BigDye® Terminator utilizado en la PCR de secuencia. El protocolo utilizado fue adaptado del protocolo del IIB y se detalla a continuación.

Se dejó reactivo de CleanSeq a temperatura ambiente se homogenizó bien con vórtex. Se colocó 3ul de CleanSeq y con 4ul de etanol al 85% junto con 10ul de PCR de secuencia. Se homogenizó durante 5 segundos, se colocó los tubos en una placa magnética y se incubó la muestra a temperatura ambiente durante 3 minutos hasta que se formó un halo de color café, que contenía las perlas magnéticas unidas al producto de la secuenciación, y el líquido quedó totalmente claro.

Con la ayuda de una pipeta multicanal y sin tocar el halo formado en la pared del tubo se retiró todo el líquido, se adicionaron 100ul de etanol al 85% y se dejó incubar durante 30 segundos. Luego, se eliminó el etanol por inversión de la placa magnética sobre papel absorbente. Se repitió el lavado

para eliminar el remanente de etanol de cada uno de los tubos se utilizó una pipeta.

Para evaporar cualquier sobrante de alcohol, se colocó la placa magnética en la estufa a 37°C durante 15 minutos. Luego, se retiró los tubos de la placa magnética, se resuspendieron en 40ul de agua miliQ y se homogenizaron con vórtex durante 5 segundos. Finalmente, centrifugó durante un minuto a velocidad máxima y se colocó 20ul del sobrenadante (transparente) en la placa del secuenciador.

2.7. ELECTROFORESIS CAPILAR

Para la secuenciación se utilizó el equipo 3130 Genetic Analyzer Applied Biosystems® y las secuencias fueron visualizadas en el software Sequencing Analysis (Applied Biosystems®) luego, fueron analizadas en un programa de libre acceso Geneious R9 (<http://www.geneious.com/download>).

2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el correspondiente estudio se realizó un análisis estadístico con el programa IBM SPSS versión 11.5 (SPSS Inc. Chicago, Illinois USA). Se utilizaron los datos de los diagnósticos histopatológicos y resultados de las PCRs para los diferentes genotipos de *vacA+*, *cagA+* y *oipA+* para calcular el riesgo de presentar patologías gástricas mediante el OR (odds ratio) con un 95% de intervalo de confianza.

Para comparar la prevalencia de *Helicobacter pylori* con respecto al género y a la edad se realizó la prueba de Chi cuadrado (X^2) con un 95% de confianza. Los resultados de las pruebas se consideraron significativos cuando el valor de significancia (P) fue menor a 0.05.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1. MUESTRAS DE PACIENTES

De un total de 211 muestras de biopsias gástricas fijadas en parafina que se obtuvieron del Hospital AXXIS de Quito, estas corresponden a mujeres y hombres con edades entre 17 y 88 años, con una edad media de 45 años. Las muestras representan un total de 94 (44,5%) personas de sexo femenino y 117 (55,5%) de sexo masculino.

Los controles positivos entregados por parte del banco de muestras de la Universidad San Francisco de Quito corresponden a muestras de ADN obtenidas de cultivos de *Helicobacter pylori* que fueron positivos para los genes *oipA*, *vacA* y *cagA* por medio de PCR. La positividad de los controles fue corroborada por PCR con los primers de este estudio.

Los controles negativos corresponden a muestras de ADN negativas al gen 16S, es decir que no contienen ADN bacteriano sólo humano. Estos controles fueron proporcionados por el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de las Américas para este estudio.

3.2. DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

Fue analizado a partir de lo que se indica en las historias clínicas, este mostró que ninguna muestra presenta mucosa gástrica normal. Todas las 211 muestras presentaron patologías gástricas. En la Tabla 12. se observa el diagnóstico histopatológico en porcentajes.

Tabla 12.

Frecuencia de patologías gástricas observadas en el diagnóstico histopatológico.

Patología gástrica	Frecuencia n (%)
Gastritis crónica no atrófica	135/211 (64)
Gastritis crónica atrófica	48/211 (22.7)
Metaplasia intestinal	26/211 (12.3)
Displasia	1/211 (0.5)
Cáncer gástrico	1/211 (0.5)

3.3. EXTRACCIÓN DE ADN

Se realizó la extracción de 211 muestras de biopsias gástricas embebidas en parafina. Las muestras de ADN extraído fue visualizado en geles de agarosa al 1% (Figura 7.), aquellas muestras que tuvieron una baja concentración ($\leq 10\text{ng/uL}$) o la presencia de contaminantes ($A_{260}/A_{280} \neq 1,8-2,0$) se realizó una repetición del ensayo.

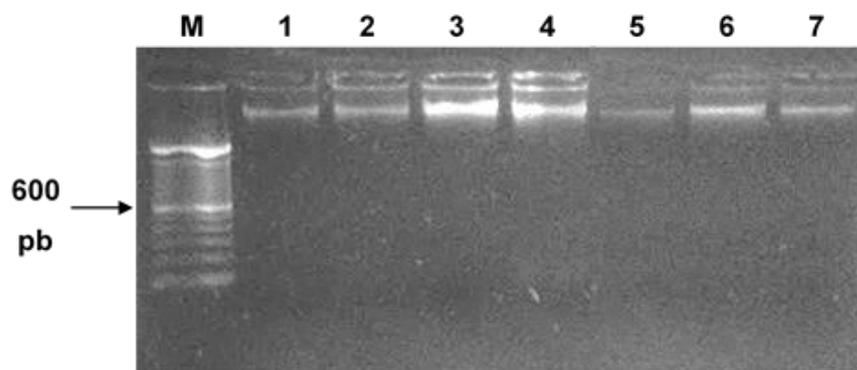


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de las muestras de ADN extraídas de biopsias gástricas en parafina: pocillo M, marcador de peso molecular de 100 pb; pocillo 1, control positivo; pocillos 2-7, muestras de ADN.

3.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA EL DIAGNÓSTICO DE *Helicobacter pylori*.

Con la utilización de los primers 16S-F y 16S-R se realizó la amplificación del gen 16S rRNA, la temperatura de melting de los primers fueron 57°C y 65°C indicadas por el fabricante. Se realizó un gradiente de temperatura a partir de la temperatura promedio de 56°C. Las temperaturas que se probaron fueron 54, 55, 56, 57 y 58°C. La temperatura de melting que dio una mejor banda fue 55°C.

Como resultado de la amplificación se obtuvieron fragmentos de 522 pares de bases que fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% (Figura 8.). Este diagnóstico molecular indicó que 118 (55,9%) muestras de un total de 211 fueron positivas para *Helicobacter pylori*. De este grupo, 47 (39,8%) fueron de sexo femenino y 71 (60,2%) fueron de sexo masculino.

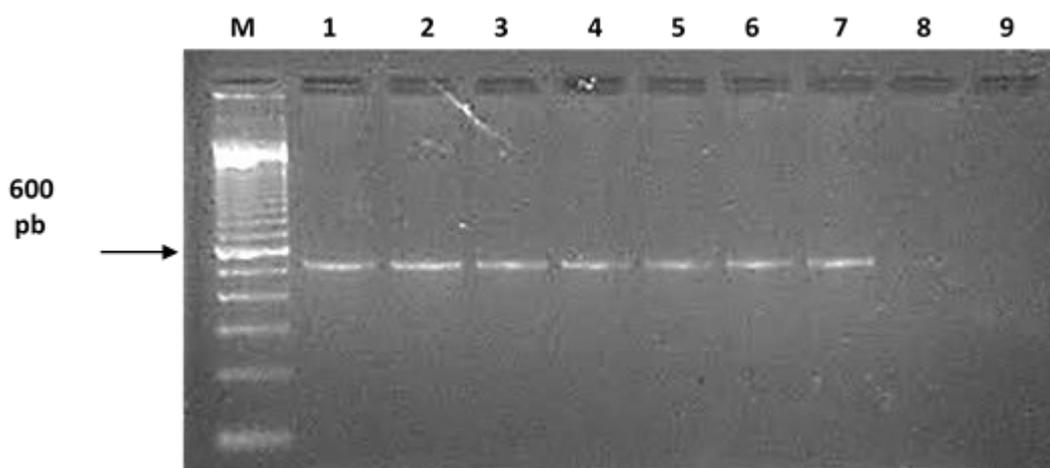


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la PCR para la detección de *H. pylori*, amplificación del fragmento correspondiente al gen 16s rRNA: pocillo M, marcador de peso molecular 100pb; pocillo 1, control positivo; pocillo 2-7, muestras *H. pylori* positivas; pocillo 8, muestra *H. pylori* negativa; pocillo 9, blanco.

Para calcular la frecuencia de las muestras positivas para *Helicobacter pylori* asociadas con el género se realizó una prueba de Chi cuadrado; en

esta se encontró que no existe una diferencia significativa ($P=0.153$) entre el sexo de los pacientes y la presencia de la bacteria (Tabla 13.).

Tabla 13.

Frecuencia del gen 16S asociado con el género de los pacientes con Helicobacter pylori.

<i>H. pylori</i>	Género		Valor P
	Masculino	Femenino	
Positivo	70/117 (59.8)	47/94 (50)	0.153
Negativo	47/117 (40.2)	47/94 (50)	

Para calcular la frecuencia de las muestras positivas para *Helicobacter pylori* asociada con la edad del paciente se subdividió a la variable paciente en dos categorías; pacientes con menos de cuarenta años y pacientes con cuarenta o más años. Se realizó una prueba de Chi cuadrado donde no se encontró diferencias significativas ($P=0.026$) entre ambos grupos (Tabla 14.).

Tabla 14.

Frecuencia del gen 16S asociado con el género de los pacientes

Edad del paciente	Casos n (%)	Valor P
<40	55/85 (64.7)	0.026
40 o más	62/126 (49.2)	

De las 118 muestras positivas para *Helicobacter pylori* se encontró que ninguna muestra presentaba cáncer gástrico. La prevalencia de *Helicobacter pylori* de acuerdo a las otras patologías gástricas se detalla en la Tabla 15.

Tabla 15.

Frecuencia de cada patología gástrica en las muestras con Helicobacter pylori.

Patología gástrica	Frecuencia n (%)
Gastritis crónica no atrófica	71/118 (60,1)
Gastritis crónica atrófica	34/118 (28,8)
Metaplasia intestinal	12/118 (10,3)
Displasia	1/118 (0,8)

3.5. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL GEN *oipA*.

Con la utilización de los primers *oipA1* y *oipA2* se realizó la amplificación del gen de virulencia *oipA*, la temperatura de melting de los primers fue 60.4°C indicada para ambos por el fabricante. Se realizó un gradiente de temperatura a partir de la temperatura promedio de 55.4°C. Las temperaturas que se probaron fueron 54.5, 55.5, 56.5, 57.5, 58.5, 59.5 y 60°C. La temperatura de melting que dio una mejor banda fue 60°C.

Como resultado de la amplificación se obtuvieron fragmentos de 430 pb que fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% (Figura 9.). La PCR indicó que 98 (83%) muestras de un total de 118 fueron positivas para el gen *oipA*.

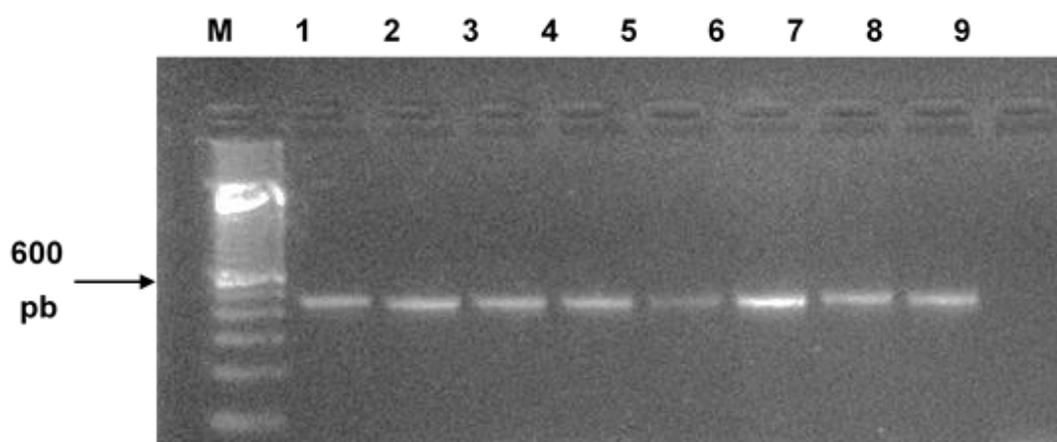


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la amplificación del gen *oipA*: pocillo M, marcador de peso molecular 100pb: pocillo 1, control positivo para el gen *oipA*; pocillos 2-8, muestras *oipA* positivas; pocillo 9, blanco.

La presencia del gen *oipA* fue más frecuente en la gastritis crónica no atrófica y en la gastritis crónica atrófica con 59,2 y 30,6% respectivamente, comparado con las patologías de metaplasia intestinal y displasia que fueron de 9,2 y 1% respectivamente (Tabla 16.). De este grupo, 39 (83%) fueron de sexo femenino y 59 (83%) fueron de sexo masculino. Además, que 49/56 (87.5%) pertenecen al grupo de menores de 40 años y 49/62 (79%) al grupo de mayores de 40.

Tabla 16.

Estatus del gen *oipA* en las muestras infectadas con *Helicobacter pylori*

Patología gástrica	<i>Helicobacter pylori</i> positivo por PCR	
	n=118/211 (56)	n <i>oipA</i> + = 98/118 (83)
Gastritis crónica no atrófica	71/118 (60,1)	58/98 (59.2)
Gastritis crónica atrófica	34/118 (28,8)	30/98 (30.6)
Metaplasia intestinal	12/118 (10,3)	9/98 (9.2)
Displasia	1/118 (0,8)	1/98 (1)

Con el fin de correlacionar las patologías gástricas y el estatus de *oipA*, se realizó una regresión logística para encontrar el odds ratio (OR), esta prueba reveló que la presencia del gen *oipA* no incrementa significativamente el riesgo de padecer las diferentes patologías gástricas (Tabla 17.).

Tabla 17.
Odds ratio para el gen *oipA* y las patologías gástricas

Patología gástrica	n (%)	OR (CI, 95%)
Gastritis crónica no atrófica	58/98 (59.2)	0.960 (0.816-1.129)
Gastritis crónica atrófica	30/98 (30.6)	1.090 (0.928-1.280)
Metaplasia intestinal	9/98 (9.2)	1.097 (0.936-1.286)
Displasia	1/98 (1)	1.206 (1.111-1.310)

3.6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES *vacA* y *cagA*.

Con la utilización de los primers VAI-F, VAI-R, VAG-F y VAG-R se realizó la amplificación del gen de virulencia *vacA* regiones s y m respectivamente, la temperatura de melting promedio de los primers fue 52.2 y 53.5°C respectivamente. Para la amplificación del gen *cagA* se utilizaron los primers *cag5c-F* y *cag3c-R* cuya temperatura de melting promedio fue de 54.5°C. Para la amplificación de ambos genes se realizó un gradiente de temperatura desde la temperatura promedio 54°C. Las temperaturas

probadas fueron 51, 52, 53, 54, 55 y 56°C de las cuales la que mejor amplificación dio fue la de 56°C.

Como resultado de la amplificación se obtuvieron fragmentos de 259/286pb para los fragmentos correspondientes al gen *vacA* región s1/s2, de 567/642 para el gen *vacA* región m1/m2 y de 350pb para el fragmento correspondiente al gen *cagA* (Figura 10.). Los resultados de la PCR indicaron que 81(68.6%) muestras de un total de 118 fueron positivas para el gen *vacA*. De las cuales 64(54.2%) son *vacA* m1, 14(11.9%) son *vacA* m2, 71(60.1%) son *vacA* s1 y 8(6.8%) son *vacA* s2.

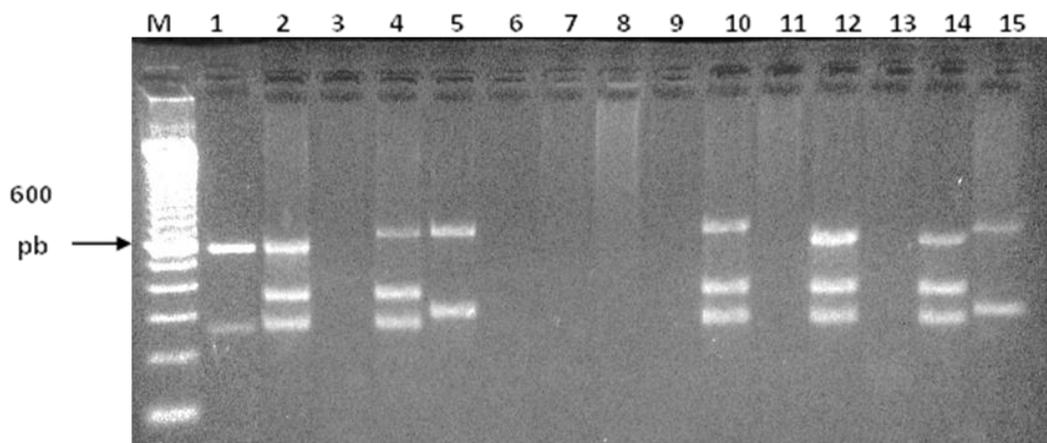


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la amplificación de los genes *vacA* y *cagA*: pocillo M, marcador de peso molecular 100 pb; pocillo 1, genotipo *vacA* m1/s1, *cagA*-; pocillos 2, 12 y 14, genotipo *vacA* m1/s1, *cagA*+; pocillos 4 y 10, genotipo *vacA* m2/s1, *cagA*+; pocillos 5 y 15, genotipo *vacA* m2/s2, *cagA*-; pocillos 3, 6-9, 11 y 13: muestras negativas a ambos genes.

Con la amplificación además, se pudo clasificar las muestras positivas en los diferentes genotipos del gen *vacA* dependiendo de su tamaño de fragmento (Tabla 18.). La mayoría, 62 (76.5%) poseen genotipo m1/s1 y con porcentajes menores los demás genotipos m1/s1 y m2/s2, además se presentaron 3 (3.7%) que solo amplificaron para *vacA* s1 y 2 (2.5%) solo *vacA* m1.

Tabla 18.
Distribución de genotipos del gen *vacA*.

Genotipos de <i>vacA</i>	n (%)
	n <i>vacA</i> + = 81/118 (83)
<i>vacA</i> m1/s1	62/81 (76.5)
<i>vacA</i> m2/s2	8/81 (9.9)
<i>vacA</i> m2/s1	6/81 (7.4)
<i>vacA</i> s1	3/81 (3.7)
<i>vacA</i> m1	2/81 (2.5)

La distribución de los diferentes genotipos de *vacA* con respecto a las diferentes patologías gástricas se evaluó mediante una prueba de odds ratio, en donde se pudo observar que los diferentes genotipos sólo se encuentran en las patologías Gastritis crónica no atrófica, Gastritis crónica atrófica y Metaplasia intestinal. La Tabla 19. Nos muestra que el genotipo *vacA* s1 aumenta en 4.417 veces el riesgo de padecer Metaplasia intestinal y el genotipo *vacA* m1 aumenta en 2.471 veces el riesgo de padecer Gastritis crónica atrófica.

Tabla 19.Odds ratio para el gen *vacA* y las patologías gástricas

Patología gástrica	Genotipos de <i>vacA</i> identificados por PCR				
	n <i>vacA</i> m1/s1=62/81 (76.5)	n <i>vacA</i> m2/s2=8/ 81 (9.9)	n <i>vacA</i> m2/s1=6/81 (7.4)	n <i>vacA</i> s1=3/81 (3.7)	n <i>vacA</i> m1=2/81 (2.5)
Gastritis crónica no atrófica	35/81 (43.2)	5/81(6.1)	4/81(4.9)	2/81(2.5)	1/81(1.2)
OR (CI, 95%)	0.858 (0.610-1.207)	1.103 (0.277-4.399)	1.324 (0.253-6.941)	1.324 (0.124-14.191)	0.662 (0.042-10.326)
Gastritis crónica atrófica	20/81 (24.7)	3/81(3.7)	2/81(2.5)	0/81(0)	1/81(1.2)
OR (CI, 95%)	1.176 (0.826-1.675)	1.482 (0.375-5.862)	1.235 (0.237-6.432)		2.471 (0.159-38.378)
Metaplasia intestinal	7/81 (8.6)	0/81(0)	0/81(0)	1/81(1.2)	0/81(0)
OR (CI, 95%)	1.124 (0.674-1.876)			4.417 (0.432-45.170)	

También se relacionó la presencia de los diferentes genotipos de *vacA* con el sexo y la edad de los pacientes (Tabla 20. y Tabla 21.).

Tabla 20.Frecuencia del gen *vacA* asociado con el género de los pacientes con *Helicobacter pylori*

Genotipos de <i>vacA</i>	Género	
	Masculino	Femenino
<i>vacA</i> m1/s1	35/71 (49.3)	27/47 (57.4)
<i>vacA</i> m2/s2	5/71 (7)	3/47 (6.4)
<i>vacA</i> m2/s1	2/71 (2.8)	4/47 (8.5)
<i>vacA</i> s1	3/71 (4.2)	0/47 (0)
<i>vacA</i> m1	1/71 (1.4)	1/47 (2.1)

Tabla 21.

Frecuencia del gen *vacA* asociado con la edad de los pacientes con *Helicobacter pylori*

Genotipos de <i>vacA</i>	Edad del paciente	
	<40	40 o más
<i>vacA m1/s1</i>	30/56 (53.6)	32/62 (51.6)
<i>vacA m2/s2</i>	2/56 (3.6)	6/62 (9.7)
<i>vacA m2/s1</i>	3/56 (5.4)	3/62 (4.8)
<i>vacA s1</i>	1/56(1.8)	2/62 (3.2)
<i>vacA m1</i>	1/56 (1.8)	1/62 (1.6)

Con respecto al gen *cagA*, se obtuvo un fragmento de 350 pares de bases, que fue visualizado en un gel de agarosa al 2% (Figura 10.). Los resultados de la PCR mostraron que un total de 52 (44%) muestras fueron positivas para el gen *cagA*, de estas 24/47 (51.1%) fueron de sexo femenino y 28/71 (39.4%) de sexo masculino. Igualmente, para las muestras positivas para el gen *cagA* asociada con la edad de los pacientes tenemos que 26/56 (46.4%) tienen menos de cuarenta años y 26/62 (41.9%) 40 años o más.

La presencia del gen *cagA* fue más frecuente en la gastritis crónica no atrófica y en la gastritis crónica atrófica con 59,6 y 30,8% respectivamente, comparado con la patología de Metaplasia intestinal que fue del 9.6% (Tabla 22.).

Tabla 22.Estatus del gen *cagA* en las muestras infectadas con *Helicobacter pylori*.

Patología gástrica	<i>Helicobacter pylori</i> positivo por PCR	
	n=118/211 (56)	n <i>cagA</i> + = 52/118 (44)
Gastritis crónica no atrófica	71/118 (60,1)	31/52 (59.6)
Gastritis crónica atrófica	34/118 (28,8)	16/52 (30.8)
Metaplasia intestinal	12/118 (10,3)	5/52 (9.6)
Displasia	1/118 (0,8)	0/52 (0)

Con el fin de correlacionar las patologías gástricas y el estatus de *cagA*, se realizó una regresión logística para encontrar el odds ratio (OR), esta prueba reveló que la presencia del gen *cagA* no incrementa significativamente el riesgo de padecer las diferentes patologías gástricas (Tabla 23.).

Tabla 23.Odds ratio para el gen *cagA* y las patologías gástricas

Patología gástrica	n (%)	OR (CI, 95%)
Gastritis crónica no atrófica	31/52 (59.6)	0.977 (0.646-1.478)
Gastritis crónica atrófica	16/52 (30.8)	1.098 (0.712-1.694)
Metaplasia intestinal	5/52 (9.6)	0.940 (0.465-1.897)

Se analizó la relación entre los diferentes genotipos de *vacA* y el estado positivo del gen *cagA* mediante una prueba de Chi cuadrado en donde se encontró una relación significativa ($p < 0.05$) entre la variante *vacA* m1/s1 y el estatus *cagA*+ en un total de 48(92.3%) muestras (Tabla 24.)

Tabla 24.

Relación entre los genotipos de *vacA* y el estatus de *cagA* en las muestras de *Helicobacter pylori*: Nd, no detectado; *, estadísticamente significativo ($p < 0.05$, prueba χ^2).

Genotipos de <i>vacA</i>	Estatus de <i>cagA</i>	
	<i>cagA</i> +	<i>cagA</i> -
<i>vacA</i> m1/s1*	48/52(92.3)	14/66(21.2)
<i>vacA</i> m2/s2	1/52(1.9)	7/66(10.6)
<i>vacA</i> m2/s1	3/52(5.8)	3/66(4.5)
<i>vacA</i> s1	Nd	3/66(4.5)
<i>vacA</i> m1	Nd	2/66(3)

Así mismo se analizó la relación entre la presencia del gen *oipA* y el estado positivo del gen *cagA* mediante una prueba de Chi cuadrado en donde no se encontró una relación significativa ($p = 0.115$) (Tabla 25.).

Tabla 25.

Relación entre el gen *oipA* y el estatus de *cagA* en las muestras de *Helicobacter pylori*: no estadísticamente significativo ($p > 0.05$, prueba χ^2).

<i>oipA</i>	Estatus de <i>cagA</i>		Valor P
	<i>cagA</i> +	<i>cagA</i> -	
Positivo	40/52(76.9)	58/66(87.9)	0.115
Negativo	12/52(23.1)	8/66(12.1)	

3.7. SECUENCIACIÓN

Se realizó la secuenciación de los fragmentos obtenidos en la identificación de los genes *oipA*, *vacA* y *cagA* mediante PCR. En los electroferogramas obtenidos a partir de secuenciación se observaron los diferentes genes. Para comprobar que las secuencias obtenidas correspondían a fragmentos de los genes *oipA*, *vacA* y *cagA*, se realizó un alineamiento por medio del programa Geneious 9.0.5 con la herramienta BLAST del NCBI (Anexo4.).

Las secuencias de los fragmentos del gen *vacA* m y s (Figuras 11.y 12.) obtenidas por secuenciación correspondían con un 91.3% y con 95,7% de homología respectivamente a las regiones analizadas del gen *vacA* de *Helicobacter pylori* (Anexo 4. A y B).

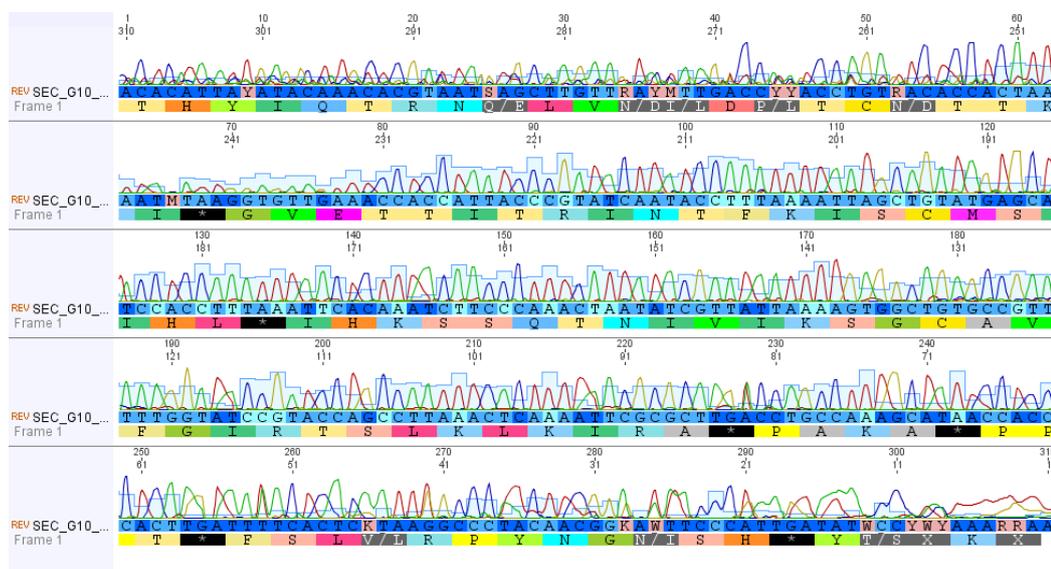


Figura 11. Electroferograma de la secuencia reverse del gen *vacA* m.

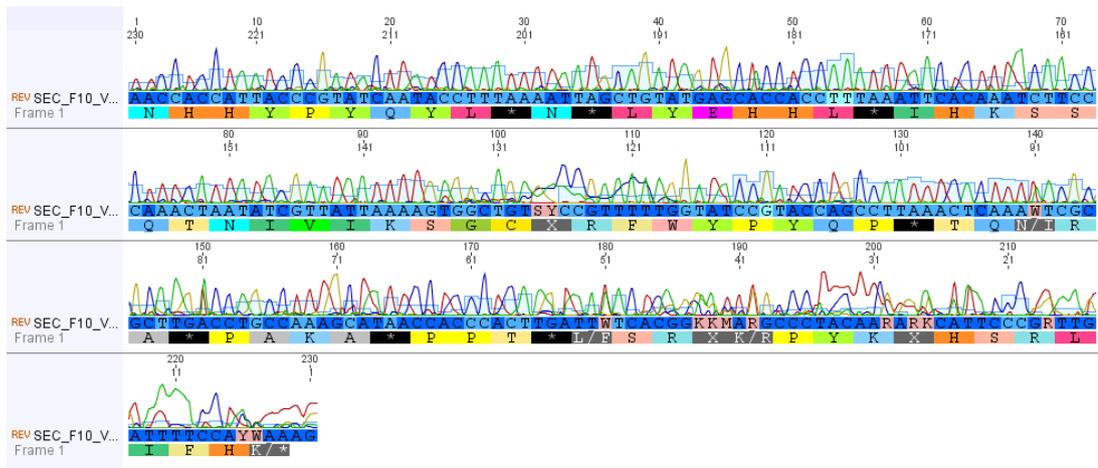


Figura 12. Electroferograma de la secuencia reverse del gen *vacA s1*.

Las secuencia del fragmento del gen *cagA* obtenidas por secuenciación (Figura 13.) correspondió con un 98.4% de homología al gen *cagA* de *Helicobacter pylori* (Anexo 4. C.).

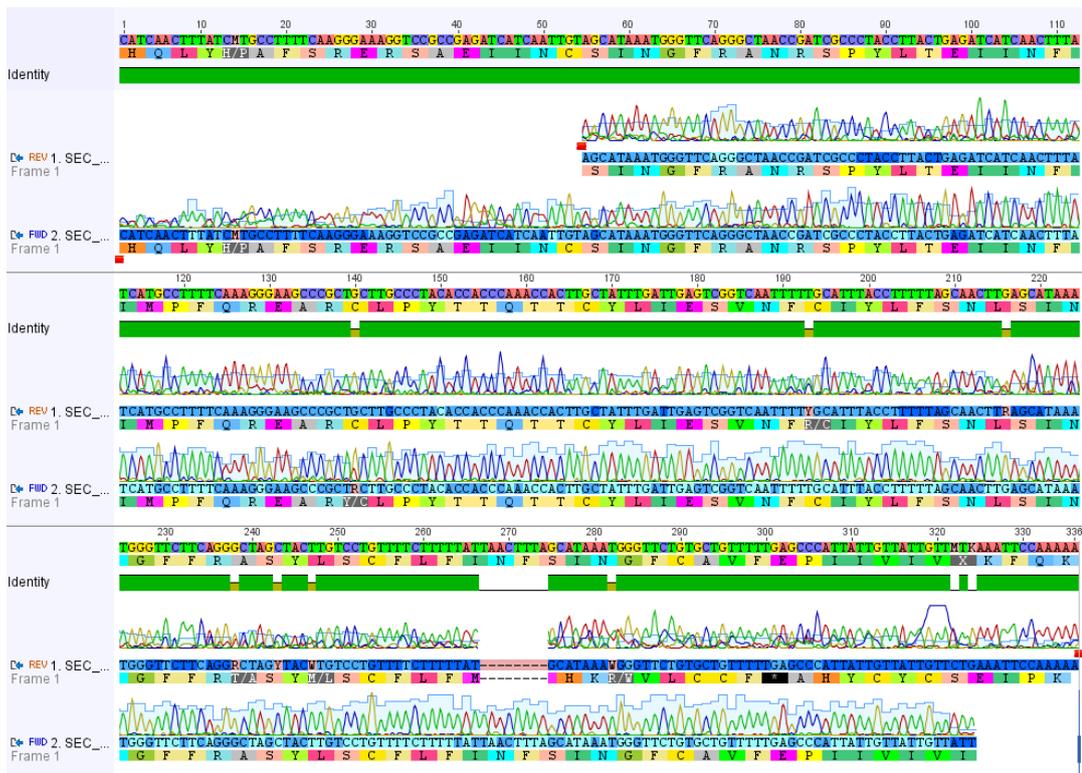


Figura 13. Electroferograma del gen *cagA*, se observan las secuencias forward, reverse y la secuencia consenso.

Las secuencia del fragmento del gen *oipA* obtenidas por secuenciación (Figura 14.) correspondió con un 97.9% de homología al gen *oipA* de *Helicobacter pylori* (Anexo 4. D.).

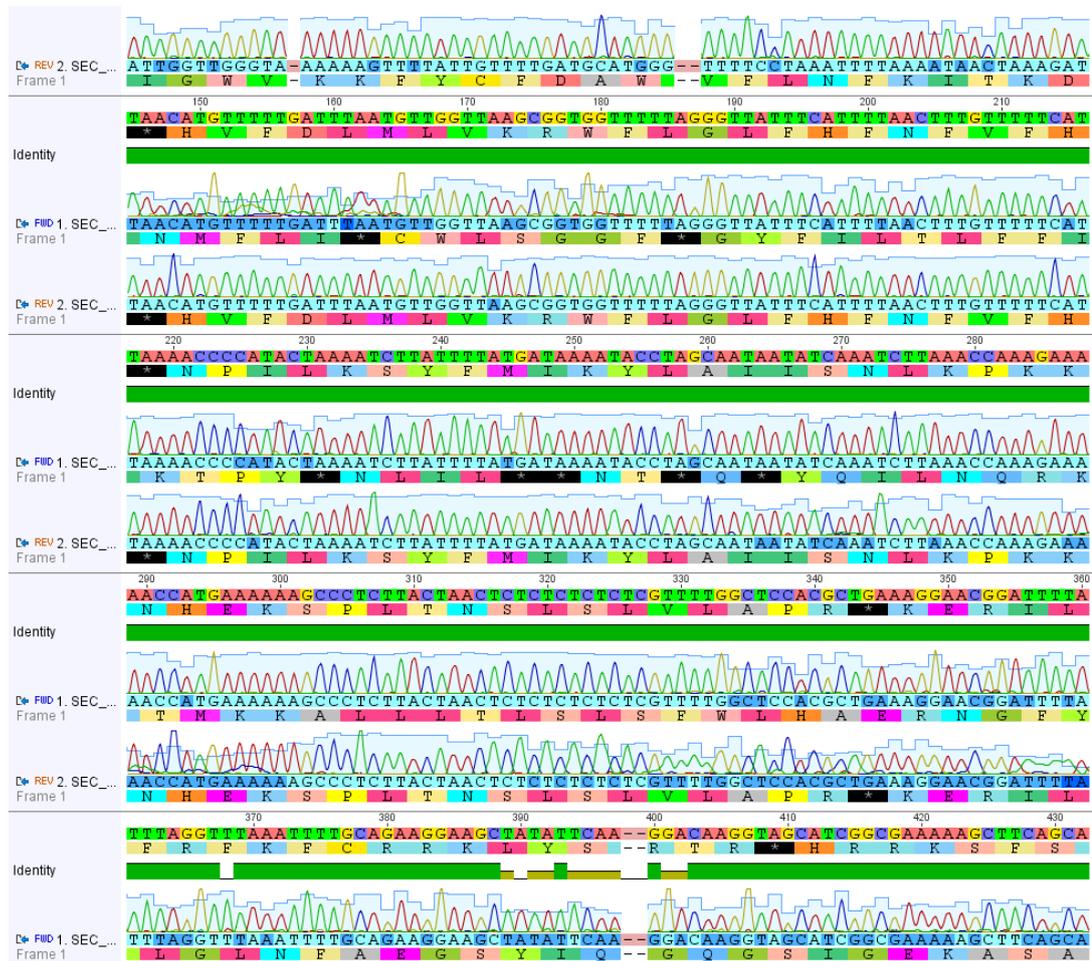


Figura 14. Electroferograma del gen *oipA* se observan las secuencias forward, reverse y la secuencia consenso.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

Como método de extracción del material genético ADN se utilizó el kit comercial High Pure PCR Template Preparation Kit de Roche para la extracción de ADN de *Helicobacter pylori* de biopsias embebidas en parafina (Figura 7). De Armas, et al., (2006) indica que el material biológico conservado en parafinas es una fuente descomunal de información para las investigaciones que tienen un carácter retrospectivo, tal y como es el nuestro. Además, es una estrategia alentadora para estudios epidemiológicos contar con métodos moleculares que permitan detectar *Helicobacter pylori* en tejidos embebidos en parafina, así como contribuye a establecer las relaciones de genotipos del microorganismo con patologías, epidemiología y otras variables del paciente (Escobar, et al., 2013).

Se identificó la presencia de *Helicobacter pylori* en las muestras de parafinas con la técnica de PCR por la amplificación del gen 16S rRNA. La ventaja de la utilización de la PCR es que esta identifica *Helicobacter pylori* en muestras pequeñas que tienen pocas bacterias presentes además las muestras pueden ser obtenidas tanto mediante métodos invasivos como no invasivos (Garza, Perez, & Maldonado, 2014). La función diagnóstica del gen 16S rRNA en contra parte de otras pruebas de identificación muestra una sensibilidad de casi el 100% y una especificidad mayor a otras pruebas como las serológicas o microbiológicas (Rojas, Barragán, Bayona, Oliveros, & Gutiérrez, 2015).

La prevalencia de *Helicobacter pylori* en las muestras fue del 55,9% que representa a más de la mitad de las muestras pero aún es mucho menor de las reportadas por Gomez, et al. (2005) que informó de que la prevalencia de la infección de *Helicobacter pylori* en pacientes ecuatorianos es del 89,5%. Otros estudios como los de Sempértegui, et al. (2007) y de Sasaki, et

al. (2009) indican igualmente una alta prevalencia de *Helicobacter pylori*, del 75,5 y 93.8% respectivamente en pacientes ecuatorianos.

Datos estadísticos muestran que la prevalencia de *Helicobacter pylori* se incrementa con respecto a la edad, en países desarrollados se incrementa en un 10% en adultos jóvenes y en un 70% en mayores de 40 años, además que la posibilidad de ser infectado por el microorganismo es de entre 10-40% en adultos sanos comparado con el 80-100% en pacientes con alguna patología gástrica. Los datos se alarman al contraponerlos con los países subdesarrollados en donde más de 50% de los niños presentan infección por *Helicobacter pylori* antes de los 5 años (Premoli, González, Millán, Percoco, & Vielma, 2004). En el presente estudio se realizó el análisis de la prevalencia de *Helicobacter pylori* con respecto a la edad del paciente, los resultados que son estadísticamente significativos ($P=0.026$) muestran que existe un mayor porcentaje de contraer el microorganismo antes de los 40 años (64.7%).

El estudio del gen *oipA* ha logrado una gran controversia, algunas investigaciones han determinado una relación entre la presencia de este gen y el desarrollo de patologías gástricas así como un aumento de la secreción de interleucina (IL)-8 de las células epiteliales *in vitro* y la inflamación gástrica aumentada *in vivo* (Yamaoka, et al., 2002), no obstante, otras investigaciones no han encontrado estas relaciones (Odenbreit, Kavermann, Püls, & Haas, 2002). Pese a que la función de esta proteína no ha sido elucidada por completo, su relación definitiva con la patogénesis nos obligó a estudiarla en este trabajo de investigación donde nuevamente se observa que pese a su alta prevalencia (83%) no aumenta el riesgo en ninguna de las patologías gástricas estudiadas (Tablas 16. y 17.).

Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Sedaghat, et al. (2014) en donde la prevalencia del gen *oipA* es del 81.1%, y también por Torres, et al. (2014) con resultados más altos y pertenecientes a

poblaciones latinoamericanas del 93.8% de prevalencia. Sin embargo el meta-análisis realizado por Liu, et al. (2013) concluye que el estudio de la presencia/ausencia del gen *oipA* pasa por alto la importancia de su estado funcional on/off y no corresponde resultados fiables para predecir los riesgos de úlcera péptica y cáncer gástrico.

Varios estudios han demostrado que el genotipo del gen *vacA* varía entre cepas de *Helicobacter pylori* provenientes de distintas regiones geográficas, así que no son válidas las conclusiones de una región geográfica para otra (Faundez, Troncoso, & Figueroa, 2002). Se observó una alta prevalencia del genotipo *vacA* m1/s1 (76.5%) con relación a los otros genotipos *vacA* m2/s2 (9.9%), *vacA* m2/s1 (7.4%), *vacA* s1 (3.7%) y *vacA* m1 (2.5%) (Tabla 18.). Estos datos corresponden a los reportados por Yamaoka, et al., (1999) en donde la prevalencia de este genotipo es mayor en Corea, Japón, Estados Unidos y Colombia, en contra parte a los encontrados en otros países como Irán (Sedaghat, et al., 2014) y Brasil (De Figueiredo, et al., 2012) en donde la variante alélica más frecuente es *vacA* m2/s1. Se conoce que las cepas *vacA* s1/m1 producen altos niveles de la toxina, las cepas *vacA* s1/m2 producen niveles de toxina bajos o moderados, mientras que las cepas s2/m2 no producen toxina. Por el momento no se han encontrado cepas del tipo *vacA* s2/m1 (van Doorn, et al., 1998). Las regiones s y m del gen han demostrado diferente relevancia clínica, las cepas *vacA* s1 se asocian con mayores neutrófilos y linfocitos infiltrados de la mucosa del antro que las del tipo s2, así como las cepas *vacA* m1 se asocian con un mayor daño del epitelio gástrico que las cepas de tipo m2 (Atherton, et al., 1995).

Con relación a las patologías gástricas no se encontró un aumento significativo en el riesgo (OR) y la presencia del gen *vacA* en los genotipos m1/s1, *vacA* m2/s2 y *vacA* m2/s, pero si en los genotipos *vacA* s1 y *vacA* m1 donde el riesgo aumentó en 4.417 y 2.471 con respecto a las enfermedades Metaplasia intestinal y Gastritis cónica atrófica respectivamente (Tabla 19.)

Estudios en esta parte de América han demostrado la asociación entre el genotipo *vacA* s1 y el desarrollo de úlcera duodenal así como la del genotipo *vacA* m1 con la presencia de úlceras pépticas (De Gusmaom, et al., 2000). Sin embargo estudios realizados en otras regiones como Asia demuestran resultados contradictorios, en donde no se relaciona ninguna de las variantes de *vacA* con las patologías gástricas (Faundez, Troncoso, & Figueroa, 2002). Por consiguiente se puede afirmar que el gen *vacA* no tiene un valor predictivo como marcador de riesgo para el desarrollo de patologías gástricas severas.

La detección del gen *cagA* en las muestras del estudio mostró una alta prevalencia (44%) lo que es similar a la tasa reportada por Sasaki, et al., (2009) donde *cagA* se detectó en el 45,9% en pacientes ecuatorianos. En países donde existe menor incidencia de cáncer que en el nuestro se pueden encontrar menores incidencias del gen, así por ejemplo en el mismo estudio de Sasaki, et al., se reporta una prevalencia de tan sólo el 20% para pacientes panameños.

En este estudio no se obtuvo un aumento significativo del riesgo de contraer ninguna patología gástrica por la presencia del gen *cagA* (Tabla 23.). Sin embargo, el meta-análisis realizado por Huang, et. al., (2003) llegó a la conclusión de que la infección con cepas *cagA+* de *Helicobacter pylori* aumenta el riesgo de cáncer gástrico en comparación al riesgo asociado con la infección *cagA-*, así mismo, la determinación del estado *cagA* en la infección por *Helicobacter pylori* puede conferir un beneficio adicional en la identificación de poblaciones en mayor riesgo de cáncer gástrico.

Se analizó la relación entre los diferentes genotipos de *vacA* y el estado positivo del gen *cagA*, se encontró una relación significativa ($p < 0.05$) entre la variante *vacA* m1/s1 y el estatus *cagA+* en un total de 48(92.3%) muestras (Tabla 24.). Estos resultados se relacionan con los encontrados en la población chilena en donde sugieren que esta población está infectada por

una cepa de *Helicobacter pylori* con el genotipo *cagA+/vacA s1m1* y esta puede estar asociada con un mayor riesgo de contraer enfermedades gástricas como úlcera (Faundez, Troncoso, & Figueroa, 2002).

Al realizar la comparación entre el estatus del gen *cagA* y la presencia del gen *oipA* no se encontraron diferencias significativas entre grupos (Tabla 25.), sin embargo la prevalencia de las cepas *cagA+/oipA+* es alta (76.9%) lo que concuerda con los datos encontrados por Quiroga, Cittelley, & Bravo, (2005) donde la frecuencia de esta misma cepa fue del 81%, así mismo lo reportado por Ando, et al., (2002) donde encontraron el 96% de las cepas *cagA+/oipA-on*. Además que ninguna de las *cagA-* tenía el gen *oipA* funcional. Esto sugiere que las cepas *cagA-* que presentaron el gen *oipA+* 58/66 (87.9%) pueden portar el gen en estado no funcional (off). Otro estudio realizado con pacientes colombianos y estadounidenses *oipA* funcional se asoció significativamente con alta densidad de *Helicobacter pylori*, la infiltración de neutrófilos severa y altos niveles de IL-8 (P <0,001) (Yamaoka, et al., 2002).

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

Se logró optimizar la extracción de ADN para muestras de biopsias gástricas parafinadas, así como se estandarizó la amplificación de los genes *vacA* y *cagA* mediante PCR múltiplex y *oipA* mediante PCR. La identificación de estos genes cuya expresión es diferente en cada muestra puede conferir una mayor capacidad de adaptación a la bacteria y, eventualmente, favorecer el desarrollo de patologías gástricas

La prevalencia de *Helicobacter pylori* con respecto a la edad del paciente muestran que existe un mayor porcentaje de contraer el microorganismo antes de los 40 años (64.7%), los resultados son estadísticamente significativos ($P=0.026$) mediante la prueba de Chi cuadrado.

Los resultados sugieren que los genes *cagA* y *oipA* y sus respectivos genotipos por si solos no se asocian ni aumentan el riesgo (OR) de presencia de las patologías gástricas como; gastritis crónica no atrófica, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia o cáncer gástrico,

Con relación a las patologías gástricas no se encontró un aumento significativo en el riesgo (OR) y la presencia del gen *vacA* en los genotipos *m1/s1*, *vacA m2/s2* y *vacA m2/s*, pero si en los genotipos *vacA s1* y *vacA m1* donde el riesgo aumentó en 4.417 y 2.471 con respecto a las enfermedades Metaplasia intestinal y Gastritis crónica atrófica respectivamente

La combinación *vacA* se asocia con la presencia del estado activo de *cagA+*, mediante la prueba Chi cuadrado se encontró una relación significativa ($p<0.05$) entre la variante *vacA m1/s1* y el estatus *cagA+* en un total de 48(92.3%) muestras

No se encontraron diferencias significativas ($p=0.115$) entre el estado activo del gen *cagA* y la presencia del gen *oipA*, sin embargo la prevalencia de las cepas *cagA+/oipA+* es alta (76.9%).

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

Con respecto a la identificación del gen *oipA*, dado los resultados no concluyentes se recomienda realizar un estudio del estado funcional on/off del gen mediante análisis de las secuencias y sus repeticiones CT. Lo que ayudaría a una mejor correlación del gen tanto con las patologías gástricas como con la relación con otros genes como *cagA*.

De igual forma se sugiere profundizar en la genotipificación del gen *vacA* en sus variantes *vacA* s1a, s1b, s1c y *vacA* m2a, m2b ya que mucha de la bibliografía citada se refiere específicamente a estas variantes, lo cual ayudaría a relacionar mejor el gen tanto con las patologías gástricas como con otros genes como *cagA*.

Se recomienda tener muestras de patologías gástricas como úlcera péptica, ya que se ha relacionado a *Helicobacter pylori* como agente causal también de esta enfermedad.

Con respecto a la información perteneciente a las historias clínicas de las muestras utilizadas, se recomienda obtener el grado de infección de *Helicobacter pylori* con el fin de obtener otros resultados, donde se relacione la cantidad de la bacteria con las diferentes patologías y genes.

Aparte de las biopsias, se cuenta con avances en la detección de *Helicobacter pylori* con técnicas no invasivas, se recomienda estudiar nuevas pruebas moleculares que puedan colaborar con otro enfoque o eficacia, por ejemplo la técnica FISH documentada por Fontenete et al., (2015).

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, M. (2009). *Biotechnology : A Text Book*. India: Global Media.
- Akamatsu, T., Tabata, K., Hironga, M., Kawakami, H., & Uyeda, M. (1996). Transmission of *Helicobacter pylori* infection via flexible fiberoptic endoscopy. *Am J Infect Control.*, 396-401.
- Ando, T., Peek, R., Pride, D., Levine, S., Takata, T., Lee, Y., . . . Blaser, M. (2002). Polymorphisms of *Helicobacter pylori* HP0638 reflect geographic origin and correlate with *cagA* status. *J Clin Microbiol*, 40(1), 239-46.
- Arévalo, A., Trespalcios, A., & Otero, W. (2009). Importancia de la proteína CagA en infección por *Helicobacter pylori*. *Rev Col Gastroenterol*, 388-395.
- Atherton, J., Cao, P., Peek, R., Tummuru, M., Blaser, M., & Cover, T. (1995). Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem*, 17771–17777.
- Boixeda, M., & Martin, A. (2000). Tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. *Inf Ter Sist Nac Salud*, 24, 141 - 146.
- Cabrera-Andrade, A., Castro, B., Lopez-Cortez, A., Muñoz, M., Leone, P., Tamaris, M., & R. (2013). Asociación de variantes genéticas en receptores de membrana relacionados con respuesta inmunitaria e infección por *Helicobacter pylori* en individuos ecuatorianos. *Rev Metro Ciencia*, 43-49.
- Chattopadhyay, S., Patra, R., Ramamurthy, T., Chowdhury, A., Santra, A., Dhali, G., . . . Mukhopadhyay, A. (2004). Multiplex PCR Assay for Rapid Detection and Genotyping of *Helicobacter pylori* Directly from Biopsy Specimens. 2821-2824.

- Correa, P. (2003). Bacterial Infections as a Cause of Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 95, 7.
- Correa, P., & Houghton, J. (2007). Carcinogenesis of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*(133), 659–672.
- Cover, T., & Blaser, M. (1992). Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem*, 10570–10575.
- de Armas, Y., Capó, V., González, E., Mederos, L., & Díaz, R. (2006). Extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina por Chelex-100. ADN de tejidos en parafina por resina quelante. *Revista Espanola de patología*, 39(6), 171-174.
- De Figueiredo, M., Simoes, C., Braga-Neto, M., Campel, A., Nunes, A., C Barbosa, A., . . . BESSA, I. (2012). *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes in patients from notheastern Brazil with upper gastrointestinal diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 107(4), 561-563.
- De Gusmaom, V., Mendes, E., De Magalhaes-Queiroz, D., Rocha, G., Rocha, A., Ashour, A., & Carvalho, A. (2000). *vacA* Genotypes in *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Children with and without Duodenal Ulcer in Brazil. *J Clin Microbiol*, 38(8), 2853–2857.
- Debets, I., Reyes, G., Mulder, J., Stegge, M., Peters, J., Savelkoul, P., . . . Vandenbroucke-Grauls, C. (2002). Characteristics of clinical *Helicobacter pylori* strains from Ecuador. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 141-145.
- Dixon, M., Genta, R., Yardley, J., & Correa, P. (1997). Histological classification of gastritis and *Helicobacter pylori* infection: an agreement at last? The international Workshop on the Histopathology of Gastritis. *Helicobacter*, 2, 17-24.
- Escobar, E., de Armas, Y., de Francisco, N., de Paz, V., Roca, F., & Jiménez, M. (2013). Identificación molecular de *Helicobacter pylori* en

tejidos gástricos con neoplasias malignas embebidos en parafina. *Rev haban cienc méd*, 12(2).

ESE, I. N., & IGAC, I. G. (2010). *Atlas de mortalidad por cáncer en Colombia*. Bogotá: Imprenta Nacional.

Faundez, G., Troncoso, M., & Figueroa, G. (2002). *cagA* and *vacA* in strains of *Helicobacter pylori* from ulcer and non-ulcerative dyspepsia patients. *BMC Gastroenterology*, 2, 20.

Fochesatto, N., Guayán, V., & Moran, E. (2004). *Helicobacter pylori* y enfermedad gastroduodenal. Bases para el Diagnóstico y Tratamiento. *Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina*, 11-17.

Fontenete, S., Leite, M., Guimarães, N., Madureira, P., Ferreira, R., Figueiredo, R., Wengel, J., & Azevedo, J. (2015). Towards Fluorescence In Vivo Hybridization (FIVH) Detection of *H. pylori* in Gastric Mucosa Using Advanced LNA Probes. *PLoS ONE*, 10(4): e0125494.doi:10.1371/journal.pone.0125494

Gamer, J., & Cover, T. (1995). Analysis of genetic diversity in cytotoxin-producing and non-cytotoxin producing *Helicobacter pylori* strains. *J Infect Dis*, 172, 290-293.

Ganten, M., Aravena, E., Sykora, J., Koschn, R., Mohr, J., Rudi, J., . . . Walczak, H. (2007). *Helicobacter pylori*-induced apoptosis in T cells is mediated by the mitochondrial pathway independent of death receptors. *European Journal of Clinical Investigation*, 37, 117-125.

García, F. (2002). Vacunas contra *Helibacter pylori*: ¿una alternativa con impacto global contra el cáncer gástrico? *Rev. costarric. salud pública*, 11(21), 1409-1429.

Garza, E., Perez, G., & Maldonado, H. (2014). A review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment, and methods to detect eradication. *World J Gastroenterol*, 1438-1449.

- Gomez, N., Alvarez, L., Zapatier, J., & Vargas, P. (2005). Eficacia de las pruebas de antígeno de heces y serológicas en el diagnóstico de *Helicobacter pylori* en población ecuatoriana. *Rev Gastroenterol Mex*, 70, 146–150.
- González, L., & Rodríguez, B. (2011). Patogénesis de la infección por *Helicobacter pylori*. *Rev cubana med*, 50(4).
- Hanna, I. (2010). Indicaciones para búsqueda y erradicación de *Helicobacter pylori* en la población de Latinoamérica. *Revista Actas Médicas*, 20, 16-25.
- Heep, M., Kist, M., Strobel, S., Beck, D., & Lehn, N. (2000). Secondary resistance among 554 isolates of *Helicobacter pylori* after failure of therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 19(7), 538-541.
- Huang, J., Zheng, G., Sumanac, K., Irvine, E., & Hunt, R. (2003). Meta-analysis of the relationship between *cagA* seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology*, 125(6), 1636-1644.
- IARC, Agencia Internacional de Investigación del Cáncer. (2013). *Helicobacter pylori Eradication as a Strategy for Preventing Gastric Cancer*. Helicobacter pylori Working Group. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- INEC, Instituto Nacional de Estadística y Censos del Ecuador. (2013). *Anuario de estadísticas vitales: Nacimientos y defunciones de la República del Ecuador*. Obtenido de Ecuador en cifras: http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Poblacion_y_Demografia/Nacimientos_Defunciones/Publicaciones/Anuario_Nacimientos_y_Defunciones_2013.pdf
- Jie, H., Z, P., Keng, F., Mar, K., & Bow, H. (1998). *Helicobacter pylori* acquisition of metronidazole resistance by natural transformation *in vitro*. *World J Gastroenterol*, 385–387.

- Kato, I., Vivas, J., Plummer, M., López, G., Peraza, S., & Castro, D. (2004). Environmental factors in *Helicobacter pylori*-related gastric precancerous lesions in Venezuela. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13, 468-476.
- Liu, J., He, C., Chen, M., Wang, Z., Xing, C., & Yuan, Y. (2013). Association of presence/absence and on/off patterns of *Helicobacter pylori oipA* gene with peptic ulcer disease and gastric cancer risks: a meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, 13, 555.
- Mancenlle, R. (2007). *Prevalencia de la infección por Helicobacter pylori en la población en general adulta de la provincia de Ourense y estudio de factores de riesgo asociados*. Santiago de Compostela: Univ Santiago de Compostela.
- Marrón, L. (2000). *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiol Rev.*, 283-97.
- Matysiak, T., & Mégraud, F. (2006). *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *European Journal of Cancer*(42), 708-716.
- Mégraud, F. (2004). *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut*, 53(9), 1374–1384.
- Odenbreit, S., Kavermann, H., Püls, J., & Haas, R. (2002). *CagA* tyrosine phosphorylation and interleukin-8 induction by *Helicobacter pylori* are independent from *alpAB*, *HopZ* and *bab* group outer membrane proteins. *International Journal of Medical Microbiology*, 257-266.
- Otero, W. (2008). Cáncer gástrico en Colombia: un diagnóstico tardío que amerita el compromiso del Estado. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 302-304.
- Pajares, J., & Gisbert, J. (2006). *Helicobacter pylori*: su descubrimiento e importancia en la medicina. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 98.

- Panayotopoulou, E., Sgouras, D., Papadakos, K., Kalliaropoulos, A., Papatheodoridis, G., Mentis, A., & Archimandritis, A. (2007). Strategy To Characterize the Number and Type of Repeating EPIYA Phosphorylation Motifs in the Carboxyl Terminus of *CagA* Protein in *Helicobacter pylori* Clinical Isolates. *Journal of clinical Microbiology*, 488-495.
- Pappo, J., Czinn, S., & Nedrud, J. (2001). Vaccines. In H. Mobley, G. Mendz, & S. Hazell, *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington : ASM Press.
- Premoli, G., González, A., Millán, B., Percoco, T., & Vielma, A. (2004). Diagnóstico de *Helicobacter pylori* mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Rev cubana med trop*, 85-90.
- Quiroga, A., Cittelly, D., & Bravo, M. (2005). Frecuencia de los genotipos *babA2*, *oipA* y *cagE* de *Helicobacter pylori* en pacientes colombianos con enfermedades gastroduodenales. *Biomédica*, 325-334.
- Quiroga, A., Cittelly, D., & Bravo, M. (2005). Frecuencia de los genotipos *babA2*, *oipA* y *cagE* de *Helicobacter pylori* en pacientes colombianos con enfermedades gastroduodenales. *Biomédica*, 325-334.
- Ramírez, A. (2014). *Libro de Tópicos Selectos en Medicina Interna*. Peru. Retrieved from http://www.cmp.org.pe/documentos/librosLibres/tsmi/Cap12_Helicobacter_pylori.pdf
- Ramírez, A., & Sánchez, R. (2008). *Helicobacter pylori* y cáncer gástrico. *Rev. gastroenterol*, 258-266.
- Ramy, K., Mohammed, M., & Radwa, R. (2015). Contaminated water as a source of *Helicobacter pylori* infection: A review. *Journal of Advanced Research*, 539–547.
- Rivas-Traverso, F., & Hernández, F. (2000). *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Rev Biomed*, 11, 187-205.

- Rojas, S., Barragán, C., Bayona, M., Oliveros, R., & Gutiérrez, A. (2015). Detección de *Helicobacter pylori* por PCR del gen 16S en biopsias gástricas colectadas en la ciudad de Bogotá: estudio preliminar. *Revista Medicina*, 37(3).
- Sasaki, T., Hirai, I., Izurieta, R., Hoe, B., Estevez, E., Saldana, A., . . . Yamamoto, Y. (2009). Analysis of *Helicobacter pylori* Genotype in Stool Specimens of Asymptomatic People. *Labmedicine*, 40(7), 412-414.
- Sedaghat, H., Moniri, R., Jamali, R., Arj, A., Zadeh, M., Gholam, S., . . . Pourbabae, M. (2014). Prevalence of *Helicobacter pylori vacA, cagA, cagE, iceA, babA2, and oipA* genotypes in patients with upper gastrointestinal diseases. *Iran J Microbiol*, 14-22.
- Sempértegui, F., Díaz, M., Mejía, R., Rodríguez, O., E, R., Guarderas, C., . . . Hamer, D. R. (2007). Low Concentrations of Zinc in Gastric Mucosa are associated with Increased Severity of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Helicobacter*, 12(1), 43-48.
- Sitas, F. (2015). Twenty five years since the prospective study by Forman et al. (1991) on *Helicobacter pylori* and stomach cancer risk. *Cancer Epidemiology*.
- Somma, M. (2015, 02 23). *Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos*. Retrieved from Organización mundial de la Salud: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/User%20Manual%20ES%20full.pdf>
- Stollman, N. (2016, 03 06). *H. pylori* and the Role of Diagnostic Testing Retrieved from *Quest Diagnostics*. http://education.questdiagnostics.com/presentations/h-pylori-and-the-role-of-diagnostic-testing?presentation_id=245

- Torres, K., Valderrama, E., Sayegh, M., Ramírez, J., & Chiurillo, M. (2014). Study of the *oipA* genetic diversity and EPIYA motif patterns in *cagA*-positive *Helicobacter pylori* strains from Venezuelan patients with chronic gastritis. *Microbial Pathogenesis*, 26-32.
- van Doorn, L., Figueiredo, C., Rossau, R., Jannes, G., van Asbroeck, M., Sousa, J., . . . Quint, W. (1998). Typing of *Helicobacter pylori vacA* Gene and Detection of *cagA* Gene by PCR and Reverse Hybridization. *J Clin Microbiol*, 1271-1276.
- Van Duynhoven, Y., & De Jonge, R. (2001). Transmission of *Helicobacter pylori*: a role for food? *Bulletin of the World Health Organization*, 79, 455-460.
- Velarde, O. (1996). *Helicobacter pylori* y la fisiopatogenia de la úlcera péptica. *Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*, 9(1).
- Wang, G., Olczak, A., Forsberg, L., & Maier, R. (2009). Oxidative stress-induced peptidoglycan deacetylase in *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*, 6790-6800.
- Yamaoka, Y. (2010). Mechanis of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nature Reviews*, 629-641.
- Yamaoka, Y., Kikuchi, S., El-Zimaity, H., Gutierrez, O., Osato, M., & Graham, D. (2002). Importance of *Helicobacter pylori oipA* in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. *Gastroenterology*, 414-424.
- Yamaoka, Y., Kodama, T., Gutierrez, O., Kim, J., Kashima, K., & Graham, D. (1999). Relationship between *Helicobacter pylori iceA*, *cagA*, and *vacA* Status and Clinical Outcome: Studies in Four Different Countries. *J Clin Microbiol*, 37(7), 2274-9.
- Zhang, G., Duan, G., Fan, Q., & Chen, S. (2016). Role of *Helicobacter pylori* infection in pathogenesis of gastric carcinoma. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 7(1), 97-107.

