

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**DETECCIÓN DEL GEN *baba2* DE *Helicobacter pylori* POR
MEDIO DE LA TÉCNICA MOLECULAR PCR (REACCIÓN
EN CADENA DE LA POLIMERASA) EN MUCOSA
GÁSTRICA Y SU CORRELACIÓN CON ALTERACIONES
HISTOPATOLÓGICAS EN PACIENTES ECUATORIANOS**

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

CECILIA JULIA CRUZ BETANCOURT

SANGOLQUÍ, SEPTIEMBRE DE 2008

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Cecilia Julia Cruz Betancourt

COORDINADOR DE LA CARRERA

Dr. Marcelo Grijalva

SECRETARIO ACADÉMICO

Ab. Vinicio Zabala

Lugar y fecha: Sangolquí, 30 de Septiembre de 2008.

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. CECILIA JULIA CRUZ BETANCOURT como requerimiento parcial a la obtención del título de **INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA.**

Fecha

Dr. Edmundo Estévez

Dr. Ángel Guevara

AGRADECIMIENTOS

Mis mas sinceros agradecimientos al **Dr. Oswaldo Rodríguez Mora**, Director del Laboratorio de Diagnóstico Molecular-PUCE, por la ayuda y apoyo no sólo con su conocimiento y experiencia sino además con su amistad durante la realización de este proyecto.

Un agradecimiento especial **Dr. Edmundo Estévez**, Director del Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador, por la apertura al uso de sus laboratorios y equipos.

Al **Dr. Fabián Tulcanazo**, médico gastroenterólogo y al departamento de gastroenterología del Hospital Eugenio Espejo, por su ayuda y colaboración en la fase de campo, tanto en el Hospital Eugenio Espejo como del Hospital Pedro Vicente Maldonado.

A la **Dra. Ivonne Orellana**, médica gastroenteróloga, a todo el staff de Cirugía Ambulatoria y al Laboratorio de Patología del Hospital VozAndes Quito, por la ayuda para la culminación de la fase de campo de esta investigación.

A la **Dra. Bertha Estrella**, Investigadora Principal de la Corporación Ecuatoriana de Biotecnología, por toda su ayuda en el planteamiento y diseño de la bioestadística para este trabajo.

A la **Ing. Fernanda Sislema**, Administradora del Laboratorio de Diagnóstico Molecular-PUCE por sus valiosas sugerencias y acertados aportes en el desarrollo de este estudio.

A mis queridos tios **Mauro** y **Moni** por todo el cariño y apoyo para culminar mi carrera universitaria.

A **Gaby**, gracias por tu amistad, apoyo y por todos los momentos compartidos. A **Pame** gracias por toda la ayuda en el laboratorio y por tu amistad.

Y a todas mis queridas amigas, amigos y colegas de laboratorio que de forma directa o indirectamente participaron en la realización de este proyecto.

DEDICATORIA

A MIS PADRES, Ángel y Elena.

Gracias por todo el amor, cariño y apoyo en todos los momentos de mi vida.

A MI HERMANA Elenita.

Gracias por los buenos momentos compartidos.

CECI

CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que el cáncer de estómago es el más común a nivel mundial, con un estimado de 934.000 nuevos casos por año. Esto representa un 8,6% de los nuevos casos de cáncer. Se considera que el cáncer de estómago es la segunda causa de muerte por cáncer, con unas 700.000 muertes al año, de las cuales, casi dos tercios de los casos ocurren en países en vías de desarrollo (*Parkin et al., 2005*).

En el mundo existen zonas que tienen alto riesgo y bajo riesgo de cáncer gástrico. Se considera una zona de alto riesgo donde existe una prevalencia anual de cáncer gástrico mayor a 20 casos por 100.000 habitantes, estas zonas incluyen China, Japón, Europa del este, partes de América Central y América del Sur. En las zonas de bajo riesgo la prevalencia anual de cáncer gástrico es menor a 10 casos por 100.000 habitantes, estas zonas incluyen el norte y este de África y Norteamérica (*Parkin et al., 2005*).

El Ecuador se encuentra en una zona de alto riesgo para cáncer de estómago, con una incidencia anual de 29 casos por 100.000 habitantes y la incidencia de cáncer gástrico representa el 12,7% de todos los cánceres, situando a nuestro país en el décimo primer puesto en mujeres y en el décimo quinto puesto en hombres entre 58 países en el mundo (*Corral et al., 2004*).

Se han descrito diversos factores de riesgo de cáncer gástrico, como la presencia de condiciones precursoras tales como: gastritis crónica atrófica y metaplasia intestinal; factores genéticos como historia de cáncer gástrico en la familia y factores ambientales como la dieta y el consumo de tabaco que pueden contribuir al desarrollo de cáncer gástrico (*Crew & Neugut, 2006*).

El principal factor de riesgo es la infección por *Helicobacter pylori*. En 1994, la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer declaró a *Helicobacter pylori* como

carcinógeno humano clase 1 para carcinoma gástrico (*Morales et al., 2001; Logan & Walker, 2001*).

Helicobacter pylori es la bacteria más común del mundo, con rangos de prevalencia que van desde el 10% en países desarrollados al 90% en países en vías de desarrollo (*Luman, 2005*). En América Latina la prevalencia de la infección causada por *Helicobacter pylori* oscila entre 30-90%, con un promedio de 60%, dependiendo de las condiciones socioeconómicas de las personas infectadas (*Ramírez et al., 2002*).

La patogénesis de la infección por *Helicobacter pylori* está determinada por una interacción del ambiente, del huésped y de los factores de virulencia. Se ha demostrado que *Helicobacter pylori* es un microorganismo con alta heterogenicidad genética, lo que hace que esta bacteria tenga diversos tipos de virulencia, que influyen en el desarrollo de diferentes enfermedades gástricas. Su variabilidad genética es de gran importancia, ya que factores bacterianos de virulencia y adherencia juegan un papel muy importante en el desarrollo de la patogénesis (*Kim et al., 2001 & Höcker et al., 2003*).

Los factores de virulencia de *Helicobacter pylori* han sido muy estudiados, y varios de sus genes han sido involucrados con patologías gástricas graves. En particular, se han estudiado genes relacionados con la producción de citotoxinas bacterianas (*cagA*), la inducción de citotoxinas vacuolizantes (*vacA*) y la adhesión de la bacteria a células epiteliales (*babA*) (*Atherton, 1998; Gerhard et al., 1999*).

La genotipificación de *Helicobacter pylori* permitió el descubrimiento del gen *babA2* que codifica la proteína BabA (The Blood-group antigen-binding Adhesin). Esta proteína ayuda a la unión de la bacteria con las células epiteliales gástricas, por lo que es un factor clave en la patogenicidad de *Helicobacter pylori* en el estómago.

El gen *babA2* está asociado a un mayor riesgo de enfermedades gástricas como: úlcera péptica, carcinoma gástrico y gastritis crónica con atrofia. La prevalencia de cepas *babA2* positivas de *Helicobacter pylori* y la correlación que existe entre la presencia de este gen con patologías gástricas es diferente en países asiáticos y países occidentales.

Esto fue demostrado en un estudio en población alemana, donde la frecuencia del gen *babA2* fue alta y este gen fue correlacionado con la presencia de úlcera duodenal y carcinoma gástrico y reportaron que este gen podría ser un marcador molecular útil para identificar pacientes propensos a presentar patologías más severas asociadas a infecciones por *Helicobacter pylori* (Gerhard et al., 1999 & Yu et al., 2002).

Sin embargo, no todos los estudios han comprobado esta correlación, en Japón a pesar de encontrar una frecuencia del gen *babA2* similar a la de Alemania, no se correlacionó la presencia de este gen con patologías gástricas. Esto también fue comprobado en otros países de Asia y algunos países de América, lo que sugiere que la frecuencia del gen *babA2* y su correlación con patologías gástricas es diferente según la zona geográfica.

1.2. Justificación del problema

Helicobacter pylori es una bacteria que coloniza el estómago humano, e infecta a más de la mitad de la población mundial. La persistencia de esta infección lleva al desarrollo de enfermedades como gastritis crónica, metaplasia intestinal, linfoma MALT, úlcera péptica y carcinoma gástrico (Mizushima et al., 2001).

Helicobacter pylori tiene diferentes genes de virulencia como: la adhesina BabA (The Blood-group antigen-binding adhesin), que es codificada por el gen *babA2* que ha sido relacionado con patologías gástricas severas como: úlcera duodenal, carcinoma gástrico, y gastritis crónica con atrofia.

Estudios iniciales en poblaciones de Europa indican que las cepas *Helicobacter pylori babA2* positivas están asociadas con un incremento de úlcera péptica y carcinoma gástrico; mientras que las cepas *babA2* negativas están relacionadas con formas poco complicadas de gastritis: como gastritis crónica no atrófica. Sin embargo, estos resultados han sido cuestionados por estudios en Japoneses en donde no se encontró una correlación significativa entre el gen *babA2* y el incremento de estas enfermedades; úlcera péptica y

carcinoma gástrico, sugiriendo que estas correlaciones de genotipo bacteriano con fenotipo de patología gástrica no son aplicables para todas las poblaciones (Höcker *et al.*, 2003).

Por lo que es necesario realizar estudios de genotipificación en distintas zonas geográficas con grandes poblaciones y controles necesarios, para obtener información acerca del gen *babA2* y su correlación con patologías gástricas en cada población.

En nuestro país es necesario realizar un estudio de genotipificación de los genes de virulencia de *Helicobacter pylori*, ya que no se ha realizado anteriormente o se lo ha hecho en forma muy limitada (Debets-Ossenkopp *et al.*, 2003). Los datos obtenidos de este estudio serían nuevos y podrían ayudar a determinar la importancia de las características genotípicas de las cepas de *Helicobacter pylori* en la patogénesis gástrica en pacientes ecuatorianos.

Este estudio mostrará la frecuencia del gen *babA2* en población ecuatoriana y la correlación de este gen con diferentes patologías gástricas como: gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia y cáncer gástrico. Además estos resultados se podrán comparar con datos obtenidos en otros países en donde se han realizado estudios acerca del gen *babA2* de *Helicobacter pylori*. De esta forma, se hará un gran aporte a la investigación en nuestro país y se abrirán nuevas perspectivas, respecto a la identificación de factores de virulencia que son responsables de la patogenicidad de *Helicobacter pylori*.

1.3. Objetivos de la Investigación

1.3.1. Objetivo General

- Detectar el gen *babA2* de *Helicobacter pylori* por medio de la técnica molecular PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y su correlación con alteraciones histopatológicas en mucosa gástrica de pacientes ecuatorianos.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Determinar la presencia de *Helicobacter pylori*, en muestras de mucosa gástrica de pacientes ecuatorianos, por medio de la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).
- Determinar la presencia del gen *babA2*, por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en las muestras positivas de *Helicobacter pylori*.
- Determinar la correlación de los resultados de histopatología con los resultados de la presencia del gen *babA2* de *Helicobacter pylori*.

1.4. Marco Teórico

1.4.1. Anatomía del Estómago

El estómago es un órgano en forma de J, que se encuentra en la sección superior del abdomen; forma parte del sistema digestivo y está situado entre el esófago y el duodeno. Este órgano recibe los alimentos masticados por la boca y deglutidos a través del esófago.

El estómago es un órgano sacular de aproximadamente 1.200 a 1.500 ml de volumen, pero con una capacidad superior a 3.000 ml. Está unido con el esófago y se conecta con el duodeno. La concavidad de la curvatura derecha interna se conoce como *curvatura menor*, y la convexidad de la curva izquierda exterior, es la *curvatura mayor* (Kumar et al., 2005).

El estómago está dividido en cinco regiones anatómicas: el *Cardias* es la porción cónica estrecha del estómago, inmediatamente distal a la unión gastroesofágica.

El *Fundus*, es la porción con forma de cúpula del estómago proximal, que se extiende en posición superolateral a la unión gastroesofágica.

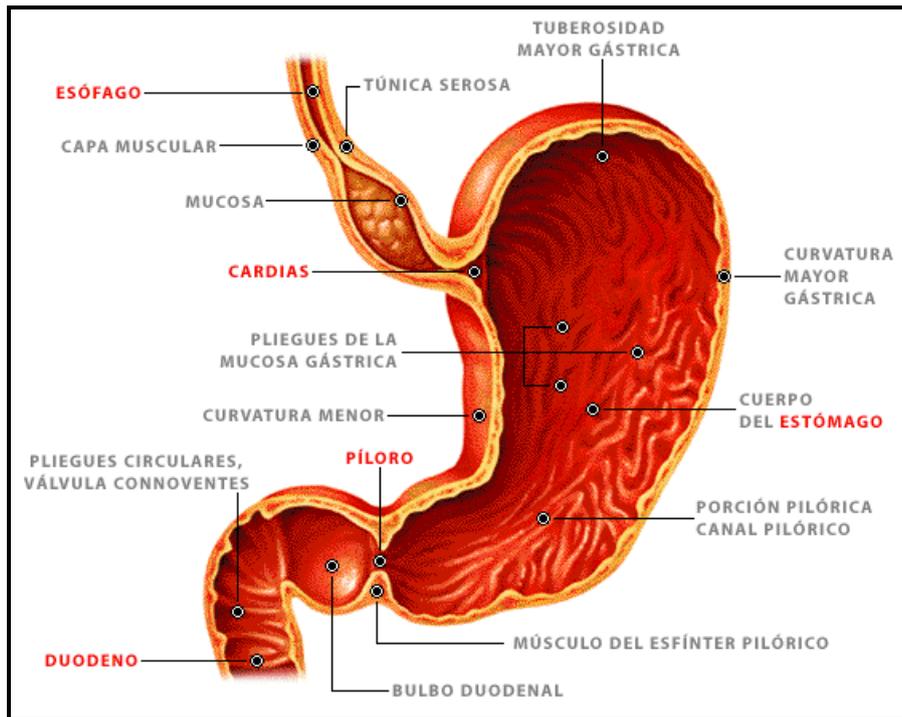
El *Cuerpo*, comprende el resto del estómago proximal a la incisura angular. El estómago distal a ese ángulo, es el *Antro*, separado del duodeno por el *Esfínter pilórico* muscular (*Kumar et al., 2005*).

La pared gástrica, como la del resto del tracto gastrointestinal, consiste en la capa mucosa, la capa muscular y la capa serosa.

La *capa mucosa*, es la capa donde están las glándulas gástricas que segregan los jugos gástricos. El pH de los jugos gástricos normalmente varía entre 1.5 a 2.5, una acidez muy superior a la de cualquier otro fluido. Los principales elementos constitutivos de los jugos gástricos son: ácido clorhídrico y las enzimas pepsina, gastrina y lipasa que ayudan a digerir los hidratos de carbono, las proteínas y las grasas del alimento (*Kumar, Abbas & Fausto, 2005*).

La *capa muscular*, es donde se encuentran los músculos, que por medio de contracciones, amasan el bolo alimenticio cuando se halla en el estómago, completando la acción mecánica y facilitando así su mezcla con los jugos digestivos.

La *capa serosa o peritoneo*, es la membrana externa que rodea al estómago (*Kumar et al., 2005*).



Fuente: <http://www.juntadeandalucia.es/averroes/~29701428/salud/ssvv/digestivo9.htm>

Figura 1.1. Partes que componen la anatomía del estómago.

1.4.2. *Helicobacter pylori*

1.4.2.1. Generalidades

Helicobacter pylori fue conocido previamente como *Campylobacter pyloridis* y posteriormente como *Campylobacter pylori*. Fue aislado por primera vez por Barry Marshall y Robin Warren en el año de 1982, en Australia, a partir de fragmentos de mucosa gástrica obtenidos de pacientes con gastritis y úlcera duodenal. Marshall y Warren realizaron observaciones en estudios patológicos y correlacionaron la presencia de este microorganismo con gastritis crónica.

En 1984, los descubridores de esta bacteria publicaron en la revista *The Lancet* la asociación de *Helicobacter pylori* con gastritis crónica y por primera vez se sugirió que la úlcera péptica pudiera ser de etiología infecciosa (Morales et al., 2001).

Helicobacter pylori es reconocido como un importante patógeno que causa una infección persistente del estómago, en un alto porcentaje de la población mundial. Esta bacteria permanece en el estómago de las personas por años o décadas, la mayoría de personas infectadas con esta bacteria no tienen síntomas y solamente un 10 a 20% de personas infectadas con *Helicobacter pylori* desarrollan patologías gástricas severas como: úlceras pépticas, cáncer gástrico o linfoma MALT (Castillo et al., 2004 & Bittencourt et al., 2006).

Las enfermedades relacionadas con *Helicobacter pylori* dependen de las propiedades específicas del microorganismo, de los factores genéticos del huésped y de los factores ambientales. El riesgo de la infección es alto en grupos de nivel socioeconómico bajo, en ciertos grupos étnicos y en poblaciones de ciertas zonas geográficas. El ser humano es el principal reservorio de la bacteria y la transmisión se cree que ocurre de persona a persona (Podzorski et al., 2003 & Go, 2002).

1.4.2.2. Patologías asociadas con *Helicobacter pylori*

a) Gastritis Crónica

La patología más común que se presenta en pacientes infectados con *H. pylori* es la gastritis, la misma que se define como una inflamación de la mucosa gástrica. La inflamación puede ser predominantemente aguda, con infiltración neutrófila, o crónica, con predominio de linfocitos y/o células plasmáticas. En etapas más avanzadas podría encontrarse metaplasia intestinal y atrofia.

La *gastritis crónica* es una inflamación del revestimiento del estómago que se presenta gradualmente y que persiste durante un tiempo prolongado, puede ser ocasionada por la irritación prolongada debido al uso de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos, por la infección con *Helicobacter pylori*, degeneración del revestimiento del estómago por la edad o por reflujo biliar crónico.

Los individuos que padecen gastritis crónica presentan síntomas como [dolor abdominal](#) en la parte superior que puede empeorar al comer, [indigestión abdominal](#), [pérdida del apetito](#), náuseas y vómitos (Owen, 2003).

b) Úlceras pépticas:

Las *úlceras pépticas* son lesiones crónicas, la mayoría de las veces únicas, que ocurren en cualquier porción del tracto gastrointestinal expuesto a la acción agresiva de los jugos ácidos.

Las úlceras pépticas pueden ser menores a cuatro centímetros de diámetro; se las puede localizar con más frecuencia en la primera porción del duodeno, en el antro del estómago y en la unión gastroesofágica. Las úlceras pépticas son producidas por un desequilibrio entre los mecanismos defensivos de la mucosa gastroduodenal y las fuerzas dañinas, tal como como el ácido gástrico (Ramakishnan & Salinas, 2007).

c) Linfoma MALT:

El linfoma MALT (Linfoma de Mucosa Asociado con Tejido Linfoide) es un Linfoma no Hodgkin de células B, extranodal, encuadrado dentro del grupo de los linfomas de la zona marginal. El proceso comienza con una inflamación de la mucosa gástrica, con mayor o menor grado de destrucción de foveolas gástricas. *Helicobacter pylori* se aloja en ellas, creando un ambiente de amonio, para defenderse del medio ácido. Allí actúan extracelularmente sobre las vacuolas de mucina y provoca en muchos casos una erosión de la mucosa (Katic et al., 2004).

d) Cáncer Gástrico:

La patología más severa que se le relaciona con *Helicobacter pylori* es el *carcinoma gástrico*, el mismo que es el tumor maligno del estómago más importante y

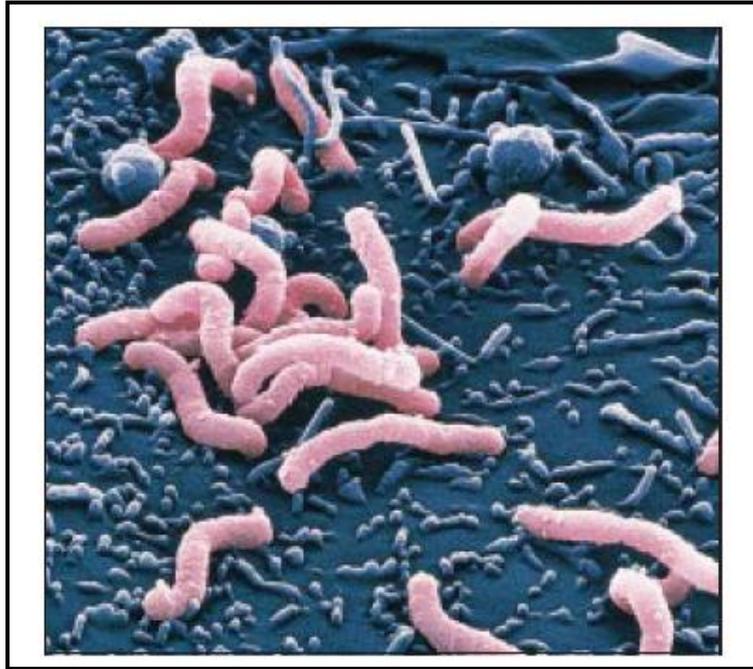
frecuente. El carcinoma gástrico es el segundo tumor maligno más común en todo el mundo. Su incidencia varía de forma amplia de país a país. La infección crónica por *Helicobacter pylori* aumenta el riesgo de carcinoma gástrico en cinco o seis veces. El carcinoma gástrico es precedido por gastritis crónica, seguida de atrofia, metaplasia intestinal, displasia y finalmente, la presencia del carcinoma. La mayoría de individuos infectados por *Helicobacter pylori* no desarrollan cáncer, y no todas las infecciones por *Helicobacter pylori* aumentan el riesgo de cáncer. Por lo tanto, en la carcinogénesis gástrica deben participar otros factores. El riesgo de cáncer gástrico aumenta mucho más cuando la inflamación de la mucosa progresa hasta atrofia multifocal y metaplasia intestinal. La displasia de la mucosa gástrica es la vía final común que conduce al desarrollo del cáncer gástrico (Kumar et al., 2005).

1.4.2.3. Microbiología

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, de forma curva o espiralada de un tamaño aproximado de 0.3 a 1 μ m de ancho, 1.5-5 μ m de longitud, con múltiples flagelos envainados en el polo de la célula que la hacen muy móvil.

Para su crecimiento, *H. pylori* necesita condiciones microaerofílicas (O₂ 5%, CO₂ 10% y N₂ 85%). La temperatura óptima para crecer está entre 35°C y 37°C, aunque algunas cepas pueden crecer a 42°C. Su crecimiento es lento, su incubación usualmente dura entre 5 a 7 días, y se ha observado que puede durar hasta 10 días. Las colonias de *Helicobacter pylori* son pequeñas, grises y ligeramente hemolíticas.

Su característica bioquímica más sobresaliente es la producción abundante de la enzima ureasa. Esta característica se usa como identificador de la presencia de *Helicobacter pylori*. Otras pruebas bioquímicas utilizadas son las pruebas de catalasa y oxidasa, para las que *Helicobacter pylori* es positivo (Morales et al., 2001 & Castillo et al., 2004).



Fuente: Logan & Walker, 2001

Figura 1.2. *Fotografía de microscopía electrónica de Helicobacter pylori sobre la superficie de células gástricas.*

1.4.2.4. Epidemiología

Helicobacter pylori es la bacteria patógena más común en los seres humanos, la infección de esta bacteria es un problema a nivel mundial. Más del 50% de la población mundial esta infectada con esta bacteria (Covacci *et al.*, 1999).

La prevalencia de la infección puede variar de un país a otro, así como de un grupo de personas de un mismo país. La prevalencia de la infección de *Helicobacter pylori* en países en vías de desarrollo es del 80%, comparado con un 10 a 30% en países desarrollados (Suerbaum & Michetti, 2002; Logan & Walter, 2001).

La prevalencia de la infección esta significativamente relacionada con las condiciones socioeconómicas; así, personas que tienen un estatus socioeconómico bajo, tienen mayor probabilidad de estar infectadas. Otras condiciones que predisponen a las

personas a la adquisición de la bacteria son el hacinamiento y la ausencia o insuficiencia de sanidad (*Morales et al., 2001; Ramírez et al., 2002*).

La mayoría de las personas que poseen esta bacteria son asintomáticas. Solo un 10 a 20% de personas que poseen *Helicobacter pylori* desarrollan patologías gástricas como gastritis y enfermedades más severas como cáncer gástrico (*Logan & Walter, 2001; Cava & Cobas, 2003*).

Los seres humanos son los principales reservorios de *Helicobacter pylori*. La bacteria es transmitida dentro de las familias durante la niñez y, una vez adquirida, puede mantenerse en la persona por toda su vida. Los mecanismos de transmisión de *Helicobacter pylori* siguen sin determinarse, pero se sabe que la transmisión de esta bacteria es de persona a persona por vías oral-oral y oral-fecal (*Ramírez et al., 2002; Suerbaum & Michetti, 2002; Castillo et al., 2004; Bittencourt et al., 2006*).

1.4.2.5. Genoma

La información completa del genoma de *Helicobacter pylori* es de gran interés para el desarrollo de nuevos tratamientos en contra de esta bacteria. La secuenciación del genoma completo fue por primera vez descrito en dos cepas de *Helicobacter pylori*, una de estas cepas fue la cepa 26695 aislada de un paciente con gastritis en 1997. Su genoma consiste en un cromosoma circular de 1.667.867 pares de bases que codifican cerca de 1.500 proteínas. El contenido de G + C en este genoma es del 39%. Este tamaño es cerca de un tercio del tamaño de *Escherichia coli* y similar al de *Haemophilus influenzae*, probablemente reflejando una adaptación a un nicho ecológico (*Tomb et al., 1997; Graham, 2003*).

La segunda cepa secuenciada muestra organizaciones genómicas relativamente conservadas. Una comparación con las secuencias de *Escherichia coli* y *Haemophilus influenzae* indican que 63% de los productos específicos de genes de *Helicobacter pylori* son potencialmente involucrados en la interacción *Helicobacter pylori* – huésped. Cerca del 1% del genoma codifica una familia de 32 proteínas externas de membrana, OMPs. El porcentaje significativamente alto de su capacidad de codificación para OMPs, comparado

con otra bacteria, puede corresponder a la complejidad única de específicas uniones de carbohidratos que se han detectado en *Helicobacter pylori* (Oh et al., 2006).

Otros factores de virulencia encontrados en el genoma de *Helicobacter pylori* son de interés para la colonización y sobrevivencia en el estómago humano. Estos factores son la enzima ureasa, que amortigua el ácido gástrico, la actividad flagelar que permite a la bacteria nadar a través de la mucosa gástrica, la Citotoxina Vacuolizante (VacA) que es responsable de la degeneración vacuolar, la proteína activadora de neutrófilos (NAP), la isla de patogenicidad CagA y otras adhesinas como BabA, que son proteínas importantes que ayudan a la colonización de la bacteria en la mucosa gástrica (Karlsson, 2000; Graham, 2003).

1.4.2.6. Patogénesis

La patogénesis de *Helicobacter pylori* incluye 2 etapas: la primera está caracterizada por la llegada y penetración del microorganismo a la mucosa gástrica donde se asienta y se multiplica. La segunda etapa se caracteriza por la inducción de la respuesta inflamatoria.

La primera etapa de la patogénesis de *Helicobacter pylori* es la colonización, en esta etapa, la producción de la enzima ureasa y la actividad flagelar ayudan a esta bacteria eludir las defensas que tiene el estómago para evitar la colonización.

El estómago tiene pH ácido. Cuando *Helicobacter pylori* entra al estómago produce una alteración en este pH, volviéndolo transitoriamente neutro, para poder moverse rápidamente y atravesar la capa de moco para llegar al epitelio gástrico.

La enzima ureasa es la encargada de metabolizar la urea en dióxido de carbono y amonio, haciendo que el amonio neutralice al ácido clorhídrico del estómago permitiendo a *Helicobacter pylori* sobrevivir en este medio ácido (Lamarque & Peek, 2003).

La actividad flagelar es otro factor esencial para la colonización de *Helicobacter pylori* en el estómago. Esta actividad permite a la bacteria moverse a través de la mucosa

gástrica y llegar al pH neutro bajo la mucosa adaptándose al nicho gástrico (*Vandenplas, 1999*).

Una vez bajo la mucosa, *Helicobacter pylori* se adhiere a las células epiteliales gástricas por medio de adhesinas y receptores. Las adhesinas son proteínas bacterianas, glicoconjugados o lípidos bacterianos. La proteína más estudiada y caracterizada es la proteína BabA que se une a los antígenos de grupo de sangre Lewis b sobre el epitelio gástrico. Los antígenos Lewis del grupo de sangre han sido implicados en otro aspecto de la patogénesis de *Helicobacter pylori*. Los lipopolisacáridos de algunas cepas contienen estructuras idénticas a los antígenos fucosilados Lewis x y Lewis y expresados sobre la mucosa gástrica. Estos antígenos pueden resultar en tolerancia inmune contra antígenos del patógeno o en inducción de autoanticuerpos que reconocen células epiteliales gástricas (*Covacci et al., 1999*).

Entre las moléculas que actúan directamente sobre los tejidos, la más importante es la proteína activadora de neutrófilos (NAP). Esta proteína tiene la capacidad de activar neutrófilos y puede estar implicado en el reclutamiento de células a la mucosa gástrica y por lo tanto puede contribuir a la respuesta inflamatoria (*Covacci et al., 2003*).

La producción de la Citotoxina Vacuolizante (VacA) es un factor de virulencia importante de *Helicobacter pylori* ya que es una proteína tóxica responsable de la erosión epitelial gástrica y causa degeneración vacuolar de las células. Otro factor importante de virulencia es la isla de patogenicidad *cag-PAI* (CagA), esta contiene algunos genes que están involucrados en la producción de IL-8 por las células epiteliales y se le considera como un factor quimiotáctico y activador de leucocitos polimorfonucleares y macrófagos, contribuyendo a una fuerte respuesta inflamatoria en pacientes infectados con esta bacteria (*Castillo et al., 2004*).

1.4.2.7. Factores de Virulencia de *Helicobacter pylori*

Algunos factores de virulencia de *Helicobacter pylori* como adhesinas y citotoxinas, han sido asociados con el desarrollo de patologías gástricas severas.

1.4.2.7.1. Cag A

La isla de patogenicidad (*cagPAI*) es considerada como el factor de virulencia más importante en la patogénesis del *Helicobacter pylori*. *cagPAI* es una región genómica de aproximadamente 40 Kb. Esta isla genética contiene 31 genes, incluyendo 6 genes llamados *cag* que son homólogos. Los genes de esta isla codifican proteínas con algunas funciones, incluyendo la proteína *cagA* de 120 kDa que es codificada por el gen *cagA*, al cual se lo considera como un marcador de la presencia de esta isla de patogenicidad (*cagPAI*). Esta isla de patogenicidad es parte del sistema de secreción tipo IV que permite la inyección de factores de virulencia dentro de las células epiteliales gástricas (*Lai et al., 2002; Pinto & Salama, 2005; Oliveira et al., 2003*).

Algunos genes de la isla *cagPAI* están involucrados en la estimulación de producción de Interleukina-8 (IL-8) por células epiteliales. IL-8 es un poderoso factor quimiotáctico y un activador de leucocitos polimorfonucleares y macrófagos, que contribuyen a una fuerte respuesta inflamatoria en pacientes colonizados por cepas positivas *cag-PAI*. Por lo tanto, pacientes infectados por cepas positivas *cag-PAI* tienen gran densidad bacteriana en la mucosa gástrica, poseen lesiones epiteliales más severas, poseen una infiltración más intensa de leucocitos polimorfonucleares y altos niveles de citoquinas proinflamatorias. Se han reportado asociaciones significativas entre la infección por cepas *cagA* positivas y diferentes tipos de patologías gástricas (*Leite et al., 2005*).

1.4.2.7.2. Vac A

La citotoxina Vacuolizante (VacA) es otro factor de virulencia importante. VacA es una proteína de 87 kDa, codificada por el gen *vacA*, y que está presente en todas las cepas de *H. pylori*. Sin embargo, solamente un 50% produce una actividad tóxica (*Arents et al., 2001*). Esta proteína es una exotoxina que induce a la formación de vacuolas intracitoplasmáticas y apoptosis en las células epiteliales. Esta toxina también incrementa la permeabilidad epitelial, la cual puede permitir un canal de sustancias tóxicas dentro del epitelio, facilitando la difusión de nutrientes de la mucosa a la bacteria, así favoreciendo a la supervivencia de *Helicobacter pylori* (*Bittencourt et al., 2006*).

Un alto grado de variabilidad de la secuencia también existe en el gen *vacA*. La región señal del gen *vacA* puede ser clasificada como subtipos *s1* y *s2*, con variaciones como *s1a*, *s1b* y *s1c*. La región media del gen *vacA* puede ser dividida en subtipos *m1* y *m2*. Diferentes subtipos combinados de estas dos regiones en diferentes cepas forman genotipos de mosaico. Especialmente las cepas *vacA s1/m1* tienen más alta actividad citotóxica que las cepas *vacA s1/m2* mientras que las cepas *vacA s2/m2* no tienen actividad citotóxica (Yu *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2006).

1.4.2.8. Factores de Adherencia de *Helicobacter pylori*

1.4.2.8.1. Adhesinas de *Helicobacter pylori*

La mayoría de cepas de *Helicobacter pylori* expresan proteínas que se unen a receptores específicos de la célula huésped. *Helicobacter pylori* ha involucrado un gran número de moléculas interactivas superficiales llamadas adhesinas, estas son muy importantes en la colonización de la bacteria ya que le permiten sobrevivir al ataque específico y no específico de las células huéspedes.

Esta adherencia puede ser una ventaja para *Helicobacter pylori* por que ayuda a esta bacteria estabilizarse y difundirse dentro del lumen gástrico y seguir hasta el epitelio gástrico que ha sido dañado por la infección (Mahdavi *et al.*, 2005).

La unión de *Helicobacter pylori* a las células epiteliales gástricas es un importante factor de virulencia para la colonización del estómago humano. El microorganismo se adhiere a las células epiteliales, confiriendo íntima adherencia al epitelio gástrico, donde la bacteria puede conseguir fácilmente los nutrientes del tejido huésped (Aspholm-Hurting *et al.*, 2004).

Las adhesinas son proteínas, glicoconjugados o lípidos bacterianos involucrados en las etapas iniciales de la colonización mediante una interacción entre la bacteria y los receptores sobre la superficie de células epiteliales, tales como lípidos, proteínas, glicolípidos o glicoproteínas (Castillo *et al.*, 2004).

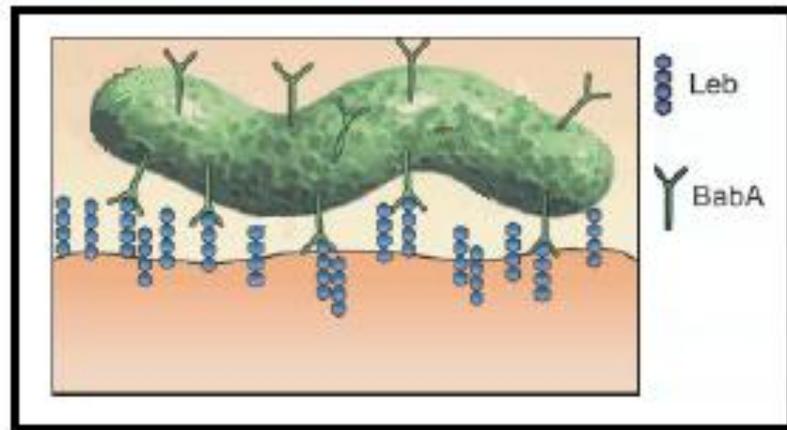
La adherencia de *Helicobacter pylori* a la mucosa gástrica se cree que juega un papel importante en la respuesta inflamatoria del organismo. Al menos 32 proteínas de membrana externa (OMPs) de *Helicobacter pylori* han sido identificadas, muchas de las cuales se involucran en la adherencia bacteriana. Al menos cinco diferentes adhesinas de *Helicobacter pylori* han sido identificadas y son designadas como son BabA, SabA, AlpA, AlpB y HopZ, de estas la adhesina más caracterizada e investigada con mayor detalle es la adhesina BabA (The Blood-group antigen-binding Adhesin) (Yamaoka *et al.*, 2005; Hennig *et al.*, 2004).

1.4.2.8.2. Adhesina BabA (The Blood-group antigen-binding Adhesin)

The Blood-group antigen-binding Adhesin (BabA) es una proteína de 75 kDa, que se une a los antígenos de grupo de sangre Lewis b, que se los pueden encontrar sobre glóbulos rojos y en la mucosa gástrica, estos antígenos son glucoproteínas integradas en las secreciones mucosas que juegan un importante papel en los fenómenos de reconocimiento, diferenciación y cohesión celular (Torrado *et al.*, 2000).

Esta proteína es considerada como un factor importante en la adherencia bacteriana ya que favorece una unión persistente entre el microorganismo y la célula gástrica epitelial contribuyendo a la patogenicidad de la bacteria y subsecuentemente a la entrega de factores de virulencia tal como VacA o CagA (Gerhard *et al.*, 1999; Prinz *et al.*, 2001; Hennig *et al.*, 2004).

La adherencia de esta proteína se ha asociado con altos niveles de infiltración linfocitaria, atrofia glandular, metaplasia intestinal e incremento de la proliferación epitelial, reportándose una asociación significativa con úlcera duodenal y cáncer gástrico (Gerhard *et al.*, 1999).



Fuente: Mahdavi et al., 2005.

Figura 1.3. Adhesina BabA (*The Blood-group antigen-binding Adhesin*) una de las adhesinas de *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori (en verde) se adhiere por medio del grupo de antígenos de sangre Lewis B (cadenas azules) en la superficie del epitelio gástrico. *Helicobacter pylori* usa BabA (Ys verdes) para un reconocimiento fuerte y específico de los antígenos Lewis b.

1.4.2.8.3. Gen *babA2* de *Helicobacter pylori*

La adhesina BabA es codificada por el gen *babA2*, por lo tanto, cepas *babA2* positivas presentan mayor capacidad de adherencia, que las cepas *babA2* negativas que se adhieren débilmente (Borén et al., 1994).

Se han identificado tres alelos *bab*: *babA1*, *babA2* y *babB*. Los genes *babA1* y *babA2* son alelos idénticos excepto que *babA1* tiene una deleción de 10 bp de la señal de la secuencia péptica que lleva a la eliminación de un codón inicial (Ilver et al., 1998).

Los alelos *babA2* y *babB*, los cuales codifican proteínas homólogas, tienen secuencias polimórficas en la región media pero conservan secuencias en regiones 5' y 3', solamente el gen *babA2* es necesario para la unión con los antígenos Lewis b (Lai et al., 2002).

1.4.2.8.4. Distribución geográfica del gen *babA2* de *Helicobacter pylori*

El estudio del gen *babA2* de *Helicobacter pylori*, se ha realizado en diferentes países tanto de América, Europa y Asia.

a) Europa:

Alemania:

Uno de los primeros y más importantes estudios realizados sobre el gen *babA2* de *Helicobacter pylori* fue realizado en Alemania, en el año de 1999. Este estudio fue tomado como referencia para los estudios realizados posteriormente. El objetivo de este estudio fue investigar la presencia del gen *babA2*. Este gen codifica la adhesina, BabA, que permite la unión de *Helicobacter pylori* a las células epiteliales gástricas.

Para este estudio se escogieron a 114 pacientes positivos para *Helicobacter pylori*, de estos: 27 pacientes presentaron adenocarcinoma gástrico, 23 presentaron úlcera duodenal, 29 presentaron linfoma MALT y 35 presentaron gastritis. Por medio de PCR se detectó la presencia del gen *babA2*.

Los resultados de este estudio demostraron que existe una frecuencia del 71,9% (82 /114) de este gen en población alemana. El genotipo *babA2* fue detectado en todos los pacientes con úlcera duodenal 100% (23/23), en 77,8% (21/27) de pacientes con adenocarcinoma gástrico, en 69% (21/27) de pacientes con linfoma MALT y existió una baja frecuencia en pacientes que presentaron gastritis 51,4% (18/35).

Estos resultados mostraron que existe una correlación significativa entre la presencia del gen *babA2* y la presencia de úlcera duodenal y adenocarcinoma gástrico. Además concluyeron que el gen *babA2* de *Helicobacter pylori* puede ser utilizado como un marcador para identificar pacientes que tienen alto riesgo de contraer enfermedades relacionadas con esta bacteria (Gerhard et al., 1999).

Italia:

Otro estudio acerca del gen *babA2* efectuado en Europa, se realizó en población italiana en el año 2003, en donde se deseaba determinar las asociaciones entre los genes *babA2*, *cagA* y los alelos *s* y *m* de *vacA* y si estos genes trabajan en conjunto o independientemente para causar enfermedades como gastritis, úlcera péptica y metaplasia intestinal.

En este trabajo se escogieron a 167 pacientes positivos para *Helicobacter pylori*, quienes después de una endoscopia, presentaron el siguiente diagnóstico histopatológico: 57 pacientes con gastritis antral, 41 pacientes con gastritis difusa, 41 pacientes con úlceras pépticas y 33 pacientes con duodenitis y mediante PCR se detectó los genes de virulencia de *Helicobacter pylori*.

En este estudio se encontró una frecuencia del gen *babA2* de *Helicobacter pylori* de 24% (40/167) y los genes *cagA*, *s1* y *m1* de *vacA* y *babA2* son asociados uno con otro y la cepa que exprese los genes *cagA*, *s1m1 vacA*, y *babA2*, tienen un alto riesgo para metaplasia intestinal (Zambon *et al.*, 2003).

Francia:

En Francia, en el año 2004, se realizó un estudio en donde, se analizó la prevalencia y la correlación, entre los genes de virulencia de *Helicobacter pylori* en muestras de pacientes con gastritis y con linfoma MALT. Uno de estos genes de virulencia es el gen *babA2*.

Se escogieron 82 pacientes en total: 43 pacientes presentaron linfoma MALT y 39 pacientes presentaron gastritis. Los genes de virulencia fueron detectados por medio de PCR.

Se encontró una frecuencia de 48,78% (40/82), donde, 44,2% (19/43) del gen *babA2* de *Helicobacter pylori* en pacientes que presentaron linfoma MALT y se encontró

53,9% (21/39) del gen *babA2* en pacientes que presentaron gastritis. Se encontró que el gen *babA2* no está asociado con linfoma MALT (Lehours et al., 2004).

Turquía:

En Turquía, en el año 2006, se realizó un estudio en donde, determinaron la prevalencia de genotipos de *Helicobacter pylori* en pacientes con dispepsia.

Se escogieron a 93 pacientes: 30 pacientes con dispepsia, 30 con úlcera duodenal y 33 pacientes con cáncer gástrico. Todos los pacientes fueron *Helicobacter pylori* positivos y por PCR se detectó el gen *babA2*, uno de los genes de virulencia.

La frecuencia del *babA2* de *Helicobacter pylori* es de 53,8% (49/93), donde, 23,3% (7/30) en pacientes con dispepsia, 46,4% (13/28) en pacientes con úlcera duodenal y 97,9% (29/33) en pacientes con cáncer gástrico.

Un análisis multivariable fue utilizado en este estudio y se encontró que el gen *babA2* es solo un marcador independiente para cáncer gástrico pero no para úlcera duodenal (Erzin et al., 2006).

Cuadro 1.1. Porcentaje del gen *babA2* de *Helicobacter pylori* en diferentes países de Europa.

Frecuencia del gen <i>babA2</i> de <i>Helicobacter pylori</i>			
Año de Investigación	País	Número de Pacientes	Porcentaje (%)
1999	Alemania	82/114	71,9
2003	Italia	40/167	24
2004	Francia	40/82	48,78
2006	Turquía	49/93	53,8

b) Asia

Japón:

Existen otros estudios realizados en Asia acerca del gen *babA2* de *Helicobacter pylori*, uno de los más sobresalientes es el estudio realizado en Japón, en el año 2001, en donde se analizó por PCR la presencia del gen *babA2* y *cagA* y se observaron las correlaciones con varias patologías gástricas como: úlcera duodenal, úlceras gástricas, adenocarcinoma gástrico y linfoma MALT.

Se escogieron 179 pacientes, de los cuales, 45 presentaron úlceras gástricas, 41 presentaron úlceras duodenales, 42 no presentaron ulceración pero sí gastritis crónica, 40 presentaron adenocarcinoma gástrico y 11 presentaron linfoma MALT.

La prevalencia del gen *babA2* fue de 84,9% (152 /179), no se encontró correlación entre los genes *babA2* y *cagA*, y no hubo asociación de estos genes con alguna patología gástrica. Estos resultados indican que el gen *babA2* no tiene relevancia en la población japonesa y que estas cepas son diferentes a las cepas encontradas en poblaciones occidentales (*Mizushima et al., 2001*).

Corea:

En el mismo año, 2001, en Corea se realizó un estudio del gen *babA2* de *H. pylori*, en donde se relacionó este gen con enfermedades gastroduodenales.

Se escogieron a 76 pacientes, 44 con úlceras pépticas y 32 con gastritis. El gen *babA2* se detectó por PCR.

El gen *babA2* fue encontrado, 36,1% (26/76) de total de pacientes, donde, 27,3% (12/44) de pacientes con úlceras pépticas y en 43,75% (14/32) de pacientes con gastritis. Esta frecuencia es baja y la presencia de este gen no se relaciona con úlcera péptica en pacientes coreanos (*Kim et al., 2001*).

Taiwán:

Otro estudio realizado en Taiwán, caracterizó la presencia de los genes *cagA* y *babA2* en aislados de la población central de ese país y correlacionaron la presencia de estos genes con enfermedades gástricas, en el año 2001.

Para este estudio se escogieron a 101 pacientes, de los cuales, 41 presentaron gastritis, 31 presentaron úlceras duodenales, 15 úlceras gástricas y 14 presentaron cáncer gástrico. Además los genes de *Helicobacter pylori*, *cagA* y *babA2*, fueron detectados por PCR.

En este estudio se demostró que la prevalencia del gen *babA2* de *Helicobacter pylori* es del 100% y del gen *cagA* es del 99%, además demostraron que no existe correlación entre el gen *babA2* con el *cagA* y no existe asociación de la presencia del gen *babA2* con alguna enfermedad gástrica.

Estos datos sugieren que las cepas de *Helicobacter pylori* varían en diferentes regiones geográficas y que la relación de los genes de virulencia con enfermedades gástricas necesitan realizarse en regiones diferentes (*Lai et al., 2001*).

China:

En el año 2002, se realizó un estudio acerca del gen *babA2* de *Helicobacter pylori*, en Shandong, una ciudad de China en donde la incidencia de cáncer gástrico es el más alto en este país.

Se correlacionó el gen *babA2* con inflamación gástrica severa y células epiteliales tumorales en un grupo de pacientes de un área con alto riesgo de cáncer gástrico. Para este estudio se escogieron a 104 pacientes positivos para *Helicobacter pylori*. El gen *babA2* de *Helicobacter pylori* fue detectado por PCR.

La frecuencia del gen *babA2* fue de 79,8% (83/104) y fueron asociados con alta infiltración linfocítica, presencia de atrofia glandular y metaplasia intestinal en el antro. El

incremento de proliferación epitelial estuvo también presente en individuos infectados con *babA2* de *Helicobacter pylori*. Además se encontró que la presencia del genotipo *babA2* esta asociado con una alta frecuencia de atrofia glandular y metaplasia intestinal.

Este estudio concluyó que la presencia del genotipo *babA2* solo o en combinación con otros genes es asociado con la presencia de lesiones pre-neoplásicas (Yu et al., 2002).

Otro estudio realizado en el 2004, en la ciudad china más poblada, Shanghai, determinó la distribución el genotipo *babA2* de *Helicobacter pylori*, en pacientes con varias enfermedades gastroduodenales y exploraron la asociación que existe entre este gen con alguna enfermedad gástrica.

Se escogieron 141 cepas de *Helicobacter pylori*, aisladas de biopsias gástricas de 43 pacientes con gastritis crónica, 47 con úlceras duodenales, 30 con úlceras gástricas y 21 pacientes con cáncer gástrico. El gen *babA2* fue determinado por PCR.

El gen *babA2* fue detectado en 63,8% (90/141) de las cepas de *Helicobacter pylori*. La prevalencia de este gen en pacientes con úlcera duodenal fue significativamente alta en comparación con pacientes con úlceras gástricas.

Esto demostró que el genotipo *babA2* tiene un rol diferente en la patogénesis de úlcera duodenal y úlcera gástrica (Han et al., 2004).

Cuadro 1.2. Porcentaje del gen *babA2* de *Helicobacter pylori* en diferentes países de Asia.

Frecuencia del gen <i>babA2</i> de <i>Helicobacter pylori</i>				
Año de Investigación	País	Ciudad	Número de Pacientes	Porcentaje (%)
2001	Japón	Sapporo	154/179	84,9
2001	Corea	Cheongju	26/76	36,1
2001	Taiwán	Taichung	101/101	100
2002	China	Shandong	83/104	79,8
2004	China	Shangai	90/141	63,8

c) América

Los trabajos más sobresalientes en América son los realizados en Estados Unidos, Colombia, Brasil y Chile.

Estados Unidos:

En Estados Unidos, en Midwestern se realizó un estudio, en el año 2003, en donde se analizaron los genes de virulencia de *Helicobacter pylori*, *babA2* que es un gen que esta involucrado en la patogénesis de este organismo.

Para este estudio se tomaron biopsias gástricas de 61 niños que presentaron síntomas como: dolor abdominal, nausea y vomito. Usando PCR se detectó el gen *babA2* de *Helicobacter pylori*.

El gen *babA2* se encontró en solo 36% (22/61) de todas las cepas de *Helicobacter pylori*. La prevalencia del gen *babA2* ha sido asociado en este estudio con el alto riesgo de patologías gástricas relacionadas con *Helicobacter pylori* (Podzorski et al., 2003).

Colombia:

En Colombia en el año 2005, se realizó un estudio en donde se determinó las posibles asociaciones entre la presencia del gen *babA2* de *Helicobacter pylori* en pacientes colombianos y las diferentes enfermedades gastroduodenales.

Para este estudio se escogieron un total de 166 aislamientos de *Helicobacter pylori* provenientes de: 50 pacientes con úlcera péptica, 39 con gastritis crónica no atrófica, 26 con gastritis crónica atrófica, 26 con metaplasia intestinal y 25 con adenocarcinoma gástrico y mediante PCR se detectó el gen *babA2*.

La frecuencia del genotipo *babA2* fue de 48,2% (66/166) y se demostró que no se encontraron evidencias que sugieran que el gen *babA2* pueda servir como marcador de ulcerogénesis o carcinogénesis en esta población, solo o en asociación con otros genes de virulencia de *Helicobacter pylori* (Quiroga et al., 2005).

Brasil:

En Brasil se realizó dos estudios diferentes del gen *babA2* de *Helicobacter pylori*. El primer estudio fue realizado en el año 2003, en la ciudad de Belo Horizonte; el objetivo de este estudio fue investigar si existe asociación entre la presencia del gen *babA2* de *Helicobacter pylori* con patologías gástricas como úlcera duodenal y carcinoma gástrico.

En este estudio se enrolaron a 208 pacientes, de los cuales: 80 presentaron úlcera duodenal, 52 presentaron carcinoma distal gástrico y 76 pacientes presentaron gastritis y por medio de PCR fue detectado el gen *babA2*.

La frecuencia del gen *babA2* en este estudio fue del 46,15% (96/208); de este total el gen *babA2* se presentó en 31,57% (24/76) de pacientes con gastritis; 53,75% (43/80) de pacientes con úlcera duodenal y 55,77% (29/52) de pacientes con carcinoma gástrico.

Una fuerte asociación fue encontrada entre la presencia del gen *babA2* de *Helicobacter pylori* con úlcera duodenal y carcinoma gástrico.

Otro estudio acerca del gen *babA2* fue realizado en Brasil, en la ciudad de Sao Paulo, en el año 2006. El objetivo de esta investigación fue encontrar la frecuencia del gen *babA2* y cualquier asociación entre este genotipo y patologías gástricas en pacientes brasileños.

Se tomaron 95 pacientes de los cuales, 37 pacientes presentaron gastritis, 29 pacientes presentaron úlceras gástricas, 21 pacientes presentaron úlceras duodenales, 50 pacientes presentaron úlceras pépticas, 7 pacientes presentaron mucosa normal y 16 pacientes presentaron reflujo gastroesofágico. Por PCR se detectó el gen *babA2* de *Helicobacter pylori*.

La frecuencia del gen *babA2* fue de 40,4% (38/95) de este total, el gen *babA2* se presentó en 43,2% (16/37) de pacientes con gastritis, 37,9% (11/29) de pacientes con úlceras gástricas; 42,9% (9/21) en pacientes con úlceras duodenales; 33,3% (2/7) en pacientes con mucosa normal y 31,2% (5/16) en pacientes con reflujo gastroesofágico.

No se encontró ninguna correlación estadística entre el genotipo de *babA2* de *Helicobacter pylori* y cualquier patología gástrica (Gatti *et al.*, 2006).

Chile:

En Chile, en el 2006, se realizó por primera vez el aislamiento del gen *babA2* de *Helicobacter pylori* de pacientes chilenos.

Para este estudio se enrolaron 66 pacientes, de estos pacientes, solamente 1,5% fue positivo para el gen *babA2* de *Helicobacter pylori*.

La baja prevalencia del gen *babA2* puede ser sugerente de su importancia como marcador específico para cepas de mayor capacidad adherente y con mayor potencial patogénico.

Así, los resultados, en su conjunto, indican que las cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes chilenos con alguna patología gastroduodenal, tendrían un considerable potencial patogénico y que el gen *babA2* debería incluirse en los estudios de pesquisa de cepas con mayor virulencia (García *et al.*, 2006).

Cuadro 1.3. Porcentaje del gen *babA2* de *Helicobacter pylori* en diferentes países de América.

Frecuencia del gen <i>babA2</i> de <i>Helicobacter pylori</i>				
Año de Investigación	País	Ciudad	Número de Pacientes	Porcentaje (%)
2003	USA	Midwestern	22/61	36
2005	Colombia	Bogotá	66/166	48,2
2003	Brasil	Belo Horizonte	96/208	46,15
2006	Brasil	Sao Paulo	38/95	40,4
2006	Chile	Concepción	1/66	1,5

1.4.2.9. Diagnóstico para *Helicobacter pylori*

Existen algunos métodos para diagnosticar *Helicobacter pylori*, métodos no invasivos o indirectos como: detección de anticuerpos anti- *Helicobacter pylori*, en suero, detección de antígenos de *H. pylori* en muestras de heces, el test de la prueba del aliento con urea-¹³C o urea-¹⁴C (Premoli *et al.*, 2004; Bittencourt *et al.*, 2006).

También existen los métodos invasivos o directos, que consisten en la detección directa del patógeno en mucosa gástrica. Entre estas técnicas encontramos: métodos microbiológicos e histológicos, técnicas de Biología Molecular como PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y test rápido de Urea.

1.4.2.9.1 Métodos no invasivos

Los métodos no invasivos son también llamados indirectos, ya que no requieren endoscopia para ser realizados entre ellos tenemos:

La **prueba rápida del aliento de urea con C^{13}** se basa en la capacidad de la ureasa producida por *H. pylori* para hidrolizar con rapidez una solución de urea marcada con C^{13} . Se realiza con la recogida del aliento basal tras 20 minutos de la administración oral de C^{13} -urea. La medición del C^{13} se realiza por espectrofotometría de masas del cociente de los hisopos o por espectrometría de infrarrojos (Chey & Wong, 2007). Esta prueba realizada correctamente tiene una sensibilidad y especificidad sobre el 95%. Este método es recomendado en niños y mujeres embarazadas. Las principales desventajas que presenta este método son sus elevados costos y, que no se encuentra en algunos países como el nuestro porque requiere contar con una infraestructura adecuada (Gatta et al., 2003).

Serología, la infección por *Helicobacter pylori* provoca una respuesta inmunológica local y sistémica con un incremento de la secreción de IgM e IgG. Los métodos serológicos se basan en la detección de anticuerpos específicos frente a *H. pylori* en suero. Las principales ventajas de esta técnica son los bajos costos y rápidos resultados. Esta técnica solo es recomendada a pacientes que no han sido previamente diagnosticados o que no han tomado previamente tratamiento para *Helicobacter pylori*, pero esto no es aplicable en países como el nuestro debido a su alta prevalencia (García, 2006; Chey & Wong, 2007).

La **detección de antígeno en heces** es un método que se basa en la detección de antígenos en muestras de heces por la técnica de inmunoensayo con el uso de anticuerpos policlonales anti- *Helicobacter pylori*. La sensibilidad y especificidad esta sobre el 90% y es considerada el reemplazo para el método de la prueba del aliento (Gatta et al., 2003; Chey & Wong, 2007).

1.4.2.9.2 Métodos invasivos

La *endoscopia digestiva alta* es un método diagnóstico utilizado en el estudio de pacientes con enfermedades abdominales. Consiste en la exploración detallada de la garganta, esófago, estómago y duodeno a través de un tubo llamado endoscopio. La gran ventaja de la exploración es la posibilidad de poder tomar muestras de las zonas exploradas o biopsias, para completar el estudio de cada paciente. El instrumental utilizado ha variado notablemente desde la introducción del primer endoscopio hace casi 40 años. Hoy se utilizan endoscopios de calibre fino (7-9 mm) con tecnología de vídeo digital y una gran calidad de la imagen (la exploración se visualiza en un monitor de TV), lo que permite al explorador obtener un diagnóstico correcto y fiable. Tras aplicar anestesia local en la garganta con un spray, similar a la que utilizan los dentistas, el explorador introduce el endoscopio directamente en la boca iniciándose así la exploración (*Mercer et al., 2006*).

El *Test rápido de Ureasa (RUT)*, es un método rápido y práctico para detectar *Helicobacter pylori* en pacientes sometidos a endoscopia, se lo realiza a través de la actividad enzimática de la ureasa del microorganismo. Tiene una sensibilidad de 90% y especificidad de 95%. Esta prueba depende de la enzima ureasa producida por *Helicobacter pylori*, que hidroliza la urea en CO₂ y Amonio llevando a un incremento de pH lo que se pone de manifiesto por un cambio en el color de un indicador ácido base que define la reacción como positiva (*Morales, 2001*).

En el mercado existen diversas pruebas comerciales como CLOtest, PyloriTek, HUT-test, Pronto Dry y Hpfast, estas tienen alta sensibilidad y especificidad y un tiempo de lectura corto, que puede ser desde una hora a 24 horas (*Donmez-Altuntas & Guven, 2002*).

Una desventaja es que puede dar falsos positivos debido a pinzas de biopsias o endoscopios contaminados, puede también dar falsos negativos en individuos con sangrado reciente o activo del tracto gastrointestinal superior y también existen medicamentos que reducen la densidad o actividad de ureasa en *Helicobacter pylori*, tal como antibióticos o PPIs, que pueden disminuir la sensibilidad de RUT en un 25%. El bajo costo y los resultados relativamente rápidos hacen del RUT una prueba práctica para la identificación de *Helicobacter pylori* (*Moncayo et al., 2006; Alba et al., 2006; Chey & Wong, 2007*).

La **histología** es otro método de detección de *Helicobacter pylori*. Es un método de rutina con tinción hematoxilina-eosina, aunque se han utilizado otras tinciones que son específicas para este microorganismo con el objetivo de aumentar el porcentaje de detección. A través de esta técnica se puede demostrar en forma directa la presencia de *H. pylori* en una muestra de mucosa gástrica. La histología es de utilidad en el diagnóstico inicial para definir la presencia o ausencia de *H. pylori*. Además una ventaja significativa de la histología sobre otros métodos diagnósticos es la habilidad para evaluar los cambios patológicos asociados con la infección de *H. pylori* tal como inflamación, atrofia, metaplasia intestinal y malignidad (Logan & Walker, 2001), por lo que se lo considera como gold estándar, pero imperfecto, porque su sensibilidad y especificidad varía en relación al nivel de experiencia del patólogo, ya que se requiere de un patólogo experimentado en la identificación de *H. pylori*. La histología tienen una sensibilidad y especificidad de 95% (Rotimi et al., 2000; Cava & Cobas, 2003; Chey & Wong, 2007).

El **Cultivo** es un método de referencia para la identificación de *Helicobacter pylori*, con el que es posible aislar e identificar la bacteria a detalle. La sensibilidad es del 70% al 95% y su especificidad es del 90% cuando la muestra es material gástrico obtenido mediante biopsia (Rivas & Hernández, 2000). El cultivo de *Helicobacter pylori* requiere cultivos especiales, sus condiciones de incubación son microaerofílicas y su incubación tarda entre 5 a 7 días. Una ventaja es que se puede realizar test de susceptibilidad antimicrobiana que es útil para los pacientes en los que el tratamiento no ha logrado erradicación y orientar a una nueva terapia. Desafortunadamente el cultivo no es tan sensible como otras pruebas y tarda mucho en brindar resultados (Chillihua et al., 2004; Chey & Wong, 2007).

Un método diagnóstico molecular para detección de *Helicobacter pylori* es la **Reacción en Cadena de la Polimerasa [Polymerase Chain Reaction (PCR)]**. Es un método poderoso que tiene como fin amplificar o reproducir *in vitro* en gran cantidad un segmento específico de ADN. La PCR es un proceso rápido, sensible y poco costoso para amplificar ADN de nuestro interés.

Esta técnica es de gran aplicabilidad en una variedad de campos, por su alta especificidad y sensibilidad ha demostrado ser muy útil en el diagnóstico de bacterias de

difícil cultivo; como *Helicobacter pylori*. Ofrece un diagnóstico confiable, rápido y menos laborioso que los cultivos normales de este tipo de microorganismo. Otra de sus ventajas radica en que la secuencia específica de interés no necesita estar aislada del resto de su genoma (*Premoli et al., 2004*).

La PCR es una reacción llevada completamente *in vitro* y requiere de los siguientes elementos:

a) ADN polimerasa

La *DNA polimerasa* es una enzima natural que cataliza la formación y la reparación del DNA. Trabaja ligándose a una sola cadena de ADN y creando una cadena complementaria. La enzima añade nucleótidos al final de la cadena en el extremo 3' en un modo independiente. La concentración de esta enzima en la reacción puede afectar el producto, una excesiva cantidad de ADN polimerasa puede amplificar productos no específicos. La ADN polimerasa más utilizada es la *Taq polimerasa*, una enzima aislada de una bacteria (*Thermophilus aquaticus*) y tiene la característica de soportar temperaturas elevadas (*Surzycki, 2000*).

b) Primers

Los primers también denominados cebadores, son los iniciadores de la PCR son oligonucleótidos sintéticos de 20 a 25 pares de bases que hibridan con la región, complementaria al ADN molde que se desea amplificar y propician el inicio de la reacción de elongación por la *Taq* ADN polimerasa.

La concentración de primers en la PCR debe ser usualmente de 0,2 a 1 μM excesos en la cantidad de primers puede ocasionar la formación de dímeros (*Surzycki, 2000*).

c) dNTPs

Los Desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) son dATP, dTTP, dUTP, dCTP, dGTP. Constituyen el sustrato con el que la ADN polimerasa construye la nueva cadena de ADN. En la PCR la concentración de cada dNTP no puede exceder de 200 μ M. La concentración de los cuatro dNTPs deben ser equivalentes, un exceso de estos puede inhibir la actividad enzimática y contribuye a la aparición de productos falsos (*Surzycki, 2000*).

d) MgCl₂

El magnesio es un cofactor para todas las ADN polimerasas. La concentración de magnesio puede afectar el alineamiento de primers, la temperatura de disociación de la cadena de ADN molde, la especificidad del producto y la formación de dímeros (*Surzycki, 2000*).

e) Buffer y Sal

El buffer usado en PCR es Tris-HCl en concentraciones de 10 a 50 mM. El pH óptimo es de 8 a 9. La sal usada en la mayoría de reacciones es Sodio o Potasio, estos son añadidos para facilitar el correcto alineamiento de los primers. Para la enzima *Taq polimerasa*, la concentración normalmente usada es de 50 mM si se coloca una concentración mayor puede inhibir la actividad de la polimerasa (*Surzycki, 2000*).

f) ADN molde

El ADN molde contiene la secuencia que se desea amplificar y servirá de plantilla para realizar las copias sucesivas de la secuencia deseada. La PCR se puede desarrollar con pequeñas cantidades de ADN impuro (*Surzycki, 2000*).

Las etapas de la PCR consisten en tres pasos: denaturación, alineamiento y extensión. Estos tres pasos son repetidos en ciclos de 25 a 30 veces. Algunos protocolos

también incluyen una simple denaturación (Denaturación inicial) antes de los ciclos y un paso de extensión larga (Extensión Final) al final de la PCR.

a) Denaturación

La denaturación es un paso en el que las cadenas del ADN molde se separan completamente. Un tiempo estándar de 30 a 60 segundos es usado para asegurar el calentamiento uniforme del volumen total de reacción. Este paso se lo realiza a altas temperaturas, normalmente se utiliza una temperatura de 94° C a 95° C (*Surzycki, 2000*).

b) Alineamiento

En el alineamiento los primers se complementan al ADN molde, el tiempo usado en este paso es de 30 a 60 segundos, tiempo requerido para enfriar la reacción de la temperatura de denaturación a la temperatura de alineamiento. La temperatura normalmente usada en este paso es de 50° C a 55° C (*Surzycki, 2000*).

c) Elongación

La elongación es un paso en donde la ADN polimerasa sintetiza una nueva cadena de ADN. El tiempo de elongación depende de la longitud de la secuencia a ser amplificada. La temperatura usada en este paso es de 72° C, con un tiempo de 60 segundos (*Surzycki, 2000; Premoli et al., 2004*).

1.5. Sistema de hipótesis o pregunta de investigación

La frecuencia del gen *babA2* de *Helicobacter pylori* en pacientes ecuatorianos es similar a la encontrada en países de Latinoamérica como Colombia, Brasil y Chile, y la presencia de este gen esta correlacionada con patologías gástricas como: gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal y cáncer gástrico.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes

2.1.1. Instituciones

Las instituciones que colaboraron en este estudio fueron:

- Hospital Eugenio Espejo, Gastroenterología y Laboratorio de Patología.
- Hospital Pedro Vicente Maldonado, Gastroenterología.
- Hospital VozAndes Quito, Cirugía Ambulatoria y Laboratorio de Patología.
- Centro de Biomedicina, Laboratorio de Biología Celular y Microbiología Molecular.
- Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Escuela de Bioanálisis, Laboratorio de Diagnóstico Molecular.
- Laboratorio de Patología, Dr. Guillermo López.
- Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción. Chile.

2.1.2. Personas cooperantes

- Dr. Oswaldo Rodríguez Mora, MD. PhD.
- Dr. Fabián Tulcanazo, MD Gastroenterólogo.
- Dra. Ivonne Orellana Narváez, MD Gastroentérológico.
- Dra. Bertha Estrella, Bioestadística.
- Dr. Olmedo Mancero Bucheli, MD Patólogo.
- Dr. Guillermo López Alarcón, MD Patólogo.
- Dra. Apolinaria García, Bioquímica, Master en Microbiología. Doctora en Ciencias Biológicas.
- Lcda. Mercy Túqueres, Jefe de Cirugía Ambulatoria.
- Sra. Elena Padilla, Secretaria de Patología, Hospital Vozandes Quito.

2.2. Zona de Estudio

2.2.1. Trabajo de Campo

Las muestras fueron recolectadas en el Hospital Eugenio Espejo ubicado en la Av. Gran Colombia s/n, Quito- Ecuador, en el Hospital Pedro Vicente Maldonado ubicado en el centro del cantón Pedro Vicente Maldonado, Pichincha - Ecuador y en el Hospital VozAndes ubicado en la calle Villalengua Oe2-37 y Av. 10 de Agosto, Quito- Ecuador.

2.2.2. Trabajo de Laboratorio

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador ubicado en la Av. 12 de Octubre y Roca, Quito-Ecuador.

Parte de los procesos de investigación se llevaron a cabo en el laboratorio de Biología Celular y Microbiología Molecular del Centro de Biomedicina, ubicado en la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Central del Ecuador, Sodiro N14-121 e Iquique, Quito-Ecuador.

2.3. Período de tiempo de investigación

El estudio se comenzó en Abril del 2007 y finalizó en Agosto del 2008.

2.4. Diseño Experimental

2.4.1. Cálculo del Tamaño de la muestra

Se calculó una muestra de $n = 139$ pacientes, con un nivel de confianza del 95%, una frecuencia esperada del 10% y un error del 5%, para este cálculo se utilizó la fórmula para el cálculo de tamaño de muestra (n).

Cuadro 2.1. Fórmula para el cálculo del tamaño de muestra dependiendo de la frecuencia esperada y del error permisible.

Fórmula	Donde
$n = \frac{z_{\alpha}^2 p(1-p)}{B^2}$	$z_{\alpha} = 1.96$ constante estadística para 95% de confianza. $p = 0.10$ frecuencia esperada. $B = 0.05$ error permisible.

Fuente: Mateu & Casal, 2003

2.5. Procedimientos

2.5.1. Selección de Personas

Las personas seleccionadas para este estudio fueron personas de cualquier edad y sexo que acuden a la consulta de Gastroenterología del Hospital Eugenio Espejo (Dr. Fabián Tulcanazo), del Hospital Pedro Vicente Maldonado (Dr. Fabián Tulcanazo) y del Hospital VozAndes Quito (Dra. Ivonne Orellana), que se realizaron un examen endoscópico porque fueron diagnosticados con gastritis clínica: que se define como un dolor crónico y recurrente en el centro del abdomen con náuseas, distensión o hinchazón del abdomen, sobre todo tras ingesta de alimentos (*Talley et al., 2005*).

Los individuos seleccionados para esta investigación, fueron informados del estudio en el que iban a participar mediante un consentimiento informado escrito y un formulario de información (Anexos A, B, C y D), el cual firmaron antes de empezar el examen endoscópico, ya que es un requisito para realizar estudios clínicos. El consentimiento informado fue aprobado por el Comité de Bioética del Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador.

2.5.2. Endoscopia Gastroduodenal

De cada paciente que se realizó el examen endoscópico, los gastroenterólogos: Dr. Fabián Tulcanazo y Dra. Ivonne Orellana tomaron biopsias tanto para la genotipificación del gen *babA2* como para el diagnóstico Histopatológico de *Helicobacter pylori*.

De cada paciente, se tomaron cuatro biopsias en total para la genotipificación del gen *babA2* de *Helicobacter pylori*, dos biopsias de antro y dos biopsias de cuerpo.

En el caso del diagnóstico histopatológico el número de biopsias varió entre cuatro a ocho biopsias, dependiendo del criterio del médico gastroenterólogo.

2.5.3. Codificación de pacientes

A cada paciente se le asignó un número para manejar su información, consentimientos y muestras de biopsias, manteniendo así su confidencialidad.

La numeración de los pacientes comenzó en el número 001 y terminó en el número 184, el código de cada paciente fue dado a medida que el paciente fue llegando al examen endoscópico.

2.5.4. Almacenamiento de Muestras

Las biopsias fueron recolectadas en tubos eppendorf de 1,5 ml, que contenían 1 ml de solución salina (PBS). En cada tubo se colocaron dos biopsias. Para el diagnóstico Histopatológico se recolectaron las biopsias en un solo frasco que contenía formol al 10%.

Cada tubo eppendorf fue etiquetado con el respectivo código del paciente y con un código para la parte del estómago del que proviene la muestra. Se designó la letra A para la biopsia de Antro, y la letra C para la biopsia de Cuerpo.

2.5.4.1. Buffer de Almacenamiento y Transporte

El buffer utilizado para almacenar y transportar las muestras de biopsias fue una solución Fosfato Buffer Salina 1X [Phosphate Buffered Saline (PBS)], se utilizó esta solución por ser isotónica y no tóxica para la células. Este buffer contiene Cloruro de Sodio (NaCl) 8 gr.; Cloruro de Potasio (KCl) 0,2 gr.; Fosfato Di-ácido de Sodio (NaH₂PO₄) 1,44 gr. y Fosfato Ácido de Potasio (KH₂PO₄) 2,41 gr. Esta solución se afora a un litro con agua destilada y el pH de esta solución se lleva a 7,3. Se esteriliza por el proceso de autoclavado (*Ausubel et al., 2002*).

2.5.5. Transporte de Muestras

Las biopsias fueron transportadas con geles congelantes a 4°C desde la toma de la muestra, en el Hospital Eugenio Espejo y en Hospital Pedro Vicente Maldonado hasta el laboratorio de Biología Celular y Microbiología Molecular del Centro de Biomedicina, donde se procesaron y se almacenaron a -20°C.

De la misma manera se transportaron las muestras que fueron recogidas en el Hospital VozAndes que luego fueron almacenadas y procesadas en el Laboratorio Diagnóstico Molecular de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

2.5.6. Histopatología

Las muestras fueron llevadas a los respectivos laboratorios de Patología de cada uno de los Hospitales donde se recogieron las muestras. En estos laboratorios se realizó la tinción de Hematoxilina-Eosina a las muestras que llegaron de endoscopía, para a continuación visualizar mediante el microscopio si *Helicobacter pylori* esta presente en ese tejido.

Si se observa la bacteria, estas muestras son positivas, si no se encuentra la bacteria se tomarán las muestras como negativas.

2.5.7. Aislamiento de ADN

2.5.7.1. Aislamiento de ADN de Cepa Control

La cepa control que contenía el gen de virulencia *babA2* de *Helicobacter pylori* fue la cepa ATCC 43504, esta cepa fue cultivada en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Universidad de Concepción-Chile y fue traída a Quito-Ecuador en Agar Columbia y sangre de caballo a 4°C, desde Concepción-Chile hasta Quito-Ecuador.

Para la extracción de la cepa control se utilizó el reactivo DNAzol® (Invitrogen), el procedimiento se realizó bajo las instrucciones del manufacturador.

Para la lisis celular se adicionó 1 ml de DNAzol® en el plato de agar que contenía la cepa control y se homogenizó con movimientos circulares, con la ayuda de una micropipeta se tomó todo el lisado de las células y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml, a continuación se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y se colocó el sobrenadante en un tubo estéril nuevo eppendorf de 1,5 ml.

Para precipitar el ADN bacteriano se colocó 0,5 ml de etanol 99,8% (Scharlan) y se mezcló por inversión varias veces, nuevamente se centrifugó a 4.000 rpm por 4 minutos y se eliminó el sobrenadante. El ADN se lavó dos veces con etanol al 75% (v/v) y se centrifugó a 1.000 rpm por 2 minutos y nuevamente se eliminó el sobrenadante. Se dejó secar el tubo por 30 segundos a temperatura ambiente dejando el tubo invertido. El ADN se resuspendió en 0,2 ml de Hidróxido de Sodio (NaOH) 8 mM.

2.5.7.2. Aislamiento de ADN de *Helicobacter pylori* a partir de muestras de biopsias

El aislamiento de ADN de *Helicobacter pylori* comenzó con la lisis celular, la que consistió en homogenizar el tejido macerándolo en un portaobjetos limpio con ayuda de una aguja y un bisturí estéril, luego se colocó en el Buffer lisis TES [Tris HCl 50 mM pH 7.2; EDTA 1 mM; SDS 1% (v/v)] y se añadió *Proteinasa K* (Invitrogen) a una concentración final de 100 ug/ml. Luego se incubó a 55 °C por dos horas (Sislema, 2008). Se incubaron las muestras a 98 °C por 10 minutos para desactivar la *Proteinasa K*.

A continuación se centrifugaron las muestras a 12.000 rpm por 13 minutos y se colocó el sobrenadante en un nuevo tubo, luego se añadió 0,5 ml de Etanol al 99,8% (Scharlan), se invirtieron los tubos varias veces para precipitar el ADN, se retiró el sobrenadante y se procedió a lavar el ADN dos veces con etanol al 75% (v/v), se centrifugó a 2.000 rpm por 5 minutos y se desechó el sobrenadante, posteriormente se dejaron secar a los tubos por un lapso de 30 segundos a temperatura ambiente, dejando los tubos invertidos. Finalmente en cada tubo se colocaron 0,2 ml de Buffer TE [Tris HCl 10 mM y EDTA 1 mM; pH 7,5] (Debets-Ossenkopp et al., 2003) para resuspender el ADN.

2.5.8. Cuantificación de ADN

Se verificó la cantidad y calidad del ADN, mediante espectrofotometría, para lo cual, se realizaron mediciones de Absorbancia a 260 nm y 280 nm.

Estas mediciones se realizaron en un espectrofotómetro de UV marca Perkin Elmer, modelo Lambda 25 UV/VIS del Diserlab (Diagnóstico, Investigación, Servicios, Laboratorios) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Se calculó la relación A_{260}/A_{280} , la cual debe tener un valor igual o mayor a 1.5, si nuestras muestras presentan un valor en este rango se considera que el ADN es de buena calidad (Monteiro, Cabrita & Mégraud, 1997). Además se calculó la concentración del ADN (N), mediante la fórmula:

$$N(\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}) = 70A_{260} - 40A_{280} \text{ (Surzycky, 2000)}$$

Finalmente se divide este valor por el factor de dilución y se obtiene la concentración de ADN.

Para realizar este procedimiento se colocó en un tubo de plástico estéril de 15 ml (Corning) 3 ml de agua destilada estéril y se adicionó 5 μl de la muestra de ADN, posteriormente se colocó el contenido de este tubo en una cubeta de cuarzo. Se procedió a

leer la muestra a una absorbancia de 260 nm y a 280 nm. El control utilizado fue 3.005 μ l de agua destilada estéril, que también se utilizó para encerrar el espectrofotómetro.

2.5.9. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el gen *16S rRNA* de *Helicobacter pylori*

Para el procedimiento de amplificación por PCR, se dividió el área de trabajo en dos partes para evitar contaminación, el área Pre-PCR y el área de Post-PCR.

En el área de Pre-PCR se realizaron los procesos de preparación del cóctel para la amplificación y en el área de Post-PCR se realizaron las amplificaciones y las visualizaciones de resultados.

Cada una de estas áreas cuentan con reactivos, suministros y equipos de uso exclusivo. Para realizar el proceso de amplificación se utilizó el ADN aislado anteriormente.

Para la amplificación se utilizó los termocicladores (Flexigene, Techne/Mynicicler Modelo FFG02HSD, y el termociclador Techne TC-312 Modelo FTC3102D).

Para la amplificación de *Helicobacter pylori* se utilizaron los primers *16S rRNA* de *Helicobacter pylori* (Cuadro 2.1).

Se llevó el coctel de PCR a un volumen total de 50 μ l, donde se utilizaron 45 μ l de PCR Supermix (Invitrogen) que contiene: 22 mM Tris-HCl (pH 8.4), 55 mM KCl, 1.65 mM MgCl₂, 220 μ M dGTP, 220 μ M dATP, 220 μ M dTTP, 220 μ M dCTP, 22 U Taq Polimerasa ADN recombinante y estabilizadores.

Además se colocó 1 μ l de cada primer con una concentración final de 200 nM, recomendado para la utilización de PCR Supermix y se colocó 3 μ l de ADN obtenido del aislamiento (Sislema, 2008).

Cuadro 2.1. Secuencia y tamaño de los primers para el gen *16S rRNA* de *Helicobacter pylori*.

Nombre de Primers	Secuencia	Tamaño del producto en pares de bases (pb)
<i>16HP1 forward</i>	5'-GCG-ACC-TGC-TGG-AAC-ATT-AC-3'	139 pb
<i>16HP1 reverse</i>	5'-CGT-TAG-CTG-CAT-TAC-TGG-AGA-3'	

Fuente: Weiss et al., 1994.

El programa de amplificación para PCR del gen *16HP1* fue realizado bajo lo descrito por Weiss et al., 1994 y optimizado por Sislema, 2008:

Denaturación Inicial a 95 °C por 5 minutos; seguido por 39 ciclos de:

- Denaturación a 95°C por 1 minuto.
- Acoplamiento a 55°C por 1 minuto.
- Extensión a 72°C por 1 minuto, y una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Los productos de la amplificación se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa de 1,6%.

2.5.10. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el gen *babA2* de *Helicobacter pylori*

Después de la amplificación de *Helicobacter pylori*, se tomaron todas las muestras positivas por PCR del gen *16HP1* y se realizó la amplificación para el gen *babA2* de *Helicobacter pylori*.

Para la reacción de amplificación del gen *babA2* de *Helicobacter pylori* se utilizaron los primers *babA2* de *Helicobacter pylori* (Cuadro 2.2).

El volumen total de la reacción de PCR fue 50 μ l . Siguiendo las especificaciones del uso de PCR Supermix, se utilizó para el coctel de PCR: 45 μ l de PCR Supermix (Invitrogen), esta contiene: 22 mM Tris-HCl (pH 8.4), 55 mM KCl, 1.65 mM MgCl₂, 220 μ M dGTP, 220 μ M dATP, 220 μ M dTTP, 220 μ M dCTP, 22 U Taq Polimerasa ADN recombinante y estabilizadores; además se adicionó 1 μ l de cada primer con una concentración final de 200 nM y 3 μ l de ADN obtenido del aislamiento.

Cuadro 2.2. Secuencia y tamaño de primers para el gen *babA2* de *Helicobacter pylori*.

Nombres de Primers	Secuencia	Tamaño del producto en pares de bases (pb)
<i>babA2F</i> <i>forward</i>	5'-AATCCAAAAAGGAGAAAAAGTATGAAA-3'	850 bp
<i>babA2R</i> <i>reverse</i>	5'-TGTTAGTGATTTTCGGTGTAGGACA-3'	

Fuente: Gerhard et al., 1999.

Las amplificaciones de PCR para *babA2* de *Helicobacter pylori* fueron realizadas de acuerdo con lo descrito por Mizushima et al., 2001:

Denaturación Inicial por 5 minutos a 92 °C; seguido por 35 ciclos de:

- Denaturación a 92°C por 1 minuto;
- Acoplamiento a 55°C por 1 minuto;
- Extensión a 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Los productos de amplificación para el gen *babA2* se los visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,6%.

2.5.11. Electroforesis de Ácidos Nucleicos en Geles de Agarosa

Para realizar la separación de los diferentes fragmentos de ADN se realizó en geles de agarosa (Ultra-Pure™, Invitrogen) a una concentración de 1.6% (p/v).

La electroforesis se la realizó en cámaras de electroforesis horizontales (Gel XL ultra V-2, Labnet Internacional, Inc) con un voltaje constante de 70V. El buffer tampón utilizado fue TAE (Tris/Acetato/EDTA) 1X. Este buffer fue preparado a partir de una solución stock de TAE 50X [TAE 50X: Tris HCl, 2M pH 7.2; EDTA 50 mM pH 8; Acido Acético 57.1 ml y agua destilada hasta 1 litro] (*Sambrook et al., 1994*).

Las muestras se prepararon con ADN amplificado y buffer de carga llamado Dye, (Cuadro 2.3) para otorgarle densidad a la muestra y también para poder observar como va el proceso de electroforesis.

Cuadro 2.3. Concentración y nombre de los componentes de Buffer de Carga Dye.

Componentes	Concentración
Azul de bromofenol	0.25%
Xilene-Cianol	0.25%
Glicerol	30%
Agua grado biología molecular	

Fuente: Sambrook et al.,(1989-1994).

Para la visualización del tamaño de los fragmentos de ADN se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb) (Trackit 100 pb, DNA Ladder, Invitrogen) que consiste en 15 fragmentos de DNA de entre 100 y 1500 pares de bases, en múltiplos de 100 pares de bases y un fragmento adicional de 2072 pares de bases.

Los geles de agarosa que contiene los fragmentos de ADN fueron sometidos a un proceso de tinción con una solución de SyBr Safe® (Invitrogen) (0,1 $\mu\text{l}/\text{ml}$) y se visualizaron en un transiluminador (Safe Imager™ Transluminator, Invitrogen) de luz Azul.

Las fotografías de los geles de agarosa resultantes se realizaron con una cámara digital, marca Lumix Panasonic; modelo DMC-FS3.

2.6. Análisis de datos

2.6.1. Diagnóstico Histopatológico

2.6.1.1. Diagnóstico Histopatológico de *Helicobacter pylori*

Una vez terminada la fase experimental se analizó el diagnóstico Histopatológico de *Helicobacter pylori*.

Para el diagnóstico Histopatológico de *Helicobacter pylori* se realizó una matriz con 1 para las muestras positivas y con 0 para las muestras negativas, tomando en cuenta los siguientes parámetros:

Positivo: Helicobacter pylori (+, ++, +++)

Negativo: Negativo para *Helicobacter pylori*, o no se identifica la presencia de bacilos.

2.6.1.2. Diagnóstico Histopatológico de Gastritis

El diagnóstico Histopatológico se lo analizó clasificando las observaciones histopatológicas en diferentes grupos como: mucosa normal, gastritis crónica no atrófica, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia y cáncer gástrico. A cada uno de estos grupos se le asigno un número.

Cuadro 2.4. Clasificación de diagnóstico Histopatológico por grupos de gastritis según las observaciones histopatológicas.

Grupo	Características
Grupo 0	Normal
Grupo 1	Gastritis Crónica No Atrófica
Grupo 2	Gastritis Crónica Atrófica.
Grupo 3	Metaplasia Intestinal.
Grupo 4	Displasia.
Grupo 5	Cáncer Gástrico

Fuente: Sempértegui et al., 2007.

2.6.2. Diagnóstico Molecular por PCR de *Helicobacter pylori*

Una vez terminada la fase experimental del diagnóstico de *Helicobacter pylori* por PCR, se analizó los resultados en una matriz con: 1 para muestras positivas y 0 para muestras negativas, tomando en cuenta los siguientes parámetros:

Positivo: cuando hay la presencia de la banda de amplificación.

Negativo: cuando no existe una banda de amplificación.

2.6.3. Cálculo de sensibilidad, especificidad y valores predictivos de la técnica molecular PCR

Para calcular la sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos de la técnica molecular PCR se utilizó una tabla de doble entrada (Gómez de la Cámara, 2004), donde se colocan los resultados obtenidos del método diagnóstico Molecular PCR y los resultados obtenidos del método diagnóstico Histopatológico, que se consideró como el Gold Standard en este estudio. Se aplicaron diferentes fórmulas para el cálculo de: sensibilidad, especificidad y valores predictivos.

Cuadro 2.5. Relación entre el resultado del método diagnóstico y la presencia o ausencia de enfermedad.

Resultado Prueba Diagnóstica	Enfermo	No enfermo
Positivo	Verdadero Positivo a	Falso Positivo b
Negativo	Falso Negativo c	Verdadero Negativo d

Fuente: Gómez de la Cámara, 2004.

2.6.3.1. Fórmulas

2.6.3.1.1. Fórmula de Sensibilidad

Cuadro 2.6. Fórmula para el cálculo de la sensibilidad del método diagnóstico Molecular PCR.

Fórmula	Donde:
$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{a + c}$	$a = \text{Verdadero Positivo}$ $c = \text{Falso Negativo}$

Fuente: Gómez de la Cámara, 2004.

2.6.3.1.2. Fórmula de Especificidad

Cuadro 2.7. Fórmula para el cálculo de la especificidad del método diagnóstico Molecular PCR.

Fórmula	Donde:
$\text{Especificidad} = \frac{d}{b + d}$	$b = \text{Falso Positivo}$ $d = \text{Verdadero Negativo}$

Fuente: Gómez de la Cámara, 2004.

2.6.3.1.3. Fórmula de Valor Predictivo Positivo

Cuadro 2.8. Fórmula para el cálculo del Valor predictivo positivo del método diagnóstico Molecular PCR.

Fórmula	Donde:
$VPP = \frac{a}{a + b}$	$VPP = \text{Valor Predictivo Positivo}$ $a = \text{Verdadero Positivo}$ $b = \text{Falso Positivo}$

Fuente: Gómez de la Cámara, 2004.

2.6.3.1.4. Fórmula de Valor Predictivo Negativo

Cuadro 2.9. Fórmula para el cálculo del Valor predictivo negativo del método diagnóstico Molecular PCR.

Fórmula	Donde:
$VPN = \frac{d}{c + d}$	$VPN = \text{Valor Predictivo Positivo}$ $c = \text{Falso Negativo}$ $d = \text{Verdadero Negativo}$

Fuente: Gómez de la Cámara, 2004.

2.6.4. Diagnóstico por PCR para gen *babA2* de *Helicobacter pylori*

Se realizó PCR para la detección del gen *babA2* de *Helicobacter pylori* y los resultados se colocaron en una matriz, el número 1 para muestras positivas y el número 0 para muestras negativas, tomando el siguiente criterio para positivo y negativo:

Positivo: cuando hay la presencia de la banda de amplificación del gen *babA2* (850 pb)

Negativo: cuando no existe la banda de amplificación del gen *babA2*

2.6.5. Correlación entre la presencia del gen *babA2* de *Helicobacter pylori* con los diferentes grupos de gastritis

Un análisis de regresión logística fue llevado a cabo para observar la asociación entre el gen *babA2* de *Helicobacter pylori* y la presencia de gastritis crónica no atrófica, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal, displasia y cáncer gástrico. El análisis estadístico fue llevado a cabo con el programa SPSS (versión 11.5, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Los resultados serán expresados en odds ratios (OR) (oportunidad relativa) con un intervalo de confianza (CI) del 95%. El valor de $p < 0.05$ es considerado como estadísticamente significativo (Gerhard et al., 1999).

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1. Pacientes

Fueron enrolados un total de 184 pacientes, de los cuales 44% (81/184) fueron hombres y 56% (103/184) mujeres. El rango de edad fue de 15 a 86 años, con una edad media de 47 años.

3.2. Diagnóstico Histopatológico

El diagnóstico Histopatológico demostró que 116 de los 184 pacientes fueron positivos para *Helicobacter pylori*. De los 116 pacientes, 61 pacientes fueron mujeres y 55 pacientes fueron hombres.

Tabla. 3.1. Porcentaje de detección de *Helicobacter pylori* según sexo por diagnóstico Histopatológico.

	Pacientes
--	------------------

	n = 184			
	H. pylori Positivo n = 116		H. pylori Negativo n = 68	
	No. De Pacientes	Porcentaje (%)	No. de Pacientes	Porcentaje (%)
Hombres	55	67,9	26	32,1
Mujeres	61	59,2	42	40,8

n: número de pacientes

El diagnóstico histopatológico también demostró que ningún paciente del grupo estudiado presentó mucosa normal y que todos los pacientes de este grupo (184), presentaron algún tipo de gastritis. El diagnóstico histopatológico también nos dio el porcentaje de la presencia de gastritis según el sexo.

Tabla 3.2. Porcentaje de grupos de gastritis observadas en el diagnóstico Histopatológico

	Pacientes n = 184	
	No. de Pacientes	Porcentaje (%)
Gastritis Crónica No Atrófica	93	50,6
Gastritis Crónica Atrófica	59	35,8
Metaplasia Intestinal	30	13,6
Displasia	0	0
Cáncer Gástrico	2	0

n: número de pacientes.

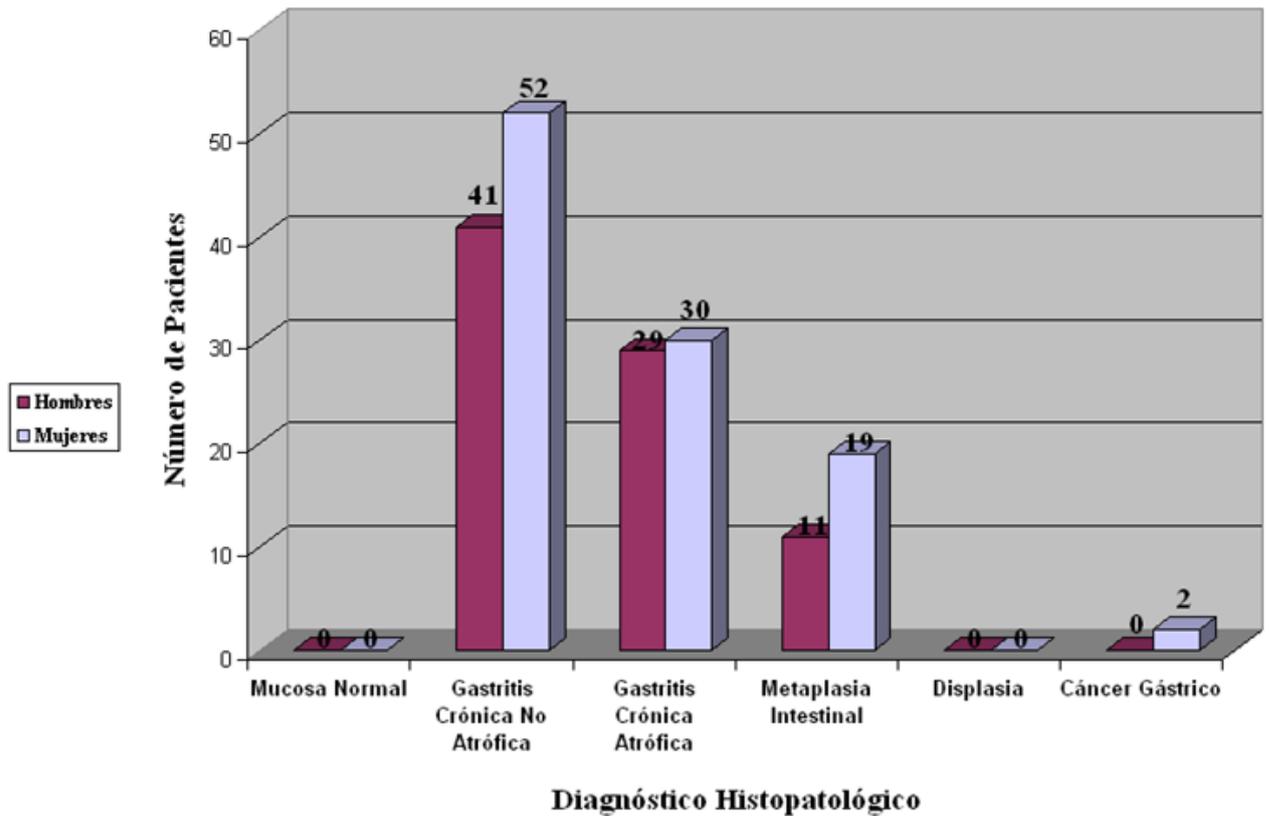


Figura 3.1. Clasificación de diagnóstico Histopatológico de los 184 pacientes según sexo

3.3. Cuantificación de ADN

Las muestras de ADN medidas por espectrofotometría presentaron un valor promedio de 1,6; el valor máximo es de 2,8 y el valor mínimo es de 1,1. Del total de las muestras, 123 muestras presentaron valores mayores o iguales al valor de referencia; 1,5 y 61 muestras presentan valores menores a 1,5. De las 61 muestras que presentan valores menores a 1,5; 8 muestras presentaron valores de 1,1; 11 muestras presentaron valores de 1,2; 16 muestras presentan valores de 1,3 y 25 muestras presentaron valores de 1,4 (Anexo E).

3.4. Diagnóstico molecular (PCR) para diagnóstico de *Helicobacter pylori*

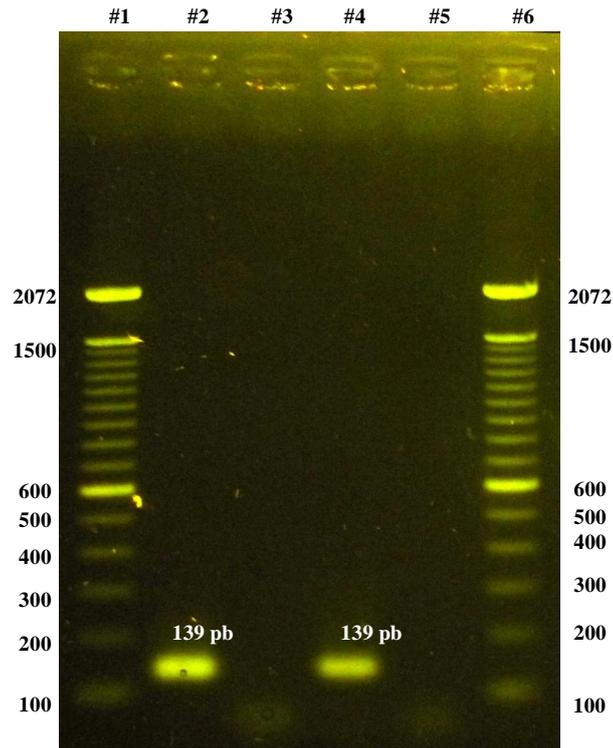


Figura 3.2. Productos de Amplificación del gen *16S rRNA* de *Helicobacter pylori*.

Pocillo # 1 y # 6: Ladder de 100 pares de bases (Invitrogen); **Pocillo # 2:** Control positivo: Cepa ATCC 43504; **Pocillo # 3:** Control negativo: Agua; **Pocillo # 4:** Muestra positiva para el gen *16S rRNA* de *Helicobacter pylori* del paciente 5 y **Pocillo # 5:** Muestra negativa para el gen *16S rRNA* de *Helicobacter pylori* del paciente 65.

Se amplificó el gen *16S rRNA* de *H. pylori* por PCR, y amplificó el fragmento específico de 139 pares de bases.

Además, el diagnóstico molecular por PCR demostró que 139 pacientes fueron positivos para *Helicobacter pylori* de un total de 184 pacientes, de este grupo, 73 pacientes fueron mujeres y 66 pacientes fueron hombres, positivos para la presencia de esta bacteria.

Tabla. 3.3. Porcentaje de detección de *Helicobacter pylori* según sexo por el diagnóstico Molecular PCR.

	Pacientes
--	------------------

n = 184				
<i>H. pylori</i> Positivo n = 139			<i>H. pylori</i> Negativo n = 45	
	No. de Pacientes	Porcentaje (%)	No. de Pacientes	Porcentaje (%)
Hombres	66	81,5	15	18,5
Mujeres	73	70,9	30	29,1

n: número de pacientes

De los 139 pacientes positivos para *Helicobacter pylori* por PCR se encontró que 66 pacientes presentaron gastritis crónica no atrófica, 49 pacientes presentaron gastritis crónica atrófica y 24 pacientes presentaron metaplasia intestinal. No se encontró ningún paciente positivo para *Helicobacter pylori* con displasia ni con cáncer gástrico.

Tabla 3.4. Prevalencia de *H. pylori* positivo en pacientes con patologías gástricas.

<i>Helicobacter pylori</i> positivos n = 139		
	No. de Pacientes	Porcentaje (%)
Gastritis Crónica No Atrófica	66	47,5
Gastritis Crónica Atrófica	49	35,3
Metaplasia Intestinal	24	17,3

n: número de pacientes

3.5. Cálculo de sensibilidad, especificidad, y valores predictivos del diagnóstico molecular PCR

La técnica molecular PCR respecto al gold Standard, el diagnóstico Histopatológico, demostró que la técnica molecular PCR tiene una sensibilidad de 100%, una especificidad de 83,5%, un valor predictivo positivo de 66,17% y un valor predictivo negativo de 100%.

Tabla 3.5. Relación entre el resultado del método diagnóstico Histopatológico y el método diagnóstico Molecular PCR para detección de *Helicobacter pylori*.

Resultado Prueba Diagnóstica		PCR		Total PCR
		Negativo	Positivo	
Histopatología	Negativo	45	23	68
	Positivo	0	116	116
Total Histopatología		45	139	184

Tabla 3.6. Porcentajes de Sensibilidad, Especificidad y valores predictivos positivo y negativo del método diagnóstico molecular PCR para la detección de *Helicobacter pylori*.

PCR para <i>Helicobacter pylori</i>	Porcentaje (%)
Sensibilidad	100 %
Especificidad	83,5%
Valor Predictivo Positivo	66,1%
Valor Predictivo Negativo	100%

3.6. Comparación de los métodos diagnósticos para *Helicobacter pylori*, métodos Histopatológico y Molecular (PCR)

Comparando los dos métodos para diagnóstico de *Helicobacter pylori* se encontró que el método histopatológico detectó solamente 116 pacientes positivos para *H. pylori*, mientras que el método diagnóstico molecular PCR detectó 139 pacientes positivos para *H. pylori* del total del pacientes (184).

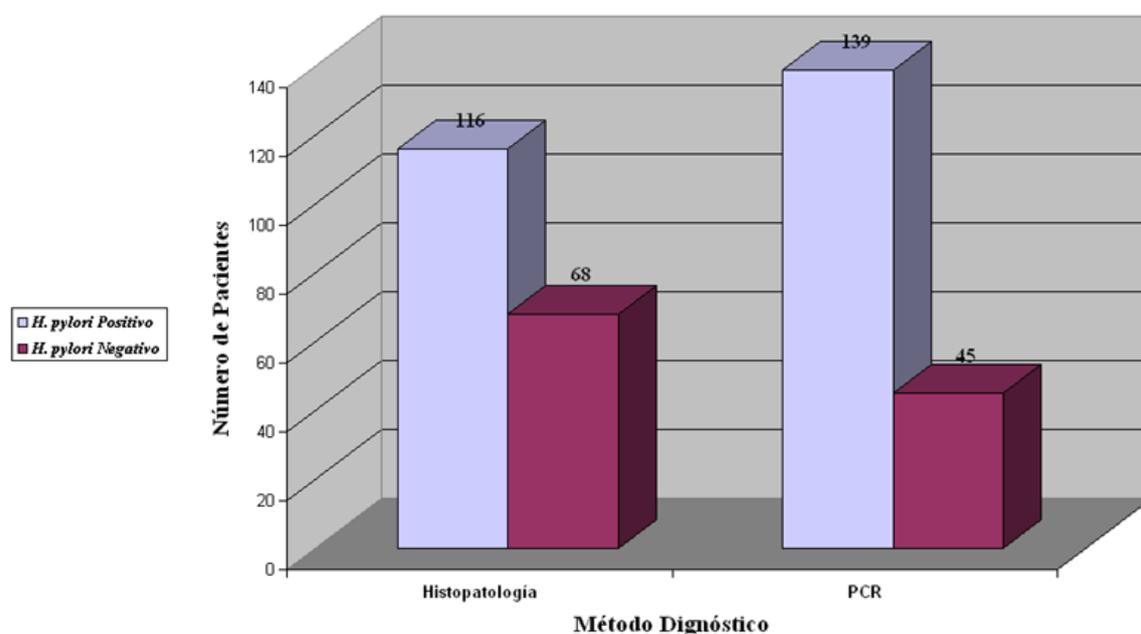


Figura 3.3. Comparación de los métodos diagnósticos molecular (PCR) y diagnóstico histopatológico para detección de *H. pylori*.

Tabla 3.7. Porcentaje de detección de los métodos diagnósticos Histopatológico y Molecular PCR en pacientes ecuatorianos.

Método Diagnóstico	No. de Pacientes	Porcentaje (%)
Histopatológico	116 / 184	63 %
PCR	139 / 184	76 %

3.7. Amplificación del gen *babA2* de *Helicobacter pylori*

De los pacientes diagnosticados positivos para *Helicobacter pylori* por la técnica molecular PCR, se amplificó el gen *babA2* de *Helicobacter pylori*. Esta reacción amplificó el fragmento específico de 850 pares de bases.

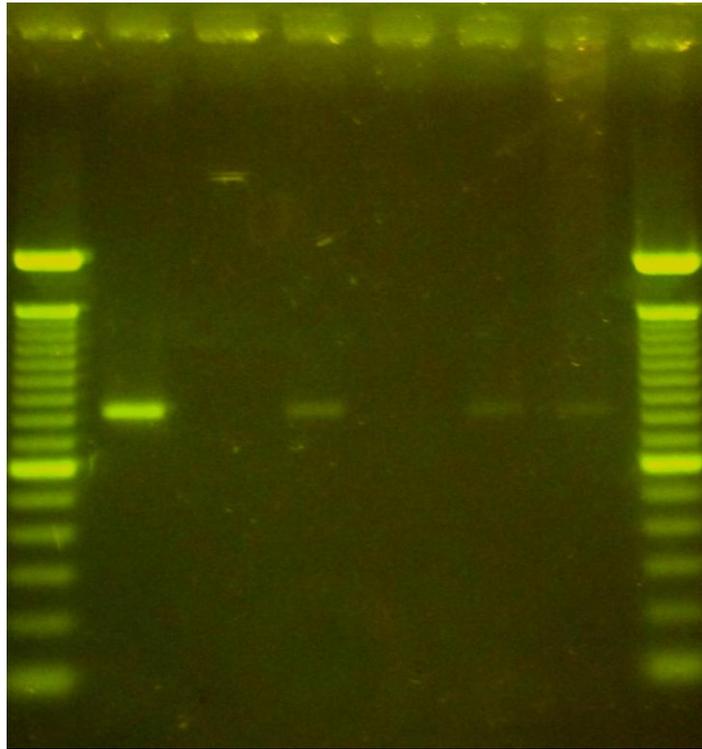


Figura 3.4. *Productos de Amplificación del gen babA2 de Helicobacter pylori.*

Pocillo # 1 y # 8: Ladder 100 pb Invitrogen, **Pocillo # 2:** Control positivo: Cepa ATCC 43504;
Pocillo # 3: Control Negativo: Agua; **Pocillo #4:** Muestra positiva para gen *babA2* paciente108; **Pocillo # 5:**
 Muestra negativa para gen *babA2* paciente 97; **Pocillo # 6:** Muestra positiva para gen *babA2* paciente145;
Pocillo # 7: Muestra positiva para el gen *babA2* paciente 153.

De los 139 pacientes que fueron *Helicobacter pylori* positivos, solamente 3 pacientes (#108, #145, #153) fueron positivos para el gen *babA2* de *Helicobacter pylori*.

Tabla 3.8. Porcentaje de detección del gen *babA2* en pacientes positivos para *Helicobacter pylori*.

	Total Pacientes
--	------------------------

	n = 139	
	No. de Pacientes	Porcentaje (%)
<i>babA2</i> positivos	3	2,2
<i>babA2</i> negativos	136	97,8

n: número de pacientes

Se analizó estadísticamente con una regresión logística, estos resultados se los relacionó con edad y sexo de los pacientes positivos para el gen *babA2* de *Helicobacter pylori* y se encontró que la oportunidad relativa (odds ratio) para la edad es 1,041 y para el sexo es 0,393. Estos dos valores revelan que no hay correlación estadística entre el sexo y la edad de los pacientes con la presencia del gen *babA2* de *Helicobacter pylori*.

Tabla 3.9. Asociación entre la presencia del gen *babA2* de *H. pylori* y la edad y sexo de los pacientes positivos para *Helicobacter pylori*.

	Valor <i>p</i>	OR	95% CI
Edad	0,290	1,041	0,966 – 1,121
Sexo	0,453	0,393	0,034 – 4,5
OR, odds ratio 95% CI, 95% Intervalo de Confianza, Valor <i>p</i> < 0,05 estadísticamente significativo			

3.8. Asociación de la presencia del gen *babA2* de *Helicobacter pylori* con el diagnóstico Histopatológico

De los 3 pacientes positivos para el gen *babA2* de *Helicobacter pylori*, dos pacientes presentaron gastritis crónica atrófica y un paciente presentó metaplasia intestinal y se los clasificó en los diferentes grupos de gastritis para el posterior análisis estadístico.

Tabla 3.10. Histopatología de pacientes positivos para el gen *babA2* de *Helicobacter pylori*.

Código Paciente (No.)	Análisis Histopatológico
108	Gastritis crónica activa atrófica multifocal. <i>Helicobacter pylori</i> : negativo (Anexo H)
145	Gastritis crónica antral atrófica moderada. No metaplasia. Hiperplasia foveolar. Atíпия del grupo II. <i>Helicobacter pylori</i> : positivo (+++) (Anexo I)
153	Gastritis crónica moderadamente activa en mucosa de tipo pilórico. Metaplasia intestinal completa. <i>Helicobacter pylori</i> : positivo (++) (Anexo J)

Conociendo el análisis histopatológico de los pacientes positivos para el gen *babA2* se procedió a realizar la clasificación en los grupos de gastritis. Dos de los pacientes positivos pertenecen al grupo de Gastritis Crónica Atrófica y un paciente pertenece al grupo de Metaplasia Intestinal.

Con esta clasificación se realizó la regresión logística y se encontró que la oportunidad relativa (odds ratio) para gastritis crónica atrófica es de 4,199 y la oportunidad relativa (odds ratio) para metaplasia intestinal es de 6,169 revelando que no hay una correlación estadística entre estas patologías gástricas con la presencia del gen *babA2* de *Helicobacter pylori*.

Tabla 3.11. Asociación entre gastritis crónica atrófica y metaplasia intestinal con la presencia del gen *babA2* de *Helicobacter pylori*.

	<i>babA2</i> positivo	OR	95% CI	Valor <i>p</i>
Gastritis Crónica Atrófica	2	4,199	0,318 – 55,371	0,276
Metaplasia Intestinal	1	6,169	0,369 – 103,198	0,206
OR, odds ratio. 95% CI, Intervalo de confianza $p < 0,05$ considerado significativo estadísticamente.				

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

Helicobacter pylori posee un factor de adherencia llamado BabA (The Blood-group antigen-binding Adhesin), esta proteína permite la unión de esta bacteria con el antígeno de grupo de sangre Lewis b del epitelio gástrico. Esta proteína es codificada por el gen *babA2* (Borén *et al.*, 1994; Ilver *et al.*, 1998). En el presente trabajo se detectó el genotipo *babA2* de *Helicobacter pylori* en población ecuatoriana, constituyendo el primer informe sobre este genotipo en esta población.

Usando el método descrito por Gerhard *et al.*, 1999; el gen *babA2* se detectó mediante PCR en 2,2% del total de cepas positivas de *Helicobacter pylori* de población ecuatoriana y la presencia de este gen no se asoció con la presencia de patologías gástricas como: gastritis crónica no atrófica, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal ni con cáncer gástrico.

Diferentes a nuestros resultados, en trabajos similares realizados en Europa encontramos que la frecuencia del gen *babA2* en población alemana es del 71,9%; la frecuencia encontrada en población italiana es del 24%, y la encontrada en Francia es de 48,78%. La presencia del gen *babA2* en Alemania tiene una fuerte correlación con cáncer gástrico y úlcera duodenal, por lo que sugirieron que este gen puede ser utilizado como un buen marcador para estas patologías gástricas. A diferencia de estos resultados, en Italia solo asocian al gen *babA2* con otros genes de virulencia, es decir que los genes de virulencia juntos son relacionados con la presencia de metaplasia intestinal; de igual manera en Francia se encontró que la presencia del *babA2* de *Helicobacter pylori* al igual que en nuestro país, no se asoció estadísticamente con patologías gástricas como linfoma MALT (Gerhard *et al.*, 1999; Zambon *et al.*, 2003; Lehours *et al.*, 2004).

En Turquía se encontró que la frecuencia del gen *babA2* es de 53,8%, siendo esta frecuencia mucho más alta que la encontrada en nuestro país y se encontró que el gen *babA2* es solo un marcador independiente para cáncer gástrico pero no para úlcera duodenal (Erzin *et al.*, 2006).

Comparando nuestros resultados con otras localizaciones geográficas, como países asiáticos, encontramos que la frecuencia en estos países es alta en comparación a los encontrados en población ecuatoriana. Así en Japón se encontró una frecuencia de 84,9%, en China 79,8% y en Taiwán un 100%. En Corea la frecuencia del gen *babA2* fue de 36,1% siendo la más baja en relación a estos países asiáticos pero alta en relación a Ecuador. Tanto en Japón, Taiwán y Corea no se encontró una asociación de la presencia del gen *babA2* de *Helicobacter pylori* con patologías gástricas, solamente en China se encontró que existe correlación del gen *babA2* con la presencia de atrofia glandular y metaplasia intestinal. Estos datos sugieren que en cada población varía, tanto la frecuencia como la asociación de este gen con alguna patología gástrica y que a pesar de que la frecuencia del gen *babA2* es alta no se correlaciona con patologías gástricas (*Mizushima et al., 2001; Yu et al., 2002; Kim et al., 2001; Lai et al., 2002*).

En Estados Unidos se encontró una frecuencia del gen *babA2* de 36% y la presencia de este gen se asociado con alto riesgo de patologías gástricas relacionadas con *Helicobacter pylori*, estos datos son diferentes a los encontrados en nuestro país (*Podzorski et al., 2003*).

Comparando nuestros resultados con países de América Latina encontramos que en Chile la frecuencia del gen *babA2* es de 1,5%, siendo esta frecuencia similar a la hallada en población ecuatoriana. A diferencia de estos resultados en Colombia se encontró una frecuencia de 48,2%, y en dos estudios realizados en Brasil, en el año 2003 y 2006 se encontró que la frecuencia del gen *babA2* es de 46,15% y 40,4% respectivamente, siendo estos resultados muy diferentes a los encontrados en nuestro país.

Con respecto a la asociación de la presencia del gen *babA2* con alguna patología gástrica encontramos que en Colombia y en el estudio realizado en Brasil en el año 2006 no se encontró ninguna asociación del gen *babA2* con patologías gástricas. A diferencia de estos hallazgos y los encontrados en nuestro país, el estudio realizado en Brasil en el 2003 muestra que el gen *babA2* esta asociado con inflamación antral, lo que nuevamente sugiere que los datos obtenidos de una población no pueden ser aplicados a otra población (*García et al., 2006; Oliveira et al., 2003; Gatti et al., 2006; Quiroga et al., 2005*).

Con todas estos datos encontrados del gen *babA2* de *Helicobacter pylori* observamos que en cada región y en cada población varía tanto la frecuencia del gen *babA2* de *Helicobacter pylori* como su asociación con diferentes patologías gástricas como gastritis, linfoma MALT, cáncer gástrico y úlceras pépticas.

Con respecto al diagnóstico de *Helicobacter pylori*, se encontró que la técnica de diagnóstico por PCR con respecto al método diagnóstico Histopatológico; detectó el 76% (139/184) de pacientes infectados con *Helicobacter pylori* y por el método Histopatológico se detectó solamente el 63% (116/184), observando que en la técnica molecular PCR hubo un incremento del 13% (23 pacientes más) en la detección de *Helicobacter pylori*; además la técnica molecular PCR presentó una sensibilidad y especificidad de 100% y 83,5%, respectivamente, y presentó un valor predictivo positivo de 66.1% y un valor predictivo negativo de 100%. Cabe recalcar que estos cálculos se hicieron tomando en cuenta que el gold Standard usado en Ecuador que es el método Histopatológico, pero este es un gold Standard imperfecto porque la mayoría de ocasiones depende del nivel de experiencia del patólogo (Chey & Wong, 2007). Sin embargo se puede observar que la sensibilidad y la especificidad encontradas en este estudio son altas. Esta afirmación coincide con el estudio de detección de *Helicobacter pylori* realizado anteriormente por Sislema, 2008; en donde la sensibilidad y especificidad es de 100% y 95%, respectivamente y el porcentaje de detección de *Helicobacter pylori* por la técnica de PCR es del 36% (39/109) y por el método Histopatológico es de 32% (35/109), existiendo un incremento de 4% (4 pacientes más), demostrando que la técnica molecular PCR se la puede usar como método diagnóstico de *Helicobacter pylori* ya que incrementa la detección de esta bacteria (Zsikia et al., 2006).

Y con respecto a la extracción de ADN, el método optimizado de extracción de ADN realizado por Sislema, 2008; demostró que es aplicable y que el ADN obtenido de este método presentó una buena calidad y cantidad de ADN en la mayoría de muestras, esto se vio reflejado en la medición por espectrofotometría que se realizó en las muestras de ADN ya que presentaron un valor promedio de 1,6 siendo mayor al valor de referencia de 1,5 el cual indica que se realizó una extracción en la que se evitó la contaminación por proteínas y se obtuvo un ADN bastante puro (Monteiro et al., 1997).

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- La presencia del gen *babA2* de *Helicobacter pylori* no está asociada con la presencia de patologías gástricas como gastritis crónica, metaplasia intestinal, displasia ni cáncer gástrico en pacientes ecuatorianos, lo que sugiere que existen otros factores de virulencia y adherencia, y factores del huésped que pueden estar relacionados con estas patologías gástricas.
- Los diferentes resultados encontrados del gen *babA2* de *Helicobacter pylori* de país a país, sugieren que existen diferentes tipos de cepas de *Helicobacter pylori* que varían de una población a otra.
- La *Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)* es una técnica molecular que se utiliza para la genotipificación de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas. Con esta técnica se detectó el gen *babA2* de *Helicobacter pylori* por primera vez en mucosa gástrica de pacientes ecuatorianos y se encontró una baja frecuencia de la presencia de este gen en esta población.
- La *Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)* es una técnica poderosa de la síntesis de DNA, es una técnica rápida, sensible y no costosa, lo que en un futuro puede usarse como un método diagnóstico eficaz para detectar *Helicobacter pylori* en biopsias de mucosa gástrica.
- La *Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)* es una técnica con alta sensibilidad y especificidad, esta técnica detectó mayor cantidad de pacientes con *Helicobacter pylori* que el método Histopatológico que se le considera como gold Standard en Ecuador.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- En el Ecuador existe una alta incidencia de cáncer gástrico en comparación con otros países. El principal factor de riesgo para cáncer gástrico es *Helicobacter pylori*, por lo tanto es importante ejecutar estudios acerca de esta bacteria para entender como funciona su mecanismo de patogénesis y como esta relacionado con el desarrollo de cáncer gástrico y otras enfermedades.
- Es importante en un futuro realizar un estudio epidemiológico acerca de todas las patologías gástricas que *Helicobacter pylori* causa en los pacientes ecuatorianos para obtener una base de datos y poder realizar estudios de la relación de esta bacteria con enfermedades gástricas.
- Para entender la importancia clínica de la genotipificación de *Helicobacter pylori* se debe realizar estudios en grandes poblaciones y con apropiados controles en diferentes regiones geográficas, ya que no se aplica lo estudiado de una región a otra.
- La genotipificación de *babA2* de *Helicobacter pylori* es una base para seguir haciendo la genotipificación de otras adhesinas de *Helicobacter pylori* como son SabA, AlpA, AlpB y HopZ y poder observar si una de ellas se relaciona con alguna patología gástrica en población ecuatoriana.
- Los procesos de extracción de DNA y amplificación por PCR se deben realizar por separado en áreas diferentes, pre-PCR y post-PCR, y se debe descontaminar todo el material utilizado en estos procesos para evitar contaminación, además utilizando procesos de automatización se disminuye la contaminación.

CAPITULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Alba, R., Toledo, R. & Viana, M. (2006). *Helicobacter pylori*: Clínica, diagnóstico y tratamiento. Revista de Posgrado de la VI Cátedra de Medicina, 158, 9-12.

Arents, N., Van Zwet, A., Thijs, J., Kooistra-Smid, A., Van Slochteren, K., Degener, J., Kleibeuker, J., & Van Doorn, J. (2001). The importance of *vacA*, *cagA*, and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* infection in peptic ulcer disease and gastroesophageal reflux disease. American Journal of Gastroenterology, 96, 2603-2608.

Aspholm-Hurting, M., Dailide, G., Lahmann, M., Kalia, A., Ilver, D., Roche, N., Vikström, S., Sjöström, R., Lindén, Bäckström A., Lundberg, C., Arnqvist, A., Mahdavi, J., Nilsson, U., Velapatiño, B., Gilman, R., Gerhard, M., Alarcón, T., López, M., Nakazama, T., Fox, J., Correa, P., Domínguez, M., Perez, G., Blazer, M., Normark, S., Carstedt, I., Oscarson, S., Teneberg, S., Berg, D., & Borén T. (2004). Functional Adaptation of BabA, the *H. pylori* ABO Blood Group Antigen Binding Adhesin. Science, 305, 519-522.

Atherton, J.C. (1998). *Helicobacter pylori* virulence factors. British Medical Bulletin, 54, 105-120.

Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J.G., Smith, J. & Struhl, K. (2002). Short protocols in Molecular Biology. Volumen 2. Canadá: John Wiley & Sons, Inc.

Bittencourt, P., Rocha, G., Penna, J. & Queiroz, D. (2006). Gastroduodenal peptic ulcer and *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents. Jornal de Pediatria (Rio J), 82, 325-334.

Borén, T., Falk, P., Roth, K., Larson, G., & Normark, S. (1993). Attachment of *Helicobacter pylori* to Human Gastric epithelium Mediated by Blood Group Antigens. Science, 262, 1892-1895.

Castillo-Rojas, G., Mazarí, M., & López, Y. (2004). *Helicobacter pylori*: Focus on CagA and VacA major virulence factors. Salud Pública México, 46, 538-548.

Cava, F. & Cobas, G. (2003). Dos décadas de *Helicobacter pylori*. Vaccimonitor, 12(1). Extraído el 20 Mayo del 2007 de la página web de la revista Vaccimonitor: <http://www.finlay.sld.cu/publicaciones/vaccimonitor/Vm2003/a1.pdf>

Chang, Y-H., Wang, L., Lee, M-S., Cheng, C-W., Wu, C-Y., & Shiau, M-Y. (2006). Genotypic Characterization of *Helicobacter pylori* cagA and vacA from Biopsy Specimens of Patients with Gastroduodenal Diseases. The Mount Sinai Journal of Medicine, 73, (3), 622-626.

Chey, W. & Wong, B. (2007). American collage of gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. American Journal of Gastroenterology, 102, 1-18.

Chillihua, K., Palomino, R. & Aguilar, E. (2004). Aislamiento de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas de pacientes con gastritis en el hospital regional del Cusco, Perú. SITUA, 13, (1), 15-19.

Corral, F., Cueva, P. & Yépez, J. (Eds.). (2004). Epidemiología del cáncer en Quito y en otras regiones del Ecuador. Quito-Ecuador: AH/editorial.

Covacci, A., Telford, J., Del Giudice, G., Parsonnet, J., Rappuoli, R. (1999). *Helicobacter pylori* Virulence and Genetic Geography. Science, 284, 1328-1333.

Covacci, A. & Rappuoli, R. (2003). *Helicobacter pylori*: After the Genomes, back to Biology. The Journal of Experimental Medicine, 197 (7), 807-811.

Crew, K. & Neugut, A. (2006). Epidemiology of gastric cancer. World Journal of Gastroenterology, 12 (3), 354-362.

Debets-Ossenkopp, I., Reyes, G., Mulder, J. Stegge, B., Peters, J., Savelkoul, P., Tanca, J., Peña, A. & Vandenbroucke-Grauls, C. (2003). Characteristics of clinical

Helicobacter pylori strains from Ecuador. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 51, 141-145.

Donmez-altuntas, H. & Guven, K. (2002). Detection of *Helicobacter pylori* using nested polymerase chain reaction and rapid urease test in gastric biopsy samples The Turkish Journal of Gastroenterology, 13 (2), 94-97.

Erzin, Y., Koksal, V., Altun, S., Dobrucali, A., Aslan, M., Erdamar, S., Dirican, A., & Kocazeybek, B. (2006). Prevalence of *Helicobacter pylori vacA, cagA, cagE, iceA, babA2* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. Helicobacter, 11 (6), 574-580.

García, A., Barra, R., Delgado, C., Kawaguchi, F., Trabal, N., Montenegro, S., and González, C. (2006). Genotipificación de aislados clínicos de *Helicobacter pylori* en base a genes asociados a virulencia *cagA, vacA* y *babA2*. Primer aislamiento de una cepa *babA2* positiva en pacientes chilenos. Revista Médica de Chile, 134, 981-988.

García, E. (2006). *Helicobacter pylori* e Infecciones Asociadas. Extraído el 23 de junio, 2007, del sitio web: <http://www.ejournal.unam.mx/revfacmed/no49-4/RFM49409.pdf>.

Gatta, L., Ricci, C., Tampieri, A. & Vaira, D. (2003). Non-invasive techniques for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Journal Clinical Microbiology and Infection, 9 (6), 489-496.

Gerhard, M., Lehn N., Neumayer N., Borén T., Rad R., Schepp W., Miehle S., Classen M., & Prinz C. (1999). Clinical relevance of *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. Proc Natl Acad Sci USA, 96, 12778-12783.

Go, MF. (2002). Review: Natural History of *Helicobacter pylori* infection. Journal Alimet Pharmacol Ther, 16, (1), 3-15.

Gómez de Cámara, A. (2004). Caracterización de pruebas diagnósticas. Neurología, 19,(1), 31-38.

Graham, J. (2003). *Helicobacter pylori* Gene Expression in Vivo: a Genomic Perspective. Genome Letters, 2, 18-23.

Henning, E., Mernaugh, R., Edl, J., & Cover, T. (2004). Heterogeneity among *Helicobacter pylori* strains in Expression of the Outer Membrane protein BabA. Infection and Immunity, 72(6), 3429-3435.

Höcker, M., & Hohenberger, P. (2003). *Helicobacter pylori* virulence factors - one part of a big picture. The Lancet, 362, 1231-1233.

Ilver, D., Arnqvist, A., Ögren, J., Frick, IM., Kersulyte, D., Incecik, E., Berg, D., Covacci, A., Engstrand, L., & Borén, T. (1998). *Helicobacter pylori* Adhesin Binding fucosylated Histo- Blood group Antigens revealed by Retagging. Science, 279, 373-376.

Karlsson, K.A. (2000). The human gastric colonizer *Helicobacter pylori*: a challenge for host-parasite glycobiology. Glycobiology, 10, 761-771.

Katic, V., Katic, K., Gligorijevic, J., Dimov, D. & Zlatic, A. (2004). The histopathology and immunohistology of gastric MALT Lymphoma. Arch Oncol, 12(1), 5-6.

Kim, S-Y., Woo, C-W., Lee, Y-M., Son, B-R., Kim J-W, Chae H-B., Youn, S-Y & Park S-M. (2001). Genotyping CagA, VacA Subtype, IceA1, and BabA of *Helicobacter pylori* isolates from Korean Patients, and their association with Gastroduodenal Diseases. Journal Korean Academy of Medical Sciences, 16, 579-84.

Kumar, V., Abbas, A. and Fausto, N. (2005). Patología Estructural y funcional. Madrid: Elsevier.

Lai, C.H., Kuo C.H., Chen, Y.C., Chao, F.Y., Poon, S.K., Chang C.S., & Wang, W.C. (2002). High Prevalence of *cagA* and *babA2* positive *Helicobacter pylori* clinical isolates in Taiwan. Journal of Clinical Microbiology, 40, 3860-3862.

Lamarque, D. & Peek, R. (2003). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Helicobacter, 8, (1), 21-30.

Lehours, P., Ménard, A., Dupony, S., Bergey, B., Richey, F., Zerbib, F., Ruskoné-Fourmestreaux, A., Delehier, J.C. & Mégraud, F. (2004). Evaluation of Association of Nine *Helicobacter pylori* Virulence Factors with Strains Involved in Low-Grade Gastric Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. Infection and Immunity, 72, (2), 880-888.

Leite, K., Darini, E., Canavez, F., Carvalho, C., Mitteldorf C, Camara-Lopes L.H. (2005). *Helicobacter pylori* and *cagA* gene detected by polymerase chain reaction in gastric biopsies: correlation with histological findings, proliferation and apoptosis. Sao Paulo Med, 123, (3), 113-118.

Logan, R. & Walker, M. (2001). ABC of the upper gastrointestinal tract. Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. BMJ, 323 (20), 920-922.

Luman, W. (2005). *Helicobacter pylori*: Causation and treatment. Royal College of Physicians of Edinburgh, 35, 45-49.

Mahdavi, J., Sondén, B., Hurtig, M., Olfat, F., Forsberg, L., Roche, N., Ångström, J., Larsson, T., Teneberg, S., Karlsson, K-A., Altraja, S., Wadström, T., Kersulyte, D., Berg, D., Dubois, A., Petersson, C., Magnusson, K-E., Norberg, T., Lindh, F., Lundskog, B., Arnqvist, A., Hammarström, L., & Borén, T. (2005). *Helicobacter pylori* SabA Adhesin in Persistent Infection and Chronic Inflammation. Science, 296, 573-578.

Mateu, E. & Casal, J. (2003). Tamaño de la Muestra. Revista Epidemiológica Medica Prev., 1, 8-14.

Mercer, D., Abourbith, J., Bradley, J., Evans, D., Gould, M., Hadjiadis, D., Halik, J., Liu, G., Lowe, C., Maciver, A., McDonald, S., Neto, C., & Zamel, N. (2006). Clinical Practice Parameters and Facility Standards. Toronto.

Mizushima, T., Sugiyama, T., Komatsu, Y., Ishizuka, J., Kato, M., & Asaka, M. (2001). Clinical relevance of *babA2* Genotype of *Helicobacter pylori* in Japanese clinical Isolates. Journal of clinical Microbiology, 39(7), 2463-2465.

Moncayo, J. M., Santacruz, J., Álvarez, A. L., Franco, B., López, M., Ángel, A., Gallego, M. & Serrano, H. (2006). Comparación de métodos diagnósticos en la infección por *Helicobacter pylori* en Quindío. Colombia Médica, 37(3), 202-213.

Monteiro, L., Cabrita, J., & Mérgraud, F. (1997). Evaluation of Performances of three DNA Enzyme Immunoassays for Detection of *Helicobacter pylori* PCR products from biopsy Specimens. Journal of Clinical Microbiology, 35, (11), 2931-2936

Morales, M., Castillo, G., López, Y. & Cravioto, A. (2001). *Helicobacter pylori* Facultad de medicina de la UNAM, Universidad de Barcelona. Extraído el 10 de Marzo, 2007 del sitio web de la Universidad de la UNAM:

http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_15/Capitulo15.pdf

Oh, J., Kling-Bäckhed, H., Giannakis, M., Xu, J., Fulton, R., Fulton, L., Cordum, H., Wang, C., Elliott, G., Edwards, J., Mardis, E., Engstrand, L., & Gordon, J. (2006). The complete genome sequence of chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: Evolution during disease progression. Journal of Clinical Microbiology, 103, (26), 9999-10004.

Oliveira, A.G., Santos, A., Guerra, J.B., Rocha, G.A., Camargos, A.M., Oliveira, C., Cabral, M., Nogueira, A., & Queiroz, D. (2003). *babA2* and *cagA* positive *Helicobacter pylori* Strains are Associated with duodenal ulcer and Gastric Carcinoma in Brazil. Journal of Clinical Microbiology, 41(8), 3964-3966.

Owen, A.D. (2003). Gastritis and Carditis. Modern Pathology, 16 (4), 325–341.

Parkin, M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P. (2005). Global Cancer Statistics 2002. A Cancer Journal for Clinicians, 55, (2), 74-108.

Pinto-Santini, D., & Salama, N., (2005). The Biology of *Helicobacter pylori* Infection, a Major Risk Factor for Gastric Adenocarcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 14(8), 1853-1858.

Podzorski, R., Podzorski, D., Wuerth, A., & Tolia, V. (2003). Analysis of the *vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA*, and *babA2* genes in *Helicobacter pylori* from sixty-one pediatric patients from the Midwestern United States. Diagnostic Microbiology and Infections Disease. 46, 83-88.

Premoli, G., González, A., Millán-Mendoza, B., Percoco, T. & Vielma, A. (2004). Diagnóstico de *Helicobacter pylori* mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Revista Cubana de Medicina Tropical. 56 (2), 85-90.

Prinz, C., Schöniger, M., Rad, R., Becker, I., Keiditsch, E., Wagenpfeil, S., Classen, M., Rösch, T., Schepp, W., & Gerhard, M. (2001). Key Importance of the *Helicobacter pylori* Adherence factor Blood group Antigen Bonding Adhesin Chronic gastric inflammation. Cancer Research. 61, 1903-1909.

Ramakrishnan, K., & Salinas, R. (2007). Peptic Ulcer Disease. American Academy of Family Physicians. 76, 1005-13.

Ramírez, A., Mendoza, D., Leey, J. & Guerra, J. (2002) Estudio del *Helicobacter pylori* en el Perú. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 19, (4), 209-214.

Rivas, F. & Hernández, F. (2000). *Helicobacter pylori*: factores de virulencia, patología y diagnóstico. Revista Biomédica. 11, (3), 187-205.

Rotimi, O., Cairns, A., Gray, S., Moayyedi, P., & Dixon, M.F. (2000). Histological identification of *Helicobacter pylori*: comparison of staining methods. Journal of Clinical pathology. 53, 756-759.

Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989-1994). Molecular Cloning. A laboratory Manual. (Vols. 1-3). United States of North America: Cold Spring harbor.

Sempértegui, F., Díaz, M., Mejía, R., Rodríguez, O., Renteira, E., Guarderas, C., Estrella, B., Recalde, R., Hamer, D. & Reeves, F. (2007). Low concentrations of Zinc in gastric mucosa are associated with increased severity of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. Helicobacter, *12*, 43-48.

Sislema, F. (2008). Optimización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de *Helicobacter pylori* en muestras de mucosa gástrica de pacientes ecuatorianos y comparación con el método diagnóstico de histopatología. Tesis de pregrado de la Escuela Politécnica del Ejército. (2008).

Suerbaum, S. & Michetti, P. (2002). *Helicobacter pylori* Infection. The New England Journal of Medicine, *47*(15), 175-1186.

Surzycki, S. (2000). Basic Techniques in Molecular Biology. New York. Springer.

Talley, N., Vakil, N., & The Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. (2005). Guidelines for the Management of Dyspepsia. The American Journal of Gastroenterology, *100*, 1–14.

Tomb, J-F., White, O., Kerlavage, A., Clayton, R., Sutton, G., Fleischmann, R., Ketchum, K., Klenk, H., Gill, S., Dougherty, B., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H., Glodek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L., Lee, N., Adams M., Hickey, E., Berg, D., Gocayne, J., Utterback, T, Peterson, J., Kelley, J., Cotton, M., Weidman, J., Fujii, C., Bowman, C., Watthey, L., Wallin, E., Hayes, W., Borodovsky, M., Karpk, P., Smith, H., Fraser, C & Craig, J. (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature, *388*, 539-547.

Torrado, J., Plummer, M., Vivas, J., Garay, J., López, G., Peraza, S., Carillo, E., Oliver, W. & Muñoz, N. (2000). Lewis Antigen Alterations in a Population at High Risk of Stomach Cancer. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, *9*, 671–674.

Vandenplas, Y., (1999). *Helicobacter pylori* infection. World Journal of Gastroenterology, 6,(1): 20-31.

Yamaoka, Y., Ojo, O., Fujimoto, S., Odenbreit, S., Hass, R., Gutierrez, O., El-Zimaity, HMT., Reddy, R., Arnqvist, A., & Graham D.Y. (2005). *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. Gut, 55, 775-781.

Yu, J., Leung, W.K., Go, M.Y., Chan, MCW., To KF., Ng, EKW., Chan, FKL., Ling TKW., Chung SCS., & Sung, JY. (2002). Relationship between *Helicobacter pylori* *babA2* status with gastric epithelial cell turnover and premalignant gastric lesions. Gut, 51, 480-484.

Weiss, J., Mecca, J., Da Silva, E., Gassner, D. (1994). Comparison of PCR and Other Diagnostic Techniques for Detection of *Helicobacter pylori* Infection in Dyspeptic Patients. Journal of Clinical Microbiology, 32(7),1663-1668.

Zambon, C-F., Navaglia F., Basso D., Rugge., & Plebani, M. (2003). *Helicobacter pylori* *babA2*, *cagA*, and *sl VacA* genes work synergistically in causing intestinal Metaplasia. Journal Clinical Pathology, 56, 287-291.

Zsikia, V. Hailemariam, S., Bauman, M., Mund, M., Schaub, N., Meier, R. & Cathomas, G. (2006). Increased rate of *Helicobacter pylori* infection detected by PCR in biopsies with chronic Gastritis. American Journal of Surgical Pathology, 30(2), 242-248.

RESUMEN

Distintos factores de virulencia de *Helicobacter pylori* han sido asociados con la presencia de diferentes patologías gástricas, uno de estos factores es la adhesina BabA (The Blood-group antigen-binding adhesin) que interviene en la adherencia de esta bacteria sobre el epitelio gástrico y esta adhesina es codificada por el gen *babA2*.

En este estudio se determinó la prevalencia del gen *babA2* de *Helicobacter pylori* en población ecuatoriana y se correlacionó su presencia con patologías gástricas como: gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal y cáncer gástrico.

Se encontró que la frecuencia del gen *babA2* de *Helicobacter pylori* en población ecuatoriana es baja (2,2 %), es decir, 3 de 184 pacientes. La presencia del gen *babA2* de *Helicobacter pylori* no estuvo asociada, ni relacionada con la presencia de gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal ni cáncer gástrico.

Comparando la frecuencia del gen *babA2*, con los resultados obtenidos en otras poblaciones de América latina, se encontró que en población chilena es similar. Sin embargo, la presencia de este gen en Colombia es mucho más elevado que en nuestro país. Además, no existe una asociación significativa de este gen con la presencia de patologías gástricas particulares en pacientes Ecuatorianos. Estos hallazgos demuestran que debe realizarse la genotipificación de *Helicobacter pylori* en cada área geográfica para establecer la verdadera influencia de esta bacteria en la patología gástrica de acuerdo a los individuos afectados.

ABSTRACT

Virulence factors of *Helicobacter pylori* have been associated with different gastric pathologies. One of these factors is BabA-the blood-group antigen-binding adhesion- which mediates the attachment of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells, BabA is encoded by *babA2* gene.

This research determined the prevalence of *H. pylori babA2* gene in Ecuadorian patients and correlated the positive genotype *babA2* patients with the presence of chronic atrophic gastritis, intestinal metaplasia, and gastric cancer as well.

The frequency of *H. pylori babA* gene was low. It was found in 2,2% of the patients, 3 from 184 patients. There was no relationship between the presence of *babA2* and chronic atrophic gastritis and intestinal metaplasia.

The prevalence of this gene was compared with results obtained in other populations of Latin America. The Ecuadorian *babA2* gene's frequency was similar to some results reported in Chilean population. However, the presence of this gene in Colombian subjects was higher than in Ecuadorian subjects. In addition, there was no significant association of this gene with the presence of particular gastric pathologies in Ecuadorian patients. To conclude, these outcomes demonstrated that *H. pylori* genotyping must be realized in each geographical area to establish the influence of this bacterium in the gastric pathology according to the affected individuals.

ANEXOS

Anexo A. Consentimiento Informado y formulario de información para los pacientes del Hospital Eugenio Espejo Quito y del Hospital Pedro Vicente Maldonado que participaron en el proyecto.

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Número:

--	--	--

ESTUDIO:

Detección del gen babA2 de Helicobacter pylori por medio de la técnica molecular PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en mucosa gástrica y su correlación con alteraciones histopatológicas en pacientes ecuatorianos.

Descripción

Usted ha sido invitado a participar en un estudio, que trata de determinar la relación entre la presencia de una bacteria llamada *Helicobacter pylori* que se encuentra en su estómago y le está causando molestias con diferentes enfermedades gastroduodenales como gastritis. Esta investigación es realizada por el Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador.

Si acepta participar en esta investigación, se le solicitará que se realice un examen para poder visualizar la superficie interna de su estómago. Este examen consiste en introducir por su boca un tubo flexible, que llegará a su estómago. Este tubo contiene una pequeña cámara que permitirá ver al médico gastroenterólogo su estómago. Durante este examen el médico tomará pequeñísimas muestras de su estómago (biopsias). Luego estas muestras serán analizadas por el médico-patólogo, para ver el estado de su estómago y encontrar a la bacteria. Además, se utilizará estas muestras para otros estudios de laboratorio.

En el caso que el médico encuentre la bacteria en su estómago, le indicará un tratamiento para eliminar a la bacteria, que consiste en medicamentos que Usted deberá tomar por el tiempo que le indique el médico. Este examen no presenta riesgos, es seguro. Puede causar náusea cuando se introduce el tubo. Sin embargo, el médico le administrará un medicamento para evitar estas molestias.

Su historia clínica y los datos de sus exámenes serán guardados por el médico investigador de manera confidencial. El médico le informará solo a Usted los resultados y le indicará el tratamiento apropiado.

Firma del consentimiento

Si ha leído este documento y ha decidido participar voluntariamente, por favor incluya su firma. Si tiene alguna pregunta o desea recibir más información sobre esta investigación, por favor comuníquese con el Dr. Oswaldo Rodríguez Mora (08-4971-491)

Su firma en este documento significa que ha decidido participar después de haber leído y discutido la información presentada en esta hoja de consentimiento.

Nombre del participante

Firma (o huella digital)

He discutido el contenido de esta hoja de consentimiento con el arriba firmante. Le he explicado todos los riesgos y beneficios del estudio.

Anexo B. Formulario de información de pacientes del Hospital Eugenio Espejo y del Hospital Pedro Vicente Maldonado que participaron en este estudio.

FORMULARIO PARA PACIENTES			
		Número:	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
		Fecha:	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
		(día)	(mes)
			(año)
DATOS DEL PACIENTE			
Nombre:	<input style="width: 200px;" type="text"/>	Apellidos:	<input style="width: 200px;" type="text"/>
Edad :	<input style="width: 50px;" type="text"/>	Sexo :	Masculino <input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/>
Nacionalidad :	Ecuatoriana <input type="checkbox"/>	Otra (especifique):	<input style="width: 150px;" type="text"/>
	Ciudad:	<input style="width: 150px;" type="text"/>	
	Provincia:	<input style="width: 150px;" type="text"/>	
Ha recibido algún tratamiento contra <i>H. pylori</i> :	No <input type="checkbox"/>	Si <input type="checkbox"/>	Observaciones: <input style="width: 150px;" type="text"/>
DATOS DE LA MUESTRA			
Tipo de Biopsia / Número:	N° Historia Clínica: <input style="width: 100px;" type="text"/>		
Antro	<input style="width: 40px;" type="text"/>		
Cuerpo	<input style="width: 40px;" type="text"/>		
Médico que realizó la endoscopia:	<input style="width: 350px;" type="text"/>		
Observaciones:	<input style="width: 600px;" type="text"/>		
DATOS DE PATOLOGÍA			
Negativo para <i>H. pylori</i>	<input type="checkbox"/>	Fecha:	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
Positivo para <i>H. pylori</i>	<input type="checkbox"/>	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>	de 3
Mucosa Normal	<input type="checkbox"/>		
Gastritis crónica:		Activa	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
Media	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>	Atrofia	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
Moderada	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>	Metaplasia Intestinal	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
Severa	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>	Displasia	<input style="width: 20px; height: 20px;" type="text"/>
Médico - Patólogo:	<input style="width: 550px;" type="text"/>		
Observaciones:	<input style="width: 600px;" type="text"/>		

Anexo C. Consentimiento Informado para los pacientes del Hospital VozAndes Quito que participaron en el proyecto.

**Universidad Central del Ecuador – Centro de Biomedicina
Pontificia Universidad Católica del Ecuador – Escuela de Bioanálisis
Hospital Vozandes Quito
Documento de Consentimiento Informado**

El investigador:

Señor (a): Después del examen que he realizado y de escuchar su información considero que usted tiene gastritis. Esta enfermedad puede deberse a varias causas. Una de las más frecuentes en pacientes como usted que acuden a este hospital es la presencia de una bacteria en su estómago. Esa bacteria se llama *Helicobacter pylori*. Para conocer lo que está causando su problema es necesario realizar un examen que nos permita mirar directamente su estómago. Durante este examen es necesario que el médico tome pequeñísimas muestras de su estómago (biopsias). Esas muestras serán estudiadas después en microscopio para conocer en que estado se encuentra su órgano y para buscar la bacteria.

Invitación:

Ya que es posible que usted tenga esta bacteria en su estómago, le invito a participar en un proyecto de investigación realizado por el Dr. Oswaldo Rodríguez, un médico investigador del Centro de Biomedicina de la Universidad Central del Ecuador, en colaboración con la Dra. Ivonne Orellana, médica gastroenteróloga del Hospital Vozandes Quito. El propósito de esta investigación es determinar mejores formas de diagnosticar esta bacteria en su estómago.

Qué se le solicita que usted haga?

Si es que usted decide participar voluntariamente, usted deberá autorizar que biopsias (muestras) de su estómago tomadas en el examen descrito arriba y sean sometidas a un proceso de diagnóstico especial que permita identificar el microbio que infecta a su estómago. Su participación en la investigación no implica gastar su tiempo más que el necesario para el examen diagnóstico habitual.

Riesgos:

El examen de su estómago puede causar náusea cuando se introduce el tubo y un pequeño dolor, pero el médico especialista le administrará un medicamento para disminuir estas molestias. No existe ningún otro riesgo durante este procedimiento.

Los exámenes especiales a realizar a sus muestras de estómago no implican riesgo alguno para usted.

Beneficios:

Es posible que esta investigación incremente las posibilidades de identificar a la bacteria en las pruebas especiales a realizarse en las biopsias de su estómago. Así, su participación en este estudio, podría ofrecerle mejores posibilidades de tener un diagnóstico de su problema de estómago.

Esta investigación podría ayudarnos a mejorar los métodos de diagnóstico de esta bacteria en el Hospital Vozandes y en el Ecuador.

Costos:

Usted solamente paga por la endoscopia e histopatología recomendada por los médicos.

Los exámenes especiales a realizarse para ver si tiene la bacteria en su estómago, no tienen costo alguno para usted.

Confidencialidad:

Su nombre no constará en ninguno de los documentos. Un número de código será usado para proteger su identidad. Los datos obtenidos de esta investigación serán mantenidos en la oficina del investigador bajo llave.

Voluntario:

Su participación es absolutamente voluntaria.

Información de contacto:

Si usted piensa que no recibe buena atención de los médicos o que no se le da toda la información que usted espera, puede llamar al Director de esta investigación, Dr. Oswaldo Rodríguez Mora (08-497-1491) o al Médico Gastroenterólogo responsable del Hospital Vozandes Quito, Dra. Ivonne Orellana (09-505-0533)

Paciente:

Yo _____ he leído (escuchado) con atención los exámenes que se realizarán en mi estómago para conocer que está causando mis molestias. Durante el examen de mi estómago tomarán muy pequeñas muestras para estudiar los daños y para buscar el microbio que podría estar causándome estas molestias. En esas muestras, se realizarán pruebas especiales para mejorar el método de diagnóstico de esta bacteria.

Si la bacteria esta presente se me indicará un tratamiento para combatirla. Si hubiere otra causa para mis molestias seré referido a los especialistas para que continúen los exámenes y se indiquen los tratamientos necesarios.

Yo autorizo libremente que se realicen los procedimientos indicados. También me siento libre de seguir o no las indicaciones o tratamientos que se establezcan. Su firma (huella) abajo indica que usted ha leído y entendido toda la información arriba explicada.

Firma (o huella digital)

Fecha: _____

Testigo (firma)

Fecha: _____

Teléfono del paciente: _____

Dirección del paciente: _____

Anexo D. Formulario de información para pacientes del Hospital VozAndes Quito.

FORMULARIO PARA PACIENTES	
Número:	<input style="width: 20px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>
Fecha:	<input style="width: 20px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>
	(día) (mes) (año)
DATOS DEL PACIENTE	
Nombre:	<input style="width: 200px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>
Apellidos:	<input style="width: 200px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>
Edad :	<input style="width: 40px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>
Sexo :	Masculino <input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/>
Dirección:	<input style="width: 350px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>
Teléfono:	<input style="width: 100px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>
Nacionalidad :	Ecuatoriana <input type="checkbox"/> Otra (especifique): <input style="width: 150px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>
Ciudad:	<input style="width: 150px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>
Provincia:	<input style="width: 150px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>
Ha recibido algún tratamiento contra <i>H. pylori</i> :	No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/>
Observaciones:	<input style="width: 150px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/>
DATOS DE LA MUESTRA	
Tipo de Biopsia / Número:	Nº Historia Clínica: <input style="width: 100px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>
Antro <input type="checkbox"/>	
Cuerpo <input type="checkbox"/>	
Médico que realizó la endoscopia:	<input style="width: 350px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>
Observaciones:	<input style="width: 350px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/>
DATOS DE PATOLOGÍA	
Negativo para <i>H. pylori</i> <input type="checkbox"/>	Fecha: <input style="width: 20px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/> <input style="width: 20px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>
Positivo para <i>H. pylori</i> <input type="checkbox"/>	(día) (mes) (año)
Gastritis crónica:	Activa <input type="checkbox"/>
Media <input type="checkbox"/>	Atrofia <input type="checkbox"/>
Moderada <input type="checkbox"/>	Metaplasia Intestinal <input type="checkbox"/>
Severa <input type="checkbox"/>	Displasia <input type="checkbox"/>
Médico - Patólogo:	<input style="width: 350px; height: 15px; border: 1px solid black;" type="text"/>
Observaciones:	<input style="width: 350px; height: 20px; border: 1px solid black;" type="text"/>

Anexo E. Cuantificación de ADN de los 184 pacientes que participaron en este estudio.

Código del Paciente	Absorbancia 260 nm (A₂₆₀)	Absorbancia 280 nm (A₂₈₀)	A₂₆₀ / A₂₈₀	Concentración ADN (ug/ml)
1	0.0120	0.0080	1.5	312.5
2	0.0029	0.0024	1.2	64.3
3	0.0020	0.0010	2.0	60.1
4	0.0034	0.0022	1.5	90.2
5	0.0022	0.0015	1.5	56.5
6	0.0031	0.0022	1.4	77.5
7	0.0028	0.0022	1.3	64.9
8	0.0025	0.0015	1.7	69.1
9	0.0046	0.0037	1.2	104.6
10	0.0036	0.0032	1.1	74.5
11	0.0029	0.0024	1.2	64.3
12	0.0079	0.0053	1.5	204.9
13	0.0048	0.0029	1.7	132.2
14	0.0068	0.0037	1.8	197.1
15	0.0015	0.0011	1.4	36.7
16	0.0047	0.0033	1.4	118.4
17	0.0027	0.0015	1.8	77.5
18	0.0015	0.0007	2.1	46.3
19	0.0011	0.0006	1.8	31.9
20	0.0014	0.0007	2.0	42.1
21	0.0021	0.0016	1.3	49.9
22	0.0042	0.0023	1.8	121.4
23	0.0041	0.0023	1.8	117.2
24	0.0069	0.0043	1.6	186.9
25	0.0023	0.0013	1.8	65.5
26	0.0051	0.0026	2.0	152.1
27	0.0071	0.0049	1.4	180.9
28	0.0028	0.0015	1.9	81.7
29	0.0043	0.0030	1.4	108.8
30	0.0077	0.0050	1.5	203.7
31	0.0050	0.0046	1.1	99.8
32	0.0015	0.0008	1.9	43.9
33	0.0040	0.0025	1.6	108.2
34	0.0010	0.0006	1.7	27.6
35	0.0054	0.0028	1.9	159.9
36	0.0024	0.0016	1.5	62.5
37	0.0021	0.0015	1.4	52.3
38	0.0013	0.0005	2.6	42.7
39	0.0120	0.0085	1.4	300.5
40	0.0071	0.0050	1.4	178.5
41	0.0193	0.0140	1.4	475.4
42	0.0060	0.0042	1.4	151.5
43	0.0033	0.0018	1.8	95.6
44	0.0052	0.0038	1.4	127.4
45	0.0103	0.0067	1.5	272.3
46	0.0100	0.0049	2.0	302.9

47	0.0071	0.0036	2.0	212.2
48	0.0034	0.0015	2.3	107.0
49	0.0110	0.0086	1.3	256.0
50	0.0218	0.0160	1.4	532.5
51	0.0097	0.0072	1.3	235.0
52	0.0106	0.0069	1.5	280.1
53	0.0060	0.0037	1.6	163.5
54	0.0092	0.0055	1.7	254.8
55	0.0050	0.0027	1.9	145.4
56	0.0069	0.0052	1.3	165.3
57	0.0069	0.0038	1.8	198.9
58	0.0081	0.0053	1.5	213.4
59	0.0075	0.0046	1.6	204.9
60	0.0097	0.0053	1.8	280.7
61	0.0106	0.0072	1.5	272.9
62	0.0088	0.0059	1.5	228.4
63	0.0084	0.0053	1.6	226.0
64	0.0122	0.0088	1.4	301.7
65	0.0087	0.0057	1.5	229.0
66	0.0080	0.0050	1.6	216.4
67	0.0064	0.0039	1.6	175.5
68	0.0056	0.0030	1.9	163.5
69	0.0066	0.0037	1.8	188.7
70	0.0063	0.0038	1.7	173.7
71	0.0118	0.0083	1.4	296.9
72	0.0044	0.0019	2.3	139.4
73	0.0059	0.0032	1.8	171.3
74	0.0065	0.0037	1.8	184.5
75	0.0058	0.0031	1.9	169.5
76	0.0048	0.0021	2.3	151.5
77	0.0069	0.0038	1.8	198.9
78	0.0042	0.0023	1.8	121.4
79	0.0034	0.0013	2.6	111.8
80	0.0050	0.0021	2.4	159.9
81	0.0057	0.0032	1.8	162.9
82	0.0041	0.0024	1.7	114.8
83	0.0044	0.0024	1.8	127.4
84	0.0042	0.0019	2.2	131.0
85	0.0078	0.0059	1.3	186.3
86	0.0058	0.0048	1.2	128.6
87	0.0082	0.0067	1.2	183.9
88	0.0058	0.0047	1.2	131.0
89	0.0066	0.0055	1.2	145.4
90	0.0074	0.0057	1.3	174.3
91	0.0056	0.0044	1.3	129.8
92	0.0092	0.0064	1.4	233.2
93	0.0054	0.0042	1.3	126.2
94	0.0079	0.0056	1.4	197.7
95	0.0097	0.0071	1.4	237.4
96	0.0062	0.0046	1.3	150.3
97	0.0053	0.0042	1.3	122.0

98	0.0061	0.0047	1.3	143.6
99	0.0048	0.0025	1.9	141.8
100	0.0070	0.0045	1.6	186.3
101	0.0045	0.0024	1.9	131.6
102	0.0066	0.0043	1.5	174.3
103	0.0073	0.0052	1.4	182.1
104	0.0041	0.0021	2.0	122.0
105	0.0042	0.0021	2.0	126.2
106	0.0037	0.0019	1.9	110.0
107	0.0041	0.0022	1.9	119.6
108	0.0083	0.0060	1.4	204.9
109	0.0048	0.0025	1.9	141.8
110	0.0039	0.0018	2.2	120.8
111	0.0047	0.0027	1.7	132.8
112	0.0058	0.0032	1.8	167.1
113	0.0056	0.0029	1.9	165.9
114	0.0038	0.0018	2.1	116.6
115	0.0047	0.0026	1.8	135.2
116	0.0026	0.0023	1.1	54.1
117	0.0014	0.0009	1.6	37.3
118	0.0035	0.0031	1.1	72.7
119	0.0048	0.0034	1.4	120.2
120	0.0047	0.0039	1.2	104.0
121	0.0114	0.0095	1.2	251.2
122	0.0089	0.0069	1.3	208.5
123	0.0093	0.0081	1.1	196.5
124	0.0109	0.0064	1.7	304.7
125	0.0075	0.0039	1.9	221.8
126	0.0092	0.0052	1.8	262.0
127	0.0056	0.0027	2.1	170.7
128	0.0054	0.0029	1.9	157.5
129	0.0151	0.0110	1.4	370.8
130	0.0151	0.0096	1.6	404.5
131	0.0083	0.0052	1.6	224.2
132	0.0042	0.0021	2.0	126.2
133	0.0046	0.0023	2.0	138.2
134	0.0072	0.0037	1.9	214.0
135	0.0039	0.0019	2.1	118.4
136	0.0202	0.0121	1.7	558.9
137	0.0046	0.0022	2.1	140.6
138	0.0047	0.0023	2.0	142.4
139	0.0081	0.0054	1.5	211.0
140	0.0046	0.0026	1.8	131.0
141	0.0074	0.0040	1.9	215.2
142	0.0108	0.0064	1.7	300.5
143	0.0073	0.0048	1.5	191.7
144	0.0074	0.0050	1.5	191.1
145	0.0072	0.0046	1.6	192.3
146	0.0124	0.0073	1.7	346.2
147	0.0061	0.0035	1.7	172.5
148	0.0053	0.0030	1.8	150.9

149	0.0223	0.0129	1.7	628.0
150	0.0132	0.0073	1.8	379.8
151	0.0043	0.0028	1.5	113.6
152	0.0112	0.0068	1.6	307.7
153	0.0036	0.0013	2.8	120.2
154	0.0063	0.0032	2.0	188.1
155	0.0070	0.0066	1.1	135.8
156	0.0027	0.0024	1.1	55.9
157	0.0033	0.0023	1.4	83.5
158	0.0105	0.0060	1.8	297.5
159	0.0034	0.0023	1.5	87.7
160	0.0030	0.0020	1.5	78.1
161	0.0080	0.0051	1.6	214.0
162	0.0075	0.0048	1.6	200.1
163	0.0046	0.0038	1.2	102.2
164	0.0044	0.0032	1.4	108.2
165	0.0034	0.0023	1.5	87.7
166	0.0024	0.0018	1.3	57.7
167	0.0025	0.0023	1.1	49.9
168	0.0090	0.0058	1.6	239.2
169	0.0082	0.0056	1.5	210.4
170	0.0092	0.0063	1.5	235.6
171	0.0057	0.0043	1.3	136.4
172	0.0063	0.0037	1.7	176.1
173	0.0013	0.0008	1.6	35.5
174	0.0041	0.0023	1.8	117.2
175	0.0048	0.0031	1.5	127.4
176	0.0065	0.0036	1.8	186.9
177	0.0078	0.0065	1.2	171.9
178	0.0043	0.0030	1.4	108.8
179	0.0056	0.0040	1.4	139.4
180	0.0036	0.0024	1.5	93.8
181	0.0109	0.0087	1.3	249.4
182	0.0031	0.0021	1.5	79.9
183	0.0042	0.0024	1.8	119.0
184	0.0069	0.0046	1.5	179.7
Cepa Control	0.0043	0.0025	1.7	120.8

Anexo F. Histopatología del paciente 108 positivo para el gen *babA2* de *H. pylori* del Hospital Eugenio Espejo.

MINISTERIO DE SALUD PUBLICA
HOSPITAL EUGENIO ESPEJO

INFORME DE HISTOPATOLOGIA

NOMBRES: PULLAS TAPIA JORGE **INFORME N°** Q-07-2936

H. CLINICA: 546823

SERVICIO: CONSULTA EXTERNA

Cama:

Edad:

Sexo: (M)

Información Clínica: Esofagitis

MUESTRA: Antro-Cuerpo (Esófago)

Médico que solicita: Dr. Tulcanazo

Recibido: 14/06/2007 **Contestado:** 11/06/2007

MACROSCOPICO.-

1.- "Antro y Cuerpo".- Se recibe 4 fragmentos irregulares de tejido blando blanquecino amarillento de entre 0.2 a 0.4 cm.

STP

2.- "Esófago".- Se recibe 4 fragmentos irregulares de tejido blando blanquecino amarillento de entre 0.2 a 0.4 cm.

MICROSCOPICO.-

1.- Los cortes muestran mucosa astral y corporal que presenta disminución de grupos glandulares, infiltrado linfoplasmocitario con polimorfonucleares congestivos y edema.

Un fragmento corresponde a mucosa duodenal con disperso infiltrado linfoplasmocitario.

2.- Los cortes muestran mucosa esofágica cuyo epitelio plano estratificado presenta acantosis, papilomatosis moderada, congestión vascular, edema a nivel de la lámina propia glándulas mucosas.

Helicobacter pylori: negativo.

DIAGNOSTICO.-

1.- Biopsia Endoscópica de Estómago:

GASTRITIS CRONICA ACTIVA ATROFICA MULTIFOCAL

Helicobacter pylori: Negativo

2.- Biopsia Esófago:

ESOFAGITIS CRONICA ACANTOSICA MODERADA

G.I

Favor: enviar datos mínimos de HCL. como edad del paciente.

ATENTAMENTE

Dra. Mónica Pérez
JEFE DE PATOLOGIA

HOSPITAL VOZANDES QUITO



“A la gloria de Dios y al servicio del Ecuador”

Villalengua Oe2-37 * Casilla 17-17-691 * Teléfono: 2262-142 * Fax: 2269-234

Quito- Ecuador

hv_pt_his_informe

ESTUDIO HISTOPATOLOGICO

Página 1 de 1

No. V07B2951
Fecha: 30/07/2007

SOLICITADO POR: Dr (a) ORELLANA NARVAEZ IVONNE DE LA CRUZ 2467531

PACIENTE: ASTUDILLO MENDOZA ZOILA BEATRIZ

HISTORIA CLÍNICA 34275201 8 **HABITACION:** **ATENCION:** CIRUGIA AMBULATORIA

EDAD: 43 Años **SEXO:** FEMENINO **FECHA DE TOMA:** 26/07/2007

ORIGEN DE LA MUESTRA:

BIOPSIA DE ESTOMAGO

INFORME ANATOMOPATOLOGICO

MACROSCOPICO

Se reciben tres fragmentos, irregulares, que miden entre 0.2 y 0.3 cm., blanquecinos y elásticos.

MICROSCOPICO

Fragmentos de mucosa gástrica con notable edema, congestión e inflamación aguda activa y crónica inespecífica que afecta en lámina propia, atrofia moderada, no se identifica metaplasma, hiperplasia foveolar, atipia del grupo II. Positivo para *Helicobacter pylori*.

DIAGNOSTICO ANATOMOPATOLOGICO

GASTRITIS CRONICA ANTRAL ATROFICA MODERADA

NO METAPLASIA

HIPERPLASIA FOVEOLAR

ATIPIA DEL GRUPO II

POSITIVO PARA HELICOBACTER PYLORI (+++).

Atentamente,

Dr(a). PONTON VILLALBA MONICA PATRICIA
Anatomía Patológica

Fecha: 17/12/2007
VEPADILL

Anexo H. Histopatología del paciente 153 positivo para el gen *babA2* de *H. pylori* del Hospital Voz Andes Quito

HOSPITAL VOZANDES QUITO



“A la gloria de Dios y al servicio del Ecuador”

Villalengua Oe2-37 * Casilla 17-17-691 * Teléfono: 2262-142 * Fax: 2269-234

Quito- Ecuador

hv_pt_his_informe

ESTUDIO HISTOPATOLOGICO

Página 1 de 1

No. V07B3258

Fecha: 17/08/2007

SOLICITADO POR: Dr(a) ORELLANA NARVAEZ IVONNE DE LA CRUZ

2467531

PACIENTE: GUACHAMIN MOSQUERA JULIO CESAR

HISTORIA CLÍNICA 10549901 13 HABITACION: ATENCION: CIRUGIA AMBULATORIA

EDAD: 63 Años SEXO: MASCULINO FECHA DE TOMA: 13/08/2007

ORIGEN DE LA MUESTRA:

BIOPSIA DE ESTOMAGO

INFORME ANATOMOPATOLOGICO

MACROSCOPICO

Se reciben tres fragmentos, irregulares, que miden entre 0.2 y 0.3 cm., blanquecinos y elásticos.

MICROSCOPICO

Los cortes muestran mucosa de tipo pilórico con actividad regenerativa foveolar y metaplasia intestinal completa focal. La lámina propia contiene moderado infiltrado linfomononuclear, folículos linfoides y neutrófilos (++) . Hay bacilos compatibles con *Helicobacter pylori* (++) .

DIAGNOSTICO ANATOMOPATOLOGICO

BIOPSIA GASTRICA:

- GASTRITIS CRONICA MODERADAMENTE ACTIVA EN MUCOSA DE TIPO PILORICO.
- METAPLASIA INTESTINAL COMPLETA.
- POSITIVO PARA HELICOBACTER PYLORI.

Atentamente,

Dr(a). MANCERO BUCHELI JOSE OLMEDO
Anatomía Patológica

Fecha: 17/12/2007
VEPADILL

