

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**PREVALENCIA DE LOS GENOTIPOS DE VIRULENCIA DE *Helicobacter pylori* *cagA*, *vacA*, *babA2* e *iceA* EN PACIENTES COLOMBIANOS CON DISPEPSIA FUNCIONAL**

**AZUCENA AREVALO GALVIS**

**TRABAJO DE GRADO**

**Presentado como requisito parcial para otorgar el título de:**

**Magister en Ciencias Biológicas**

**BOGOTA D.C., 2010**

### **NOTA DE ADVERTENCIA**

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velara por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de julio de 1946.

**PREVALENCIA DE LOS GENOTIPOS DE VIRULENCIA DE *Helicobacter pylori* *cagA*, *vacA*, *babA2* e *iceA* EN PACIENTES COLOMBIANOS CON DISPEPSIA FUNCIONAL**

**AZUCENA ARÉVALO GALVIS**

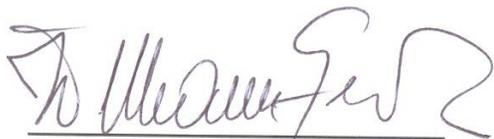
**APROBADO**



**Alba Trespalacios. MSc Cand. PhD**  
**Director**



**Marcela Mercado MEpd,**  
**Codirector**



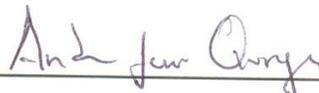
**William Otero M.D**  
**Gastroenterólogo**  
**Asesor**



**Hugo Diez MSc, Ph.D**  
**Jurado1**



**Mauricio Corredor, Ph.D**  
**Jurado 2**



**Andrés Quiroga MSc**  
**Jurado 3**

## INDICE GENERAL

<b>Capitulo 1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>Capitulo 2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	4
<b>Capitulo 3. MARCO TEÓRICO</b>	
3.1 Microbiología de <i>Helicobacter pylori</i>	5
3.1.1 Características Generales del Genoma	6
3.2 Factores de Virulencia	10
3.2.1 Adhesinas y Proteínas de Membrana Externa	12
3.2.2 Citotoxina Asociada al Gen A ( <i>cagA</i> )	19
3.2.3 Citotoxina vacuolizante Vac A	25
3.2.4 Gen Inducido por Contacto con el Epitelio <i>iceA</i>	32
3.3 Patogénesis	36
3.3.1 Respuesta Inmune del Huésped a <i>H.pylori</i>	36
3.3.2 Consecuencias Clínicas de la Infección	39
3.4 Relación entre los Genotipos de Virulencia de <i>H.pylori</i> con la patología	44
3.5 Epidemiología	51
3.6 Diagnóstico	54

3.6.1	Urea en Aliento (UTB)	54
3.6.2	Pruebas serológicas	54
3.6.3	Antígenos en materia fecal	55
3.6.4	Identificación de <i>H.pylori</i> en el laboratorio	56
3.7	Tratamiento	59
<b>Capitulo 4. OBJETIVOS</b>		51
<b>Capitulo 5. METODOLOGIA</b>		62
5.1	Diseño del Estudio	62
5.2.1	Población y Muestra	62
5.2.2	Población de estudio	62
5.2.3	Descriptores de la población de estudio	63
5.2.4	Criterios de inclusión Y exclusión	63
5.2.5	Muestra	64
5.2.6	Definición de variables	64
5.3	Recolección de información, procesamiento de datos y análisis estadístico	65
5.4	Procedimiento	65
5.3.1	Obtención de muestras	65
5.3.2	Transporte de las muestras	65
5.3.3	Procedimiento microbiológico	66
5.3.4	Procedimiento molecular	67
5.3.5	Verificación de la Erradicación en los pacientes que recibieron tratamiento	72

<b>Capítulo 6. RESULTADOS</b>	73
6.1 Medio de cultivo líquido para el crecimiento de <i>H.pylori</i>	73
6.2 Descriptores generales de la Población	73
6.3 Concordancia de las pruebas diagnosticas	78
6.4 Distribución de genotipos de virulencia de <i>H.pylori</i>	78
6.4.1 Presencia del gen <i>cagA</i>	79
6.4.2 Presencia del gen <i>vacA</i>	80
6.4.3 Presencia del gen <i>babA</i>	82
6.4.4 Presencia del gen <i>iceA</i>	83
6.4.5 Relación de los Genes <i>cagA</i> , y <i>vacA</i> en los aislamientos obtenidos	85
6.4.6 Relación de los Genes <i>cagA</i> , y <i>babA2</i> , y entre <i>cagA</i> e <i>iceA</i> en los aislamientos obtenidos	86
6.4.7 Relación de los Genes <i>vacA</i> y <i>babA2</i> , y entre <i>vacA</i> e <i>iceA</i> en los aislamientos obtenidos	86
6.4.8 Relación de los Genes <i>cagA</i> , <i>vacA</i> , <i>babA2</i> e <i>iceA</i> en los aislamientos obtenidos	87
6.4.9 Distribución del genotipo completo de acuerdo a las características de la población (Genero, edad, erradicación del microorganismo)	89
<b>Capítulo 7 DISCUSIÓN</b>	96
<b>Capítulo 8 CONCLUSIONES</b>	105

<b>Capitulo 9 RECOMENDACIONES</b>	107
<b><i>Glosario</i></b>	109
<b>Bibliografía</b>	113
<b>Anexos</b>	126

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Función de la urea	11
<b>Figura 2.</b>	Regulación transcripcional de <i>babA2</i>	14
<b>Figura 3.</b>	Formación de la quimera de <i>babA/B</i>	15
<b>Figura 4.</b>	Formación de la quimera de <i>babB/A</i>	16
<b>Figura 5.</b>	Formación del antígeno Lewis	17
<b>Figura 6.</b>	Isla de patogenicidad de <i>H.pylori</i>	19
<b>Figura 7.</b>	Sistema de secreción tipo IV (SST4)	20
<b>Figura 8.</b>	Mecanismo de acción de <i>cagA</i>	23
<b>Figura 9.</b>	Estructura del gen <i>vaca</i> y su diversidad alélica	27
<b>Figura 10.</b>	Proteína VacA	28
<b>Figura 11.</b>	Modo de acción de VacA	30
<b>Figura 12.</b>	Representación de la organización genómica de <i>iceA1</i>	33
<b>Figura 13.</b>	Representación de la organización genómica de <i>iceA2</i>	34
<b>Figura 14.</b>	Fenotipos de gastritis	40
<b>Figura 15.</b>	Electroforesis de la amplificación del gen <i>cagA</i>	79
<b>Figura 16.1</b>	Electroforesis de la a mplificación del gen <i>vacAs1-s2</i>	81
<b>Figura 16.2</b>	Electroforesis de la amplificación del gen <i>vacAs1a</i>	81
<b>Figura 16.3</b>	Electroforesis de la amplificación del gen <i>vacAs1b, vacAs1c</i>	81
<b>Figura 16.4</b>	Electroforesis de la amplificación del gen <i>vacAm1</i>	82
<b>Figura 16.5</b>	Electroforesis de la amplificación del gen <i>vacAm2</i>	82

<b>Figura 17.</b> Electroforesis de la amplificación del gen <i>babA2</i>	83
<b>Figura 18.</b> Electroforesis de la amplificación del gen <i>iceA1</i>	84
<b>Figura 19.</b> Electroforesis de la amplificación del gen <i>ice2</i>	84

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Definición de variables por escala y unidad de medición.	64
<b>Tabla 2.</b> Primers usados y condiciones de la PCR	69
<b>Tabla 3.</b> Distribución de los sujetos de acuerdo con la procedencia	74
<b>Tabla 4.</b> Distribución del nivel socioeconómico de los sujetos	74
<b>Tabla 5.</b> Distribución de la escolaridad de los sujetos	75
<b>Tabla 6.</b> Distribución de la escolaridad de los sujetos	75
<b>Tabla 7:</b> Distribución de los antecedentes familiares de enfermedad gastroduodenal	76
<b>Tabla 8:</b> Distribución de los antecedentes familiares de cáncer gástrico y linfoma tipo MALT	76
<b>Tabla 9:</b> Distribución de los sujetos de acuerdo al motivo de consulta	77
<b>Tabla 10:</b> Concordancia de las pruebas utilizadas en el diagnóstico de <i>H.pylori</i>	78
<b>Tabla 11:</b> Presencia del genotipo <i>cagA</i> en aislamientos obtenidos de biopsias gástricas de antro y cuerpo	79
<b>Tabla 12:</b> Combinaciones de los alelos del gen <i>vacA</i> en aislamientos obtenidos de biopsias gástricas de antro y cuerpo	80
<b>Tabla 13:</b> Presencia del genotipo <i>babA2</i> en aislamientos obtenidos de biopsias gástricas de antro y cuerpo	83
<b>Tabla 14:</b> Distribución del genotipo <i>iceA</i> en aislamientos obtenidos de biopsias gástricas de antro y cuerpo	84

<b>Tabla 15:</b> Relación entre los genes <i>cagA</i> , <i>vacA</i> , <i>babA2</i> e <i>iceA</i>	88
<b>Tabla 16:</b> Distribución del genotipo completo de acuerdo al género	89
<b>Tabla 17:</b> Distribución del genotipo completo de acuerdo a las diferentes edades	91
<b>Tabla 18:</b> Distribución del genotipo completo de <i>Hpylori</i> en pacientes con falla terapéutica	95

## Índice de Cuadros

<b>Cuadro 1a.</b> Procedimiento microbiológico	70
<b>Cuadro 1b.</b> Procedimiento molecular	71
<b>Cuadro 2.</b> Relación entre los genotipos <i>cagA</i> y <i>vacA</i>	85
<b>Cuadro 3.</b> Relación entre los genotipos <i>cagA</i> y <i>babA2</i> y entre <i>cagA</i> e <i>iceA</i>	86
<b>Cuadro 4.</b> Relación entre los genotipos <i>vacA</i> y <i>babA2</i> y entre <i>vacA</i> e <i>iceA</i>	87
<b>Cuadro No 5:</b> Relación entre el genotipo completo y antecedentes familiares de cáncer gástrico	92
<b>Cuadro No 6:</b> Frecuencia de los genes de virulencia <i>cagA</i> , <i>vacA</i> , <i>babA2</i> e <i>iceA</i> en los pacientes con falla terapéutica.	94

## Índice de Anexos

<b>Anexo A.</b> Consentimiento informado	125
<b>Anexo B.</b> Formato seguimiento pacientes	128
<b>Anexo C.</b> Preparación de agar wilkins chalgren modificado para <i>Helicobacter pylori</i>	133
<b>Anexo C.1.</b> Componentes Agar Wilkins – Chalgren (BBL)	134
<b>Anexo C.2.</b> Componentes Caldo Brucella (BBL)	134
<b>Anexo D.</b> Isovitalex (BD)	135
<b>Anexo E.</b> Suplemento selectivo para <i>H.pylori</i> (DENT) (OXOID)	136
<b>Anexo F.</b> Preparación de urea para prueba de ureasa	137
<b>Anexo G.</b> DNA zol®	138
<b>Anexo H.</b> Prueba de ELISA para detección de antígenos fecales (RIDASGREEN®)	139
<b>Artículos Publicados</b>	

## AGRADECIMIENTOS

- ✎ A Colciencias por patrocinar el proyecto dentro del cual se desarrollo este trabajo.
- ✎ A la Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá-Colombia por hacer parte de mi formación académica.
- ✎ A la Clínica Fundadores y los pacientes que aceptaron participar en este trabajo.
- ✎ A la Dra Alba Alicia Trespacios por su orientación, enseñanzas, aportes calidad humana y amistad.
- ✎ A la Dra Marcela Mercado por su ayuda, paciencia, calidez, risas y amistad.
- ✎ Al Dr. William Otero por compartir sus conocimientos, por sus consejos y por ser un ser humano especial.
- ✎ Al Dr Raúl Poutou por sus enseñanzas y amistad.
- ✎ A todos los integrantes del equipo de investigación en *H.pylori* que trabajan en el Laboratorio de Microbiología Especial.
- ✎ A amigos y compañeros que aportaron de una u otra forma para que se culminara este trabajo.
- ✎ Muy especialmente a DIOS y a MI FAMILIA.

*Con mi más grande amor y cariño dedico este trabajo y el esfuerzo  
que este demando a Dios quien siempre me dice al oído no temas  
yo te ayudo, quien guía mis manos y me ha regalado lo mejor de  
la vida.*

*A mi Padre, Hermana y con mucho amor a mi Mamá por apoyarme,  
guíarme y amarme.*

## RESUMEN

*Helicobacter pylori* es una bacteria Gram negativa agente causal de gastritis crónica, úlceras pépticas, duodenales, cáncer gástrico y linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT). Aunque no se sabe con exactitud porqué la infección produce diversos desenlaces clínicos, se considera que para la generación de los mismos participan características genéticas del huésped, factores medioambientales y factores de virulencia del microorganismo. Dentro de estos últimos, hay evidencia de que algunos de ellos están asociados con diversas patologías. El objetivo del presente trabajo fue determinar en pacientes con dispepsia funcional, la prevalencia de los diferentes factores de virulencia que se han asociado a patologías graves. Dentro de estos factores se eligieron los genotipos que se consideran más agresivos, tales como *cagA*, *vacA*, *babA2* e *iceA* y se determinaron mediante PCR alelo específica en 119 aislamientos de pacientes con dispepsia funcional. Adicionalmente se determinó el genotipo más frecuente en los aislamientos de pacientes con antecedentes familiares de cáncer gástrico, linfoma tipo MALT y en pacientes con falla terapéutica. Encontrándose una alta prevalencia de los genes *cagA+*, *vacAs1am1*, *babA2* e *iceA1* siendo la combinación más frecuente el genotipo *cagA+/vacAs1am1/babA2+/iceA1* tanto en aislamientos de pacientes con y sin antecedentes familiares de cáncer gástrico y linfoma MALT. Con respecto a los aislamientos provenientes de pacientes con falla terapéutica se observó que sus genotipos completos se caracterizaron por presentar los genes *cagA-*, *vacAs2*, *vacAm2*, y *babA2-*. Se concluye que a pesar de que la población estudiada son pacientes con dispepsia prevalece un genotipo muy virulento que ha sido asociado con el desarrollo de complicaciones gástricas. Se recomienda que se realicen estudios a largo plazo en pacientes similares a los nuestros para determinar si hacia el futuro la infección con este tipo de *Helicobacteres* agresivos implica riesgo para la aparición de enfermedades serias. La población objeto de estudio será

seguida por nuestro grupo de investigación y se comparará con pacientes que tengan tales enfermedades.

## ABSTRACT

*Helicobacter pylori* is a Gram negative bacteria, it's a major cause of chronic gastritis peptic ulcers, duodenal ulcers gastric cancer and mucosa associated lymphoma tissue (MALT lymphoma. Although the reason for such a clinically diverse outcome of infection remains uncertain, it may include genetic host characteristics, environmental factors and bacterial virulence factors. Between last conditions there is evidence that some of them are associated with different pathologies. The object of this study was to determine the prevalence of different virulence factors that has been associated with several pathologies in functional dyspeptic patients. Between these virulence factors there were choosing which according to literature are consider more aggressive, such as *cagA*, *vacA*, *babA2* and *iceA*, these genes were determine by allele specific PCR in 119 isolates of functional dyspeptic patients. In addition, there was resolving the most frequent genotype in isolates from patients with familiar history of gastric cancer, MATL lymphoma and patients with therapeutic failure. There was found that *cagA+*, *vacAs1am1*, *babA2* and *iceA1* genes were the most frequent, the prevalent combination in isolates from patient with and without familiar history of gastric cancer and MALT lymphoma was *cagA+/vacAs1am1/babA2+/iceA1*. With respect to isolates from patients with therapy failure the complete genotype was characteristic by it had one or two of these genes: *cagA-*, *vacAs2*, *vacAm2*, y *babA2-*. In conclusion, in dyspeptic patients the prevalent genotype was the most virulent, which has been associated with gastric complications. So for this reason is recommended to do future studies in patients with similar characteristics of this study to determine if infection with this type of aggressive *Helicobacters* is involved in risk of development several diseases. The subjects of this study will be following by our investigation group and it will be compare with patients that have several gastric diseases.

## INTRODUCCIÓN

*Helicobacter pylori* es una bacteria microaerofílica, Gram negativa, en forma de espiral o de “s”, con flagelos polares, capaz de colonizar la mucosa gástrica humana y causar gastritis crónica, úlceras gástricas, duodenales, cáncer gástrico y linfoma del tejido linfoide asociado a mucosa (MALT) (1). La infección por *H.pylori* ocurre en todo el mundo, pero su prevalencia varía con respecto al área geográfica, presentándose desde 20-50% en países industrializados, hasta un 80% en países subdesarrollados. El microorganismo se puede adquirir durante la infancia o en cualquier etapa de la vida por vía oral-oral u oral-fecal permaneciendo por largo tiempo y en ocasiones con ausencia de síntomas (2). El curso y la evolución clínica de la infección por *H.pylori* están determinados por una interacción compleja entre la influencia del ambiente, las características genéticas e inmunes del huésped y los factores de virulencia del microorganismo (3).

*H.pylori* cuenta con factores de permanencia (flagelos, enzimas, proteínas de shock térmico, adhesinas etc) que le permiten colonizar y mantenerse en el huésped y con factores de virulencia (citotóxicas, adhesinas), que contribuyen con los efectos patógenos del microorganismo, muchos de los factores del microorganismo funcionan como los dos, es decir son tanto factores de permanencia como de virulencia. Una vez la bacteria es adquirida se dirige hacia la mucosa gástrica haciendo uso de sus 4-6 flagelos y amortiguando el pH ácido del estómago a través de producción de ureasa, la cual hidroliza la urea en dióxido de carbono y amonio hasta que logra ubicarse a aproximadamente 25µm de la superficie epitelial donde el pH es más neutro. Una vez se encuentra en cercanía con las células epiteliales gástricas hace uso de varias de sus adhesinas para evitar ser retirada por las fuerzas de vaciado gástrico; la adhesina mejor caracterizada es BabA, una proteína de membrana externa de 78kD que se une a los antígenos del grupo sanguíneo glucosilados Lewis b.

Luego de adherida la bacteria, comienza el ensamblaje del sistema de secreción tipo IV (SST4) mediante el cual es posible la transferencia de DNA y la secreción de otro de sus factores de virulencia, la proteína CagA de 140 kDa, presente en el 50-70% de las cepas de *H.pylori*, por lo que las cepas que la poseen se han denominado *cagA+*. Esta proteína es codificada por el gen *cagA*, el cual junto con el SST4 se encuentra dentro del islote de patogenicidad *cag* (*cagPAI*) por lo que la presencia de *cagA* representa un marcador genómico de PAI. Una vez CagA es liberada dentro de la célula epitelial es tirosinfosforilada en varios y diferentes motivos EPIYA, los cuales son secuencias de cinco aminoácidos (Glu-Pro-Ile-Tyr-Alu) que están presentes en la región variable carboxi terminal de la proteína y cuya cantidad varía entre cepas dependiendo del área geográfica, transcurrida la tirosin fosforilación se desencadenan procesos de señalización intracelular que finalmente conducirán a cambios en la morfología celular e inducción de interleucinas proinflamatorias (4). Otro de los factores de virulencia de *H.pylori* es la citotoxina vacuolizante Vac A, de aproximadamente 95kDa. Todas las cepas del microorganismo llevan el gen funcional *vac A*, sin embargo su actividad vacuolizante es heterogénea debido a las diferentes formas en las que se puede expresar el gen *vac A*, el cual codifica para una secuencia señal que puede ser *s1a*, *s1b*, *s1c*, *s2* y una secuencia que puede ser *m1* o *m2*, las combinaciones de los alelos de la secuencia señal y la media son los que determinaran la capacidad vacuolizante de la toxina. Adicional a los factores ya mencionados, recientemente se ha descrito al gen *ice A*, el cual posee dos variantes alélicas *ice A1* e *ice A2* y está presente en todas las cepas de *H.pylori*, aunque su función no es clara se conoce que al ser inducido por contacto con el epitelio codifican para una proteína homologa a una endonucleasa de restricción tipo II. (5).

La importancia de estos factores de virulencia radica no solo en la capacidad que le confieren a la cepa infectante de causar daño, sino que además estudios han asociado su presencia con algunas formas de presentación de la enfermedad. (6, 7, 8, 9)

En Colombia el Instituto Nacional de Cancerología ha realizado varios estudios relacionados con la presencia de factores de virulencia del microorganismo y su asociación con la patología presentada, dentro de ellos los estudios de Citty, *et al* en 2002 demostraron que *cagA+*, *vacA+* podrían usarse como marcadores del incremento de virulencia de las cepas ya que estos factores se encontraron con mayor frecuencia en pacientes con gastritis crónica y úlcera péptica que en pacientes con gastritis no atrófica. Por otra parte se observó que *iceA* no se asocia con ninguna patología de la misma manera como lo demuestran los estudios de Quiroga *et al* en 2005, en donde se demostró que los genes *babA2* y *oipA* no sirven como marcadores de úlceras o cáncer en Colombia. A.M López, en 2009 en el Tolima estudió la prevalencia del gen *vacA*, encontrando que el alelo más frecuente es *vacA s1m1* (42%), concordando con los otros estudios realizados previamente en Colombia, sin embargo este estudio no encontró asociación con la aparición de patologías gástricas, a diferencia de los estudios realizados en el Instituto Nacional de Cancerología.

En razón al interés global por comprender la distribución de los genotipos de *H. pylori* se hace necesario seguir estudiando estos genes en Colombia no solo para conocer su frecuencia de distribución, sino para iniciar a proponer estrategias terapéuticas y de prevención de las enfermedades gastroduodenales producidas por este microorganismo. Por ello este estudio evaluará los genotipos de virulencia en aislamientos de *H. pylori* y las asociaciones de estos con la falla o fracaso terapéutico en un grupo de pacientes infectados con la bacteria y que cumplan con una serie de criterios de inclusión y exclusión muy estrictos, que permitan a futuro entender el comportamiento y la circulación de los diferentes genotipos en nuestro medio y aplicar este conocimiento en la prevención y manejo terapéutico de los pacientes.

## **2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

*H.pylori* es la principal causa de gastritis crónica, úlceras pépticas y duodenales, sin embargo los pacientes pueden desarrollar complicaciones como cáncer gástrico y linfoma MALT, cuyas variaciones clínicas han sido atribuidas a factores ambientales, del huésped y del microorganismo, ya que se ha asociado la severidad de estas con los genes de virulencia que presente la cepa infectante.

Los genes de virulencia de *H.pylori* representan marcadores moleculares epidemiológicos que pueden permitir reconocer entre las personas infectadas aquellas con mayor riesgo de desarrollar patologías gástricas más severas. Teniendo en cuenta que en Colombia hay una alta prevalencia (80%) del microorganismo, y que en nuestro país el cáncer gástrico es la primera causa de muerte por cáncer, (43,53) se hace importante estudiar en pacientes sin complicaciones gastroduodenales cuál es el genotipo de virulencia circulante para así poder evaluar cual podría ser el probable riesgo de desarrollar complicaciones gástricas, por lo que en este estudio se determinó la frecuencia de genotipos *cagA*, *vacA*, *babA2* e *iceA* en pacientes con dispepsia funcional, de tal manera que permitió conocer cuál es el genotipo de virulencia más frecuentemente encontrado en esta población.

### 3.1 Microbiología de *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* pertenece a la subdivisión de *Proteobacteria*, orden *Campylobacteriales*, de la familia *Helicobacter*. Esta familia también incluye al género *Wolinella*, *Flexispira*, *Sulfimicrospira*, *Thiomicrospira* y *Thiovulum*. En la actualidad se reconocen 20 especies. Son microorganismos microaerofílicos, en la mayoría de los casos son catalasa, oxidasa y ureasa positivos. (4,14)

Las especies de *Helicobacter* se pueden subdividir en dos linajes: Especies de *Helicobacter* gástricos y entero hepáticos; los cuales muestran un alto nivel de órgano-especificidad, puesto que los *Helicobacter* gástricos son incapaces de colonizar intestino e hígado y viceversa.

*H.pylori* es una bacteria Gram negativa que mide de 2-4 µm de largo y de 0.5 a 1 µm de ancho, aunque usualmente tiene forma espiral, también puede aparecer en forma bacilar o cocoide, tiene de 2-6 flagelos unipolares de aproximadamente 3 µm de largo, estos le confieren movilidad permitiéndole desplazarse rápidamente en soluciones viscosas. Su envoltura celular es similar a la de otras bacterias Gram negativas, consta de una membrana interna citoplasmática, periplasma, peptidoglicano y una membrana externa; esta última está constituida por fosfolípidos y por lipopolísacarido (LPS). El LPS usualmente está compuesto por lípido A, un core oligosacárido y una cadena de antígeno O; el lípido A de *H.pylori* tiene poca actividad biológica comparada con el de otras bacterias, por otra parte, el antígeno O puede ser fucosilado y mimetizarse con antígenos del grupo sanguíneo Lewis (Lewis x [Le<sup>x</sup>] y [Le<sup>y</sup>] ) y así evadir la respuesta inmune del huésped, ya que usualmente este antígeno es reconocido por la proteína D surfactante y al fucosilarse, no habría reconocimiento del mismo.

### 3.1.1 Características Generales del Genoma

El grupo de Tomb, *et al*, en 1997 realizaron la descripción de la cepa 26695 de *H.pylori* cuyo análisis se realizó comparándolo con sus homólogos taxonómicamente, teniendo como base las secuencias de rRNA 16S de *H.influenzae* y *E.coli*. Sin embargo, es importante resaltar que al realizar la secuenciación del genoma de *H.pylori* se encontraron secuencias que codifican para proteínas involucradas en varios procesos celulares que son altamente similares con microorganismos que no son Proteobacterias, sino Archeas e incluso Eucaryotes; lo cual podría significar la transferencia lateral de genes en la historia evolutiva del microorganismo, también podría indicar que *H.pylori* proviene de un linaje temprano de las Proteobacterias, motivo por el cual retiene formas "antiguas" de varias enzimas que con el tiempo microorganismos como *H.influenzae* y *E.coli* fueron reemplazando por otras.

El genoma de *H.pylori* está compuesto por un cromosoma circular de 1,667,867 pares de bases (pb) y un contenido de G+C de 39%, cinco regiones dentro del genoma tienen una composición significativamente diferente de G+C, dos de ellas contienen una o más copias de secuencias de inserción IS605 acompañadas por secuencias de RNA ribosomal 5S en los extremos y una repetición de 521 pb una cerca a la otra. Estas dos regiones también contienen genes involucrados en el procesamiento del DNA y una contiene dos genes ortólogos del gen *virB4/ptI* de *Agrobacterium*, el cual codifica para el sistema de secreción tipo IV. Otra región importante es la isla de patogenicidad (PAI) asociada a *cag* la cual parece ser el producto de la transferencia lateral de genes.

Se han identificado 36 especies de tRNA, los cuales están organizados dentro de 7 clusters más 12 genes solos; dos grupos de genes de rRNA 23S-5S y 16S, un gen "huérfano" 5S y un gen estructural de RNA. Asociado al cluster de rRNA

23S-5S Tomb y su grupo reportó la presencia de una repetición de 6-kilobases la cual contiene un operón de 5 marcos abiertos de lectura (ORF) que no coincide con las secuencias reportadas para otros microorganismos en las bases de datos. Dentro de las repeticiones reportadas en el cromosoma de *H.pylori* se han encontrado 8 familias de repeticiones las cuales varían en tamaño; los miembros correspondientes a la familia de repetición 7 se han encontrado en regiones intergénicas, mientras que las otras repeticiones se han asociado con secuencias codificantes que podrían representar duplicaciones de genes, adicionalmente las repeticiones 1,2,3 y 6 se han asociado con genes que codifican para proteínas externas de membrana (OMP).

El cromosoma del microorganismo también se ha reportado la presencia de dos secuencias de elementos de inserción diferentes uno previamente descrito IS605 y otro nuevo elemento designado IS606, del primero hay ocho copias parciales y del segundo solo dos, los dos elementos de inserción codifican para dos transposasas TnpA y TnpB.

Tomb, *et al*, en 1997 identificaron 1590 secuencias codificantes, cuyos genes tienen en promedio un tamaño de 945 pb, de los cuales a 1091 se le asignó un papel biológico. Además encontraron que más del 70% de las proteínas de *H.pylori* tienen un punto isoeléctrico de 7 en las que hay dos veces más frecuencias de aminoácidos básicos, arginina y lisina que en *H.influenza*, *E.coli* lo cual podría ser un reflejo de su adaptación al ambiente ácido. Se identificaron 95 familias de genes parálogos, cuyas funciones en su gran mayoría están involucradas con la envoltura celular, el transporte, proteínas de adhesión y proteínas involucradas en la replicación. *H.pylori* cuenta con mecanismos de replicación básicos similar a los de *E.coli* aunque carece de algunas de las proteínas involucradas en la formación del primosoma (DNA C, MinC, chaperonas secretorias SecB), lo que sugiere que podría haber pérdida de estas funciones o

que hay otras proteínas diferentes que realizarían las funciones de estas. El microorganismo cuenta con sistemas de recombinación y reparación del DNA mediante metil-transferasas, mutS y uvrD, pero no cuenta con el sistema de reparación SOS. Adicionalmente se identificaron once sistemas de restricción y modificación para la degradación del DNA foráneo, dentro de estos once sistemas hay tres tipo I, uno tipo II, tres tipo IIS y cuatro tipo III; estos sistemas son usados como defensa, son similares a endonucleasas, metil-transferasas y subunidades específicas. Recientemente se ha identificado una endonucleasa de respuesta a células epiteliales, iceA1.

La transcripción y la traducción al igual que la replicación es también muy similar a como ocurre en *E.coli* cuyas diferencias en estos dos procesos radica principalmente en: la ausencia de genes que codifican para la catálisis en la maduración del t-RNA, solo posee una ribonucleasa fosfato para degradar el mRNA en lugar de tres, no tiene gen que codifique para Asn-tRNA sintetasa en lugar de ello forma Asn-tRNA-Asn a partir de Asp-tRNA mediante una transamidación hasta el momento reportada en la archaea *Haloferox volcanii*. Adicionalmente los genes que codifican para las subunidades  $\beta$  y  $\beta'$  de la RNA polimerasa están fusionados y no separados como en otros procariontes lo que sugiere la presencia de un posible splicing.

*H.pylori* regula la expresión génica en respuesta a estímulos ambientales, tales como la disponibilidad de nutrientes, la densidad, el pH, el contacto con células dañadas, presencia de agentes que dañan el DNA, temperatura y osmolaridad. La respuesta de estos estímulos requiere que la bacteria cense cambios en el ambiente y que sea capaz de transmitir la información a vías regulatorias celulares, *H.pylori* consta con un sistema de dos componentes que consiste en una proteína-histidina-quinasa en la membrana y un regulador de respuesta de unión a ADN, en este microorganismo se han identificado cuatro proteínas censoras y siete proteínas reguladoras de respuesta.

A diferencia de otras bacterias *H.pylori* es genéticamente heterogéneo, esta heterogenicidad genética se debe principalmente a las secuencias repetitivas en el DNA las cuales median un control a nivel transcripcional ya que están presentes en regiones promotoras y que probablemente pueden estar involucradas en la adaptación a las condiciones ambientales en el hospedero (14). La heterogenicidad también se puede deber a que en pacientes infectados con más de una cepa se favorece el intercambio de fragmentos de DNA entre las diferentes cepas; los cambios en el genoma pueden ocurrir ya sea por inserciones o deleciones de secuencias, por variaciones o mutaciones en la fase trasducional o traduccional (4).

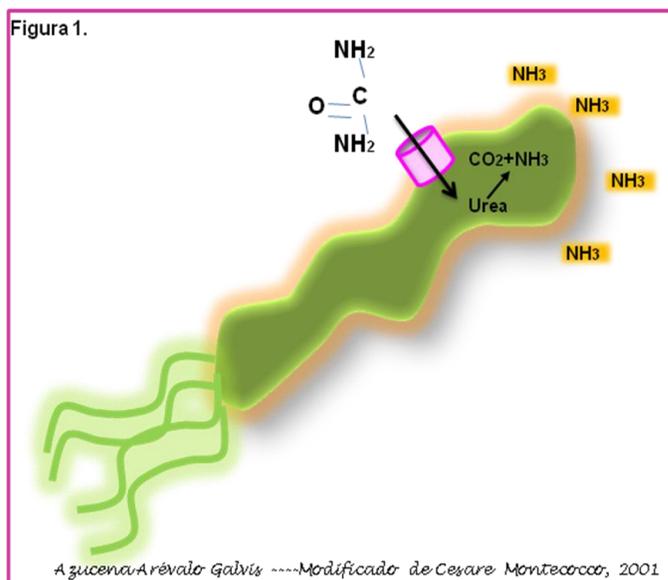
### 3.2 Factores de Virulencia

*H.pylori* es la principal causa de gastritis y el principal factor de riesgo para el desarrollo de adenocarcinoma gástrico y linfoma, sin embargo el desarrollo de la enfermedad está influenciado por varios aspectos, la susceptibilidad genética del huésped, el ambiente, y los factores de virulencia de la cepa infectante; de los cuales este último es uno de los más importantes (15). Los factores de virulencia son características presentes en los microorganismos que los hacen capaces de causar enfermedad (16). En *H.pylori* algunos de los factores de virulencia más importantes son la ureasa, el flagelo, la proteína CagA, la citotoxina VacA y otros recientemente descritos como la proteína BabA (17).

#### Tolerancia al pH ácido

Una vez *H.pylori* entra al ambiente gástrico por ingestión oral, el microorganismo es sujeto al extremo pH del lado luminal de la mucosa gástrica (pH~2), sin embargo, *H.pylori* tiene la habilidad de resistir este pH debido a que es capaz de establecer un potencial de membrana positivo y posteriormente modificar el microambiente mediante la producción de ureasa y la liberación de factores que inhiben la producción de ácido en las células parietales. El cambio en la polaridad de la membrana provee una barrera eléctrica que previene la entrada de protones (H<sup>+</sup>). El interior positivo de la célula es creado por la activa extrusión de aniones o por difusión del potencial de protones, este último es el mecanismo más aceptado aunque no es muy claro. La difusión del potencial de protones requiere que la permeabilidad de aniones en la membrana citoplasmática sea bajo y aunque se han identificado tres transportadores de aniones es necesario determinar si la

conductancia de estos está asociada con otras proteínas. También se ha sugerido que el transporte de protones puede estar mediado por ATPasas tipo P que podrían mediar la supervivencia en condiciones ácidas por extrusión de protones del citoplasma, esta idea no es soportada por los genes de los transportadores identificados ya que las secuencias de ATPasas tipo P del microorganismo se relacionan mas con transportadores de cationes divalentes que con ATPasas específicas por protones o cationes monovalentes. Adicionalmente, en respuesta al estrés generado por el pH ácido *H.pylori* puede inducir la expresión de algunos genes que codifican para ciertos factores de virulencia, proteínas externas de membrana y proteínas censoras y reguladoras de respuesta (14).



Por otra parte, el microorganismo tiene la habilidad de producir ureasa, una enzima compuesta por dos subunidades (UreA, UreB), codificadas por los genes *ureA*, *ureB* los cuales son esenciales para su producción junto con genes accesorios como *ureF*, *ureG* y *ureH* los cuales están involucrados en la incorporación

de  $Ni^{2+}$  al sitio activo de la enzima durante su ensamblaje. La ureasa es un dodecamero de seis subunidades UreA y seis UreB, dispuestas en doble anillo.

La enzima tiene como función hidrolizar la urea en amoníaco y gas carbónico, para ello *H.pylori* capta urea a través de un canal de protones que se abre a pH ácido y

se cierra a pH neutro; una vez la urea ha sido captada es hidrolizada de tal manera que se amortigua el pH tanto en el citosol, el periplasma y alrededor de la bacteria (18). (Figura1) El papel principal de la ureasa como factor de virulencia se evidencia debido a que cepas defectuosas en la producción de la enzima son incapaces de colonizar la mucosa gástrica, adicionalmente tiene la capacidad de causar daño sobre la mucosa gástrica ya sea directamente al activar monocitos y neutrófilos, o indirectamente a través de la producción de amonio el cual causa daño sobre la célula epitelial (15, 17).

### **3.2.1 Adhesinas y Proteínas de Membrana Externa**

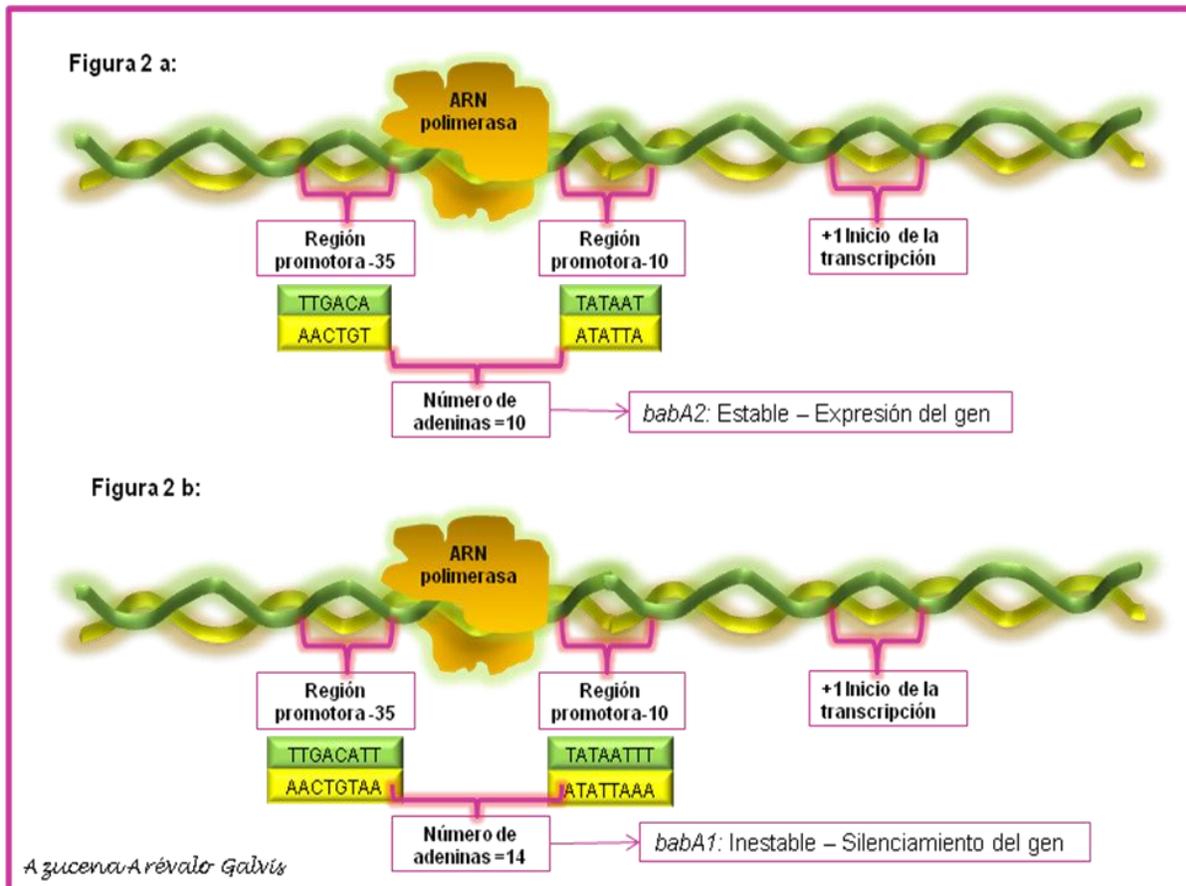
Muchos factores bacterianos median la adhesión de *H.pylori* al epitelio gástrico, sin embargo es difícil probar la contribución de cada adhesina. Aproximadamente el 4% del genoma de *H.pylori* codifica para un diverso repertorio de proteínas externas de membrana (OMPs), la mayoría de las cuales corresponden a 21 genes de la familia Hop (*Helicobacter* outer membrane protein) (4, 19). *H.pylori* usa al menos cinco adhesinas diferentes para unirse a las células del epitelio gástrico, dentro de las cuales se encuentran adhesinas de unión a antígenos fucosilados de grupo sanguíneo ABO (BabA), adhesinas de unión a ácido siálico (SabA), que reconocen antígenos de sialil-Lewis<sup>x</sup> y sialil-Lewis<sup>a</sup>, proteínas inflamatorias de membrana externa (OipA), y HopZ, lipoproteínas asociadas a adherencia (AlpA y AlpB) cuyos receptores al igual que para OipA y HopZ no se conocen con exactitud (19). Otra lipoproteína es HpA que fue previamente identificada como parte del gancho flagelar y de membrana externa, además de estas se identificaron otras 19 lipoproteínas de las que solo a unas pocas se les ha identificado su función. Dado el amplio número de genes que codifican para proteínas de superficie hay un gran potencial de eventos de recombinación que a la vez permiten la organización en mosaico, lo cual podría ser una de las bases de variación antigénica y un mecanismo efectivo para evadir la respuesta del huésped (14).

**BabA (HopS):** es una proteína de membrana externa de 78 kDa, codificada por el gen *babA*, BabA que media la unión de *H.pylori* a un grupo de antígenos sanguíneos fucosilados Lewis b (Le<sup>b</sup>) presente en las células del epitelio gástrico de individuos secretores (4). Estudios en tres cepas (26695, J99 y HPAG1) de *H.pylori* han reportado la presencia de genes *babA* y *babB* en diferente localización genómica, adicionalmente en la cepa 26695 se encontró la presencia de otro gen similar a *babA* y *babB*, *babC* cuya función aun se desconoce. *babA* se ha encontrado tanto en el locus B como en el locus C e incluso se han encontrado copias de *babA* en dos locus diferentes lo cual nos podría indicar la recombinación intragenómica que realiza el microorganismo (19). (Figura 4a)

Hay dos alelos distintos del gen, *babA1* y *babA2* pero solamente *babA2* puede codificar para la proteína completa y activa (4). Esto posiblemente se deba a que el gen *babA1* se encuentra silenciado motivo por el cual se expresa el gen *babA2*; la razón por la cual no se expresa *babA1* es por la presencia de una delección en el péptido señal de 10pb en la que se elimina el codón de iniciación traduccional. Sin embargo, en otras cepas de *H.pylori* no se ha encontrado ausencia de este codón de inicio por lo que se ha reportado como una mutación. Henning *et al*, encontró que de 24 cepas *babA* positivas el 4% presentan mutación “frameshift” o de cambio en el marco de lectura (en la posición 55) que previene la expresión de la proteína BabA completa (19).

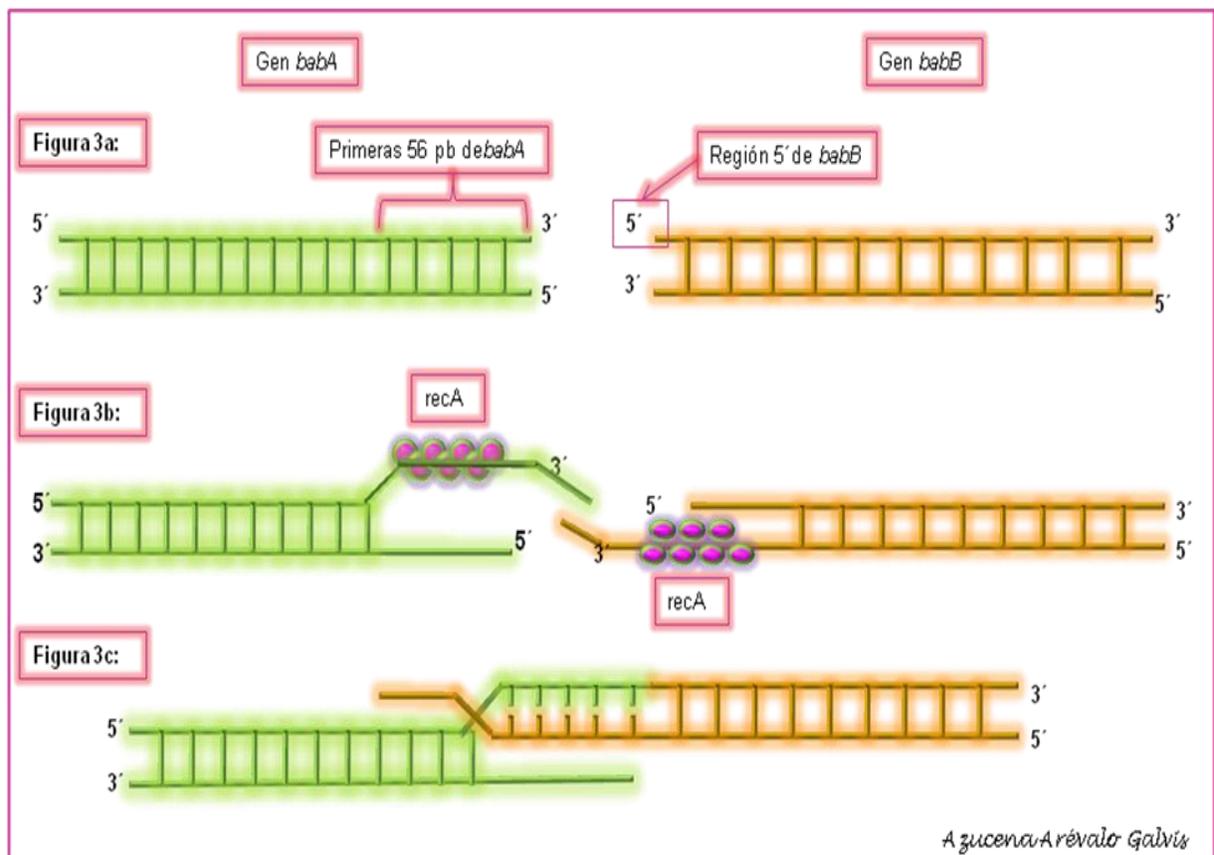
La principal forma de control de la actividad del gen *babA* es la recombinación dentro del locus *babB*, o por recombinación con el alelo silencioso de *babA* (4).

Estudios realizados por Backstrom *et al* en la cepa CCUG17875 han mostrado que la transcripción de *babA* parece estar regulada por el número de adeninas (poli A) en la región de -10 a-35 del promotor de *babA*, ya que esta región es estable cuando el numero de adeninas es 10 (*babA2*) (Figura 2 a) pero llega a no ser funcional cuando el número de adeninas es 14 (*babA1*) (Figura 2 b). Estas secuencias poli A podrían predisponer a mutaciones, sin embargo esto aún es motivo de estudio (19, 20).



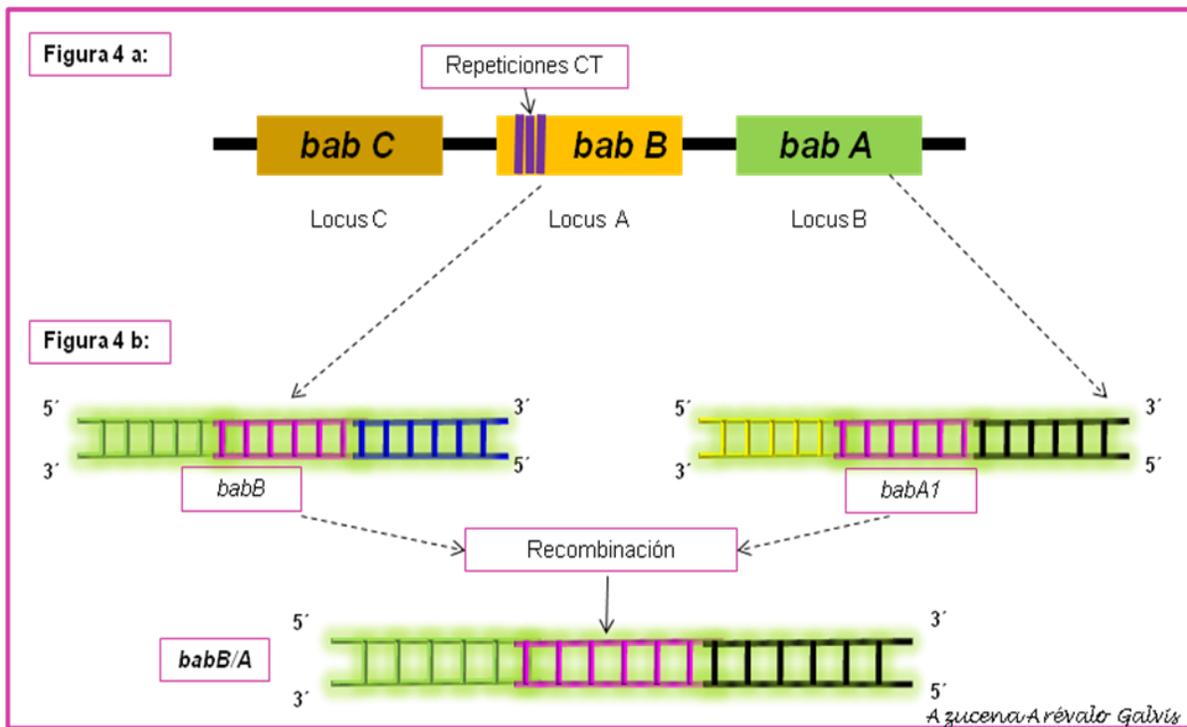
**Figura 2 Regulación transcripcional de *babA*:** La regulación parece depender del número de adeninas en la región promotora (-10 a -35). En la figura a). Se observa que cuando estas regiones tienen 10 adeninas esta región es estable y se transcribe el gen *babA2*. Por el contrario en la figura b). Se observa que cuando el número de adeninas en la región promotora es 14 el gen no es estable. Esto probablemente se debe a que esta región promotora es susceptible a mutaciones que conllevan a cambios en los niveles de la transcripción.

Otra forma de regulación de la expresión de BabA ocurre a nivel traduccional mediante la formación de proteínas quimeras entre *babA* y *babB*, las quimeras que se pueden formar pueden ser las resultantes de procesos de recombinación *babA/B* o *babB/A*, cuyo proceso es dependiente *recA* (19). Estudios realizados por Pride, *et al* en 2002 reporta que la quimera resultante de la recombinación *babA/B* ha sido encontrada a nivel experimental mediante la infección en monos *Rhesus* en donde la región 5' de *babB* es reemplazada por las primeras 56pb de *babA*. (Figura 3)



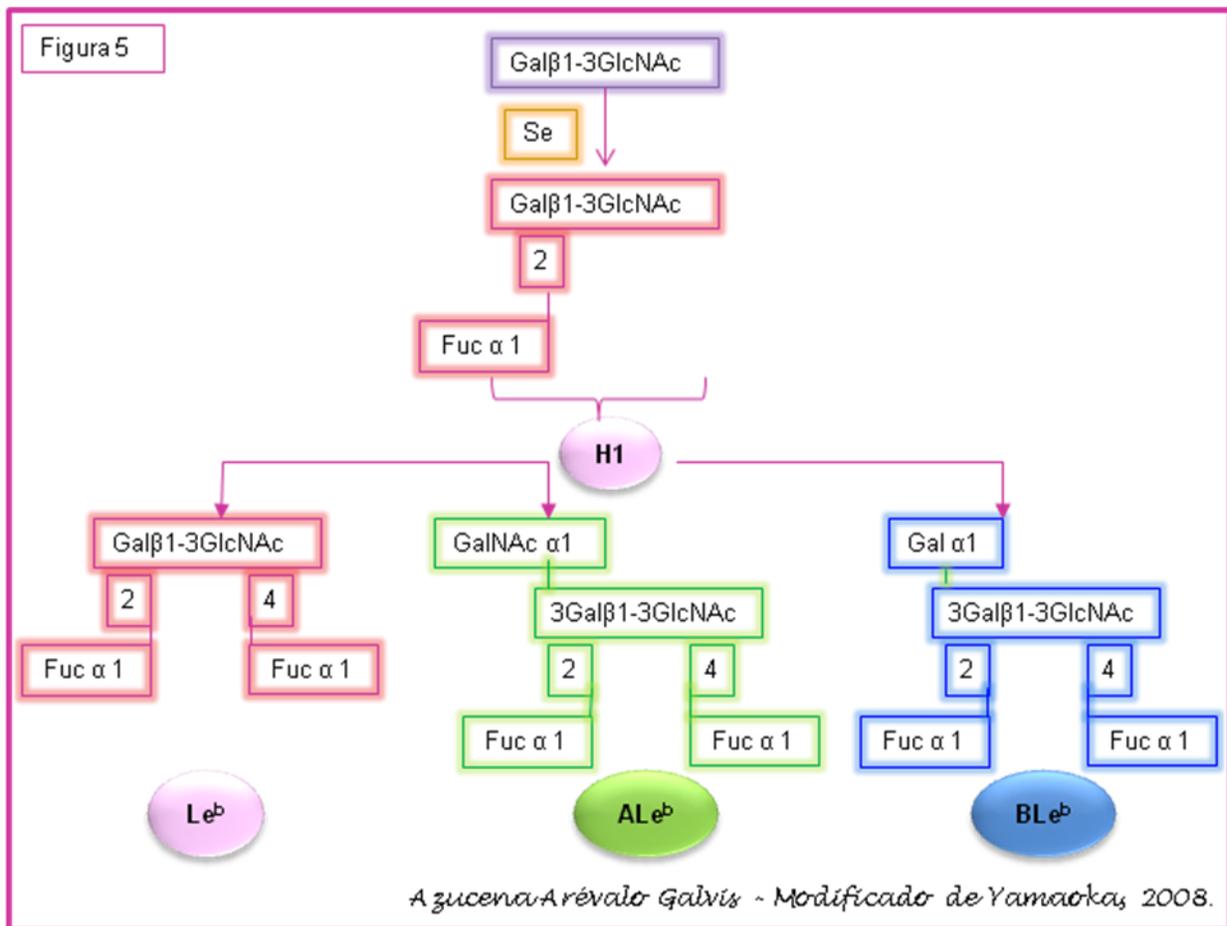
**Figura 3 Formación de la quimera *babA/babB*:** En la figura 3 a). Se observa tanto al gen *babA* como *babB*, en cada gen se pueden ver los sitios susceptibles a realizarse la recombinación. 3 b). El proceso de recombinación es independiente del sistema *recBCD*, sin embargo esto no excluye que haya un sistema que lo reemplacé y que contribuya a la unión inicial de la proteína *recA*, encargada de promover el intercambio de hebras de ADN. 3c). La quimera se forma porque la región 5' de *babB* es reemplazada por las primeras 56pb de *babA*.

Por otra parte la quimera *babB/A* es la resultante de la recombinación homóloga del alelo *babA2* con el alelo silencioso *babA1* dentro del locus del gen *babB*, la formación de esta quimera también se conoce como la forma mutada del gen *babA2*. (Figura 4) Análisis de la formación de la quimera *babB/A* han revelado que está conformada por 47pb específicas de *babB*, seguidas de 66pb compartidas entre *babA* y *babB*, y el resto de la secuencia que corresponde específicamente a *babA*. (Figura 4b) Adicionalmente la proteína producida puede estar sujeta a variación de fase a través un corrimiento de bases mal pareadas, repeticiones dinucleótidas en la región 5' del gen *babB* (switch "on" → funcional y switch "off" → no funcional) (Figura4a). Adicionalmente es posible encontrar algunas cepas *babB/C* ya que algunas cepas que poseen el gen *babC* poseen repeticiones CT en la región 5' (19).



**Figura 4 Formación de la quimera *babB/A*:** Resulta de la recombinación de *babA2* con el alelo silencioso *babA1* dentro del locus del gen *bab B*. En la figura 4a se observa la posición de los genes *bab* dentro de cada locus, las cuales pueden variar entre cada cepa, es decir el gen *bab B* puede encontrarse en cualquiera de los locus y de la misma forma ocurre con la ubicación de los demás genes *bab*. Además se observa la presencia de repeticiones citocina-timina, las cuales podrían estar implicadas en variaciones de cambio de fase de la proteína producida. En 4b se observa la como ocurre la recombinación, la cual esta conformada por 47pb específicas del gen *babB* (color verde), 66 pb compartidas entre *babA* y *babB* (en color rosado) y el resto de la secuencia que corresponde a *babA 1* (color negro).

El receptor de la adhesina resultante, BabA es el antígeno Le<sup>b</sup> que se forma por la adición de un residuo de fucosa al antígeno H1 el cual es una estructura de carbohidratos que define el grupo sanguíneo de fenotipo O, esta adición de fucosa también puede suceder en los fenotipos A y B del grupo sanguíneo ABO, en este caso los antígenos de fenotipo A y B y su correspondiente antígeno del sistema de grupo sanguíneo Lewis se forma por la sustitución de H1 por una N-galactosamina (GalNAc) o galactosa (Gal) y la adición de la fucosa para formar los antígenos ALe<sup>b</sup> o BLe<sup>b</sup> respectivamente. (Figura 5)



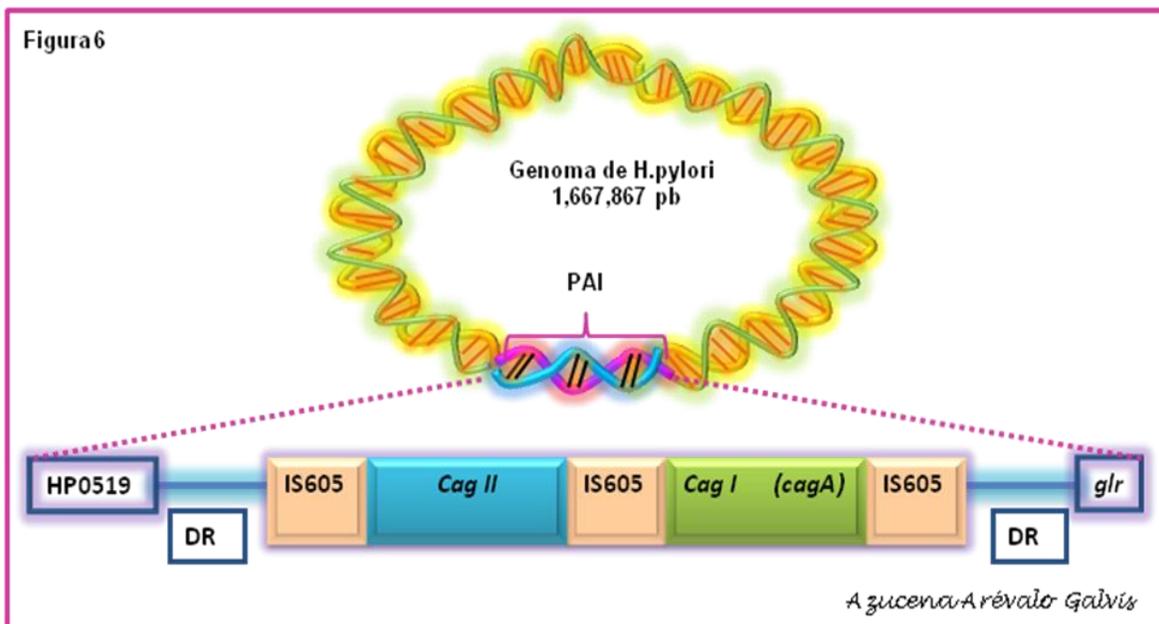
**Figura 5 Formación del Antígeno Lewis:** Su biosíntesis se inicia a partir de una cadena central (en morado) y la adición de una fucosa (Fuc) a la galactosa terminal mediante la enzima 1,2-fucosiltransferasa (Se) dando como resultado el antígeno H1 (antígeno O del grupo sanguíneo ABO) este antígeno puede ser blanco de una GalNAc o Gal transferasa para dar lugar a los antígenos A (verde) o B (azul) del grupo sanguíneo ABO respectivamente. Finalmente se añade una fucosa en la posición 4 dando lugar a la formación del antígeno Lewis en cada uno de los grupos ABO (círculo rosado-con el antígeno O, círculo verde-con el antígeno A, círculo azul-con el antígeno B) . Modificado de Yamaoka, 2008.

La habilidad de BabA de unirse a Le<sup>b</sup>, A Le<sup>b</sup>, o B Le<sup>b</sup> es amplia, ya que estudios han mostrado que la mayoría de las cepas de *H.pylori* pueden unirse a cualquiera de estos tres receptores, por lo que los autores las han denominado “cepas generales”, sin embargo también se ha encontrado que algunas cepas de *H.pylori* tienen afinidad solo por uno de estos tres receptores en especial Le<sup>b</sup> así que estas han sido denominadas como “especializadas”; curiosamente este grupo de cepas se han encontrado principalmente en aislamientos de pacientes de Sur América (Perú, Venezuela y Colombia) donde la mayoría de la población tiene un grupo sanguíneo O, lo que podría significar que la mayor afinidad por Le<sup>b</sup> puede causar una fuerte adherencia del microorganismo a la mucosa gastrointestinal en individuos con este fenotipo sanguíneo y por ende tener un mayor riesgo al desarrollo de ulcera péptica (21). Pero cuál de las regiones de BabA es la que determina los diferentes patrones de unión de la proteína, es una pregunta que aun es motivo de estudio, ya que aunque los autores han propuesto a la región media de la proteína como la responsable aun no se han identificado los motivos específicos implicados en los diferentes patrones de unión (19).

Se ha propuesto que BabA está involucrado con la virulencia de *H.pylori* ya que la presencia de *babA2* se ha asociado con ulcera péptica y adenocarcinoma gástrico pero esta distribución es controversial, la presencia del alelo *babA2* está unida a los alelos *vacA* s1 y *cagA* (4,5). Por este motivo es importante realizar seguimiento a los pacientes cuya cepa de *H.pylori* presente estos marcadores para conocer el desenlace y su posible asociación con cáncer gástrico.

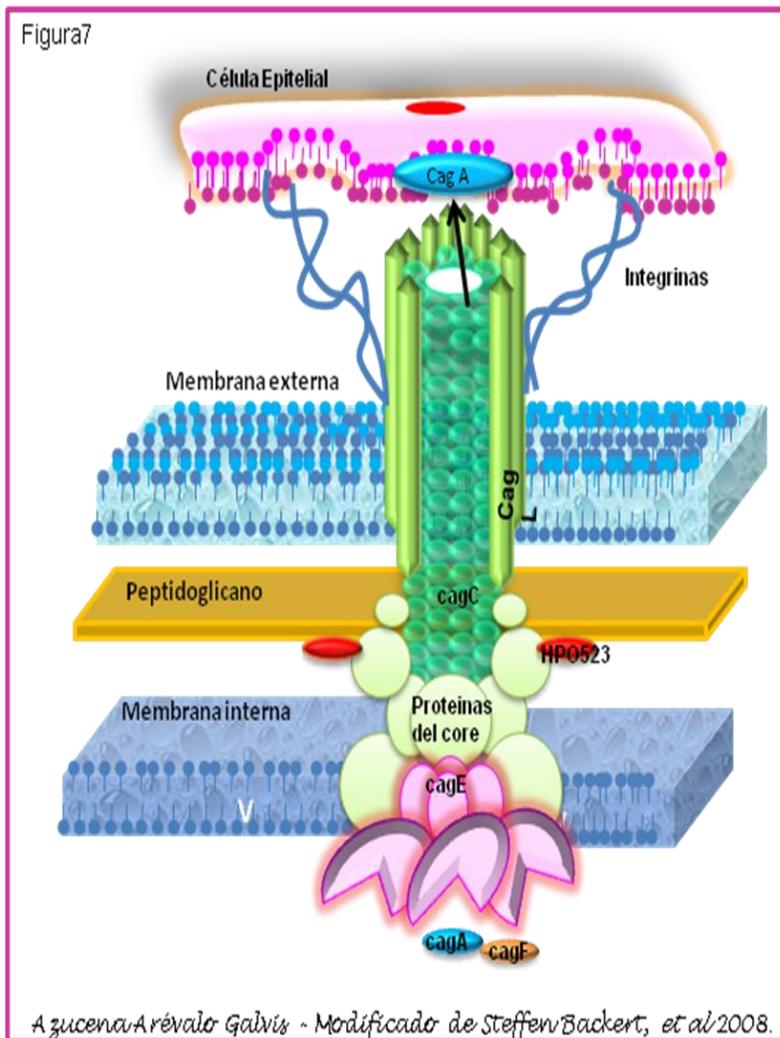
### 3.2.2 Citotoxina Asociada al Gen A (*cagA*)

Es una proteína de aproximadamente 140 kDa que es altamente inmunogénica, codificada por el gen *cagA*, este gen está presente en aproximadamente el 50-70% de las cepas de *H.pylori*, es un marcador de la presencia genómica de la isla de patogenicidad (PAI) que tiene cerca de 40 kb y dependiendo de la cepa codifica entre 27 y 31 proteínas, PAI es la zona más variable en todo el genoma de la bacteria está rodeada por 31pb de repeticiones directas (DR), las cuales contienen sitios de recombinación, PAI se encuentra ubicada entre el gen glutamato racemasa (*glr*), y un ORF denominado ORF5 o HP0519 de función desconocida, en los extremos derecho e izquierdo tiene secuencias de inserción o elementos *IS605*, los cuales varían en número dependiendo de la cepa, los elementos *IS605* también se encargan de dividir a PAI en dos segmentos *cagI* y *cagII* (16,18, 22) . (Figura6)



**Figura 6 Isla de patogenicidad de *H.pylori*.** Región que se encuentra entre el gen *glr* y un ORF HP0519. PAI está rodeada por secuencias de repeticiones directas (DR), está dividida en *cagI* y *cagII* por elementos *IS605* . Dentro de la región *cagI* y *cagII* hay genes involucrados en codificar para el sistema de secreción tipo IV con la diferencia de que dentro de la región *cagI* se encuentra el gen *cagA*.

Dieciocho de las proteínas codificadas por la región *Cag* PAI forman parte de un aparato secretorio tipo IV el cual permite transportar Cag A, peptidoglucano y otros factores de la bacteria dentro de la célula blanco del huésped. (Figura 7) El sistema de secreción tipo IV (SST4), es un organelo filamentososo que cuando es inducido por contacto se localiza en un polo de la superficie bacteriana, una vez se ha ensamblado el SST4, para que se pueda transportar CagA, se requiere que



este sistema interaccione con un receptor específico en la célula del huésped; se ha propuesto que este receptor podría ser la integrina  $\alpha_5\beta_1$  las cuales interactuarían con la proteína CagL presente en el SST4; sin embargo, para que CagA pueda transportarse requiere de una proteína adicional, CagF, que actúa como chaperona llevándola desde el interior bacteriano hasta la célula blanco (23,24,25).

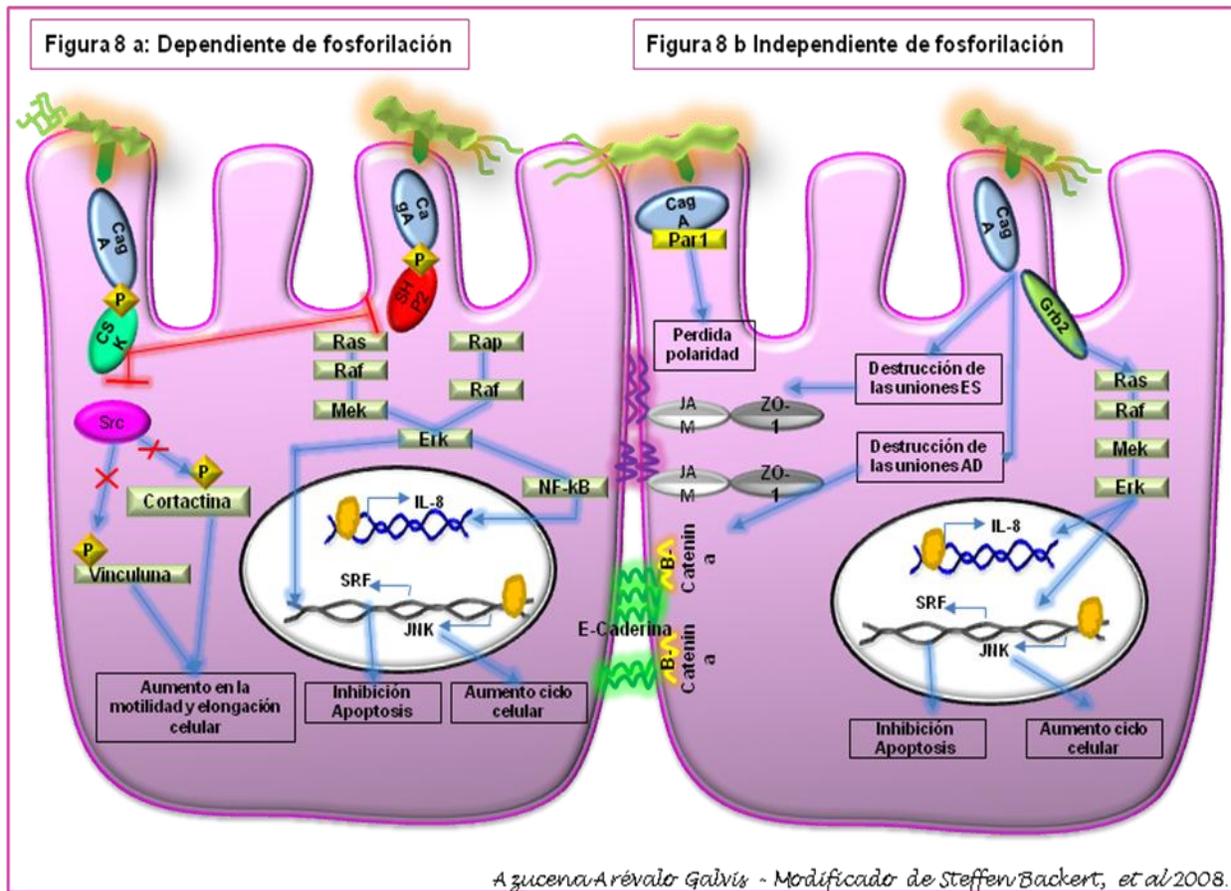
**Figura 7 Sistema de secreción tipo IV (SST4) de *H. pylori*:** La figura representa la organización de las proteínas que conforman el SST4 del microorganismo, dentro de las que se encuentran la proteína chaperona de CagA, CagF, proteínas con función ATPasa (CagE), las cuales se organizan en la membrana interna del la bacteria. Proteínas que hacen parte del complejo central (CagT/12 (HPO532), CagV/10, CagX/8 (HPO528) y CagY/7 (HPO527)) y que se disponen a nivel del periplasma bacteriano, y finalmente atravesando parte del peptidoglino y la membrana externa se encuentran las proteínas que hacen parte del pili (CagC y CagL) y que permitirá la comunicación con la célula epitelial a través de integrinas, para la posterior inyección de la proteína CagA.

Una vez Cag A es liberada dentro de la célula, es fosforilada por la familia de las Src quinasas en los residuos tirosina en los motivos EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Alu) presentes en la porción carboxi-terminal de la proteína. Puede haber variación en el número de fosforilaciones de este motivo lo cual está directamente relacionado con el número de repeticiones, de acuerdo con esto se ha planteado que las cepas Cag A+ con gran número de repeticiones inducen cambios morfológicos más pronunciados en las células epiteliales y han sido asociadas con un incremento en el riesgo de carcinogénesis gástrica (4). El motivo EPIYA hace parte de cuatro sitios EPIYA distintos, EPIYA A, B, C, D, cada uno de los cuales está rodeado por una secuencia de amino ácidos que rodea la secuencia EPIYA. Las cepas de *H.pylori* occidentales poseen sitios EPIYA A, B seguidos de EPIYA C, el número de repeticiones de este último puede variar entre cepas occidentales, y de los tres sitios es el que constituye el sitio de mayor tirofosforilación. Por el contrario cepas de *H.pylori* del Este Asiático también poseen EPIYA A y B pero en lugar de EPIYA C poseen EPIYA D el cual constituye el sitio de mayor fosforilación en estas cepas (26,27).

Cag A fosforilado entonces interactúa con moléculas de señalización como tirosin fosfatasa SHP-2 en un 80%, la formación del complejo CagA-SHP2 estimula la actividad fosfatasa de SHP2. SHP2 actúa en vías de señalización para estimular la transcripción del factor de crecimiento, inducir proliferación, morfogénesis y motilidad celular; por lo que al formarse un complejo con la proteína CagA resulta en cambios morfológicos en la célula epitelial caracterizados por rearrreglos en el citoesqueleto que conducen a una elongación celular o fenotipo en forma de colibrí. Adicionalmente, SHP-2 tiene la capacidad fisiológica de activar Erk MAP quinasas tanto de manera dependiente como independiente de Ras, una de las funciones de Erk es que es necesaria para que la célula pase de fase G<sub>1</sub> a S en el ciclo celular, lo que significa que la formación del complejo CagA-SHP2 también podría inducir un crecimiento descontrolado de la célula

epitelial gástrica por la activación sostenida de Erk, la activación de Erk en la célula epitelial a la vez activa NF- $\kappa$ B el cual posteriormente induce la producción de IL-8, aunque CagA es tiene la capacidad de inducir IL-8, recientes estudios han mostrado que otros genes codificados por PAI son los principales inductores de IL-8 (26, 28). Por otra parte, la activación sostenida de SHP2 induce apoptosis en la célula epitelial gástrica, sin embargo la unión de la proteína CagA a la porción carboxi terminal de la quinasa CSK regula negativamente esta fosforilación prolongada resultando en una disminución de los complejos CagA-SHP2, la desfosforilación inducida contribuirá a que se desfosforilen otras proteínas sustratos de las SRC como la cortactina la cual es una proteína del citoesqueleto que puede estar involucrada en los cambios morfológicos inducidos por CagA. (Figura 8) Esta retroalimentación favorece en parte la persistencia del microorganismo permitiendo que se produzca una infección crónica (26).

CagA también causa efecto sobre la célula epitelial gástrica de manera independiente a la fosforilación puesto que tiene la capacidad de unirse a Grb2 y activar Ras, induciendo una alta motilidad conocido como fenotipo “disperso”. Además tiene la capacidad de asociarse con proteínas de las uniones estrechas como zonulina (ZO-1), proteínas de adhesión celular como E-caderina, receptor del factor de crecimiento de hepatocitos c-Met, caderina asociada a la proteína  $\beta$ -catenina y la kinasa PAR1, estas interacciones producen alteraciones de las funciones del complejo apical, destruyen la barrera epitelial, promueven perdida de la polaridad celular e inducen cambios displásicos en la morfología de las células epiteliales cuyas alteraciones han mostrado tener un papel importante en carcinogénesis (26,27,28, 29,30). (Figura 8)



**Figura 8 Mecanismo de acción de CagA:** Una vez *H. pylori* se adhiere sobre la célula epitelial gástrica sintetiza el SST4 (triángulo verde, unido a la bacteria) a través del cual inyecta a la célula la proteína CagA, cuando la CagA es translocada al citoplasma celular puede actuar sobre diferentes vías de señalización de manera dependiente como independiente de la fosforilación. En **8a** se observa que una vez CagA entra a la célula es fosforilada y se forma un complejo con SHP2 activándose la actividad fosfatasa y conduciendo a la activación de Erk por dos vías diferentes, la activación de Erk actuara sobre varios factores de transcripción encargados de controlar ciclo celular y apoptosis. También se observa retroalimentación negativa sobre Src quinasas y SHP2 cuando CagA interactúa con CSK, (líneas rojas). En **8b** se observa que cuando CagA no es fosforilada puede unirse a varias proteínas como Grb2, Par1, ZO-1, E-caderina, caderina-Bcatenina y promover daño en las uniones estrechas (ES), uniones adherentes (AD), pérdida de la polaridad celular.

De acuerdo a la presencia del gen *cagA*, las cepas de *H. pylori* se han denominado como *cagA+* o *cagA-*; la importancia de cepas *cagA+* radica en que son más agresivas ya que son capaces de causar inflamación severa, úlceras e incluso tumores. Estudios realizados por Naomi Ohnishi *et al*, 2006 en gerbils mongoles han demostrado que CagA es una oncoproteína bacteriana cuya expresión es suficiente para desarrollar neoplasias; se ha reportado que la formación de tumores en los ratones se ha asociado a la tirosin-fosforilación de

formación de tumores en los ratones se ha asociado a la tirosin-fosforilación de CagA lo cual es esencial para que CagA interactúe con la oncoproteína SHP-2 descontrolándola, conllevando a la proliferación anormal de células epiteliales gástricas y alterando la leucogénesis lo cual apoya la asociación de la infección por *H.pylori* y el desarrollo de linfomas de células B (31). Aunque el desarrollo de cáncer gástrico es un proceso complejo en el que están involucrados múltiples pasos, en presencia de una infección por *H.pylori* con una cepa *cagA+* una de los pasos más importantes es la capacidad de la proteína de descontrolar la proteína SHP-2 e inducir muchos de los cambios anteriormente mencionados ya que la proteína SHP-2 al interactuar con CagA funciona como si el gen *PTPN11* que es el encargado de codificar para SHP-2 estuviera mutado, lo cual es relevante puesto que mutaciones en este gen han sido reportadas en procesos malignos (27).

Sin embargo, que es lo que hace a unas cepas de *H.pylori* más agresiva que otras, esto podría explicarse por la presencia de polimorfismos estructurales en la proteína CagA, los cuales varían dependiendo del área geográfica. Como se menciono anteriormente la fosforilación de la proteína CagA ocurre en los motivos EPIYA en especial en EPIYA-C (predominante en cepas Occidentales) o EPIYA-D (predominante en cepas Orientales), estos motivos EPIYA están rodeados por secuencias repetitivas de DNA involucradas en recombinación lo cual podría explicar la variabilidad en el número de estos motivos así como las diferencias en la patogenicidad de las cepas de *H.pylori*. Masanori naito *et al*, 2006 en uno de sus estudios evaluó si los polimorfismos que presentara la proteína CagA en sus motivos EPIYA influenciaban en la magnitud de la fosforilación y de la actividad de la proteína CagA encontrando que el nivel de fosforilación y la capacidad de CagA de inducir el fenotipo en forma de colibrí es directamente proporcional al número de motivos EPIYA-C y EPIYA-D tanto en cepas occidentales como orientales respectivamente. Igualmente encontró que la interacción de CagA con Csk es proporcional al número de motivos EPIYA-A y EPIYA-B.

Masanori naito *et al*, 2006 también reporta que EPIYA-D tiene una mayor afinidad por SHP-2 que EPIYA-C, por lo que los cambios celulares inducidos por cepas portadoras del motivo EPIYA-D son más agresivas, lo cual coincide con estudios en los que reportan que pacientes asiáticos infectados con cepas *cagA+* presentan un alto grado de inflamación, gastritis y atrofia que pacientes occidentales infectados con cepas *cagA+* (27). No obstante, cepas de *H.pylori cagA +* occidentales portadoras de varias repeticiones EPIYA-C han sido aisladas con más frecuencia de pacientes con cáncer gástrico. Estas observaciones indican que cepas de *H.pylori* que se unan con mayor afinidad a SHP-2 están con mayor frecuencia involucradas en el desarrollo de cáncer gástrico, pero aun mas importante es que estas cepas pueden aislarse de pacientes con gastritis atrófica y úlceras pépticas por lo que el estudio del gen *cagA* es realmente un marcador importante de virulencia.

### **3.2.3 Citotoxina vacuolizante Vac A**

En 1988 Leunk *et al*, demostró que algunas cepas de *H.pylori* producían una proteína en el sobrenadante de cultivos las cuales inducían vacuolización en células epiteliales, motivo por el cual se designó a la proteína como citotoxina vacuolizante (Vac A), luego de su purificación, se identificó, clonó y secuenció el gen que codificaba para la proteína por 4 grupos diferentes (16, 32).

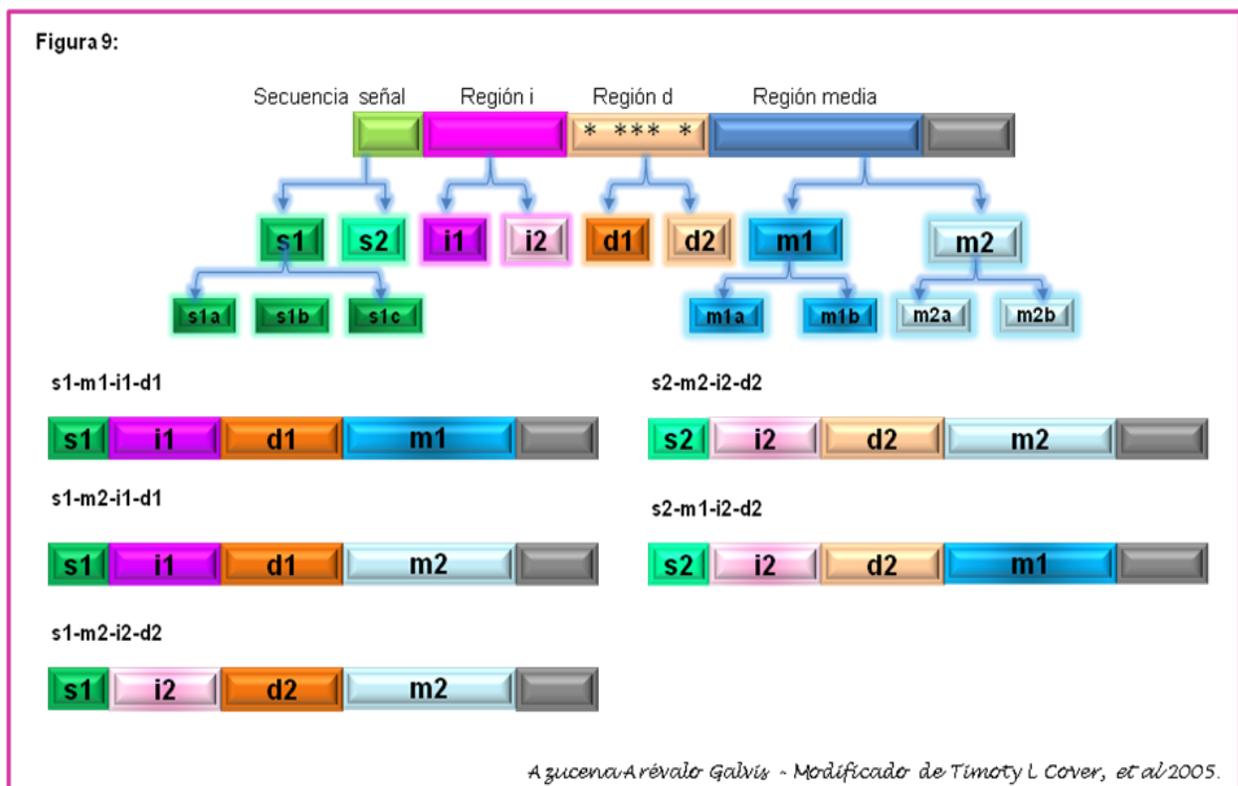
La proteína Vac A es codificada por el gen *vacA*, el cual se encuentra en todas las cepas de *H.pylori*, sin embargo estas presentan variaciones su actividad vacuolizante debido a la heterogenicidad dentro del gen *vaca* (16).

Estructuralmente el gen comprende principalmente dos partes variables; una región s que codifica para el péptido señal y está localizada en la región 5' final del gen y existe como alelo s1 o s2, dentro del tipo s1 hay varios subtipos (s1a, s1b, s1c). La región media del gen (región m) puede tener los alelos m1 o m2.

Los tipos de combinaciones alélicas entre estas regiones s y m determinan la producción y el tipo de actividad de la citotoxina, ya que por ejemplo cepas con la combinación *vacA* s1/m1 producen grandes cantidades de toxina por lo que tienen una alta actividad vacuolizante, las cepas *vacA* s1/m2 producen cantidades moderadas de toxina y su actividad vacuolizante también es moderada, mientras que las cepas *vacA* s2/m2 producen muy poca toxina o no producen. En cuanto a los subtipos de s1 se ha reportado que las cepas que expresan el subtipo s1a parecen ser más patógenas que las cepas s1b o s2 (1, 6,16). (Figura 9)

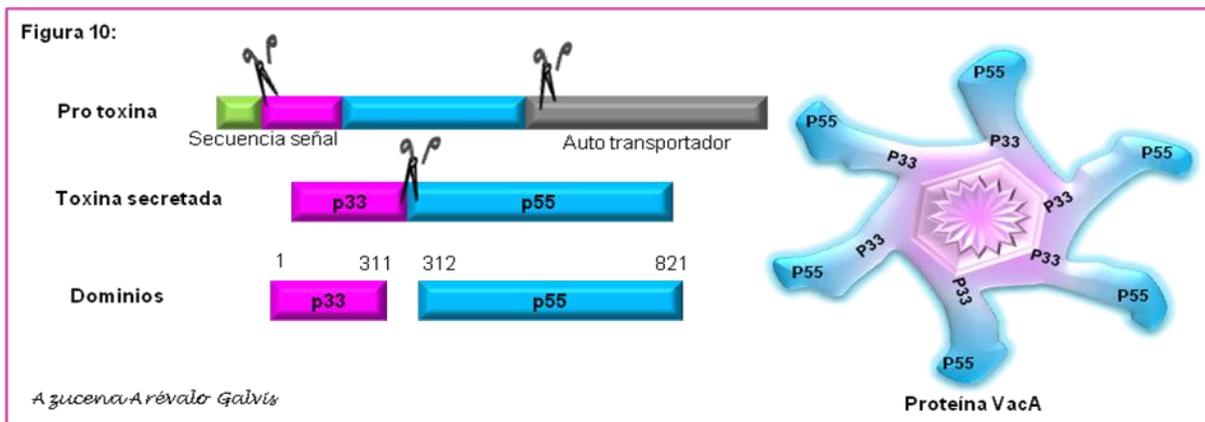
Recientemente se identificó un tercer determinante de la actividad vacuolotóxica denominado región intermedia (i) y localizado entre las regiones s y m. Se han descrito dos subtipos i1 e i2 presentes en las cepas con genotipo *vacA* s1/m1 y *vacA* s2/m2 respectivamente y variaciones de la región i en cepas con genotipos *vacA* s1/m2. La importancia clínica de esta región es su relación con cáncer gástrico, sin embargo, estudios realizados por Hiroaki *et al*, en 2009 revelan que la determinación de los genotipos de *vacA* en los que se combinan las tres regiones (s, m, i) no proveen ninguna ventaja como un marcador determinante sobre las regiones s y m por lo menos en países asiáticos; un hallazgo importante del estudio de Hiroaki *et al*, en 2009 es la presencia de una cuarta región *vacA* d, denominación que le asignaron a la presencia de una deleción de 81pb entre las regiones i y m, la región d del gen *vacA* esta localizada en la porción N-terminar del dominio p55 y que podría estar involucrada en la unión de la toxina a las células epiteliales gástricas y con la actividad citotóxica de la proteína, hay dos variantes de esta región, d1 y d2 sin embargo, no se ha demostrado diferencia en la actividad biológica de cepas d1 o d2. (Figura 9)

La importancia de esta región d es que de acuerdo con el estudio realizado por Hiroaki *et al* revela ser un marcador más sensible que s o m de inflamación severa y atrofia de la mucosa gástrica, por lo que se podría considerar un factor de riesgo para cáncer gástrico más que la región i; sin embargo es necesario que se realicen estudios con mejores tamaños de muestra que permitan entender no solo cual es la actividad biológica de estas dos regiones (i, d) sino que proporcionen un mejor acercamiento de la relación de estos marcadores con la patología producida por el microorganismo (33).



**Figura 9: Estructura del gen *vacA* y su diversidad alélica:** Hasta el 2007 se consideraba que el gen *vacA* estaba constituido por dos regiones conocidas como secuencia señal s (en verde) y región media m ( en azul) . La secuencia señal existe como alelo s1 o s2 (verde oscuro, verde claro), a la vez el alelo s1 tiene subtipos (s1a, s1b, s1c). La región media tiene dos alelos m1 o m2 cada uno de los cuales con subtipos m1a, m1b, m2a y m2b. Estudios posteriores han descrito la presencia de otras dos regiones denominadas región intermedia i ( en rosado) y una región d que se ubica entre la región i y la región m cada una con dos alelos denominados i1, i2, d1,d2. Se ha denominado región d porque análisis de las secuencias de *vacA* de diferentes cepas de *H.pylori* han puesto de manifiesto la presencia de deleciones (en asteriscos) en esta región. Teniendo en cuenta la diversidad alélica de las cepas de *H.pylori* , se pueden presentar combinaciones de los diferentes alelos para dar lugar a varios de los genotipos *vacA* , dentro de las combinaciones mas frecuentes se observan las que aparecen en la figura.

La proteína VacA es producida como una pro-toxina de 140 kDa constituida por una región aminoterminal de 33 aminoácidos que constituye el péptido señal, el cual se encarga de dirigir la pro-toxina del citoplasma al periplasma bacteriano, también consta de una región carboxiterminal de 45kDa que funciona como autotransportador y que permite exportar la proteína a través de la membrana externa, esta pro-toxina es clivada en su forma madura (88kDa) para ser secretada. La proteína madura es clivada para producir dos fragmentos p33 y p55 los cuales constituyen dos subunidades o dominios de la proteína cada una con funciones relevantes en la proteína. El dominio p33 está constituido por hojas plegadas  $\beta$  y por residuos hidrofóbicos ricos en glicina probablemente responsables de la dimerización transmembrana y con una región sensible a proteasa, motivo por el cual una vez la proteína es liberada en el medio se rompe en este punto. El dominio p55 está involucrado en la unión de VacA a las células del huésped, dentro de estos dominios solo 422 aminoácidos de la región aminoterminal de p33 y 100 aminoácidos del dominio p55 son suficientes para inducir vacuolotoxicidad (34). (figura 10)

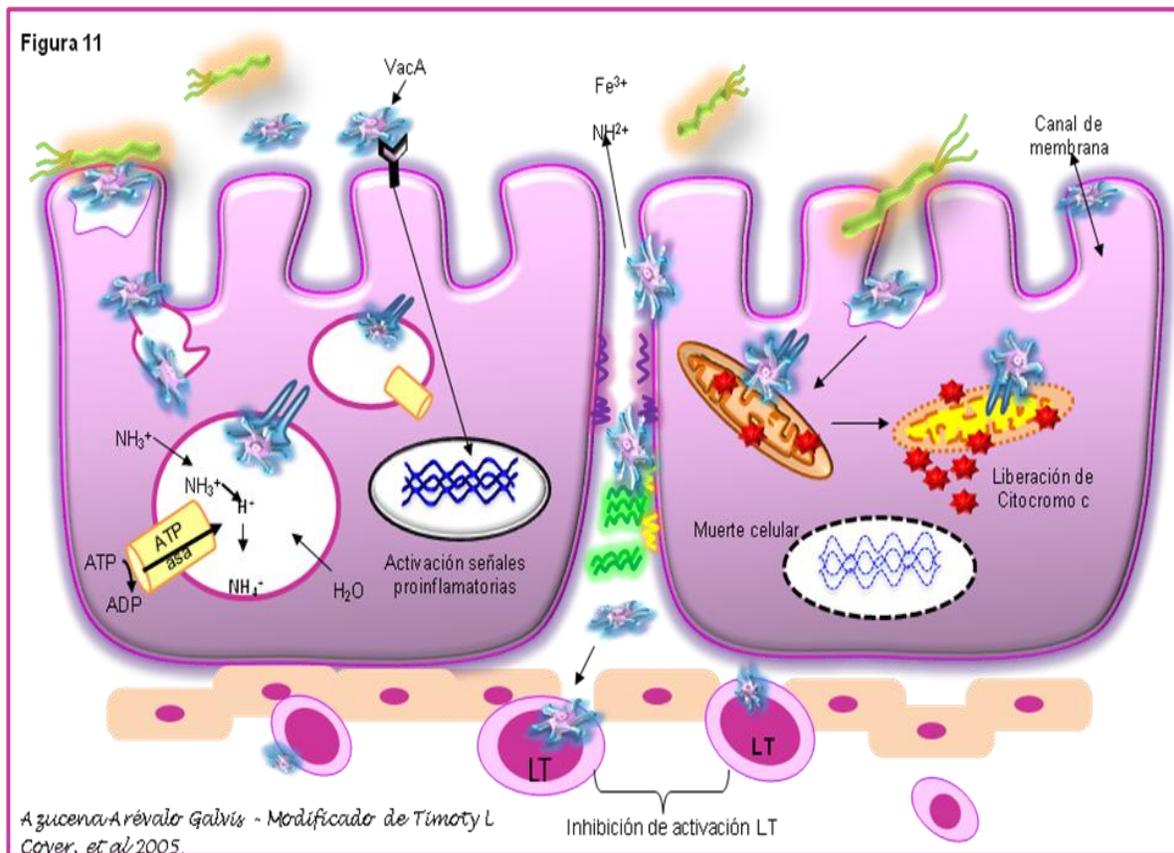


**Figura 10 Proteína VacA:** la proteína es producida como una pro toxina de 140kDa, la cual es dirigida por el péptido señal (verde) hasta el periplasma bacteriano, posteriormente durante su proceso de secreción es clivada para retirar el péptido señal y el autotransportador dando lugar a una toxina de 88kDa de dos dominios p33 y p55 en este ultimo esta ubicada la región m, luego hay una proteólisis parcial separando los dos dominios p33, involucrado en la formación del poro y p55 en la unión de la toxina a la membrana de la célula blanco, estos dominios pueden oligomerizar para formar una estructura en forma de flor como la que se observa al lado derecho, para luego unirse a la membrana de las célula blanco y formar el canal o poro en las membranas lipídicas.

La proteína madura es secretada fuera de la bacteria, pero un 50% de esta permanece unida a la superficie del microorganismo y el resto es liberado; las moléculas de VacA que están asociadas a la superficie de la bacteria interactúan directamente con la membrana de la célula del huésped cuando la bacteria tiene contacto con la célula epitelial, mientras que el resto de la toxina liberada oligomeriza formando una estructura en anillo en forma de flor, la cual se cree es formada cuando entra en contacto con la membrana de la célula blanco (1). La forma oligomérica de la proteína es activada por la exposición al medio ácido o alcalino, siendo resistente a pH de 1,5 y a la degradación por la pepsina, sin embargo la exposición de la proteína a muy bajos pH disocia los oligómeros en monómeros los cuales pueden mediar en la inserción de la proteína en las membranas de la célula blanco. VacA puede actuar sobre la célula blanco de manera dependiente o independiente de endocitosis. (Figura 11)

La proteína entra a la célula epitelial directamente por endocitosis o porque su entrada está mediada por un receptor dentro de los cuales se ha descrito varios componentes de la superficie celular como RPTP $\beta$ , RPTP $\alpha$ , lípidos y el receptor del factor de crecimiento epidermal; una vez VacA es endositada induce acidificación aumento de urea, aniones y bases débiles gracias a que contiene una bomba de protones tipo ATPasa, la acumulación de estos componentes en el lumen de la vacuola conlleva a la hinchazón de la misma y aumento de la permeabilidad celular permitiendo la liberación de nutrientes y cationes. La formación de vacuolas incluye la formación de un canal de membrana que destruye la actividad endosomal y lisosomal, trayendo como consecuencia liberación de hidrolasas ácidas al medio extracelular, estas hidrolasas también pueden destruir el espesor de la capa de mucina incrementando la permeabilidad a iones y nutrientes que le permitirán al microorganismo sobrevivir (18, 34). (Figura 11)

VacA tiene elección por las membranas por lo que además de la formación de vacuolas en los endosomas tardíos también causa alteración en la mitocondria como reducción en el potencial de membrana y liberación del citocromo c, trayendo como consecuencias reducción en las concentraciones celulares de ATP y daño en la progresión del ciclo celular induciendo apoptosis debido a la liberación de citocromo c y la posterior activación de la caspasa 3 (18,32). (Figura 11)



**Figura 11 Modo de acción toxina VacA:** La toxina es secretada por *H. pylori* al medio, esta oligomeriza (forma de flor azul) y se puede unir a la célula epitelial ya sea a través de un receptor, en cuyo caso su unión podría inducir señales al núcleo para activar genes involucrados en respuesta inflamatoria. La toxina también puede insertarse directamente en las membranas plasmáticas formando un canal selectivo de aniones a través de los cuales hay liberación de bicarbonato y otros compuestos orgánicos que le permitirán sobrevivir a la bacteria. Los canales formados por VacA son lentamente endositados hasta alcanzar compartimentos endosomales tardíos, trayendo como consecuencia el aumento de permeabilidad a aniones gracias a la actividad ATPasa, adicionalmente el amonio generado por la acción de la ureasa induce a que entre agua a la vesícula formada. (Figura de la izquierda) Por otra parte VacA tiene la capacidad de alterar la membrana interna mitocondrial permitiendo la liberación de citocromo c y la posterior inducción de apoptosis. También es capaz de atravesar las uniones estrechas e interferir con la activación de linfocitos T (LT) en la lamina propia.

Adicionalmente VacA tiene la capacidad de activar diferentes vías de señalización que involucran MAP quinasas y el factor de transcripción 2, aunque se desconocen con exactitud las consecuencias funcionales de la activación de estas vías por VacA, se ha propuesto que la interacción de la toxina con su receptor es el que desencadena la activación de vías de señalización (32).

VacA también actúa de manera independiente a la endocitosis aumentando la permeabilidad paracelular de la monocapa epitelial gástrica permitiendo el flujo de moléculas y iones como  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ , azúcares y aminoácidos, cuya liberación ayudan al crecimiento de *H.pylori* en la mucosa gástrica, sin embargo se desconoce el mecanismo exacto por el cual altera la permeabilidad paracelular (32). (Figura 11)

Por otra parte la vacuolotoxina también afecta la respuesta inmune, en las células presentadoras de antígeno APC afecta la presentación antigénica a través del complejo mayor de histocompatibilidad II (CMHC II) debido a que induce una disminución de la actividad proteolítica en las vías endocíticas por ende inhibe la estimulación de los linfocitos T no solo al alterar la presentación antigénica sino porque además VacA tiene la capacidad de inhibir la producción de IL2 la cual es necesaria para la proliferación de los linfocitos T, efecto que se atribuye a que VacA inhibe el factor nuclear de activación de células T (NFAT) el cual es un factor de transcripción que actúa como regulador de los genes involucrados en la respuesta inmune y que son requeridos para la activación óptima de los linfocitos T (1,18,32). (Figura 11)

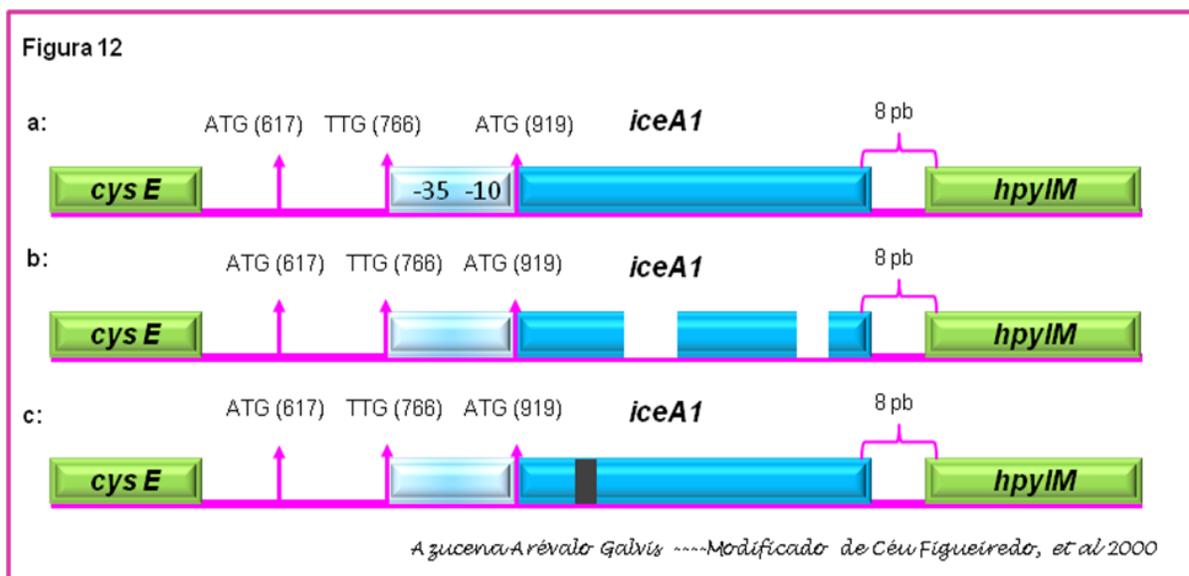
### 3.2.4 Gen Inducido por Contacto con el Epitelio *iceA*

*iceA* es un gen descrito por Peek RM Jr, *et al* en 1998, en su estudio identificaron la inducción de este gen tras la exposición de aislamientos provenientes de pacientes con ulcera y gastritis a células gástricas epiteliales, los análisis de las secuencias de DNA revelaron dos variantes alelicas *ice A1* e *iceA2*. *iceA* está rodeado corriente arriba por el gen *cysE* el cual codifica para una proteína homologa a una serina acetil-transferasa y corriente abajo por el gen *hpyIM* que codifica para una metilasa de adenina (35). Se ha reportado que *iceA1* tiene una fuerte homología (66%) con *nlalIIR* que codifica para una endonucleasa específica para la secuencia CATG en *Neisseria lactamica*; por otra parte, se desconoce si *iceA2* codifica para alguna proteína homologa con otros microorganismos, sin embargo un estudio reciente realizado por Céu Figueiredo, *et al* en 2000, revelo cinco subtipos distintos de *iceA2* (36).

Céu Figueiredo, *et al* en 2000 estudio la organización genómica de *iceA* y la heterogenicidad del mismo, encontrando que el gen *iceA1* cuenta con dos posibles codones de inicio TTG y ATG, siendo el ultimo el mas conservado entre las secuencias de las cepas analizadas; en cuanto al tamaño de la proteína codificada se encontró variabilidad entre las cepas analizadas, produciéndose proteínas de 127 y 228 aminoácidos. (Figura 12) Entre las secuencias de las cepas evaluadas se encontró la presencia de deleciones en *iceA1* en especial en cepas provenientes de Hong Kong, trayendo como consecuencia proteínas más cortas de 120 a.a, así como también se reportó la presencia de inserciones en cepas provenientes de Canada, Estados Unidos y Portugal. (37)

Aunque la similaridad entre el gen *iceA1* y *nlalIIR* es alta a nivel nucleotídico, en ocasiones esta similaridad es limitada lo cual probablemente se deba a la

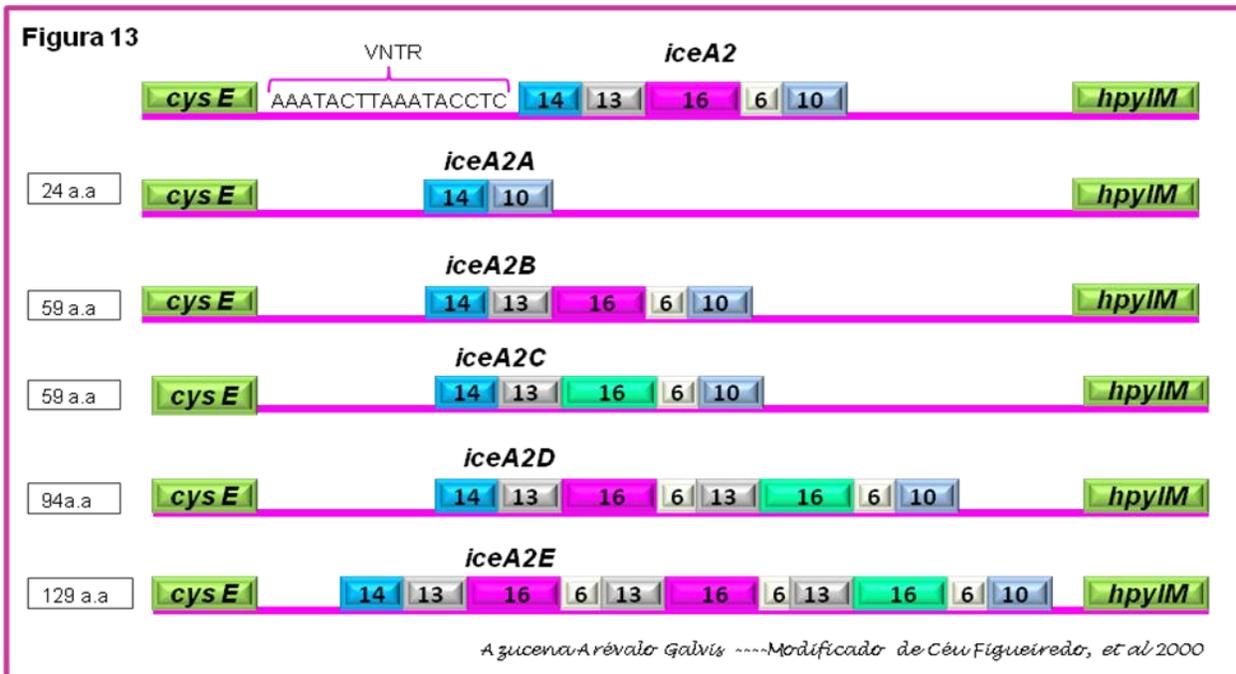
presencia de deleciones o inserciones haciendo que salgan proteínas truncadas, motivo por el cual al estudiar el gen algunos autores consideran que realmente el gen no codifica para una endonucleasa de restricción sino que funciona como un regulador. Por otra parte, aunque se desconoce la función biológica exacta de *iceA1*, es importante tener en cuenta que el que *H.pylori* tenga un gen que codifica para una metilasa (*hpyIM*) y un gen que posiblemente codifica para una endonucleasa (*iceA1*) nos está indicando que el microorganismo tienen mecanismos que le permiten proteger su genoma de endonucleasas así como también de DNA foráneo, por lo que se podría decir que el microorganismo cuenta con su propio sistema de restricción y modificación. (37)



**Figura 12 Representación de la organización genómica de *iceA1*:** En la figura 12 a se observa la localización de *iceA1*, el cual está rodeado por los genes *cysE* y *hpyIM*. Se observa la posición de los dos posibles codones de iniciación TTG y ATG, la ubicación de las probables regiones promotoras (-35 y -10) y las 8 pb que separan el gen *iceA1* y *hpyIM*. En **b** se observa en blanco la presencia de mutaciones (en blanco) lo cual puede generar proteínas más cortas, en **c** se observa que otra causa por la cual la proteína generada puede ser truncada es por la presencia de inserciones (en negro).

En cuanto a *iceA2* se encontró que las secuencias son altamente diversas entre el codón de parada del gen *cysE* y el codón de inicio de *iceA2* oscilando desde 224pb hasta 338pb, adicionalmente se halló que el codón de inicio de *iceA2* está localizado aproximadamente 90pb después de un variable número de repeticiones

en tándem de una secuencia de 8pb (AAATACT, AAATACTT o AAACACTT). *iceA2* tiene una estructura de casete, que de acuerdo al orden de sus dominios peptidicos dividen al gen en subtipos *iceA2A*, *iceA2B*, *iceA2C*, *iceA2D* e *iceA2E*. En su forma corta *iceA2A* codifica para una proteína de 24 a.a que consiste en un dominio peptidico de 14 y 10 a.a. Las formas *iceA2B*, *iceA2C* codifican para una proteína de 59 a.a se caracterizan por tener la misma estructura de casete constituida por dominios peptidicos internos de 13, 16 y 6 a.a, además de los dominios de *iceA2A* de 14, 10 a.a, sin embargo, la diferencia entre *iceA2B*, *iceA2C* radica en el dominio central de 16 a.a. La forma *iceA2D* codifica para una proteína de 94 a.a, este casete está conformado por los dominios 14 y 10 además de repeticiones de los dominios de 13, 16 y 6 a.a con la diferencia que el primer dominio de 16 a.a es idéntico al de *iceA2B*, mientras que su repetición es idéntica al de *iceA2C*. La forma *iceA2E* codifica para una proteína de 129 a.a y está conformada por los mismos dominios del subtipo *iceA2D* con la diferencia que tiene tres repeticiones de cada dominio interno. (37) (Figura 13)



**Figura 13 Representación de la organización genómica de *iceA2*:** *iceA2* está rodeado por los genes *cysE* y *hpyIM*, entre *cysE* e *iceA2* hay una región de 8pb con repeticiones en tándem variables (VNTR), 90 pb corriente debajo de estas repeticiones se encuentra el codón de inicio del gen. Se han reportados 5 subtipos de *iceA2* los cuales se caracterizan por tener una estructura de casete que consiste en diferentes dominios peptidicos (representados en colores y con números) En la figura los números hacen referencia a los dominios peptidicos cuya sumatoria será igual al tamaño de la proteína producida. Es importante notar que estos dominios se repiten una o dos veces dependiendo del subtipo de *iceA2*.

*iceA*, en especial *iceA1* se ha considerado como un factor de virulencia debido a que es inducido tras la adherencia del microorganismo a la célula epitelial gástrica, y este tipo de interacción induce la expresión de genes involucrados con virulencia en otros patógenos gastrointestinales, esta hipótesis ha sido soportada por estudios epidemiológicos en los que se muestra asociación entre *iceA* y el desarrollo clínico de la enfermedad; sin embargo otros estudios han mostrado desacuerdo con esta asociación, sugiriendo que *iceA* refleja la variabilidad geográfica del microorganismo más que su relación con la patología producida.

(7,38, 5, 9)

### 3.3 Patogénesis

La mucosa gástrica se encuentra bien protegida contra infecciones bacterianas, sin embargo, como se ha descrito anteriormente *H.pylori* se ha adaptado de manera extraordinaria a las condiciones de la mucosa de tal forma que la ha convertido en su nicho ecológico; la bacteria entra a la mucosa gástrica, para lo cual secreta ureasa para amortiguar el pH ácido del estomago y mediante su flagelo y guiada por quimiotaxis se dirige hacia las células epiteliales gástricas en donde adquiere una orientación espacial adecuada hasta unirse a las células epiteliales mediante las adhesinas ya mencionadas, una vez allí secreta muchos de sus factores de virulencia y evade la respuesta inmune trayendo como consecuencia la persistencia y transmisión del microorganismo. (1)

#### 3.3.1 Respuesta Inmune del Huésped a *H.pylori*

*H.pylori* causa inflamación de la mucosa gástrica en las personas infectadas, esta respuesta inflamatoria inicial se debe al reclutamiento de neutrófilos seguido de linfocitos T, linfocitos B, células plasmáticas y macrófagos alrededor de la célula epitelial dañada. (1, 39, 40, 41)

La respuesta primaria es desencadenada por la adherencia de la bacteria a la célula epitelial, activando a células dendríticas, monocitos, macrófagos y neutrófilos. (1, 39, 40, 41) El patógeno en la mucosa puede ser detenido por la proteína D surfactante (SP-D) uniéndose al LPS O de la bacteria evitando su movimiento y disminuyendo la susceptibilidad a la infección, pero como se explicó anteriormente, una misma cepa de *H.pylori* puede modificar la cadena O del LPS

y evitar así dicha unión con SP-D. Adicionalmente, la bacteria una vez se adhiera a la mucosa puede ser reconocida por receptores presentes sobre las células epiteliales, macrófagos, neutrófilos y natural killer, como receptores Toll (TLR 2,4,5) y receptores NOD principalmente NOD1. Dentro de los TLRs, TLR2 reconoce lipopeptidos y estructuras del lípido A, sin embargo no se ha encontrado en células del epitelio gástrico por lo que el reconocimiento inicial sería dado por TLR 4 que reconoce LPS pero debido a que este es un activador pobre de la respuesta inmune innata TLR4 podría no detectarlo y así la bacteria escaparía a este tipo de reconocimiento. Otro de los TLR que si se encuentra presente en la mucosa gástrica es el TLR 5 que reconoce las flagelinas Fla A y Fla B pero al igual que el sucede con TLR 4 este reconocimiento es muy débil, lo cual posiblemente se deba a que TLR5 en individuos infectados con *H.pylori* se encuentra localizado principalmente en la parte basolateral de la célula epitelial gástrica y no en la apical, y *H.pylori* generalmente no invade la mucosa gástrica. Por otra parte está el receptor NOD 1 encargado de reconocer el tripeptido de muramilo del peptidoglicano que es secretado gracias al sistema de secreción tipo IV de la bacteria, desencadenando la activación de NF- $\kappa$ B y la posterior secreción de IL-8; por lo que se podría decir que en este caso en especial son más importantes los receptores NOD que los TLR. (40, 41)

Una vez reconocido el microorganismo por alguno de estos receptores es fagocitado y procesado para luego ser presentado en contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II a otras células del sistema inmune, sin embargo *H.pylori* puede evadir estos pasos ya que el microorganismo tanto antes como después de la fagocitosis produce arginasa de tal forma que no permite al macrófago usar la arginina para producir óxido nítrico y por ende evitando su muerte e induciéndosela al macrófago ya que al usar la L-arginina intracelular la bacteria la metaboliza hasta espermidina y posteriormente a espermina paso que

la bacteria revierte mediante la espermina oxidasa conllevando a la producción de peróxido de hidrogeno el cual desestabiliza la membrana interna del macrófago e induce apoptosis del mismo. Proceso que desencadena la secreción de IL-12 y de citocinas pro inflamatorias como IL-1, FNT- $\beta$ , IL-6. (40)

En cuanto a la repuesta inmune adaptativa frente a la infección por *H.pylori* hay controversia ya que aunque induce una fuerte celular y humoral en la mucosa, la producción de anticuerpos no permite erradicar la infección pero puede contribuir al daño del tejido. (1,40) Durante la respuesta inmune específica surgen diferentes grupos de linfocitos T, estas células participan en la protección a la mucosa haciendo distinción entre bacterias patógenas y comensales. Los linfocitos T ayudadores inmaduros (Th0) expresan CD4 pueden diferenciarse en Th1 o Th2 dependiendo del estímulo presente, ya que mientras que las primeras son inducidas por patógenos intracelulares, y se caracterizan por secretar IL-2, INF $\gamma$ ; las Th2 son inducidas por patógenos extracelulares secretan IL-4, IL-5, IL-10 y estimulan a los linfocitos B. (1) Debido a que *H.pylori* no es un patógeno invasivo e induce una fuerte respuesta humoral se esperaría que la respuesta fuera de tipo Th2, (1) sin embargo, reportes recientes indican que el microorganismo es capaz de invadir las células epiteliales tanto *in vitro* como *in vivo* y paradójicamente las células T de la mucosa gástrica generalmente presentan un fenotipo Th1 que promueven la inflamación. (39, 40, 41) Esta orientación hacia Th1 podría ser debido a un incremento en la producción de IL-8 a nivel antral en respuesta a la infección. Esta polarización hacia una respuesta Th1 combinada con la apoptosis de los clones de LT específicos para *H.pylori* mediada por Fas puede favorecer la persistencia de la infección.(1)

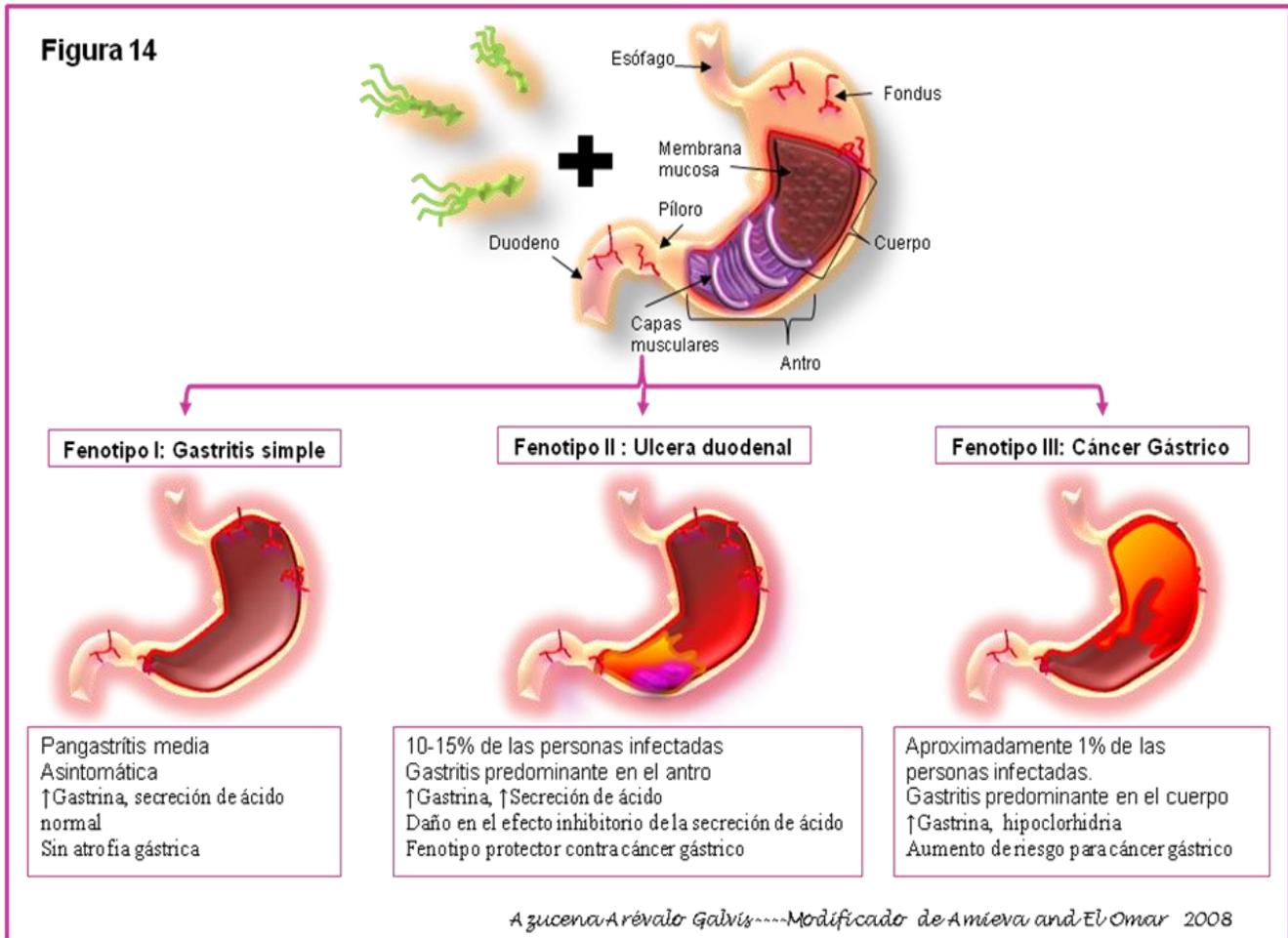
### **3.3.2 Consecuencias Clínicas de la Infección**

El curso clínico de la infección por *H.pylori* es altamente variable y está influenciado tanto por factores de la bacteria como del huésped, el patrón y la distribución de gastritis se ha correlacionado fuertemente con el riesgo de secuelas clínicas ya sea ulcera duodenal, gástrica, atrofia de la mucosa, carcinoma gástrico o linfoma gástrico.(4) Algunos autores han agrupado las anormalidades fisiopatológicas en tres fenotipos dependiendo también de la distribución de la gastritis, que podrían explicar por qué ocurre cierto desenlace. El fenotipo I es caracterizado por pangastritis media con poco daño en la secreción de ácido, este fenotipo es comúnmente visto en individuos que son asintomáticos y que no desarrollan una enfermedad gastroduodenal seria. El fenotipo II es también llamado fenotipo de ulcera duodenal y ocurre en más del 15% de los pacientes infectados, principalmente en occidente; este fenotipo es caracterizado por el predominio de una gastritis antral, estos pacientes tienen elevados niveles de gastrina así como de inflamación, una mucosa relativamente sana, además presentan alteración en el control de la secreción de ácido, contribuyendo a úlceras pépticas, principalmente duodenales y úlceras pre pilóricas. El fenotipo III “fenotipo de cáncer gástrico” es el más serio y se caracteriza por un patrón de gastritis predominante en cuerpo, gastritis atrófica multifocal e hipo o aclorhidria; fisiológicamente este fenotipo es caracterizado por baja secreción de ácido, altos niveles de gastrina y bajos niveles de pepsinógeno I/II. Figura 14.(1)

#### **Gastritis Aguda**

Esta fase de la colonización por *H.pylori* se ha asociado con síntomas de dispepsia transitorios y no específicos, tales como llenura, náuseas, vómito, inflamación considerable tanto en la zona distal como proximal en la mucosa gástrica o pangastritis. Esta fase se ha asociado con hipocloridria que se puede

resolver espontáneamente, sin embargo no se sabe con exactitud a que se debe esta resolución espontanea.(4) Esta fase se caracteriza por la infiltración de neutrófilos en la superficie del epitelio y por el inicio de cambios degenerativos, esta fase dura de una a cuatro semanas posterior a las cuales comienza una fase crónica con infiltrado de monocitos en la lamina propia. (42)



**Figura 14 Fenotipos de Gastritis:** En la figura la parte superior de la figura se representa la estructura del estómago humano sano. Cuando *H.pylori* coloniza el estómago puede causar diferentes formas de gastritis, (parte media de la figura) la cual dependiendo de su localización en el estómago puede dar lugar a el desarrollo de otras enfermedades mas severas como úlceras o cáncer.

### **Gastritis Crónica**

Cuando la colonización llega a ser persistente hay una correlación entre el nivel de secreción de ácido y la distribución de gastritis, esta correlación resulta de los efectos del ácido sobre la bacteria versus el crecimiento bacteriano asociado a la inflamación de la mucosa sobre la secreción de ácido y su regulación. Esta interacción es crucial en la determinación del desenlace de la infección. La gastritis crónica activa ocurre en la mayoría de los individuos infectados y consiste en la degeneración de la superficie epitelial, persistente infiltración de neutrófilos en epitelio y lamina propia e infiltración de mononucleares (linfocitos y células plasmáticas) en la lamina propia. (42) En pacientes con secreción de ácido intacta *H.pylori* coloniza particularmente el antro mientras que estén presentes células parietales secretoras de ácido, este patrón de secreción se ha asociado principalmente con gastritis antral. Pacientes en los cuales la secreción de ácido está dañada debido a varias causas, pueden tener una distribución bacteriana tanto en antro como en cuerpo permitiendo al microorganismo estar en un contacto más cercano con la mucosa dando lugar a pangastritis. (4)

### **Enfermedad Ulcero Péptica**

Las úlceras gástricas o duodenales, conocidas comúnmente como úlcera péptica se han definido como defectos en la mucosa con un diámetro de al menos 0,5cm de penetración a través de la muscularis mucosa. La úlcera gástrica ocurre con frecuencia a lo largo de la curvatura del estómago en particular en la transición de la mucosa del cuerpo al antro. Las úlceras duodenales usualmente ocurren en el bulbo duodenal, que es el área más expuesta al ácido gástrico. Pacientes con gastritis antral que es la forma más común de gastritis tienen predisposición a úlcera duodenal, mientras que pacientes con gastritis predominantes en cuerpo y atrofia multifocal tienen más probabilidad de úlcera gástrica y mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico. (4, 42, 43)

Tanto la ulcera gástrica como la duodenal se han relacionado con la colonización por *H.pylori*, reportes después de la primera década del descubrimiento del microorganismo muestran que el 95% de las úlceras duodenales y el 85% de úlceras gástricas ocurren en presencia de la bacteria, sin embargo solo el 15% de los pacientes infectados con el microorganismo desarrollan úlceras pépticas, (4; 44)

### **Gastritis Atrófica, Metaplasia Intestinal y Cáncer Gástrico**

La inflamación crónica inducida por *H.pylori* puede eventualmente permitir la pérdida de la arquitectura normal de la mucosa con destrucción de las glándulas gástricas y reemplazo por fibrosis y epitelio de tipo intestinal, las áreas que presentan pérdida glandular y metaplasia se extienden de manera multifocal con el tiempo incrementado el riesgo de cáncer gástrico de 5 a 90 veces, dependiendo de la extensión y la severidad de la atrofia.

Debido a que varios estudios realizados en casos y controles donde la incidencia de la infección por la bacteria se asocia con la prevalencia de cáncer y estudios soportados en modelos animales muestran la evidencia que *H.pylori* incrementa el riesgo de cáncer gástrico, la organización mundial ha designado el microorganismo como carcinógeno tipo I. Sin embargo, es importante resaltar nuevamente que la infección por el microorganismo incrementa el riesgo, mas esto no significa que el riesgo de desarrollar cáncer gástrico se deba exclusivamente *H.pylori* ya que también interfieren factores ambientales y del huésped. (1; 4)

### **Linfoma del Tejido Linfoide Asociado a Mucosas (MALT)**

La mucosa gástrica normalmente no contiene tejido linfoide pero el tejido linfoide asociado a mucosas siempre aparece en respuesta a la colonización por *H.pylori*,

en raros casos la población monoclonal de células B puede incrementarse de este tejido y lentamente proliferar a linfoma MALT, ocurre en menos del 1% de pacientes infectados con el microorganismo. Aunque ensayos aleatorios del efecto de la erradicación de *H.pylori* en pacientes con linfoma MALT no son factibles, Kusters *et al*, 2006 reporta que en varias serie de casos la erradicación la bacteria puede permitir la remisión total en aproximadamente el 60 s 80% de los pacientes, en donde un 10% continua con enfermedad mínima residual.

### **Desordenes Extra gastroduodenales**

*Helicobacter pylori* se ha relacionado con varios enfermedades extra gástricas como enfermedad coronaria, desordenes dermatológicos como rosácea y urticaria idiopática, enfermedad autoinmune de la tiroides y purpura trombocitopenica idiopática, anemia ferropenica, fenómeno de Raynaud, escleroderma y Gillan-Barret; sin embargo se requiere de más estudios que permitan evidenciar la asociación directa entre estos desordenes y la infección por *H.pylori* o que la erradicación de la bacteria contribuye con la mejoría de la patología como ocurre en pacientes con purpura trombocitopenica idiopática. (1)

### 3.4 Relación entre los Genotipos de Virulencia de *H.pylori* con la patología

*H.pylori* es el principal agente causal gastritis, úlceras pépticas, duodenales, linfoma tipo MALT y cáncer gástrico, sin embargo, solo en un 20% de la población infectada se desarrolla una enfermedad severa. El desarrollo de alguna complicación en la infección por el microorganismo depende de varios aspectos que involucran factores genéticos del huésped, factores ambientales y los factores de virulencia de la cepa infectante. (45)

Se han descrito varios genes de virulencia del microorganismo, los cuales difieren dependiendo del área geográfica y se han clasificado en tres categorías: La primera categoría incluye genes específicos de la cepa, que solo están presentes en *H.pylori*, dentro de esta categoría el más estudiado es el islote de patogenicidad *cag*, y como indicador de *PAI* se ha estudiado el gen *cagA*. En el segundo grupo se encuentran los genes de fase variable, es decir que pueden cambiar de estado dependiendo del crecimiento del microorganismo en diferentes condiciones, el estado funcional de estos genes está mediado por un mecanismo de deslizamiento del desapareamiento de nucleótidos y esta mediado por el número de repeticiones de guaninas y citocinas en la región 5' de los genes, dentro de este grupo están los genes que codifican para proteínas de membrana como *oipA*, *sabA*, *sabB*, *babA*, *babB*, *babC*. En la tercera categoría están los genes con estructura o genotipo variable dependiendo de la cepa, dentro de este grupo están los genes que tienen diferentes alelos y que a la vez permiten diferenciar el posible origen de las cepas, como por ejemplo *vacA*. (45)

En general, la presencia de *cagA* se ha asociado con presencia de úlcera péptica y cáncer gástrico. (46) En cuanto a *vacA* las diferentes combinaciones alélicas no solo determinan la producción de citotóxina, sino que están asociadas con la

patogenicidad de la bacteria, las cepas *vacA s1m1* producen más cantidad de citotóxina, las cepas *vacA s1m2* producen cantidades moderadas de citotóxina y las cepas *vacA s2m2* no producen toxina, así mismo las cepas *s1a* son más patógenas que las *s1b* y que las *s2* y se encuentran con más frecuencia en pacientes con úlceras. Las cepas con el tipo *m1* se encuentran más asociadas con daño epitelial gástrico que las cepas *vacA m2*.

Se ha sugerido que otros genes como *babA2* e *iceA*, también pueden estar implicados en las consecuencias clínicas de infección por *H.pylori*. Se ha sugerido por ejemplo que *babA2* juega un papel importante en el desarrollo de adenocarcinoma gástrico, úlcera péptica y gastritis severa mientras que *iceA* podría solo estar asociado con úlcera péptica.

Sin embargo, la relación entre la enfermedad y los factores de virulencia de *H.pylori* es controversial, mientras algunos autores reportan que no hay asociación otros autores sugieren lo contrario, sin embargo, se sigue en el estudio de las características del microorganismo que podrían influenciar el desarrollo de complicaciones gástricas y que a futuro podrían ser importantes blancos terapéuticos para erradicar el microorganismo.

Van Doorn, *et al*; 1998 estudio la relación entre la presencia de los genes *cagA*, *vacA* e *iceA* en biopsias gástricas de 94 pacientes y la enfermedad en Netherlands, encontrando que los genotipos más frecuentes fueron *cagA* (67%), *vacA s1am1* (36,2%) e *iceA1* (56,4%) los cuales se asociaron con la presencia de úlcera péptica sugiriendo que las cepas *cagA +/- vacA s1/ iceA1* son las más patógenas y que la presencia de estos genotipos puede usarse como marcadores de enfermedad ulcero péptica. (6)

Otros autores no concuerdan totalmente en que *iceA* este asociado con ulcera péptica, como propone Van Doorn, ya que en sus estudios han encontrado otro tipo de asociaciones; Miehle, *et al*, 2001 en Alemania estudió la frecuencia de los genotipos *vacA*, *iceA* y *cagA* y el patrón de gastritis en pacientes con cáncer gástrico, linfoma MALT, ulcera duodenal y dispepsia funcional, encontrando a nivel histológico mayor grado de gastritis en el cuerpo de pacientes con cáncer y linfoma MALT que en los pacientes con ulcera duodenal, sin embargo a nivel antral no se evidenció diferencias significativas. (47) En cuanto a la asociación del genotipo y la enfermedad solo se encontró asociación entre el genotipo *vacA* s1m1 y cáncer gástrico, pero no se encontró diferencias significativas con los otros genotipos evaluados, hallazgo que aunque concuerda con otros estudios Europeos, es difícil de comprender la ausencia de asociación entre *cagA+* y cáncer gástrico, teniendo en cuenta que se ha comprobado el potencial cancerígeno de los aislamientos con genotipos *cagA+*, lo cual probablemente se pueda deber a las variaciones que presenta la proteína CagA en los motivos EPIYA y que varía entre las diferentes aéreas geográficas.

C-F Zambon, *et al*; 2002 en Italia reporta asociación entre la presencia de los genes *cagA*, *vacA* s1m1 y *babA2* y metaplasia intestinal, sugiriendo que cada uno de estos genes tienen un papel patógeno en lesiones precancerosas. También reporta que aunque los genes estudiados fueron significativamente más frecuentes en pacientes con gastritis difusa, ulcera péptica o duodenitis que en gastritis antral, la inflamación solo se asocio con la presencia de *cagA+* y *vacA* s1. (48). Chin-Lin Perng, *et al*; 2004 investigó la presencia de los genotipos *cagA*, *vacA*, e *iceA* en 278 pacientes con sangrado de ulcera péptica en Taiwan, encontrando al igual que Leen-Jan Van Dorn, *et al*; 1998 que los genotipos más frecuentes fueron *cagA* (50%), *vacA* s1am1 (45,7%) e *iceA1* (45%), en todos los pacientes, sin embargo el genotipo *vacA* s1a m1 fue menor en pacientes con sangrado de ulcera péptica que en los pacientes con ulcera péptica sin sangrado,

en cuanto a *iceA1* no hubo diferencia significativa entre pacientes con úlceras sangrantes o en pacientes con ausencia de ellas.

Lobo, *et al*; 2005 en Brasil estudio la asociación entre los genotipos *cagA*, *vacA*, *babA2* y la enfermedad gástrica en 89 aislamientos de *H.pylori*, encontrando que el 48% de estos fueron positivos para *cagA*, el 58% para *vacA* s1m1 y el 16% para *vacA* s2m2, adicionalmente el 13% de los casos presento múltiples genotipos del gen *vacA*. Se encontró asociación entre la presencia de *cagA* y *vacA* s1 en un 79%. El gen *babA2* se detectó en el 47% de los aislamientos, pero a diferencia de lo reportado por Van Doorn, la presencia de estos genotipos presentó asociación con gastritis crónica, y no con úlcera péptica, en especial el gen *babA2*.

Torres, *et al*, 2009 en un estudio realizado en Cuba en 130 aislamientos de *H.pylori* coincide con otros estudios en que los genotipos más frecuentes son *cagA+*, *vacA* s1m1 y *babA2*. Encuentra que hay asociación significativa entre los genotipos *cagA+* y *vacA* s1m1 así como entre *vacA* s1m1 y *babA2+* y entre *cagA+* y *babA2+*. Al evaluar la asociación de cada uno de los genotipos, solo encontraron que *babA2* se asocio de forma significativa con úlcera duodenal y no con úlceras pépticas, sin embargo al combinar los genotipos *cagA+*, *vacA* s1m1 y *babA2+* también encontraron asociación significativa con úlcera duodenal, lo que podría significar que la presencia de estos tres genotipos en pacientes con dispepsia podría incrementar el riesgo de desarrollar úlcera duodenal.

Contrario a lo anterior, otros estudios reportan que no se hay asociación entre la patología desarrollada y los genes de virulencia de *H.pylori* ejemplo de ello es lo reportado por Yamaoka, *et al*; 1999, quienes evaluaron la presencia de *iceA* y su relación con *cagA* y *vacA* en 424 aislamientos procedentes de cuatro países diferentes (Colombia, Houston, Korea y Japón) y su posible relación con del

desenlace clínico de la enfermedad, confirmando una vez más que los genotipos encontrados especialmente de *vacA* e *iceA* difieren entre áreas geográficas, además los autores reportan que los genotipos estudiados no se asocian con el desarrollo clínico de la enfermedad. (49)

En Korea un estudio realizado por Kim, *et al*; 2001 muestra que no hay asociación entre los genotipos *cagA*, *vacA* s1cm1, *iceA1* y *babA2* y ulcera péptica, en su estudio encontró que los genotipos predominantes fueron *cagA+* (97,4% - 96,1%), *vacA* s1cm1 (61,9%), *iceA1* (84,2%), con una baja prevalencia de *babA2* (36,1%). Un estudio posterior realizado por Chomvarin, *et al*; 2008 en Tailandia concordó con los hallazgos previamente reportados por Kim tanto en los genotipos más frecuentes como en que no hay asociación entre los genes de virulencia, tanto de manera individual como en alguna de sus combinaciones con el desenlace clínico de la enfermedad. (50, 51)

En Colombia se han realizado varios estudios por diferentes grupos de investigación, los cuales han brindado aportes enriquecedores y que motivan a seguir con el estudio de los genotipos de virulencia del microorganismo que permitan elucidar los patrones de virulencia de la bacteria en el tiempo, sin embargo hasta el momento no se ha encontrado asociación entre los genotipos evaluados y las consecuencias clínicas de la infección.

Moncayo, *et al*; 2000 encontró que los 21 aislamientos estudiados procedentes de 73 pacientes con enfermedad ulcero péptica en Risaralda, el 74,1% fueron aisladas de pacientes con ulcera duodenal y el 28,4% de pacientes con ulcera gástrica, de estos aislamientos el 90,5% fueron positivas para *cagA*, el 80,9% presentaron un genotipo *vacA* s1m1 y el 19% un genotipo *vacA* s2m2, encontrando mayor prevalencia del genotipo *vacA* s1m1 en pacientes con ulcera duodenal que en pacientes con ulcera gástrica, sin embargo no se puede hablar de asociación con la enfermedad en este estudio ya que el objetivo del mismo fue identificar la presencia del gen *cagA* y *vacA*. (52)

Cittelly, *et al*; 2002 exploraron la relación entre la patología gástrica en pacientes con gastritis atrófica, metaplasia intestinal, ulcera péptica, cáncer gástrico y en pacientes asintomáticos con gastritis no atrófica y los genotipos de *H.pylori* provenientes de 137 aislamientos, encontrando una alta prevalencia del genotipo *cagA* (63,7%), *vacA* s1a (52,1%), *vacA* m1 (59,8%) e *iceA* (85%), en el estudio se encontró asociación entre la presencia del gen *vacA* s1m1 y *cagA*+ pero no con la presencia de *iceA* o alguno de sus alelos. A diferencia de otros estudios, no hallaron asociación individual entre los aislamientos *cagA* + y la patología, sin embargo como los genotipos *cagA*, *vacA* s1m1 fueron los más frecuentes, sugieren que estos podrían ser usados como marcadores de mayor virulencia. (53)

En otro estudio realizado en Colombia por Quiroga, *et al*; 2005 determinó la asociación entre los genes *vacA*, *cagA*, *cagE*, *babA2* y *oipA* en 166 aislamientos de *H.pylori* con las diferentes patologías presentes en la población estudiada, encontrando que los genotipos más frecuente fueron *cagA*+ (72,9%), *vacA* s1m1 (69,9%) seguidos por *oipA* (74,5%) y *babA2* (48,2%). Encontraron predominio de aislamientos con genotipos *cagA*+, *cagE*+ y *vacA* s1m1 (cepas citotóxicas), adicionalmente la presencia de los genes *oipA* y *babA2* fue más frecuente en cepas citotóxicas que en las no citotóxicas. La prevalencia de las cepas citotóxicas fue mayor en pacientes con cáncer, metaplasia y ulcera en comparación con la observada en pacientes con gastritis no atrófica, sin embargo, los autores no encontraron evidencia que sugieran que *babA2* u *oipA* podrían servir como marcadores de úlceras o cáncer gástrico. (8)

La asociación más cercana que se ha realizado con aislamientos Colombianos ha sido a nivel histológico un estudio realizado por Nogueira, *et al*, 2001 con biopsias gástricas procedentes de Portugal y de Colombia (Nariño) en el que reveló que los genotipos *cagA*+, *vacA* s1m1 se asocian con mayor grado de inflamación, infiltrado de neutrófilos, atrofia glandular y metaplasia intestinal, con

algunas diferencias de presentación entre los dos países, por ejemplo en Colombia el genotipo mas asociado con atrofia en cuerpo fue *cagA+*, mientras que en antro si la asociación con atrofia se presento para los genotipos *cagA+*, *vacA* s1m1. De acuerdo con el estudio la metaplasia intestinal se asocio principalmente con el genotipo *vacA* s1. (46)

### 3.5 Epidemiología

La prevalencia de *H.pylori* varía dependiendo la localización geográfica, el grupo étnico, el estado socioeconómico y la edad. (54) En occidente la prevalencia del microorganismo es más alta, en países en vía de desarrollo las cifras se mantienen constantes, donde más del 80% de la población es *H.pylori* positivo; mientras que en países industrializados las cifras declinan, llegando a estar presente en el 40% de la población, con cifras menores en niños y adolescentes que en adultos. En países en desarrollo los porcentajes de infección de *H.pylori* aumentan rápidamente en los primeros 5 años de vida y se mantiene constante, indicando que la bacteria se adquiere en etapas tempranas de la vida, sin embargo en países industrializados la prevalencia de la infección de *H.pylori* es baja durante la niñez y se incrementa lentamente con la edad. (4,55)

Estudios realizados en países desarrollados y subdesarrollados han revelado que hay varias formas mediante las que *H. pylori* puede ser adquirido, dentro de estas formas se ha contemplado una ruta de transmisión gastro-oral, como por ejemplo cuando se está expuesto al vomito de alguien infectado; oro-fecal que se cree que es la principal forma de transmisión especialmente en países subdesarrollados. (4)

El agua y los alimentos contaminados también funcionan como un vector importante.(55) Magalhanes *et al* 2006 reporta la importancia del agua como vector en países subdesarrollados al encontrar al microorganismo en un 33% de 36 muestras fecales humanas, en el 66% de muestras de aguas negras y en un 11% en muestras de río; lo cual también apoya la ruta de transmisión fecal oral. Adicional a esto, se ha observado que *H. pylori* se encuentra unido a cuerpos como por ejemplo levaduras, lo cual ha llevado a pensar que *H. pylori* podría tener una asociación simbiótica con las levaduras las cuales le servirían como reservorio y vehículo.

Se ha planteado una vía de transmisión intrafamiliar, en la que si uno de los padres está infectado, el hijo también lo estará; otra posibilidad es la transmisión directa de madre a hijo. Kunno et al. Reporta el hallazgo de cepas provenientes del jugo gástrico de niños de madres infectadas con el mismo patrón genético que las que provenían de sus progenitoras. Análisis de los genotipos *cagA*, *vacA* e *iceA* en familias hispanas en Houston también apoyan la hipótesis de Kunno *et al* revelado que los niños y sus madres portan el mismo genotipo de *H.pylori* (55)

M. Brian Fennerty, 2005 en su revisión cita las prevalencias de la infección por *H.pylori* en diferentes lugares del mundo hacia mediados de los noventas las cuales se distribuían así: Estados Unidos de un 30-40%, México, Sur América y África entre un 70-90%, Europa Occidental entre 30-50%, Europa Oriental un 70%, Asia entre un 70-80% y en Australia de un 20%. (54)

Michael G. Bruce, *et al* en 2008 realiza una revisión de la prevalencia del microorganismo en 19 países diferentes (India, Arabia Saudita, Bulgaria, China, Latvia, Tanzania, Taiwan, Alaska, Canadá, Líbano, Japón, Malaysia, Sur África, Turkia, Rusia, Korea del Sur, Iceland, Estonia y Suecia) encontrando que la prevalencia varía entre un 11% y 69%. En los estudios revisados por el autor se encontró relación entre los bajos niveles socioeconómicos y la alta prevalencia de *H.pylori*, así como altos niveles socioeconómicos y baja prevalencia *H.pylori*, sin embargo también se encontró que la prevalencia del microorganismo ha mostrado una disminución a nivel global debido al mejoramiento de las condiciones de higiene. (56)

En Colombia un estudio retrospectivo realizado por Bravo y col. 2003 mostró que la prevalencia de *H.pylori* en biopsias de estomago durante 1997 fue de 69.1%, los lugares con mayor prevalencia fueron Tunja 99.1%, Manizales 85.5%, costa atlántica con 65.4% y zona andina con 69.5%. Se encontró además una estrecha relación entre la edad y el tipo de lesión histológica ya que con el envejecimiento hubo disminución del diagnostico de gastritis no atrófica y mucosa gástrica normal.

En cambio en sujetos con gastritis atrófica multifocal, cáncer y ulcera gástrica la prevalencia tuvo un aumento proporcional con la edad. En Bogotá un estudio de casos y controles realizado por Martínez J. y col. se reporta que el 70% está infectado con el microorganismo. (57)

De acuerdo con las bases seroepidemiológicas de estudios de casos y controles, la bacteria fue clasificada en 1994 por la Agencia Internacional de la Investigación de Cáncer como carcinógeno clase I. ( 58) Un estudio prospectivo de 1526 casos de cáncer gástrico distal y 208 controles, mostró que los individuos colonizados por *H.pylori* tienen de 2.9-34.5 veces más probabilidad de desarrollar adenocarcinoma gástrico distal, dependiendo del grado de atrofia de la mucosa y de la presencia de metaplasia intestinal. Un metanálisis de 12 estudios, que incluyó 1228 casos de cáncer y 3406 controles mostró que los individuos positivos para *H.pylori* tienen un aumento en el riesgo de 6 veces de desarrollar adenocarcinoma gástrico comparado con los individuos negativos para *H.pylori*. Teniendo en cuenta lo anterior es importante desarrollar programas de prevención y guías de manejo para cada país de acuerdo a la prevalencia de la infección y datos de resistencia del microorganismo a los medicamentos usados para su erradicación.

### 3.6 Diagnóstico

La infección por *H.pylori* puede ser diagnosticada por métodos no invasivos o invasivos, la selección de la prueba adecuada depende de la clínica del paciente. Los métodos no invasivos incluyen el test de urea en aliento, pruebas serológicas y antígenos en materia fecal. Y los invasivos incluyen la biopsia y el cultivo. (2)

#### 3.6.1 Urea en Aliento (UTB)

El test de urea en aliento fue publicado por Kornberg *et al* en 1954 en un gato. (59) Permite evidenciar la actividad ureasa en el estomago, detecta de manera cualitativa la infección activa con una sensibilidad y especificidad de más del 90%, la prueba es indicada para el diagnostico inicial de la infección y para el seguimiento después de la terapia para confirmar erradicación en cuyo caso no debe realizarse antes de un intervalo de cuatro semanas para evitar falsos negativos. El test se puede realizar en niños mayores de seis años pero necesita ser validado en niños menores. (2) El test consiste en dar al paciente una solución de urea marcada con C13 o C14 y luego de 30 a 60 minutos se recolecta el aliento en un tubo para la subsecuente medición de C13 o C14. (42)

#### 3.6.2 Pruebas Serológicas

Las pruebas serológicas son ampliamente usadas para el diagnóstico de *H.pylori* en pacientes antes del tratamiento, aunque tienen sensibilidad de 92% y especificidad de 83% y los valores predictivos positivos y negativos son comparables con UTB y biopsia, (42) algunos autores reportan inconsistencia entre las pruebas serológicas y otras pruebas. (2)

Estos test usan un pool de antígenos de *H.pylori* como proteínas de superficie de alto peso molecular, proteínas citosólicas, extractos ácidos, o lisados completos de todo la célula, pero dentro de estos los antígenos inmunodominantes reconocidos por anticuerpos de pacientes infectados corresponden a varias proteínas citosólicas y proteínas de superficie; sin embargo debido a que las cepas de *H.pylori* difieren en cuanto a la localización geográfica estos métodos deben ser (2, 42) Las pruebas serológicas permiten determinar tanto anticuerpos totales (IgG, IgA e IgM) pero se ha encontrado mejores resultados al detectar solo IgG, sin embargo en paciente infectados con HIV la sensibilidad en la detección de IgG disminuye de un 50-60% vs 90%, por lo que un resultado negativo en estos pacientes debe confirmarse por UTB o biopsia. Aunque se han desarrollado pruebas de aglutinación rápida que permiten detectar IgG anti-*H.pylori* la sensibilidad y la especificidad de un poco menores en comparación al ELISA, por lo que cualquier resultado negativo debe ser confirmado por ELISA. Los ensayos que detectan IgA tienen sensibilidades variables (39-82%) comparado con los que detectan IgG sin embargo la detección de IgA es útil en individuos sintomáticos con IgG negativo. Su uso tiene limitaciones cuando se desea probar erradicación, no se debe realizar en niños pequeños. (42)

### **3.6.3 Antígenos en materia fecal**

La prueba de antígenos en materia fecal tiene una sensibilidad del 89 al 98% y una especificidad mayor al 90%, ha sido aprobado por la US Food Administration tanto para el diagnóstico como para realizar seguimiento de la infección, el test se debe realizar ocho semanas después de terminada la terapia. La prueba permite detectar antígenos del microorganismo mediante ELISA usando anticuerpos policlonales absorbidos a la placa. (42) Una de las ventajas es que se puede realizar en niños de todas las edades. (2)

En pacientes que presenten síntomas de alarma, como sangrado gastrointestinal, anemia, pérdida de peso y mayores de 50 años es recomendable realizar endoscopia para diagnosticar infección por *H.pylori*. En este caso con la muestra de biopsia de antro se realiza la prueba de ureasa la cual permite una detección rápida del microorganismo con una sensibilidad del 79-100% y una especificidad del 92 al 100%. Se pueden observar falsos negativos en pacientes con sangrado activo o reciente y en pacientes que están tomando antibióticos o componentes anti secretorios. (2)

### **3.6.4 Identificación de *H.pylori* en el laboratorio**

#### **3.6.4.1 Cultivo Microbiológico**

Debido a que *Helicobacter pylori* es un microorganismo fastidioso requiere de un medio de transporte enriquecido si la muestra de biopsia no se procesa en las 2 horas siguientes; uno de los problemas es que no hay un medio de transporte comercial además el cultivo del microorganismo no es sencillo, (42) por lo que el cultivo a partir de biopsias para diagnóstico y susceptibilidad de *H.pylori* no es enviado de rutina, pero está recomendado si la terapia de segunda línea falla. (2)

Para el cultivo y recuperación del microorganismo varios autores en sus estudios reportan diferentes medios usados, pero con la característica de que todos ellos son altamente enriquecidos. Se ha reportado el uso de medios de cultivo que contienen agar sangre al 5%, con caldo Brucella y 5% de suero fetal bovino Megráud *et al* reporta el uso de tres agares diferentes, entre ellos; Agar Columbia enriquecido con 10% de sangre humana sin antibióticos, medio de cultivo comercial selectivo para *H.pylori* (pylori agar-bioMérieux) y agar Wilkins Chalgren enriquecido con 10% de sangre humana, suplementado con vancomicina, cefsulodin, trimetropim y actidione. (60)

Megráud y Lehours, 2007 proponen que el medio debe incluir un agar base (agar cerebro corazón, Columbia o Wilkins) suplementos de crecimiento como sangre de cordero o suero cuya proporción debe oscilar ente 5-10% (incluyen vitaminas y oligoelementos), también se ha propuesto el uso de yema de huevo, charcoal, almidón y suplementos selectivos ya que las biopsias pueden venir contaminadas con flora bucal o intestinal, por lo que estos suplementos contienen vancomicina que inhiben cocos Gram positivos, polymixina, ácido nalidixico, colistín, trimethopim, o cefsulodin que inhibe bacilos gram negativos y nistatina o anfotericina B que inhiben hongos. (59)

Identificación fenotípica: Transcurrida la incubación en microaerofilia se procede a observar la morfología de las colonias, las cuales se caracterizan por ser pequeñas, circulares, lisas y transparentes. A partir del cultivo se realiza coloración de Gram, en el cual se deben observar bacilos curvos Gram negativos. (59)

Catalasa: mediante la prueba se estudia si el microorganismo en presencia de peróxido de hidrogeno es capaz de desdoblarlo en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O gracias a la presencia de la enzima. La prueba debe ser positiva para *H.pylori*. (59)

Oxidasa: para realizar la prueba se usan tiras impregnadas con oxalato de *p*-áminodimethylamina, se toma una colonia y se coloca sobre la tira, cuando la oxidación ocurre se produce indofenol desarrollándose un color rosado-purpura; mediante la prueba se puede evidenciar que la bacteria usa la vía respiratoria de citocromo C oxidasa. La prueba es positiva para *H.pylori*. (59)

Ureasa: la prueba se realiza suspendiendo una colonia en medio urea el cual contiene como indicador rojo de fenol, por lo que si la bacteria produce ureasa es capaz de desdoblar la urea en amonio y CO<sub>2</sub> aumentandose el pH y en consecuencia se desarrolla un color fucsia en el medio gracias a la presencia del indicador. (59)

#### **3.6.4.2 Diagnóstico molecular**

La detección de DNA de *H.pylori* usa como estrategia de investigación y ha propuesto usar como estrategia de diagnostico a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual se puede usar para identificar múltiples blancos genéticos dentro de los que se encuentran genes que codifican para factores de virulencia como *vac A* y sus diferentes alelos, *cagA*, genes que codifican para proteínas de superficie, *glmM (ure C)* entre otros y recientemente con algunas modificaciones a la PCR convencional (RFLP, PCR en tiempo real) se pueden identificar rápidamente mutaciones que confieren resistencia. (42)

La PCR es una técnica que sirve para la amplificación *in vitro* de secuencias de ADN específicas, en tres etapas; desnaturalización, es el paso en el que gracias a altas temperaturas se separan las hebras de DNA previamente extraído y cuantificado, la segunda fase es anillamiento, durante el cual los primers hibridan con secuencias complementarias a secuencias localizadas en los dos extremos 3` del segmento DNA que se desea amplificar a temperaturas que oscilan entre 37 a 65°C y finalmente durante la etapa de elongación o extensión; en la que la enzima Taq polimerasa termoestable con ayuda de MgCl<sub>2</sub> elonga los cebadores usando como molde ambas hebras de DNA empleando como sustrato los cuatro dNTPs hasta terminar la lectura del molde, por lo general esta fase se lleva a cabo a temperaturas entre 72 – 75°C. (61) La sensibilidad de la prueba depende de los primers usados. (42)

### 3.7 Tratamiento

El objetivo del tratamiento de *H.pylori* es lograr la eliminación completa del microorganismo, o por lo menos en un 80% con mínima inducción de resistencia y sin efectos colaterales mayores, una vez llevada a cabo el porcentaje de re infección es baja, lo que significa que los beneficios del tratamiento son durables. Sin embargo los antibióticos no pueden actuar solos ya que el pH ácido del estómago influye sobre la efectividad de los agentes antimicrobianos usados, razón por la cual se usan en combinación con un inhibidor de la bomba de protones (PPI) o ranitidina citrato bismuto. (2,62) Se recomienda usar terapia triple en la que se combinen un agente antisecretorio y dos antibióticos por 7 a 14 días, cuyos regímenes han sido evaluados y aprobados por la Food and Drug Administration (FDA). (2)

Las pruebas y el tratamiento de *H.pylori* está indicado en pacientes infectados con el microorganismo, mayores de 45 años con síntomas de dispepsia o dispepsia no ulcerativa, pacientes con úlcera péptica y bajo grado de gastritis, linfoma MALT, paciente con gastritis atrófica, pacientes cuyos parientes en primer grado tengan antecedentes de cáncer gástrico, pacientes con inexplicable anemia por deficiencia de hierro (ADH), pacientes con purpura trombocitopenica idiopática, pacientes que consuman anti inflamatorios no esteroideos (NSAID) que reciban tratamiento con PPI deben ser estudiados y tratados para *H.pylori* si están infectados con el microorganismo ya que la interacción entre PPI y la bacteria acelera la pérdida de glándulas especializadas. (2, 63) En niños con dolor abdominal recurrente, síntomas sistema gastrointestinal superior, con ADH que no respondan a suplemento con hierro y con exclusión de otras causas deben ser estudiados para confirmar infección por *H.pylori*. (63)

*H.pylori* es susceptible a muchos antimicrobianos *In vitro* pero *in vivo* solamente a unos pocos, la falta de actividad de estos *in vivo* se debe a varios factores, como por ejemplo la inhabilidad del medicamento de llegar a la mucosa gástrica en la concentración apropiada, inactivación del medicamento por el pH ácido y la tasa baja de crecimiento del microorganismo. En razón a esto es indispensable usar inhibidores de la bomba de protones (PPI) o antagonistas del receptor H<sub>2</sub> ya que estos incrementan el pH gástrico, permitiendo extender la vida media de los antibióticos usados; algunos PPI tienen efecto antimicrobiano ya que afectan de manera directa la fuerza motriz de la bacteria. (62)

El Consenso de Maastricht III realizado en el año 2000 se recomienda tres líneas de tratamiento; una terapia inicial triple estándar con PPI, claritromicina (500mg) y amoxicilina (1000mg) o metronidazol (400 ó 500mg) por 7 días a 14 días; está recomendada en lugares donde la resistencia a claritromicina no supera el 15-20% y el 40% al metronidazol. (62) El tratamiento de segunda elección está basado en una terapia cuádruple con bismuto y en lugares donde este no está disponible se recomienda usar PPI, amoxicilina o tetraciclina y metronidazol, se ha reportado una erradicación hasta del 91% al usar PPI tetraciclina y metronidazol. (62) Se usa cuando el tratamiento de primera línea ha fallado lo cual se puede asociar con resistencia, motivo por el cual el tratamiento debe ser guiado con base en los datos de pruebas de susceptibilidad (2) Para la terapia de tercera elección o terapia de rescate se ha propuesto dos clases de antibióticos una fluoroquinolona, levofloxacina y una rifamicina, rifabutin. Sin embargo se presentan dos inconvenientes el primero es que aun no hay pruebas de susceptibilidad a fluoroquinolonas estandarizadas para *H.pylori* y la segunda, el uso del rifabutin debe realizarse con cuidado ya que también se usa para *Mycobacterium* y se podría inducir resistencia. Es importante tener en cuenta que debido a la variedad de situaciones clínicas y a la disponibilidad de antibióticos en los diferentes países, no hay una recomendación específica para el tratamiento de tercera elección excepto la de realizar pruebas de susceptibilidad. (63)

## Capitulo 4.

### OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo General

Determinar la frecuencia de los genes de virulencia *cag A*, *vac A*, *ice A* y *bab A<sub>2</sub>* en sujetos con dispepsia funcional o ulcera péptica de la ciudad de Bogotá.

#### 4.2 Objetivos Específicos

1. Llevar a punto la extracción de DNA a partir de la estandarización del crecimiento de *H.pylori* en medio de cultivo líquido.
2. Determinar la frecuencia de genes de virulencia *cag A*, *vac A*, *ice A* y *bab A<sub>2</sub>* en los aislamientos de *H.pylori* por PCR.
3. Identificar los genotipos de *H. pylori* que se asocian con el fracaso terapéutico en los pacientes que recibieron tratamiento.

## Capítulo 5.

### METODOLOGIA

#### 5.1 Diseño del Estudio

El presente estudio es un estudio de corte transversal para identificar los genotipos de virulencia de *H.pylori* en pacientes con dispepsia funcional o úlcera péptica.

#### 5.2 Población y Muestra

##### 5.2.1 Población Universo

Aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori* obtenidos durante febrero 2009 y febrero de 2010.

##### 5.2.2 Población de estudio

Aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori* obtenidos de biopsias gástricas de pacientes con dispepsia funcional o úlcera péptica previo consentimiento informado en la Clínica Fundadores de Bogotá.

### 5.2.3 Descriptores de la población de estudio

Aislamientos de clínicos de *H.pylori* que se hayan obtenido de biopsias gástricas de pacientes con dispepsia funcional, reflujo gastroesofágico o úlcera péptica durante el período comprendido entre febrero de 2009 y febrero de 2010 conservadas de manera adecuada a -70°C en caldo Brucella® (BD) con glicerol (invitrogen) al 20% hasta su procesamiento.

Aislamientos de pacientes que cumplan con los criterios de inclusión y exclusión.

### 5.2.4 Criterios de inclusión

En el estudio se incluyeron pacientes que cumplieran con las siguientes características:

- ✎ Realización de endoscopia digestiva alta por síntomas dispépticos o de reflujo gastroesofágico.
- ✎ Con edad entre 19 y 70 años.
- ✎ Que no hayan recibido tratamiento previo para erradicación de *Helicobacter pylori*, ni medicamentos anti secretores durante las dos últimas semanas antes de entrar al estudio.

### 5.2.4 Criterios de exclusión

En el estudio no se incluyeron pacientes que:

- ✎ Presentaran enfermedades concomitantes serias (insuficiencia renal crónica, insuficiencia cardiaca descompensada, insuficiencia respiratoria, tumores enfermedades malignas)
- ✎ Con cirugía gástrica previa.
- ✎ Mujeres en embarazo o lactantes.
- ✎ Mujeres en etapa reproductiva que no estén planificando.

✎ Que presentaran enfermedades psiquiátricas, adicción a drogas o alcohol.

### 5.2.5 Muestra

✎ El tamaño de muestra corresponde a los aislamientos clínicos de *Helicobacter pylori* que se obtuvieron durante el período del estudio.

### 5.2.6 Definición de variables

El estudio evaluó la frecuencia de los genotipos de virulencia de *H.pylori* en los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión, de acuerdo a esto se definieron las variables relacionadas en la tabla No1.

**Tabla No 1:** Definición de variables por escala y unidad de medición.

TIPO DE VARIABLE	VARIABLE		ESCALA	UNIDAD DE MEDICIÓN
Dependiente	Genotipo de virulencia	<i>cagA</i>	Nominal	Presencia/Ausencia
		<i>vacA</i>	Nominal	Presencia/Ausencia
		<i>s1a</i>	Nominal	Presencia/Ausencia
		<i>s1b</i>	Nominal	Presencia/Ausencia
		<i>s1c</i>	Nominal	Presencia/Ausencia
		<i>s1/s2</i>	Nominal	Presencia/Ausencia
		<i>m1</i>	Nominal	Presencia/Ausencia
		<i>m2</i>	Nominal	Presencia/Ausencia
		<i>iceA1</i>	Nominal	Presencia/Ausencia
		<i>iceA2</i>	Nominal	Presencia/Ausencia
Independiente		<i>babA2</i>	Nominal	Presencia/Ausencia
		Edad	Razón	Años
		Genero	Nominal	Femenino/Masculino
		Características socioeconómicas	Nominal	Nivel Estrato,
		Sitio de aislamiento de la muestra	Nominal	escolaridad
		Procedencia	Nominal	Región
		Grupo Familiar	Numérica	Cantidad
		Motivo Consulta	Nominal	Antro/Cuerpo
Prueba diagnóstica (Cultivo/Histología/Ureasa)			Nominal	Enfermedad previa
				Positivo/Negativo
Falla terapéutica			Nominal	Positivo/Negativo

### **5.3 Recolección de Información, Procesamiento de Datos y Análisis de Estadístico**

Una vez comprobados los criterios de inclusión los sujetos que ingresaron al estudio firmaron un consentimiento informado y la información solicitada fue consignada en un formato único recolección precodificado. (Anexo B)

Con los datos obtenidos se realizó una base de datos en el programa PASW 18, donde se procesaron y analizaron estadísticamente.

### **5.4 Procedimiento (Cuadro No. 1)**

#### **5.3.1 Obtención de muestras**

Previo consentimiento informado, el médico tratante realizó endoscopia digestiva alta, se tomaron cuatro biopsias del antro y cuatro biopsias del cuerpo. Una de cada sitio se llevo a estudio de histología, una biopsia de antro se utilizó para la prueba de ureasa rápida. Las dos biopsias restantes de antro y cuerpo se usaron para cultivos, pruebas microbiológicas y de biología molecular.

#### **5.3.2 Transporte de las muestras**

Las dos biopsias restantes de antro y cuerpo que se usaron para cultivos y pruebas microbiológicas se depositaron en crioviales con 500 µl de caldo Brucella® (BD) y glicerol (invitrogen) al 20% una vez recolectada la muestra se mantuvieron en cadena de frío (2 a 8°C) hasta su procesamiento el cual se realizó antes de 24 horas posterior a su recolección.

### 5.3.3 Procedimiento microbiológico

#### Cultivo y aislamiento de *H.pylori*

Acorde con las normas de bioseguridad y protocolos de laboratorio de microbiología de la Universidad Javeriana para el cultivo de *H.pylori* se procedió a aislar el microorganismo de las muestras tomadas, tanto de biopsias de antro como de cuerpo, para ello las biopsias se maceraron hasta obtener una solución homogénea con un aplicador de madera estéril, previamente tratado con 1% de carbón activado, luego toda la muestra se vertió en agar Wilkins® Chalgren (BD) modificado para *H. pylori* (anexo C) y enriquecido con Isovitalax® (anexo D) y suplemento antibiótico DENT (anexo E), posteriormente se incubo a 37°C con 11% de CO<sub>2</sub> durante tres a 14 días. Una vez se recuperó la bacteria se realizaron pruebas de identificación (tinción de Gram, catalasa, oxidasa y ureasa), y se procedió a obtener colonias puras del microorganismo.

Para la obtención de colonias puras se realizaron siembras por duplicado, una de las cajas fue usada para realizar cultivo líquido y obtener mayor biomasa del microorganismo para posteriormente realizar extracción de DNA y genotipificación, y la otra para conservar el aislamiento a -70°C en caldo Brucella® (BD) y glicerol (invitrogen) al 20% y así mantener reserva del microorganismo.

**Cultivo Líquido:** Previo a su implementación para la extracción de DNA, se estandarizó y optimizó, para lo cual se usaron varios modelos estadísticos:

1. Se uso un diseño de Box Bechenken que se caracterizó por incluir factores categóricos y/o numéricos representados en tres niveles (-1, 0,+1), este diseño permitió seleccionar las condiciones del medio de cultivo (agitación, tiempo, inóculo).

2. Posteriormente, se uso un diseño general factorial para analizar la influencia de aditivos que permitieran disminuir tensión superficial, ensayando bloques de agar-agar, agarosa y bolas de alginato, esto se evaluó teniendo en cuenta los resultados del experimento del paso 1.
3. Luego de obtener los resultados del paso 1 y 2 y partiendo de ellos se procedió a evaluar el comportamiento del microorganismo frente a varios medios de cultivo (BHI, caldo Brucella, Mueller Hinton) dos suplementos antibióticos (DENT y Preston), dos suplementos vitamínicos (Isovitalex y Vitox) y tres clases de derivados sanguíneos (Suero Fetal bovino, sangre de cordero, sangre de caballo), para esto se usó un diseño de reducción D-óptimo, teniendo en cuenta que es un diseño que permite estudiar de 1 a 12 variables con diferentes niveles de estudio
4. Finalmente, teniendo en cuenta los resultados de los diseños anteriores, se selecciono un segundo diseño de Box Bechenken para estudiar los niveles numéricos de las variables seleccionadas con anterioridad. (Anexo final- Artículo)

Luego de la estandarización del medio liquido procedió a inocular el microorganismo, para lo cual, a partir de uno de los cultivos en medio solido se realizó una suspensión bacteriana en 4,3ml de caldo BHI, suspensión que posteriormente se inoculó en 76,22ml del medio de cultivo liquido anteriormente descrito y se incubó por 12 horas a 37°C, en agitación de 60rpm con suministro directo de 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurridas las 12 horas de incubación se procedió a realizar pruebas confirmatorias del microorganismo y extracción de DNA.

#### **5.3.4 Procedimiento molecular**

La identificación de los genotipos *cag A*, *vac A*, *ice A* y *bab A<sub>2</sub>* se realizó en todos los aislamientos de *H.pylori* obtenidos.

#### **Extracción de ADN cromosomal**

A partir del medio de cultivo liquido se realizó extracción de DNA, para lo cual se tomaron 2ml del cultivo, se agitaron y centrifugaron a 10.000r.p.m por 4 minutos,

trascurridos los cuales se descarto el sobrenadante, obteniéndose pellet bacteriano.

A los pellets del microorganismo se le agregó 1ml de DNAzol® (invitrogen) (anexo G) agitando con la pipeta muy bien evitando la formación de espuma hasta homogenización completa. Se centrifugó a 10.000 r.p.m. por 10 minutos, el sobrenadante obtenido se transfirió a un eppendorf estéril y se trató con 500ul de etanol al 100%, mezclándose por inversión para precipitar el DNA. Para esto se centrifugó a 4.000 r.p.m. por 3 minutos, se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó 2 veces con etanol al 75%, posteriormente se dejó evaporar el etanol y se agregó 500-1000ul de NaOH 8mM sobre el DNA de tal manera que se observara una solución homogénea.

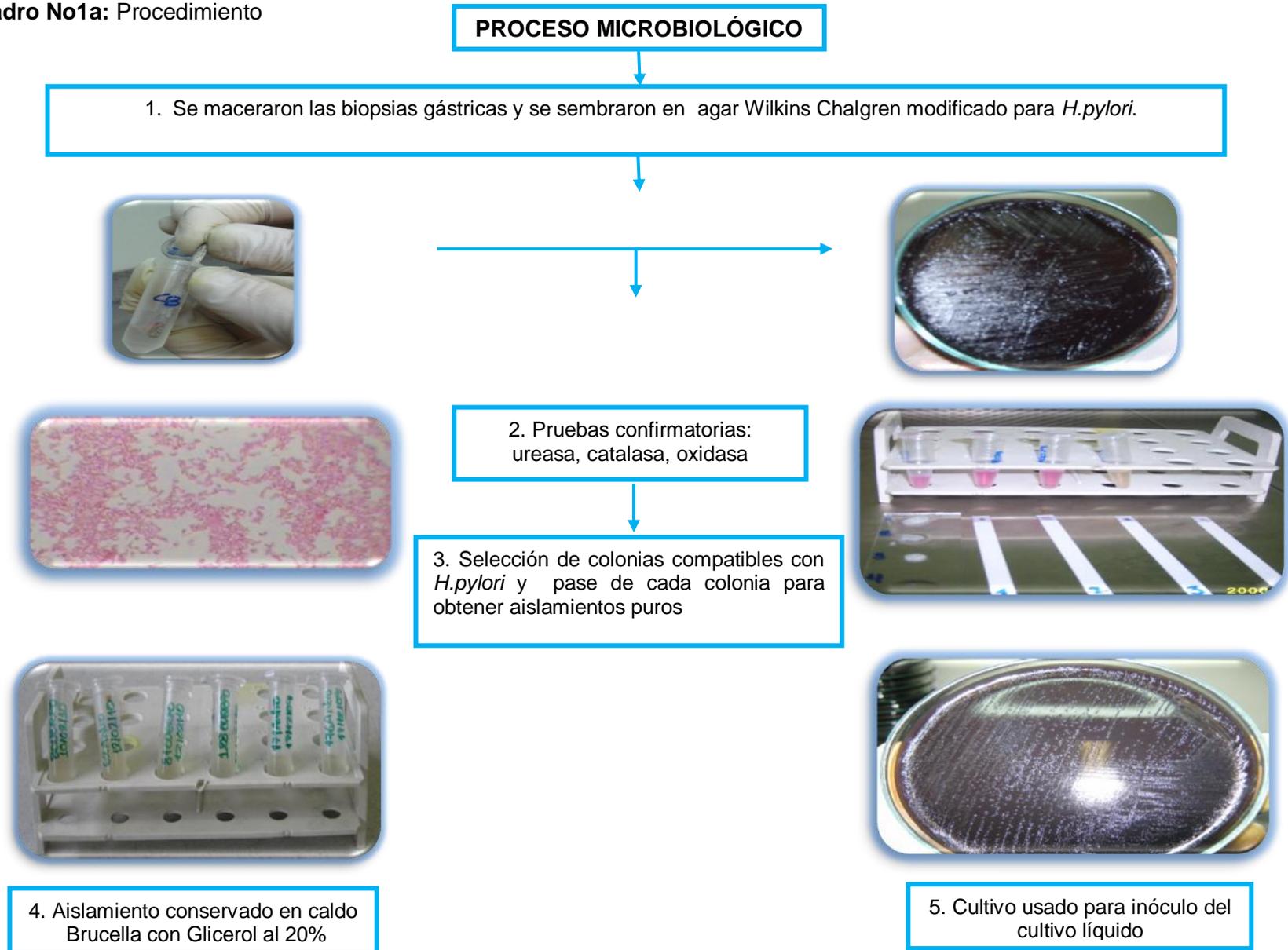
#### **Aplificación de los Genes *cag A*, *vac A*, *ice A* y *bab A<sub>2</sub>***

La amplificación de los genes *cag A*, *vac A*, *ice A* y *bab A<sub>2</sub>* y de los alelos de *vac A* e *iceA* se realizó usando primers citados por la literatura; (Tabla No 2 ) para *cagA* y *vacA*, la PCR se realizó de acuerdo a los protocolos del laboratorio de microbiología de la Universidad Javeriana, y para la determinación *ice A* y *bab A<sub>2</sub>* se realizó estandarización de las PCR.

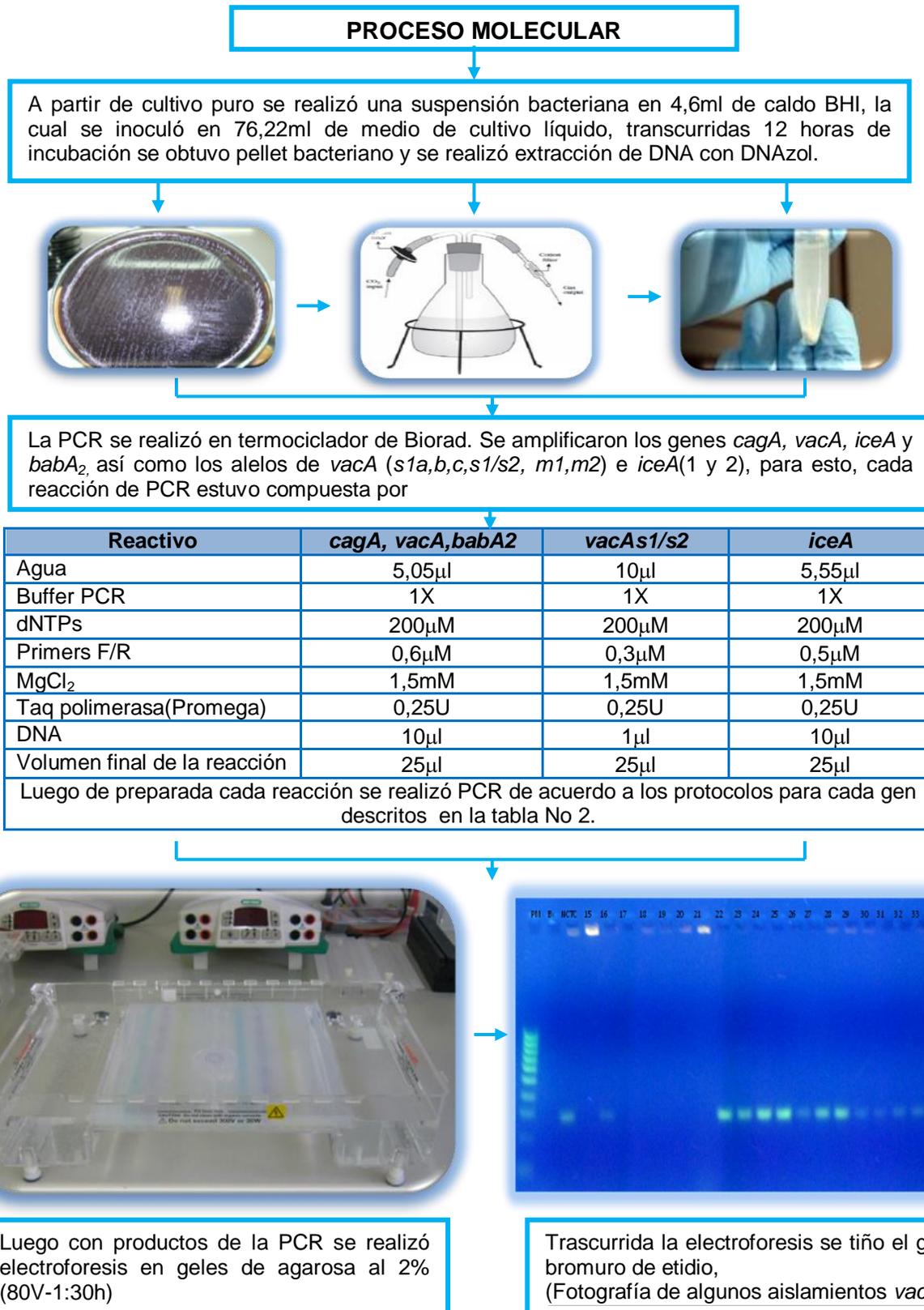
TablaNo. 2: Primers usados y condiciones de la PCR

GEN	REFERENCIA	PRIMER FORWARD / REVERSE	TAMAÑO pb	Denaturacion inicial	Denaturación	Hibridación	Extensión	Extensión final	Ciclos	No Acceso Genk Bank
<i>cagA</i>	Van Doorn,L.J. 1998	TTG ACC AAC AAC CAC AAA CCG AAG	183	94°C -9min	95° 30seg	50°C-45 seg	72°-45seg	72°-5min	40	L1174
		CTT CCC TTA ATT GCG AGA TTC C								
<i>vacA s1/s2</i>	Atherton, J.C,1995, Erzlin, Y. 2006	ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC	259(s1)	95°-2min	95°-30seg	52°-30seg	72°-30seg	72°-5min	40	U29401
		CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	286(s2)							
<i>vacA s1a</i>	Erzin, Y. 2006	GTC AGC ATC ACA CCG CAA C	190		94°-1min	52°-1min	72°-1min	72°-5min	35	U05676
		CTG CTT GAA TGC GCC AAA C								
<i>vacA s1b</i>	Erzin, Y. 2006	AGC GCC ATA CCG CAA GAG	187		94°-1min	52°-1min	72°-1min	72°-5min	35	No hay coordenadas publicadas
		CTG CTT GAA TGC GCC AAA C								
<i>vacA s1c</i>	Erzin, Y. 2006	TTA GTT TCT CTC GCT TTA GTR GGG YT	220		94°-1min	52°-1min	72°-1min	72°-5min	35	No hay coordenadas publicadas
		CTG CTT GAA TGC GCC AAA C								
<i>vacA m1</i>	Atherton, J.C,1995	GGT CAA AAT GCG GTC ATG G	290	95°-2min	94°-30 seg	52°- 30 seg	72°-30 seg	72°-5min	40	U05676
		CCA TTG GTA CCT GTA GAA AC								
<i>vacA m2</i>	Atherton, J.C,1995	GGA GCC CCA GGA AAC ATT G	352	95°-2min	94°-30 seg	52°-30 seg	72°-30 seg	72°-5min	40	U05677
		CAT AAC TAG CGC CTT GCA C								
<i>iceA1</i>	Van Doorn, 1998,Chomvarin, M.L, 2008	GTG TTT TTA ACC AAA GTA TC	247	95°C -2min	94° 30seg	50°C-30 seg	72°-30seg	72°-5min	40	U43917.1
		CTA TAG CCA STY TCT TTG CA								
<i>iceA2</i>	Chomvarin, M.L, 2008	GTT GGG TAT ATC ACA ATT TAT	229	95°C -2min	94° 30seg	50°C-30 seg	72°-30seg	72°-5min	40	No hay coordenadas publicadas
		TTT CCC TAT TTT CTA GTA GGT								
<i>babA2</i>	Mizushima, T. 2001,Erzin, Y. 2006	AAT CCA AAA AGG AGA AAA AGT ATG AAA	832	95°C -5min	92° 1min	52°C-1min	72°-1min	72°-5min	35	No hay coordenadas publicadas
		TGT TAG TGA TTT CGG TGT AGG ACA								

Cuadro No1a: Procedimiento



Cuadro No1b: Procedimiento



### 5.3.5 Verificación de la Erradicación en los pacientes que recibieron tratamiento

Los pacientes que fueron positivos para *H.pylori* recibieron tratamiento antibiótico durante diez días, el esquema terapéutico solo lo conoció el médico tratante. Transcurridas seis semanas de terminado el tratamiento se verificó erradicación del microorganismo mediante la prueba de ELISA de antígenos fecales (Ridascreen®), para lo cual a cada paciente se le solicitó una muestra de materia fecal y se proceso de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial.

La prueba para la detección de antígenos fecales para *H.pylori* es un enzimoimmunoensayo que emplea una placa para la determinación de antígenos de *H.pylori* en muestras de heces. Los pozos de la placa están recubiertos con anticuerpos monoclonales contra antígenos de *H.pylori*. Para la prueba se emplea el sobrenadante de una suspensión de heces, la cual si tiene antígenos de *H.pylori* presentes, al entrar en contacto con los anticuerpos de la placa y con los presentes en el conjugado (anticuerpos marcados con peroxidasa) formaran un complejo tipo sándwich, reacción que se deja incubar durante una hora. El conjugado de enzima que no se combina se elimina mediante lavados con micropipeta. Posterior a los lavados, se añade el sustrato para la peroxidasa, si la muestra es positiva, la enzima enlazada transforma el color de la solución en los pozos de la microplaca de incolora hacia azul, sin embargo luego de agregar la solución de parada, se produce un cambio de color de azul a amarillo. La prueba se lee por absorbancia, la cual es proporcional a la concentración de antígeno de *H.pylori* en la muestra. (Anexo H)

## Capitulo 6.

### RESULTADOS

Los resultados se dividieron en cuatro partes, la primera describe el mejor medio líquido para el crecimiento de *H.pylori*, a partir del cual se realizó la extracción de DNA. La segunda parte describe las características generales de la población, la tercera parte describe la concordancia de las pruebas diagnosticas y la cuarta parte hace referencia a la distribución de los genotipos de virulencia de *H.pylori*.

#### 6.1 Medio de cultivo líquido más apropiado para el crecimiento de *H.pylori*

Como resultado de la estandarización del medio de cultivo liquido, se obtuvo que el mejor medio fue: caldo BHI, bloques de agarosa de 1cm<sup>2</sup> (1,5% p/v), sangre de cordero (3,18% v/v), suplemento vitamínico VITOX (0,52% v/v) y suplemento antibiótico DENT (5% v/v).

#### 6.2 Descriptores generales de la Población

Se realizaron 119 aislamientos de *H.pylori* obtenidos de 79 pacientes que asistieron al servicio de gastroenterología de la Clínica Fundadores en la ciudad de Bogotá entre febrero 2009 y febrero de 2010 que cumplieron con los criterios de inclusión, de estos, 54 (63.4%) fueron mujeres y 25 (31.6%) hombres, con edad promedio de 44 años ( $\pm 10$ ) y 44 años ( $\pm 12$ ) respectivamente.

La distribución de las variables relacionadas con características sociodemográficas (procedencia, estrato socioeconómico, grado de escolaridad, número de miembros de la familia), antecedentes familiares y motivo de consulta, se observan en las tablas 3-9.

De acuerdo con la procedencia el 91,2% (72/79) de los sujetos fueron del área andina, y el 8.8% de los hombres procedían de otras regiones.

**Tabla 3:** Distribución de los sujetos de acuerdo con la procedencia.

PROCEDENCIA	MUJERES		HOMBRES		TOTAL	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
Andina	54	(100%)	18	(72%)	72	(91,2%)
Pacifica	0	(0%)	3	(12%)	3	(3,8%)
Oriental	0	(0%)	2	(8%)	2	(2,5%)
Caribe	0	(0%)	2	(8%)	2	(2,5%)
Total	54	(100%)	25	(100%)	79	(100%)

En cuanto a la variable de estrato socioeconómico, se evaluó de acuerdo al estrato social al que pertenecían, observándose que el 55,7% (44/79) de los sujetos en estudio correspondía al estrato 3.

**Tabla 4:** Distribución del nivel socioeconómico de los sujetos

ESTRATO	MUJERES		HOMBRES		TOTAL	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
2	9	(16,7%)	5	(20%)	14	(17,7%)
3	31	(57,4%)	13	(52%)	44	(55,7%)
4	10	(18,5%)	5	(20%)	15	(19%)
5	4	(7,4%)	2	(8%)	6	(7,6%)
Total	54	(100%)	25	(100%)	79	(100%)

Con respecto al grado de escolaridad se observó que el 43% (34/79) de los individuos se caracterizaron por tener estudios universitarios completos.

**Tabla 5:** Distribución de la escolaridad de los sujetos

ESCOLARIDAD	MUJERES		HOMBRES		TOTAL	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
Primaria incompleta	1	(1,9%)	0	(0%)	1	(1,3%)
Primaria	0	(0%)	2	(8%)	2	(2,5%)
Secundaria incompleta	1	(1,9%)	2	(8%)	3	(3,8%)
Secundaria	4	(7,4%)	1	(4%)	5	(6,3%)
Técnica	0	(0%)	1	(4%)	1	(1,3%)
Universitaria Incompleta	2	(3,7%)	2	(8%)	4	(5,1%)
Universitaria	22	(40,7%)	12	(48%)	34	(43%)
Posgrado	24	(44,4%)	5	(20%)	29	(36,7%)
Total	54	(100%)	25	(100%)	79	(100%)

Con relación a la cantidad de integrantes del grupo familiar, se observó que la mayoría de los sujetos vivían con cuatro 32,4% (25/77) y tres 31.2% (24/77) personas.

**Tabla 6:** Distribución del número de integrantes de la familia de cada sujeto

No. Integrantes	MUJERES		HOMBRES		TOTAL	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
1	2	(3,8%)	2	(8%)	4	(5,2 %)
2	9	(17,3%)	4	(16%)	13	(16,9%)
3	16	(30,8%)	8	(32%)	24	(31,2%)
4	18	(34,6%)	7	(28%)	25	(32,4%)
5	5	(9,6%)	4	(16%)	9	(11,7%)
6	2	(3,8%)	0	(0%)	2	(2,6%)
Total	52	(100%)	25	(100%)	77	(100%)

Con respecto a la variable de antecedentes de enfermedad gastroduodenal, cáncer gástrico y linfoma tipo MALT en la familia, se observó que el 59,5% (47/79) de los sujetos referían tener antecedentes familiares de gastritis. El 27,8% (22/79) antecedentes familiares de cáncer gástrico y el 1,3% (1/79) linfoma tipo MALT. Tablas 7-8.

**Tabla 7:** Distribución de los antecedentes familiares de enfermedad gastroduodenal

ENFERMEDAD GASTRODUODENAL	N	%
Gastritis	47	59,5%
Úlcera péptica	3	3,8%
Hernia hiatal	1	1,3%
Sin antecedentes	28	35,4%
Total	79	100%

**Tabla 8:** Distribución de los antecedentes familiares de cáncer gástrico y linfoma tipo MALT.

Cáncer-linfoma	N	%
Cáncer gástrico	22	27,8%
Linfoma tipo MALT	1	1,3%
Sin antecedentes	56	70,9%
Total	79	100%

De acuerdo con el motivo principal de consulta de los sujetos que ingresaron en el estudio, se observó que el 50,6% ingresó por dispepsia. Los pacientes que entraron por motivos diferentes a los enunciados en la tabla 9 comprenden: cuerpo extraño, cirugía, antecedentes de cáncer gástrico y de colon.

**Tabla 9:** Distribución de los sujetos de acuerdo al motivo de consulta.

MOTIVO CONSULTA	MUJERES		HOMBRES		TOTAL	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
Dispepsia	25	(47,2%)	15	(60%)	40	(50,6%)
Reflujo	8	(15,1%)	6	(24%)	14	(18%)
Anemia	1	(1,9%)	0	(0%)	1	(1,3%)
Disfagia	5	(9,4%)	1	(4%)	6	(7,6%)
Pérdida de peso	2	(3,8%)	0	(0%)	2	(2,5%)
Otros	12	(22,6%)	3	(12%)	15	(19%)
Total	53	(100%)	25	(100%)	78	(100%)

### 6.3 Concordancia de las pruebas utilizadas en el diagnóstico de *H.pylori*

Las pruebas utilizadas en este estudio para el diagnóstico de *H.pylori* fueron la histología, el cultivo y la ureasa. Con el fin de evaluar su desempeño en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad gastroduodenal producida por *H.pylori* se realizaron pruebas de concordancia, las cuales tienen por objeto establecer el grado de comparación entre los resultados de dos pruebas diagnósticas y así determinar si las dos pruebas producen resultados lo suficientemente comparables de tal forma que los haga intercambiables.

Para la evaluación de la concordancia se consideró como patrón de oro a la histología, observándose la mejor concordancia entre el cultivo y la histología. Tabla 10.

**Tabla 10:** Concordancia de las pruebas utilizadas en el diagnóstico de *H.pylori*.

PRUEBA	Concordancia (%)	IC 95%
Histología vs Cultivo	96%	91,6 - 100%
Urea vs Cultivo	82%	73,5 - 90,4%
Histología vs Urea	81,6%	73 - 90,2%

### 6.4 Distribución de genotipos de virulencia de *H.pylori*

El análisis de la distribución de los genotipos de virulencia de *H.pylori* se realizó mediante PCR alelo específico en 119 aislamientos del microorganismo obtenidos de 79 pacientes que al cultivo fueron positivos. De esos 119 aislamientos, 60 (50,4%) fueron de antro y 59 (49,6%) de cuerpo.

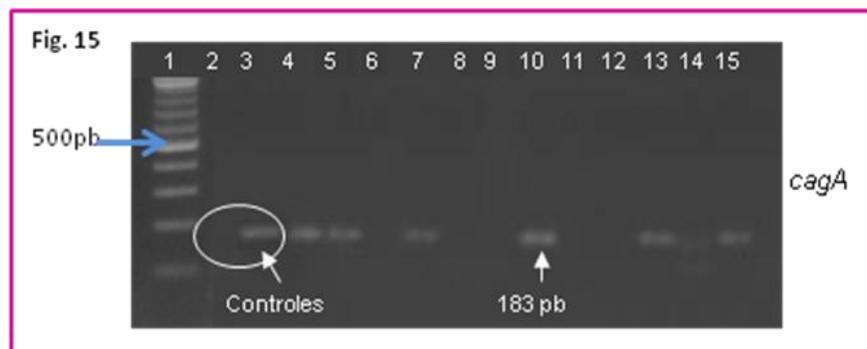
### 6.4.1 Presencia del gen *cagA*

De los aislamientos analizados se encontró presencia del gen *cagA* en 71,4% (85/199) de los casos, distribuidos en antro y cuerpo. Tabla 11. El tamaño de los productos amplificados del gen *cagA* producen una banda de 183pb, como se observa en la figura 15.

**Tabla 11:** Presencia del genotipo *cagA* en aislamientos obtenidos de biopsias gástricas de antro y cuerpo.

Genotipo <i>cagA</i>	Antro		Cuerpo		Total		P
	N	(%)	N	(%)	N	(%)	
Positivo	42	(70%)	43	(72,9%)	85	(71,4%)	0,87 (NS)
Negativo	18	(30%)	16	(27,1%)	34	(28,6%)	0,62 (NS)
Total	60	(100%)	59	(100%)	119	(100%)	

❖ Genotipo más frecuente.



**Figura 15 Electroforesis de la amplificación de *cagA*:** Carril 1: Patrón de peso molecular. Carril 2: Blanco. Carril 3: Control positivo, cepa de referencia de *H.pylori* NCTC11637. Carril del 4 al 15: Aislamientos de pacientes de *H.pylori* tanto positivos como negativos para *cagA*.

#### 6.4.2 Presencia del gen *vacA*

Para la genotipificación del gen *vacA* se realizó tipificación para los alelos s1, s2, m1 y m2. Adicionalmente, se realizó tipificación de los subtipos del alelo s1 (s1a, s1b, s1c) para cada una de las cepas. Se encontraron ocho combinaciones, de los subtipos del alelo s1 y s2 con el alelo m, siendo *vacAs1am1* y *vacAs1am2* las combinaciones más frecuentes. Tabla 12. Los tamaños de los diferentes amplificadores producidos por cada uno de los alelos de *vacA* se pueden observar en las figuras 16.1 a 16.5.

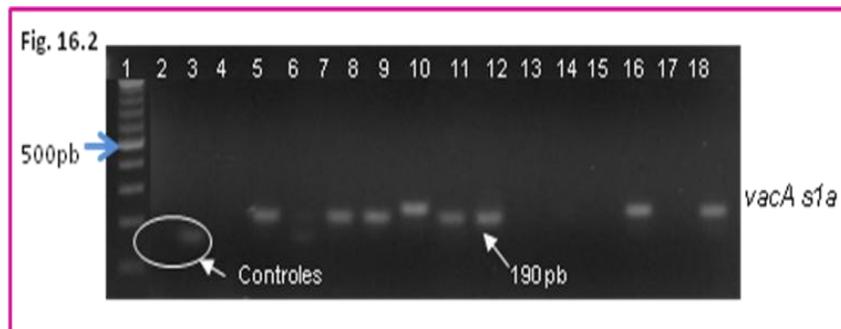
**Tabla 12:** Combinaciones de los alelos del gen *vacA* en aislamientos obtenidos de biopsias gástricas de antro y cuerpo.

Genotipo <i>vacA</i>	Antro N %	Cuerpo N %	Total N %	p
<i>vacA</i> s1am1*	24 (40%)	23 (39%)	47 (39,5%)	0,83 (NS)
<i>vacA</i> s1am2 *	16 (26,7%)	22 (37,3%)	38 (31,9%)	0,16 (NS)
<i>vacA</i> s1bm1	2 (3,3%)	4 (6,8%)	6 (5%)	0,24 (NS)
<i>vacA</i> s1bm2	2 (3,3%)	1 (1,7%)	3 (2,5%)	0,41 (NS)
<i>vacA</i> s1cm1	3 (5%)	0 (0%)	3 (2,5%)	0,014 (NS)
<i>vacA</i> s1cm2	4 (6,7%)	5 (8,5%)	9 (7,6%)	0,63 (NS)
<i>vacA</i> s2m2	8 (13,3%)	2 (3,4%)	10 (8,4%)	0,073 (NS)
<i>vacA</i> s2cm1	1 (1,7%)	2 (3,4%)	3 (2,5%)	0,41 (NS)
Total	60 (100%)	59 (100%)	119 (100%)	

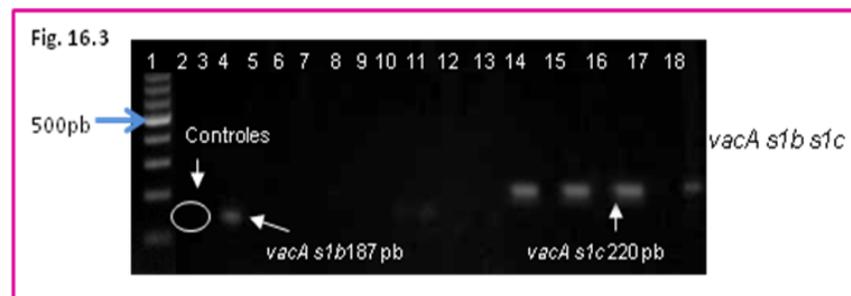
❖ \*Genotipos más frecuentes.

Figura16. Electroforesis de los alelos del gen *vacA*.

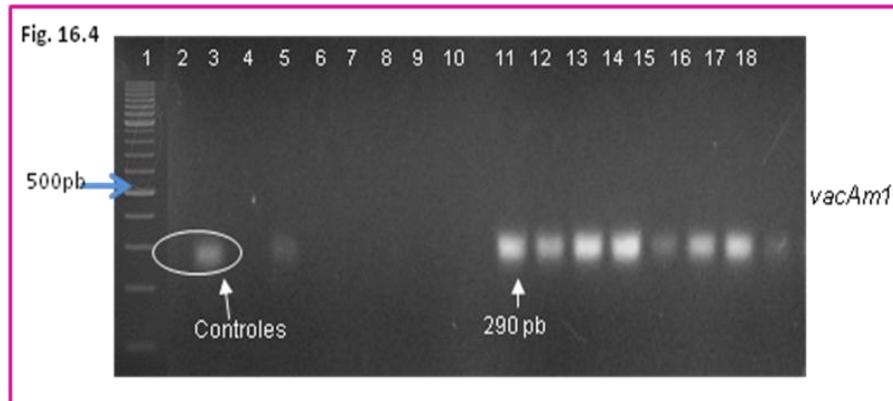
**Figura 16.1 Electroforesis de la amplificación de *vacAs1-s2*:** El producto amplificado de este gen produce una banda de 259pb para el alelo *s1* y de 286pb para el alelo *s2*. Carril 1: Patrón de peso molecular. Carril 2: Blanco. Carril 3: Control positivo, cepa de referencia de *H.pylori* NCTC11637 (*vacAs1*). Carril del 7, 10, 14: Algunos aislamientos de pacientes de *H.pylori* con alelo *vacAs1*. Carril 5,8,11,12: Algunos aislamientos de pacientes de *H.pylori* con alelo *vacAs2*.



**Figura 16.2 Electroforesis de la amplificación de *vacAs1a*:** El producto amplificado de *vacAs1a* produce una banda 190pb. Carril 1: Patrón de peso molecular. Carril 2: Blanco. Carril 3: Control positivo, cepa de referencia de *H.pylori* NCTC11637 (*vacAs1*). Carril del 7, 10, 14: Algunos aislamientos de pacientes de *H.pylori* con alelo *vacAs1*. Carril 5,8,11,12: Algunos aislamientos de pacientes de *H.pylori* con alelo *vacAs2*.



**Figura 16.3 Electroforesis de la amplificación de *vacAs1b*, *vacAs1c*:** El tamaño del amplificado del subtipo *s1b* es de 187pb y el del subtipo *s1c* es de 220pb. Carril 1: Patrón de peso molecular. Carril 2 y 12: Blanco. Carril 3 y 13: Control cepa de referencia de *H.pylori* NCTC11637 (negativa para los subtipos *s1b* y *s1c*). Carril 4: aislamientos de paciente de *H.pylori* positivo para *vacAs1b*. Carril 14, 15, 16, 17 y 18: Algunos aislamientos de pacientes de *H.pylori* positivos para *vacAs1c*.

**Figura16.** Electroforesis de los alelos del gen *vacA*.

**Figura 16.4 Electroforesis de la amplificación de *vacAm1*:** Los amplificados del alelo *m1* tienen producen una banda de 290 pb. Carril 1: Patrón de peso molecular. Carril 2: Blanco. Carril 3: Control positivo cepa de referencia de *H.pylori* NCTC11637 (positiva para *m1*). Carril 4 al 18: aislamientos de pacientes de *H.pylori* positivos y negativos para el alelo *m1* del gen *vacA*.



**Figura 16.5 Electroforesis de la amplificación de *vacAm2*:** Los amplificados del alelo *m2* corresponden a bandas de 352 pb. Carril 1: Patrón de peso molecular. Carril 2: Blanco. Carril 3: Control cepa de referencia de *H.pylori* NCTC11637 (negativa para *m2*). Carril 4 al 14: aislamientos de pacientes de *H.pylori* positivos y negativos para el alelo *m2* del gen *vacA*.

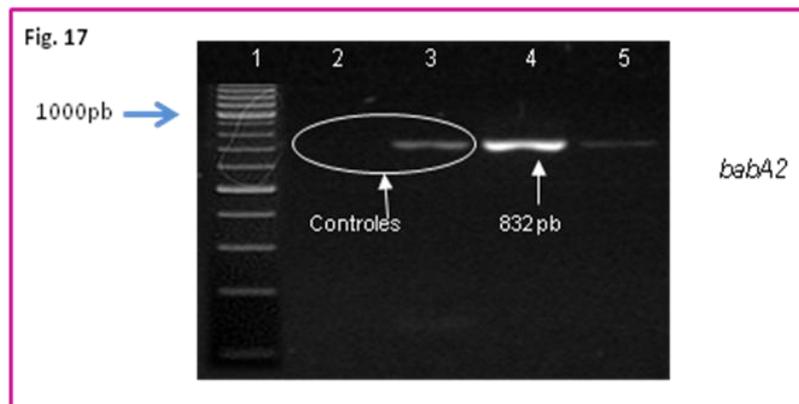
### 6.4.3 Presencia del gen *babA*

La presencia del gen *babA*, se estudió mediante la determinación del alelo *babA2*, que es el encargado de codificar para la adhesina completa y activa. (4) En este caso se encontró que el 58% (69/119) fue positivo para *babA2*. Tabla 13. El tamaño de los amplificados es de 832pb. Figura 27.

**Tabla 13:** Presencia del genotipo *babA2* en aislamientos obtenidos de biopsias gástricas de antro y cuerpo.

Genotipo <i>babA2</i>	Antro		Cuerpo		Total		p
	N	%	N	%	N	%	
Positivo	39	(65%)	30	(50,8 %)	69	(58%)	0,12 (NS)
Negativo	21	(35%)	29	(49,2%)	50	(42%)	0,10 (NS)
Total	60	(100%)	59	(100%)	119	(100%)	

❖ Genotipo más frecuente.



**Figura 17. Electroforesis de la amplificación de *babA2*:** Carril 1: Patrón de peso molecular. Carril 2: Blanco. Carril 3: Control cepa de referencia de *H.pylori* NCTC11637 (positiva para *babA2*). Carril 4 ,5: aislamientos de pacientes de *H.pylori* positivos el gen *babA2*.

#### 6.4.4 Presencia del gen *iceA*

Para estudiar la presencia del gen *iceA* se evaluaron los alelos *iceA1* e *iceA2*, encontrando que el alelo más frecuente fue *iceA1* en el 84,9% (101/119) de los aislamientos, En cuanto al alelo *iceA2*, se observó que fue positivo en el 15,1% (18/119). Tabla 14. El tamaño de los amplificadores producidos fue de 247pb para *iceA1* y de 334pb para *iceA2*. Figura 18 y 19.

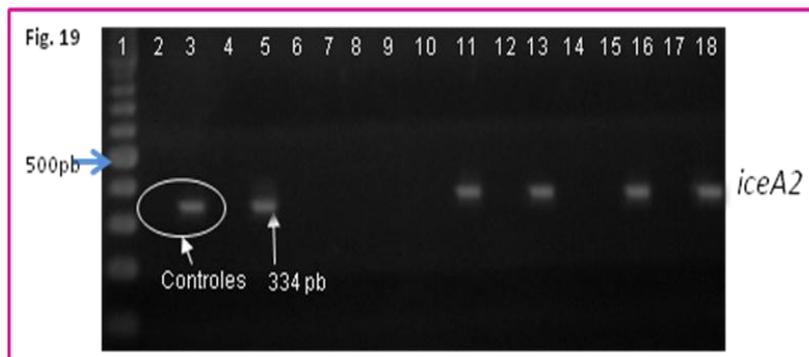
**Tabla 14:** Distribución del genotipo *iceA* en aislamientos obtenidos de biopsias gástricas de antro y cuerpo.

Genotipo <i>iceA</i>	Antro		Cuerpo		Total		P	
	N	%	N	%	N	%		
<i>iceA1</i>	46	(76,7%)	55	(93,2%)	101	(84,9%)	0,20	(NS)
<i>iceA2</i>	14	(23,3%)	4	(6,8%)	18	(15,1%)	0,0009	(NS)
Total	60	(100%)	59	(100%)	119	(100%)		

❖ Genotipo más frecuente.



**Figura 18. Electroforesis de la amplificación de *iceA1*:** Carril 1: Patrón de peso molecular. Carril 2: Blanco. Carril 3: Control cepa de referencia de *H.pylori* NCTC11637 (negativa para *iceA1*). Carril 4 al 9: aislamientos de pacientes de *H.pylori* positivos y negativos para el gen *iceA1*.

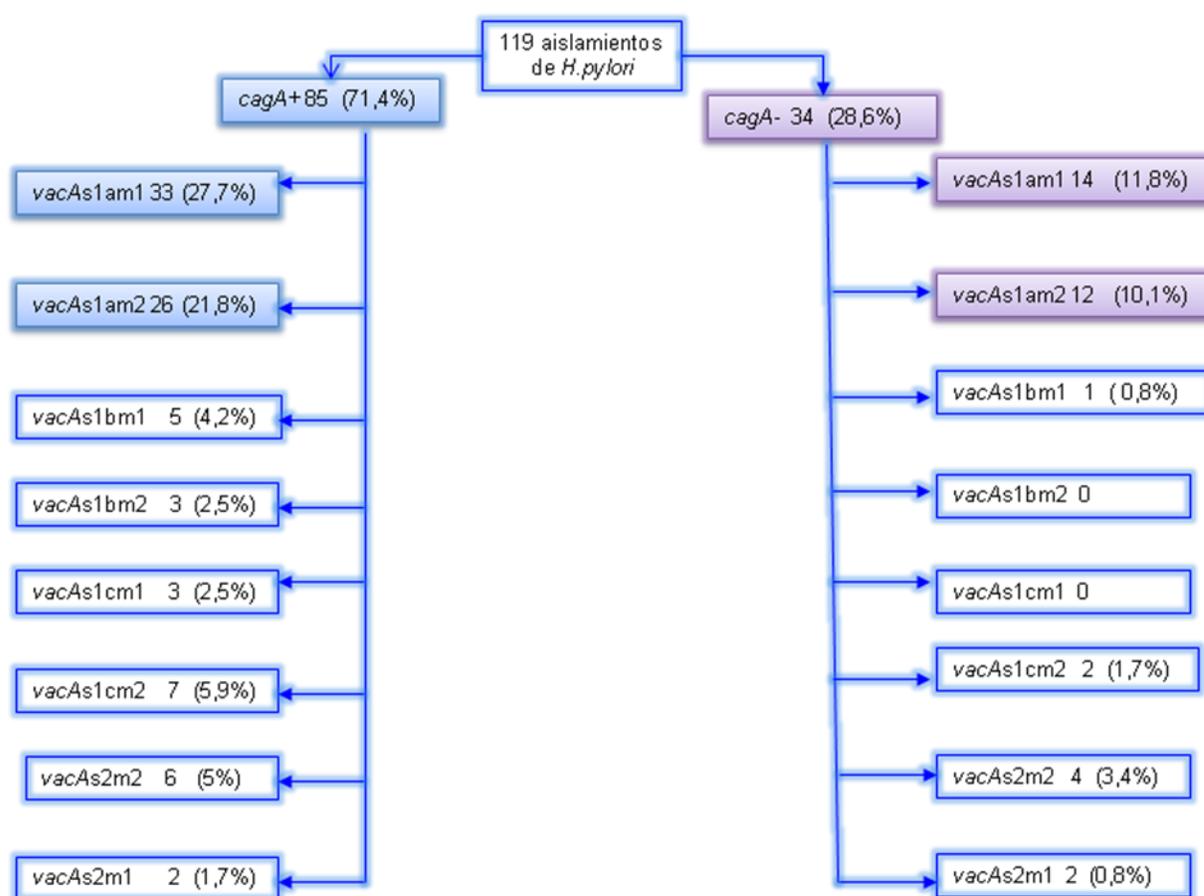


**Figura 19. Electroforesis de la amplificación de *iceA2*:** Carril 1: Patrón de peso molecular. Carril 2: Blanco. Carril 3: Control cepa de referencia de *H.pylori* NCTC11637 (positiva para *iceA2*). Carril 4 al 18: aislamientos de pacientes de *H.pylori* positivos y negativos para *iceA2*.

### 6.4.5 Relación de los Genes *cagA*, y *vacA* en los aislamientos obtenidos

Al analizar la relación entre los genes *cagA* y *vacA*, se encontró la presencia de 14 combinaciones entre los dos genes. Los genotipos más frecuentes fueron *cagA*+/*vacAs1am1* (27,7%), *cagA*+/*vacAs1am2* (21,8%), *cagA*-/*vacAs1am1* (11,8%), *cagA*-/*vacAs1am2* (10,1%). Cuadro No 2.

**Cuadro No2:** Relación entre los genotipos *cagA* y *vacA*.

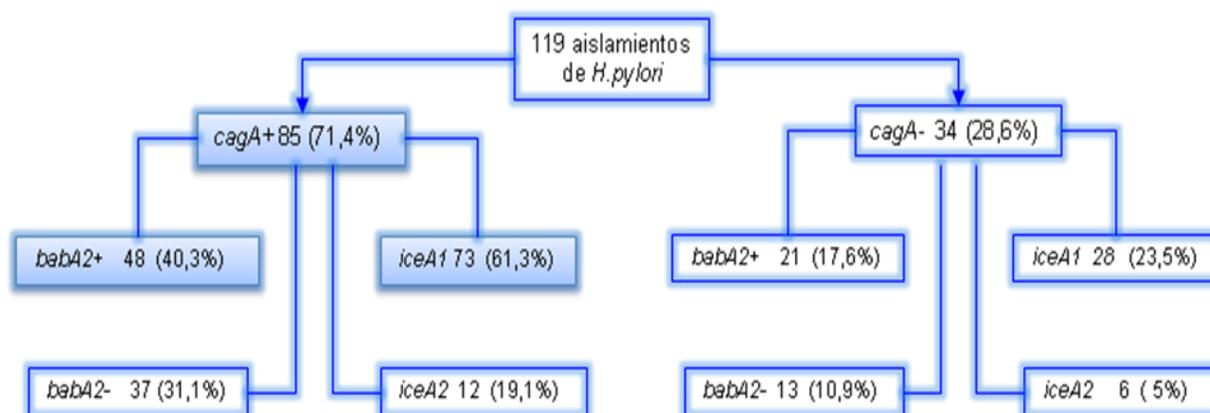


- ❖ Combinación más frecuente de *vacA* que fue *cagA*+.
- ❖ Combinación más frecuente de *vacA* que fue *cagA*-.

#### 6.4.6 Relación de los Genes *cagA* vs *babA2*, y entre *cagA* vs *iceA* en los aislamientos obtenidos

En la relación de los genes *cagA* vs *babA2*, se observó que el genotipo más frecuente fue *cagA*+/*babA2*+ con 40,3% (48/119). Al examinar la relación entre *cagA*+ vs *iceA*, se encontró que el genotipo más frecuente fue *cagA*+/*iceA1* con 61,3% (73/119). Cuadro No 3.

**Cuadro No3:** Relación entre los genotipos *cagA* vs *babA2* y entre *cagA* vs *iceA*.

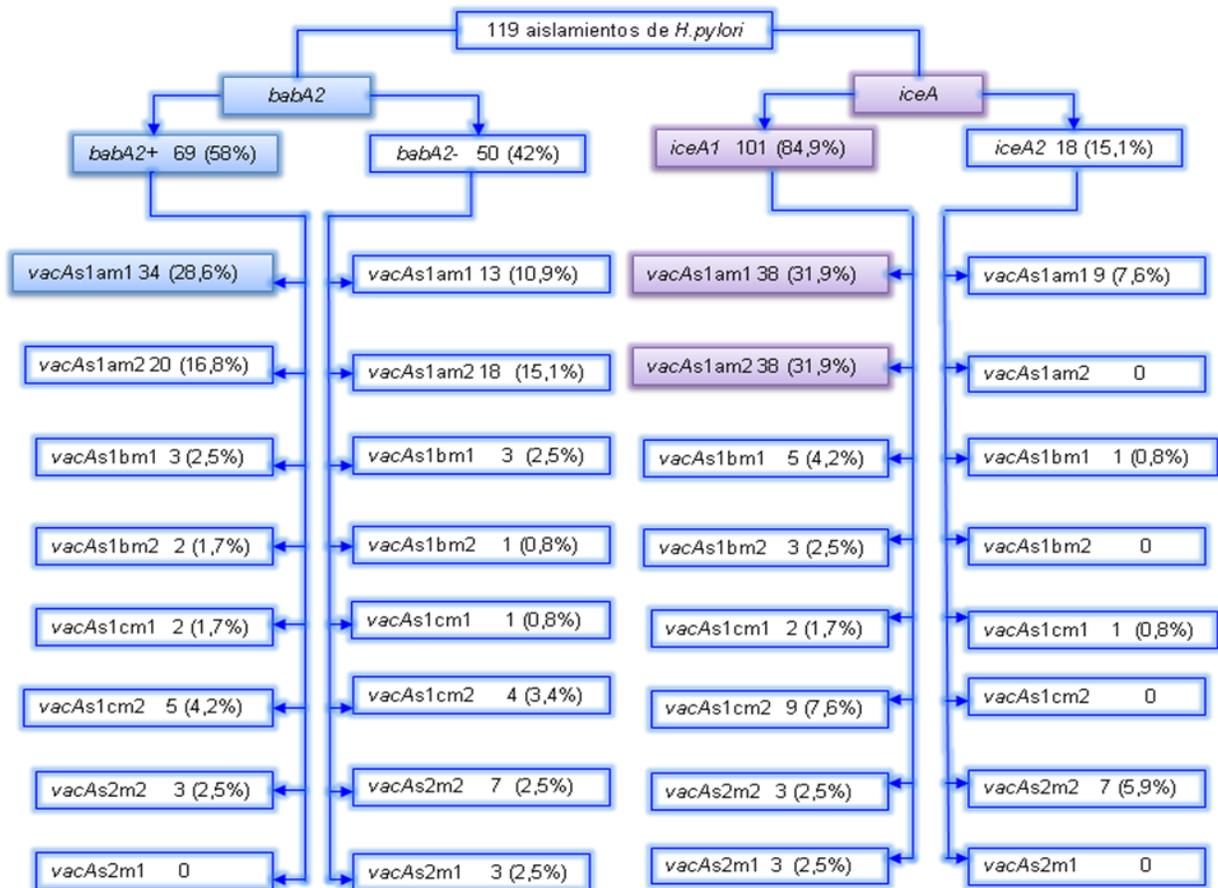


❖ Combinaciones más frecuentes entre *cagA* vs *babA2* y entre *cagA* vs *iceA*.

#### 6.4.7 Relación de los Genes *vacA* vs *babA2*, y entre *vacA* vs *iceA* en los aislamientos obtenidos

Se analizó la relación entre los alelos de *vacA* vs *babA2* así mismo de los alelos de *vacA* vs *iceA*. El genotipo más frecuente para la combinación *vacA* vs *babA2* fue *vacA* s1am1/*babA2*+ con una frecuencia de 28,6% (34/119). Para la combinación *vacA* vs *iceA* con un 31,9% (38/119). El resto de las combinaciones entre estos genes se puede observar con más detalle en el cuadro No 4.

**Cuadro No 4:** Relación entre los genotipos *vacA* vs *babA2* y entre *vacA* vs *iceA*.



- ❖ Combinación más frecuente para *vacA* vs *babA2*.
- ❖ Combinación más frecuente para *vacA* vs *iceA*.

#### 6.4.8 Relación de los Genes *cagA*, *vacA*, *babA2* e *iceA* en los aislamientos obtenidos

Al analizar la combinación de todos los genes estudiados, se encontraron 28 combinaciones en los aislamientos evaluados. La combinación más frecuente fue *cagA*+/*vacA* s1am1/*babA2*+/*iceA*1 presentándose en un 16% (19-119). La distribución de los aislamientos para el resto de los genotipos se puede observar en la tabla 15.

Tabla 15: Relación entre los genes *cagA*, *vacA*, *babA2* e *iceA*.

Genotipo completo	Antro	Cuerpo	Total	P
<i>cagA+</i> / <i>vacA</i> s1am1 / <i>babA2+</i> / <i>iceA1</i>	10 (16,7 %)	9 (15,3%)	19 (16%)	0,74 (NS)
<i>cagA+</i> / <i>vacA</i> s1am2 / <i>babA2+</i> / <i>iceA1</i>	5 (8,3%)	8 (13,6%)	13 (10,9%)	0,23 (NS)
<i>cagA+</i> / <i>vacA</i> s1am2 / <i>babA2-</i> / <i>iceA1</i>	4 (6,7%)	9 (15,3%)	13 (10,9%)	0,05 (NS)
<i>cagA-</i> / <i>vacA</i> s1am1 / <i>babA2+</i> / <i>iceA1</i>	3 (5%)	6 (10,2%)	9 (7,6)	0,15 (NS)
<i>cagA-</i> / <i>vacA</i> s1am2 / <i>babA2-</i> / <i>iceA1</i>	5 (8,3%)	3 (5,1%)	8 (6,7%)	0,31 (NS)
<i>cagA-</i> / <i>vacA</i> s1am2 / <i>babA2+</i> / <i>iceA1</i>	4 (6,7%)	3 (5,1%)	7 (5,9%)	0,59 (NS)
<i>cagA+</i> / <i>vacA</i> s1am1 / <i>babA2-</i> / <i>iceA1</i>	1 (1,7%)	6 (10,2%)	7 (5,9%)	0,007 (S)
<i>cagA+</i> / <i>vacA</i> s1am1 / <i>babA2+</i> / <i>iceA2</i>	5 (8,3%)	0 (0%)	5 (4,2%)	0.0016 (S)
<i>cagA+</i> / <i>vacA</i> s1cm2 / <i>babA2+</i> / <i>iceA1</i>	2 (3,3%)	2 (3,4%)	4 (3,4%)	1 (NS)
<i>cagA+</i> / <i>vacA</i> s2m2 / <i>babA2+</i> / <i>iceA1</i>	3 (5%)	1 (1,7%)	4 (3,4%)	0,15 (NS)
<i>cagA+</i> / <i>vacA</i> s2m2 / <i>babA2-</i> / <i>iceA2</i>	2 (3,3%)	1 (1,7%)	3 (2,5%)	0,41 (NS)
<i>cagA-</i> / <i>vacA</i> s2m2 / <i>babA2-</i> / <i>iceA2</i>	2 (3,3%)	1 (1,7%)	3 (2,5%)	0,41 (NS)
<i>cagA+</i> / <i>vacAs1bm1</i> / <i>babA2+</i> / <i>iceA1</i>	1 (1,7%)	1 (1,7%)	2 (1,7%)	1 (NS)
<i>cagA+</i> / <i>vacAs1bm1</i> / <i>babA2-</i> / <i>iceA1</i>	1 (1,7%)	1 (1,7%)	2 (1,7%)	1 (NS)
<i>cagA+</i> / <i>vacAs1bm2</i> / <i>babA2+</i> / <i>iceA1</i>	1 (1,7%)	1 (1,7%)	2 (1,7%)	1 (NS)
<i>cagA+</i> / <i>vacAs1cm1</i> / <i>babA2+</i> / <i>iceA1</i>	2 (3,3%)	0 (0%)	2 (1,7%)	0,04 (NS)
<i>cagA+</i> / <i>vacAs1cm2</i> / <i>babA2-</i> / <i>iceA1</i>	1 (1,7%)	1 (1,7%)	2 (1,7%)	1 (NS)
<i>cagA+</i> / <i>vacAs1am1</i> / <i>babA2-</i> / <i>iceA2</i>	1 (1,7%)	1 (1,7%)	2 (1,7%)	1 (NS)
<i>cagA-</i> / <i>vacAs1am1</i> / <i>babA2+</i> / <i>iceA2</i>	2 (3,3%)	0 (0%)	2 (1,7%)	0,04 (NS)
<i>cagA+</i> / <i>vacAs2m1</i> / <i>babA2-</i> / <i>iceA1</i>	1 (1,7%)	1 (1,7%)	2 (1,7%)	1 (NS)
<i>cagA-</i> / <i>vacAs1bm1</i> / <i>babA2+</i> / <i>iceA1</i>	0 (0%)	1 (1,7%)	1 (0,8%)	0,15 (NS)
<i>cagA+</i> / <i>vacAs1bm1</i> / <i>babA2-</i> / <i>iceA2</i>	0 (0%)	1 (1,7%)	1 (0,8%)	0,15 (NS)
<i>cagA+</i> / <i>vacAs1bm2</i> / <i>babA2-</i> / <i>iceA1</i>	1 (1,7%)	0 (0%)	1 (0,8%)	0,15 (NS)
<i>cagA+</i> / <i>vacAs1cm1</i> / <i>babA2-</i> / <i>iceA2</i>	1 (1,7%)	0 (0%)	1 (0,8%)	0,15 (NS)
<i>cagA-</i> / <i>vacAs1cm2</i> / <i>babA2+</i> / <i>iceA1</i>	1 (1,7%)	0 (0%)	1 (0,8%)	0,15 (NS)
<i>cagA-</i> / <i>vacAs1cm2</i> / <i>babA2-</i> / <i>iceA1</i>	0 (0%)	1 (1,7%)	1 (0,8%)	0,15 (NS)
<i>cagA-</i> / <i>vacAs2m1</i> / <i>babA2-</i> / <i>iceA1</i>	0 (0%)	1 (1,7%)	1 (0,8%)	0,15 (NS)
<i>cagA-</i> / <i>vacAs2m2</i> / <i>babA2+</i> / <i>iceA2</i>	1 (1,7%)	0 (0%)	1 (0,8%)	0,15 (NS)
<b>Total</b>	60 (100%)	59 (100%)	119 (100%)	

#### 6.4.9 Distribución del genotipo completo de acuerdo a las características de la población:

Para este análisis se tuvo en cuenta todos los genotipos encontrados en la población, incluyendo los pacientes en los que se encontró más de un genotipo.

a). Genotipo vs género:

Se encontró que el genotipo más frecuente fue *cagA+/vacAs1am1/babA2+/iceA1* en un 16% (19/119), con una frecuencia más alta en hombres 22% (9/41) que en mujeres 12,8% (10/78). El genotipo menos virulento *cagA-/vacAs2m2/babA2-/iceA2* solo se presentó en un 2,5% (3/199) con una frecuencia muy similar en hombres 2,4% (1/41) como mujeres 2,6% (2/78). Tabla 16

**Tabla 16:** Distribución del genotipo completo de acuerdo al género.

Genotipo	MUJERES		HOMBRES		TOTAL		P
	N	%	N	%	N	%	
<i>cagA+/vacAs1am1/babA2+/iceA1</i>	10	(12,8%)	9	(22%)	19	(16%)	0,74 (NS)
<i>cagA+/vacAs1am2/babA2-/iceA1</i>	10	(12,8%)	3	(7,3%)	13	(10,9%)	0,0060 (S)
<i>cagA+/vacAs1am2/babA2+/iceA1</i>	8	(10,3%)	5	(12,2%)	13	(10,9%)	0,23 (NS)
<i>cagA-/vacAs1am1/babA2+/iceA1</i>	7	(9%)	2	(4,9%)	9	(6,7%)	0,018 (NS)
<i>cagA-/vacAs1am2/babA2-/iceA1</i>	7	(9%)	1	(2,4%)	8	(6,7%)	0,002 (NS)
<i>cagA-/vacAs1am2/babA2+/iceA1</i>	5	(6,4%)	2	(4,9%)	7	(5,9%)	0,10 (NS)
<i>cagA+/vacAs1am1/babA2-/iceA1</i>	4	(5,1%)	3	(7,3%)	7	(5,9%)	0,59 (NS)
<i>cagA+/vacAs1am1/babA2+/iceA2</i>	5	(6,4%)	0	(0%)	5	(4,2%)	0,0016 (S)
<i>cagA+/vacAs2m2/babA2+/iceA1</i>	3	(3,8%)	1	(2,4%)	4	(3,4%)	0,15 (NS)
<i>cagA+/vacAs1cm2/babA2+/iceA1</i>	1	(1,3%)	3	(7,3%)	4	(3,4%)	0,15 (NS)
<i>cagA-/vacAs2m2/babA2-/iceA2</i>	2	(2,6%)	1	(2,4%)	3	(2,5%)	0,41 (NS)
<i>cagA+/vacAs2m2/babA2-/iceA2</i>	1	(1,3%)	2	(4,9%)	3	(2,5%)	0,41 (NS)
<i>cagA+/vacAs1am1/babA2-/iceA2</i>	2	(2,6%)	0	(0%)	2	(1,7%)	0,045 (S)

<i>cagA</i> -/ <i>vacAs1am1/babA2+/iceA2</i>	2 (2,6%)	0 (0%)	2 (1,7%)	0,045 (S)
<i>cagA</i> +/ <i>vacAs1bm1/babA2+/iceA1</i>	0 (0%)	2 (4,9%)	2 (1,7%)	0,045 (S)
<i>cagA</i> +/ <i>vacAs1bm2/babA2+/iceA1</i>	0 (0%)	2 (4,9%)	2 (1,7%)	0,045 (S)
<i>cagA</i> +/ <i>vacAs1cm2/babA2-/iceA1</i>	2 (2,6%)	0 (0%)	2 (1,7%)	0,045 (S)
<i>cagA</i> +/ <i>vacAs1cm1/babA2+/iceA1</i>	1 (1,3%)	1 (2,4%)	2 (1,7%)	1 (NS)
<i>cagA</i> +/ <i>vacAs1bm1/babA2-/iceA1</i>	1 (1,3%)	1 (2,4%)	2 (1,7%)	1 (NS)
<i>cagA</i> +/ <i>vacAs2m1/babA2-/iceA1</i>	2 (2,6%)	0 (0%)	2 (1,7%)	0,045 (S)
<i>cagA</i> +/ <i>vacAs1bm1/babA2-/iceA2</i>	1 (1,3%)	0 (0%)	1 (0,8%)	0,15 (NS)
<i>cagA</i> +/ <i>vacAs1cm1/babA2-/iceA2</i>	1 (1,3%)	0 (0%)	1 (0,8%)	0,15 (NS)
<i>cagA</i> +/ <i>vacAs1bm2/babA2-/iceA1</i>	0 (0%)	1 (2,4%)	1 (0,8%)	0,15 (NS)
<i>cagA</i> -/ <i>vacAs2m1/babA2-/iceA1</i>	1 (1,3%)	0 (0%)	1 (0,8%)	0,15 (NS)
<i>cagA</i> -/ <i>vacAs2m2/babA2+/iceA2</i>	1 (1,3%)	0 (0%)	1 (0,8%)	0,15 (NS)
<i>cagA</i> -/ <i>vacAs1cm2/babA2+/iceA1</i>	0 (0%)	1 (2,4%)	1 (0,8%)	0,15 (NS)
<i>cagA</i> -/ <i>vacAs1cm2/babA2-/iceA1</i>	1 (1,3%)	0 (0%)	1 (0,8%)	0,15 (NS)
<i>cagA</i> -/ <i>vacAs1bm1/babA2+/iceA1</i>	0 (0%)	1 (2,4%)	1 (0,8%)	0,15 (NS)
<b>TOTAL</b>	78 (100%)	41 (100%)	119 (100%)	

❖ Genotipo más frecuente de acuerdo al género.

#### b). Genotipo vs edad

Este análisis se realizó para conocer cuál era el genotipo de virulencia más frecuente de acuerdo a la edad, para lo cual se dicotomizó la variable edad en menores de 50 y mayores de 50 años (Tabla 18). En general el genotipo *cagA*+/*vacAs1am1/babA*+/*iceA1* fue el más frecuente en los dos rangos de edad, pero se destacó principalmente en los sujetos mayores de 50 años 25% (19/40).

Tabla 17: Distribución del genotipo completo de acuerdo a las diferentes edades.

Genotipo	<50 años	> 50 años	TOTAL	p	significancia
<i>cagA+/vacAs1am1/babA+/iceA1</i>	9 (11,4%)	10 (25%)	19 (16%)	0,05	NS
<i>cagA+/vacAs1am2/babA2+/iceA1</i>	9 (11,4%)	4 (10%)	13 (10,9%)	0,81	NS
<i>cagA+/vacAs1am2/babA2-/iceA1</i>	7 (8,9%)	6 (15%)	13 (10,9%)	0,31	NS
<i>cagA-/vacAs1am1/babA2+/iceA1</i>	6 (7,6%)	3 (7,5%)	9 (7,6%)	0,98	NS
<i>cagA-/vacAs1am2/babA2-/iceA1</i>	7 (8,9%)	1 (2,5%)	8 (6,7%)	0,19	NS
<i>cagA-/vacAs1am2/babA2+/iceA1</i>	4 (5,1%)	3 (7,5%)	7 (5,9%)	0,59	NS
<i>cagA+/vacAs1am1/babA2-/iceA1</i>	4 (5,1%)	3 (7,5%)	7 (5,9%)	0,59	NS
<i>cagA+/vacAs1am1/babA2+/iceA2</i>	5 (6,3%)	0 (0%)	5 (4,2%)	0,10	NS
<i>cagA+/vacAs1am2/babA2+/iceA1</i>	3 (3,8%)	1 (2,5%)	4 (3,4%)	0,71	NS
<i>cagA+/vacAs2m2/babA2+/iceA1</i>	1 (0,8%)	3 (7,5%)	4 (3,4%)	0,07	NS
<i>cagA+/vacAs2m2/babA2-/iceA2</i>	3 (3,8%)	0 (0%)	3 (2,5%)	0,21	NS
<i>cagA-/vacAs2m2/babA2-/iceA2</i>	3 (3,8%)	0 (0%)	3 (2,5%)	0,21	NS
Otros	18 (22,8%)	6 (15%)	24 (22,8%)	0,32	NS
<b>TOTAL</b>	79 (100%)	40 (100%)	119 (100%)		

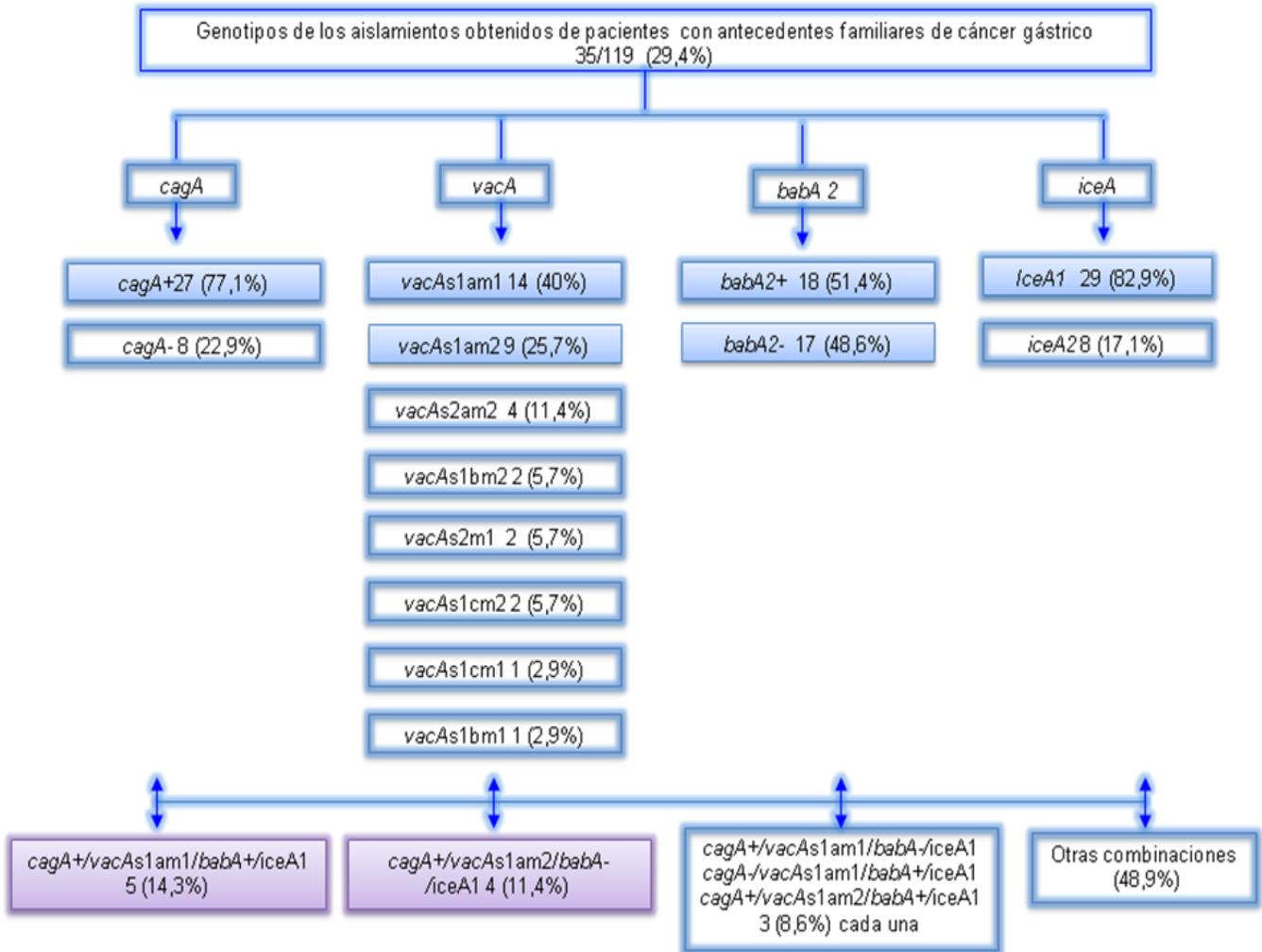
❖ Genotipo más frecuente de acuerdo a las edades relacionadas.

### c). Antecedentes familiares de cáncer gástrico y linfoma tipo MALT vs Genotipo

Se analizó cuales fueron los genotipos más frecuentes en los pacientes con antecedentes de cáncer gástrico, se encontró que el 29,4% (35/119) de los aislamientos provenían de 22 pacientes que referían haber tenido antecedentes de cáncer gástrico. El análisis de la distribución de cada gen de virulencia muestra que los más frecuentes fueron *cagA+* (77,1%), *vacAs1am1* (40%), *vacAs1am2* (25,7%), *iceA1* (82,9%), *babA2+* (51,4%) y *babA2-* (48,6%), adicionalmente el análisis del genotipo completo con los 4 genes en estudio muestra que los más frecuentes fueron *cagA+/vacAs1am1/babA2+/iceA1* (14,3%) y *cagA+/vacAs1am2/babA2-/iceA1* (11,4%). Cuadro No 5.

En cuanto al antecedente de linfoma tipo MALT solo hubo un paciente del cual se obtuvo un aislamiento cuyo genotipo fue *cagA+/vacAs1am1/babA2+/iceA1*.

**Cuadro No 5:** Relación entre el genotipo y los antecedentes familiares de cáncer gástrico.



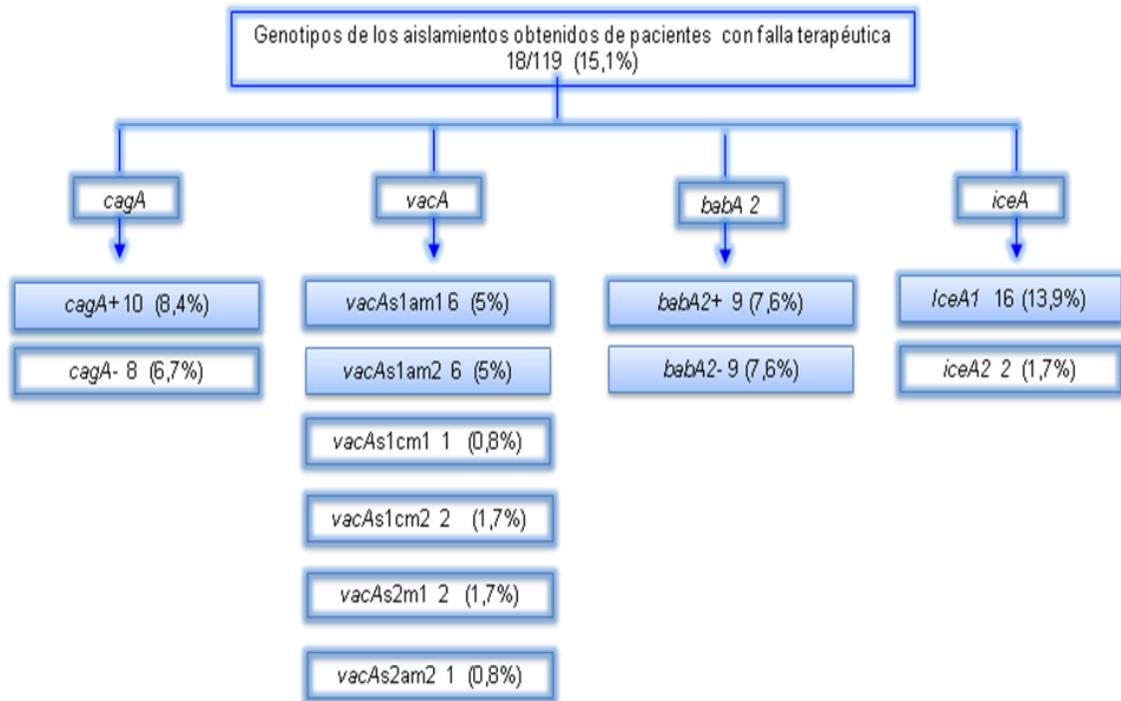
- ❖ Genotipos más frecuentes encontrados en los aislamientos de pacientes con antecedentes de cáncer gástrico.
- ❖ Combinaciones más frecuentes en aislamientos de pacientes con antecedentes de cáncer gástrico.

d). Genotipos vs falla del tratamiento para *H.pylori*:

El análisis de los genotipos versus la falla del tratamiento para *H.pylori* se realizó previa evaluación de la erradicación del microorganismo mediante la prueba de antígenos fecales (Ridascren®) en los pacientes que recibieron tratamiento. De los 79 pacientes, recibieron tratamiento 44, de los cuales en 34 hubo éxito en la erradicación del microorganismo, y en 10 pacientes no se logró erradicar la bacteria. Los 35 pacientes restantes en los que no se evaluó erradicación fue por que recibieron tratamiento y lo suspendieron, recibieron tratamiento particularmente, o porque no asistieron a verificación de la erradicación.

Para este análisis primero se evaluó el comportamiento de cada genotipo por separado y luego se observó cómo fue la combinación completa de los genotipos en los aislamientos de los pacientes con falla. Llama la atención que aunque por separado la frecuencia de los genotipos involucra principalmente genes con alta virulencia lo cual probablemente se deba que en la población de estudio estos son los más frecuentes, al combinar los genotipos se observa que los 18 aislamientos de los pacientes que presentaron falla tienen genes que son menos virulentos y que se han asociado con falla terapéutica. Cuadro 6 y tabla 18.

**Cuadro No 6:** Frecuencia de los genes de virulencia *cagA*, *vacA*, *babA2* e *iceA* en los pacientes con falla terapéutica.



- ❖ Genotipos más frecuentes encontrados en los aislamientos de pacientes con falla terapéutica.

**Tabla 18.** Distribución del genotipo completo de *Hpylori* en pacientes con falla terapéutica.

GENOTIPO	No Erradicación N (%)	
<i>cagA</i> -/ <i>vacAs1am1/babA2+/iceA1</i>	3	(2,5%)
<i>cagA</i> +/ <i>vacAs1am2/babA2-/iceA1</i>	3	(2,5%)
<i>cagA</i> +/ <i>vacAs2m1/babA2-/iceA1</i>	2	(1,7%)
<i>cagA</i> +/ <i>vacAs1am2/babA2+/iceA1</i>	1	(0,8%)
<i>cagA</i> +/ <i>vacAs1cm1/babA2+/iceA1</i>	1	(0,8%)
<i>cagA</i> +/ <i>vacAs1cm2/babA2-/iceA1</i>	1	(0,8%)
<i>cagA</i> -/ <i>vacAs1cm2/babA2-/iceA1</i>	1	(0,8%)
<i>cagA</i> -/ <i>vacAs1am2/babA2+/iceA1</i>	1	(0,8%)
<i>cagA</i> -/ <i>vacAs1am2/babA2-/iceA1</i>	1	(0,8%)
<i>cagA</i> -/ <i>vacAs2m2/babA2+/iceA2</i>	1	(0,8%)
<i>cagA</i> -/ <i>vacAs1am1/babA2+/iceA2</i>	1	(0,8%)
<i>cagA</i> +/ <i>vacAs1am1/babA2-/iceA1</i>	1	(0,8%)
<i>cagA</i> +/ <i>vacAs1am1/babA2+/iceA1</i>	1	(0,8%)
<b>TOTAL</b>	<b>18</b>	<b>(15,1%)</b>

- ❖ Genotipos más frecuentes en pacientes con falla terapéutica.
- ❖ Genotipos que de acuerdo con la literatura se han relacionado con falla terapéutica. (64, 65)
- ❖ Genotipos que se han asociado con menor virulencia.

## CAPITULO 7.

### DISCUSIÓN

El desarrollo clínico de la infección por *H.pylori* está determinado por la interacción de varios factores tanto del huésped como de la bacteria. Dentro de los factores del microorganismo hay evidencia de la participación de ciertos genotipos de *H.pylori* con patologías más severas. (5, 6, 58) Teniendo en cuenta que los genes de virulencia pueden usarse como marcadores que permiten determinar el riesgo de desarrollar patologías más severas, en este estudio se determinó la frecuencia de los genotipos *cagA*, *vacA*, *babA2* e *iceA* de *H.pylori* en 119 aislamientos provenientes de 79 pacientes con dispepsia funcional seleccionados de manera estricta.

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les realizó prueba de ureasa rápida, histología y cultivo. Se encontró que la concordancia entre las pruebas realizadas fue buena, (mayor a 80%), sin embargo, la mejor concordancia se obtuvo entre la histología y el cultivo (96%). Aunque en Colombia los estudios que se han realizado a nivel de pruebas diagnósticas no informan la concordancia ya que solo han evaluado las características operativas de las pruebas, (67,68) los resultados encontrados concuerdan con lo reportado por Opavski N, *et al*; en 2007, quienes encontraron que el cultivo tiene una alta concordancia con la prueba de la ureasa rápida y con la histología, lo que sugiere el uso de cualquiera de las tres pruebas para el diagnóstico del microorganismo. (66)

De los 79 pacientes con cultivo positivo se obtuvieron 119 aislamientos los cuales se distribuyeron de manera similar en el cuerpo y en el antro con 49,6 y 50,4% respectivamente, por lo cual consideramos que de cualquiera de los dos sitios se pudieran obtener muestras para cultivo de *H.pylori*, cuando el paciente no esté tomando inhibidores de bomba de protones como en el presente estudio.

A los aislamientos obtenidos de los realizó cultivo líquido, previa estandarización del mismo, encontrándose luego de evaluar diferentes factores como condiciones del medio, medio usado, aditivos nutricionales y antibióticos, así como el suministro directo de CO<sub>2</sub> en el medio de cultivo que era posible obtener mayor cantidad de células en menos tiempo de incubación, comparado con estudios previos reportados por la literatura (69-71)), obteniéndose de esta manera una buena cantidad de biomasa bacteriana no solo para la extracción de DNA sino para otras pruebas realizadas en el laboratorio.

De manera similar a investigaciones de otros países (58, 72), en el presente estudio el gen *cagA* se encontró en el 71,4% (85/119) de los aislamientos y concuerda también con estudios realizados en Colombia por Citelly, *et al*; 2002, (63,7%), Quiroga, *et al*; 2005 (72,9%) aunque un poco diferente a los resultados de Muñoz, *et al*; 2007. (8, 53, 73) Varios estudios realizados en otros países latinoamericanos, también han encontrado prevalencias del gen *cagA* similares a los de esta investigación. En Brasil Ribeiro, *et al*; 2003 y Oliveira, *et al*; 2003 reportan presencia de *cagA* del 67% y 79,8% respectivamente y en Cuba Martínez, *et al*; 2008 lo encontraron en 70,7%. (74-76)

Mediante la determinación del gen *vacA* se observó la presencia de ocho combinaciones de los subtipos de los alelos s1 y s2 con alelos m. La combinación alélica más frecuente fue *vacA* s1m1 en el 47% (56/119) de los casos y la combinación alélica más frecuente teniendo en cuenta el subtipo del alelo s1 fue *vacAs1am1* en el 39,5% (47/119) de los casos, hallazgos que son parecidos a otros estudios realizados en Colombia que también encontraron que estos alelos fueron los más frecuentes en las poblaciones estudiadas por ellos (8,53, 73, 77) al igual que lo encontrado por Yamaoka, *et al*; en 1999 en muestras de pacientes colombianos cuya prevalencia de *vacAs1am1* fue de 45% en pacientes con gastritis crónica. (7) El hecho de que en pacientes con dispepsia funcional predomine una cepa muy virulenta contrasta con el concepto de que en esta

patología, las cepas generalmente son menos agresivas (48, 78), no obstante debido a que en este estudio no se incluyeron pacientes con cáncer gástrico y/o ulcera duodenal, no se puede establecer si en nuestro medio existen diferencias con respecto a la agresividad de las cepas y el desenlace de patologías más graves. Sin embargo, teniendo en cuenta que estas cepas virulentas también se han asociado con alteraciones histológicas más severas como atrofia y metaplasia intestinal, que implican un mayor riesgo de cáncer gástrico (46,72,79) y aunque los pacientes del presente estudio, se caracterizaron por presentar dispepsia, sería importante investigar si con seguimientos a largo plazo, este tipo de cepas de *H.pylori* implican un mayor riesgo de cáncer gástrico en nuestro medio.

Adicionalmente, se observó que la combinación *vacAs2m1* estuvo presente en el 2,5% (3/119) de los casos. En nuestro país esta combinación ha sido informada en estudios previos (53, 73, 80) pero solo en el estudio de Muñoz se ha tenido en cuenta para el análisis estadístico ya que esta combinación es poco frecuente y algunos autores consideran que no es viable y puede conferir desventajas para el microorganismo. No obstante, en este trabajo decidió incluirse en el análisis estadístico debido no solo a que en otros estudios que reportan frecuencias similares a las encontradas en este trabajo las han incluido (77, 80) sino porque además se observó que esta combinación se presentó en el 1,7% de aislamientos de los pacientes que tuvieron falla terapéutica, por lo que se considero relevante tenerla en cuenta, ya que podría indicar que *vacAs2m1* no necesariamente le confiera una desventaja de selección al microorganismo sino que podría ser una forma silenciosa de evadir la terapia antibiótica, por lo que se recomienda en estudios posteriores tener en cuenta el estudio de este genotipo.

Por otra parte, se determinó la presencia de *babA2*, encontrando que el 58% de los aislamientos evaluados fueron *babA2+*, resultado que aunque difiere en un 10% de un estudio previo realizado en nuestro país por Quiroga, *et al*; 2005 (48%), coincide con reportes en Sur América en los que las frecuencias de este gen

varían del 46% al 82,3%. (77,82,83). Las diferencias grandes que se pueden encontrar con relación a las frecuencias de este gen en varios estudios, puede ser causada por dos razones: la primera, debido a la diferencia de especificidad de los primers usados, por lo que se recomienda usar dos pares de primers diferentes para su detección o usar los primers propuestos por Mizushima, T. 2001 que son los mismos que se emplearon en este estudio ya que el primer reverse usado no se une a la región variable de *babA2* lo que hace que se generen menos falsos negativos. Y la segunda debido a la población que se está estudiando ya que se encuentra una mayor frecuencia de *babA2* en lugares donde hay una alta prevalencia de ulcera duodenal y cáncer gástrico, lo cual ha sido confirmado por algunos estudios que muestran asociación entre *babA2* y las dos patologías mencionadas. (75) Es importante tener en cuenta que las cepas de *H.pylori* *babA2+* se han asociado con aumento de riesgo de ulcera péptica y cáncer gástrico, mientras que las cepas *babA2-* se han asociado con formas de gastritis menos severas,(58) aunque en este estudio la frecuencia de aislamientos *babA2+* (58%) fue muy cercano a la de aislamientos *babA2-* (42%) es aconsejable que se haga seguimiento a estos pacientes o por lo menos a los que tengan características similares a los incluidos en este estudio para evitar complicaciones gástricas futuras.

Con respecto a la presencia del gen *iceA*, se encontró que la variante alélica más frecuente fue *iceA1* en un 84,9%, resultado que difiere totalmente de lo reportado por estudios previos en pacientes Colombianos, (7, 53) que han informado que el alelo más frecuente es *iceA2*. Motivo por el cual, la alta frecuencia del alelo *iceA1* llama la atención ya que aunque se desconoce con exactitud su papel en la enfermedad gastroduodenal, hay información controversial con respecto a su asociación con la patología, puesto que mientras algunos autores han encontrado asociación de *iceA1* con ulcera péptica (6, 83), otros autores desvirtúan este hallazgo (7, 9) lo cual hace que se plante una problemática interesante ya que

este resultado podría indicar que hay una alta probabilidad de desarrollo de úlcera péptica en la población estudiada, teniendo en cuenta que son pacientes con gastritis crónica no atrófica, y que no debería predominar esta variante; por lo que se hace indispensable que en nuestro país se estudie si existe tal asociación y así verificar si este gen se puede usar realmente como un marcador de la patología.

Por otra parte, se estudió la distribución de cada gen tanto en antro como en cuerpo, no encontrando diferencias significativas de la distribución de los genotipos *cagA+*, *vacAs1am1* y *babA2*, aunque se observó que el genotipo *babA2+* presentó mayor predominio en antro que en cuerpo, cuya localización podría estar relacionada con la asociación entre *babA2+* y úlcera duodenal reportada por algunos autores. En cuanto a los aislamientos con genotipo *iceA*, no se observaron diferencias significativas en la distribución anatómica del *iceA1*, aunque tuvo un mayor predominio en cuerpo lo cual podría estar relacionado con la asociación entre este alelo y el desarrollo de úlceras pépticas. Con relación al alelo *iceA2* se observó diferencia significativa en su distribución encontrándose principalmente en antro. Aunque en Colombia anterior al presente estudio no existen otros trabajos que evalúen la distribución de los genotipos de acuerdo con la localización anatómica, estos resultados concuerdan con lo informado en México por López, *et al*; 2008, quien al evaluar la presencia de *cagA* y *vacA* de acuerdo con la localización anatómica en pacientes con y sin cáncer, observó que en los pacientes sin cáncer con aislamientos *cagA+* hay una distribución uniforme en antro y en cuerpo de este genotipo. En cuanto a *vacA*, el autor no reporta significancia estadística de la distribución del genotipo a través del estómago. (80)

Con respecto al genotipo completo de virulencia, se encontró que 25 pacientes presentaron infección por más de un genotipo de *H.pylori*, hallazgo que coincide con varios reportes en Colombia y Latinoamérica (9,53, 85, 86). Se ha sugerido que la presencia de varios genotipos en un mismo paciente, podría ser una

ventaja para que la bacteria sobreviva con más facilidad en los diferentes nichos ecológicos de la mucosa gástrica, o bien presentarse una competencia entre las cepas por mantenerse en el ambiente y transcurrido el tiempo una cepa predomine sobre las demás.(87, 88) Teniendo en cuenta que ante la presencia de este tipo de infecciones no se sabe con certeza cuál es el genotipo causante de la patología o involucrado con falla terapéutica, en este estudio se considero incluir estos aislamientos dentro del análisis estadístico.

Adicionalmente se analizó el genotipo completo en todos los pacientes, se observó presencia de 28 combinaciones diferentes, siendo la combinación más frecuente *cagA+/vacAs1am1/babA2+/iceA1* en el 16% de los casos; con mayor frecuencia en hombres 22% (9/41) que en mujeres 12,8% (10/78); este genotipo fue más frecuente en pacientes mayores de 50 años, sin embargo no se encontró diferencia significativa con relación a su presencia en pacientes menores de 50 años. Varios estudios reportan que las cepas más virulentas son aquellas que presentan las combinaciones *cagA+/vacAs1m1*, *cagA+/vacAs1m1/babA2+*, *cagA+/vacAs1m1/iceA1* ya que la presencia de estos genes puede estar relacionada con altos grados de colonización antral y corporal, adicionalmente la coexistencia de uno o más de estos genes resulta en un incremento de la severidad en cambios histopatológicos, este hallazgo es importante puesto que pone en evidencia la presencia de cepas virulentas de *H.pylori* en nuestra población. (46, 48,58)

Dado que los pacientes que se vincularon en el estudio se caracterizaban por presentar dispepsia funcional, y que el genotipo encontrado se caracteriza por ser el más virulento, se estudio la distribución del genotipo completo teniendo en cuenta los antecedentes familiares de cáncer gástrico y linfoma tipo MALT. El 29,4% (35/119) de los aislamientos provenían de 22 pacientes que refirieron haber tenido en su familia antecedentes de cáncer gástrico, en este grupo el genotipo

más frecuente fue *cagA+/vacAs1am1/babA2+/iceA1* en un 14,3% (5/35), sin embargo también se encontró la presencia de genotipos menos virulentos aunque en menores frecuencias. Solo un paciente refirió antecedentes familiares de linfoma tipo MALT, el cual también se caracterizó por presentar el genotipo *cagA+/vacAs1am1/babA2+/iceA1*. En Colombia no hay un estudio que muestre este tipo de análisis, sin embargo, se considero relevante hacerlo teniendo en cuenta que en nuestro país hay una alta prevalencia de cáncer gástrico y que la historia familiar de cáncer gástrico está asociada al aumento del riesgo de gastritis atrófica, metaplasia intestinal y cáncer gástrico, además porque se ha sugerido que la infección por cepas de *H.pylori* genéticamente similares en pacientes con antecedentes familiares de cáncer gástrico, es un factor importante en el desarrollo clínico de la infección, (47, 89) en especial si existe un historial materno de cáncer gástrico. (90) Lo anterior, plantea un seguimiento riguroso a aquellos pacientes con antecedentes de cáncer gástrico que presentan genotipos virulentos del microorganismo.

Por otra parte, teniendo en cuenta que de los 79 pacientes incluidos en el estudio, 44 aceptaron recibir tratamiento antibiótico cuya erradicación se verifico mediante la prueba de antígenos fecales, encontrando que en 10 pacientes no se logró erradicar la bacteria, se quiso analizar cuál fue el genotipo característico de en los aislamientos de estos pacientes, encontrando que el 2,5% presentó el genotipo *cagA-/vacAs1am1/babA2+/iceA1*, sin embargo, se presentaron diferentes combinaciones de los genes evaluados, que se caracterizaron porque en su genotipo completo eran negativos para *cagA*, presentaban el alelo m2, o porque fueron negativos para *babA2*, sin embargo también hubo pacientes que tuvieron falla terapéutica y presentaron la combinación *vacAs1am1*. Van Doorn, *et al*; 2000 y Sugimoto, *et al*; 2008 reportan que el éxito o fracaso terapéutico puede ser multifactorial, por lo que puede estar influenciado por los genotipos de virulencia que presente la cepa infectante, los dos autores concuerdan que los genotipos

que más fácilmente se erradican son los más virulentos, lo cual concuerda con lo encontrado en este trabajo. (11, 64) Esto se debe probablemente a que el *cagA*<sup>+</sup> está asociado con mayor respuesta inflamatoria que a la vez permite una mejor difusión de los antibióticos, debido a un aumento en el flujo sanguíneo y al aumento del pH gástrico gracias a la acción indirecta de la IL-1 $\beta$ ; mientras que las cepas *cagA*<sup>-</sup> producen menos inflamación y por ende hay menos inducción de IL-1 $\beta$ , y menos accesibilidad del antibiótico al lugar de la infección. Por otra parte las cepas *vacA*s1m1 se caracterizan por producir más toxina y más daño epitelial que las cepas *vacA*s2m2, las cuales se han asociado con mayor falla terapéutica. (64)

En este trabajo, cuatro pacientes fueron *cagA*<sup>-</sup> y presentaron el alelo m2. Aunque la literatura no reporta nada con relación a la falla terapéutica y los genotipos *babA2* e *iceA*, en este trabajo llama la atención que tres pacientes en los que se presentó falla terapéutica los aislamientos fueron *babA2*<sup>-</sup>.

La importancia del estudio de los factores de virulencia es que sirvan como marcadores epidemiológicos moleculares de tal manera que a futuro permitan crear estrategias de prevención de patologías severas, es por ello que en varios estudios se reporta asociación con los desenlaces clínicos de la enfermedad.

En general, diversos estudios han reportado asociación de *cagA* con úlcera péptica y con cáncer gástrico, en cuanto a *vacA* la combinación s1m1 es la más virulenta, reportándose asociación de *vacA*s1 con úlcera duodenal y de *vacA*m1 con úlcera péptica y cáncer gástrico. (16,87,47) La presencia de *cagA*<sup>+</sup>/*vacA*s1m1, se ha asociado significativamente con alta densidad del microorganismo, abundante infiltrado linfocitario y polimorfonuclear, atrofia, metaplasia intestinal y presencia de daño epitelial. (46)

Por otra parte, la presencia de *babA2*, se ha asociado con úlcera duodenal; la combinación *cagA*<sup>+</sup>/*vacA*s1/*babA2*<sup>+</sup> se correlaciona con la presencia de úlcera y

adenocarcinoma. (77, 92) Con relación al gen *iceA*, el alelo *iceA1* se ha asociado con úlceras pépticas, y cáncer gástrico; mientras que el alelo *iceA2* se ha asociado con úlcera duodenal y gastritis, sin embargo, la combinación *vacAs1/iceA1* también se ha asociado con úlcera duodenal. (92)

Dado que en la población estudiada el genotipo más frecuente fue *cagA+/vacAs1am1/babA2+/ice1* y teniendo en cuenta que no hay muchos estudios en los que se haya estudiado la combinación de estos cuatro genes y que en Colombia es el primer estudio en el que se evalúan de manera simultánea en una población de pacientes con dispepsia funcional y con criterios de inclusión muy estrictos, es importante considerar que los pacientes que estén infectados con los genotipos más virulentos, si no reciben tratamiento, o en su defecto si presentan falla terapéutica, podrían estar sujetos a desarrollar enfermedades más severas, como úlceras y adenocarcinoma si se tienen en cuenta la alta prevalencia de cáncer gástrico en nuestro país y las asociaciones entre la patología y los genotipos de virulencia del microorganismo reportadas por la literatura. Se recomienda para tener una mejor claridad de cómo el genotipo de virulencia puede afectar el desenlace de la enfermedad, realizar estudios a nivel celular de tal manera que permitan evaluar no solo alteraciones en las vías de señalización, sino también en la morfología celular.

## Capítulo 8

### CONCLUSIONES

1. Aunque en el estudio hubo más mujeres que hombres, se observa que la mayoría de la población incluida tuvo diagnóstico final de dispepsia funcional 29,7% de los aislamientos obtenidos provenían de pacientes con antecedentes familiares de cáncer gástrico.
2. Los genotipos más frecuentes en la población evaluada fueron: *cagA+*, *vacA* s1am1, *babA2* e *iceA1*, lo cual es un importante hallazgo teniendo en cuenta que de acuerdo a lo reportado por la literatura son los genotipos más virulentos y más frecuentemente asociados con el desarrollo de patologías severas. Dado que los pacientes al ingresar al estudio solo tenían dispepsia funcional y no patologías más severas como cáncer gástrico, úlceras pépticas o linfomas MALT; con los resultados del presente estudio planteamos la necesidad de investigaciones adicionales con seguimiento a largo plazo para determinar si en este tipo de pacientes se justificaría una vigilancia clínica y endoscópica.
3. El genotipo completo de los aislamientos provenientes de los pacientes con falla terapéutica se caracterizaron por ser *cagA-*, ó presentar el alelo m2 de *vacA*, cuyos genes se han asociado con falla terapéutica. Adicionalmente se encontró que algunos de los aislamientos de estos pacientes se caracterizaron por ser cepas que no solo eran *cagA-* y presentaban los alelos menos citotóxicos de *vacA* sino que además fueron *babA2-*.

4. Se diseñó un nuevo método para cultivo líquido de *H. pylori*, que ha recibido ya muy buenos comentarios de la comunidad científica a nivel internacional porque es una alternativa para obtener una cantidad importante de biomasa en poco tiempo y resultando mucho más eficiente que el medio sólido.

## Capítulo 9

### RECOMENDACIONES

1. Se recomienda estudiar como es el comportamiento de los aislamientos con genotipos menos virulentos frente a los antibióticos usados en las terapias contra *H.pylori* con relación a los aislamientos con los genotipos más virulentos, previa determinación de la ausencia de mutaciones que le confieran resistencia a los antibióticos evaluados, y así conocer si la resistencia a determinado antibiótico en nuestra población podría estar influenciada por el genotipo de virulencia en ausencia de resistencia molecular al medicamento.
2. Se recomienda estudiar la influencia a nivel intracelular de los genotipos *babA2+* e *iceA* en la patología gastroduodenal.
3. De acuerdo con estudios previos hechos en nuestro país y con los resultados encontrados en este trabajo se encontró que sigue prevaleciendo un genotipo virulento, dado que en este trabajo el genotipo *cagA+/vacAs1am1/babA2+/iceA1* fue el más frecuente se recomienda secuenciar estos aislamientos y analizar si hay diferencias en sus secuencias entre aislamiento y aislamiento a pesar de tener el mismo genotipo, para saber si es posible que haya un solo clon el circulante en la población a pesar de la amplia diversidad genómica del microorganismo.
4. En el caso de los aislamientos que presentaron un genotipo *cagA+* y que provenían de pacientes con antecedentes familiares de cáncer gástrico y linfoma tipo MALT, se recomienda analizar los motivos EPIYA

de estos aislamientos, usando como referencia aislamientos provenientes de pacientes con y sin cáncer gástrico.

5. Se recomienda implementar el medio de cultivo líquido para la extracción de DNA, ya que de acuerdo con los resultados obtenidos en el artículo “Sequential Statistical Improvement of Liquid Cultivation of *Helicobacter pylori*”. Se obtiene buena cantidad de biomasa del microorganismo, por lo que evitaría estar repicando continuamente el microorganismo para las diferentes pruebas.

## GLOSARIO

**ADN Girasa:** Es una de las topoisomerasas de ADN que actúa durante la replicación del ADN para reducir la tensión molecular causada por el superenrollamiento. La ADN girasa produce cortes de doble cadena y después los une.

**Alelo:** Copia de un gen.

**Antibiótico:** Sustancia química producida por un ser vivo o derivada sintética de ella que a bajas concentraciones mata -por su acción bactericida- o impide el crecimiento -por su acción bacteriostática- de ciertas clases de microorganismos sensibles, y que por su efecto, se utiliza en medicina humana, animal u horticultura para tratar una infección provocada por dichos microorganismos.

**Antígeno Lewis:** Un sistema de sustancias solubles en secreciones y en plasma que representa uno de los antígenos de grupo sanguíneo distinguibles serológicamente e inmunológicamente débiles. La especificidad de Lewis es llevada a cabo por glicoesfingolípidos y glicoproteínas

**Antro:** Zona distal del estómago, corresponde a una tercera parte de este, contiene células G liberadoras de gastrina. En la mayoría de sujetos colonizados *H. pylori* se encuentra en esta zona.

**ARN ribosomal 23S:** Es un componente de la subunidad 50S de los ribosomas de procariotas. Bioquímicamente, se trata de una cadena de ácido ribonucleico que, en *Escherichia coli*, posee 2.904 nucleótidos de longitud. En él radica la actividad peptidil transferasa del ribosoma, esencial en la biosíntesis de proteínas.

**ATPasas tipo P:** Enzimas que transportan protones e iones, siempre con consumo de ATP. Su denominación se debe a que forma un intermediario fosforilado al obtener energía del ATP. Todas las ATPasas de tipo P comparten homología en la secuencia de aminoácidos y todas son sensibles a la inhibición por el vanadato, que es similar al fosfato y toma su lugar en una de las fases del funcionamiento de la enzima.

**Bacterias gran-negativas:** Microorganismos que en la coloración de Gram se observan de color rojo y que se caracterizan por presentar una membrana celular interna la cual se rodea por una pared celular delgada de peptidoglucano y, hacia el lado externo del cuerpo celular una membrana celular externa que recubre la pared celular en estas bacterias. Entre la membrana citoplasmática interna y la membrana externa está el espacio periplásmico el cual presenta una sustancia llamada periplasma la cual contiene enzimas importantes para la nutrición en estas bacterias.

**Bomba de Protones:** Proteína integral de membrana que es capaz de movilizar protones a través de la membrana de una célula, de la mitocondria o de cualquier otro compartimento subcelular.

**Citocinas:** Factores de crecimiento que regulan a las células sanguíneas y linfocitos.

**Cuerpo:** Zona proximal del estómago que comprende dos terceras partes y en la que se encuentran las células parietales secretoras de ácido y las células similares a enterocromatina (ECL) liberadoras de histamina.

**Delección:** Tipo especial de anomalía estructural cromosómica que consiste en la pérdida de un fragmento de ADN de un cromosoma. Esta pérdida origina un desequilibrio, por lo que las delecciones están incluidas dentro de las reordenaciones estructurales desequilibradas. Una delección puede producirse en el extremo de un cromosoma (delección terminal) o a lo largo de uno de sus brazos (delección intersticial).

**Dispepsia:** Condición clínica es definida como un dolor, malestar o trastorno en la parte central del abdomen, la mayoría de pacientes con dispepsia no tienen ulceración péptica (dispepsia no ulcerativa) u otra enfermedad excepto gastritis que claramente explica los síntomas.

**Endonucleasas:** Grupo de enzimas, cada una de las cuales se une al ADN en una secuencia de bases distinta y produce fragmentos de ADN de distinta longitud.

**Factor de crecimiento epidermal (EGF):** Factor de crecimiento que estimula la proliferación celular. Tiene capacidad mitogénica sobre una amplia variedad de células epiteliales, hepatocitos y fibroblastos. Esta actividad es importante en la cicatrización de heridas, situación en la que los macrófagos, los queratinocitos y otras células inflamatorias que migran a la zona dañada segregan dicho factor, que se distribuye ampliamente en secreciones tisulares y fluidos.

**Gastritis:** Inflamación aguda o crónica de la mucosa del estómago. En la forma aguda se producen erosiones de las células superficiales, formaciones nodulares y a veces hemorragia de la pared gástrica. En la forma crónica se produce, además, una transformación progresiva de la mucosa a tejido fibroso.

**Inhibidor de la bomba de protones:** Medicamentos cuya acción principal es la reducción pronunciada y duradera de la producción de ácido en el jugo gástrico. Los inhibidores de la bomba de protones son bases débiles lipofílicos y, estructuralmente, todos estos fármacos son distintas variantes del benzimidazol.

**Interleucina:** Conjunto de citocinas que son sintetizadas principalmente por los leucocitos, aunque en algún caso también pueden intervenir células endoteliales o del estroma del timo o de la médula ósea. Su principal función es regular los eventos que atañen a las funciones de estas poblaciones de células del sistema inmune, como la activación, diferenciación o proliferación, la secreción de anticuerpos, la quimiotaxis, regulación de otras citocinas y factores, entre otras.

**Lipopolisacáridos (LPS):** Componentes de la membrana externa de las bacterias Gram negativas que está constituida por un lípido, un oligosacárido central y una cadena O unida al azúcar.

**Linfoma:** Cáncer originado de la proliferación descontrolada de linfocitos.

**Linfoma tipo MALT:** Linfoma originado a partir del tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica compuesto en su mayoría por linfocitos B.

**Locus:** posición fija sobre un cromosoma, como la posición de un gen o de un biomarcador (marcador genético).

**Mutación:** Alteración genética.

**Pepsina:** Enzima digestiva que degrada las proteínas en el estómago. Se produce en el estómago, actúa sobre las proteínas degradándolas, y proporciona péptidos y aminoácidos en un ambiente muy ácido.

**Proteínas quiméricas:** O proteínas de fusión son proteína elaboradas con un gen de fusión, que se crea al unir partes de dos genes diferentes. Los genes de fusión se pueden presentar de forma natural en el cuerpo mediante la transferencia de ADN entre los cromosomas. Los genes de fusión y las proteínas también se pueden producir en el laboratorio al combinar genes o partes de los genes de un mismo organismo o de organismos diferentes.

**Recombinación introgenómica:** Recombinación dentro del mismo gen.

**Transposasas:** Enzimas que corta el ADN de forma específica en una secuencia diana originando extremos cohesivos de modo similar a algunas enzimas de restricción.

**Úlcera:** Toda lesión de la piel o membrana mucosa con forma crateriforme, que se forma al perderse parte del tejido y que tiene escasa o nula tendencia a la cicatrización.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Amieva M.R, Omar E.E. Host Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterology*.2008; 134 (1): 306-329.
2. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *New England Journal of Medicine*. 2002. 347 (15): 1175-1185.
3. Höcker M, Hohenberg P. *Helicobacter pylori* virulence 5551factors-one part of a big picture. *The Lancet*. 2003. Oct. 362. 1231-33.
4. Kusters J.G, Vliet A.M.A.M, Kuipers E.J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 2006. July 19(3).449-490.
5. Caner V, Yilmaz M, Yonetci N, Zencir S, Karagenc N, Kaleli I, Bagci H. *H pylori iceA* alleles are disease-specific virulence factors. *World J Gastroenterol* 2007. May 14; 13(18). 2581-2585.
6. Van Doorn L-J, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, Boer W, Quint W. Clinical Relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* Status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1998; 115:58-66.
7. Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim J.G, Kashima K, Graham D. Relationship between *Helicobacter pylori iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999; 37(7): 2274-2279.

8. Quiroga A.J, Cittelly D.M, Bravo M.M. Frecuencia de los genotipos babA2, oipA y cagE de *Helicobacter pylori* en pacientes colombianos con enfermedades gastroduodenales. *Biomedica*. 2005; 25:325-34.
9. Podzorski R.P, Podzorski D.S, Wuerth A, Tolia V. 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 Infectious Disease*. 2003; 46: 83-88.
10. Yepes C.A, Rodríguez Varón C.A, Ruiz Morales A, Ariza B. Resistencia antibiótica del *Helicobacter pylori* en el Hospital Universitario San Ignacio de Bogotá. *Acta Medica Colombiana*. 2008; 33 (1): 11-14.
11. Van Doorn J-I, Schneeberger P.M, Nouhan N, Plaisier A.P, Quint WGV , Boer WA. Importance of *Helicobacter pylori* *cagA* and *vacA* status for the efficacy of antibiotic treatment. *Gut*. 2000; 46: 321-326.
12. Toro C, García-Samaniego J, Alarcón T, Baquerod M. Relación entre detección de anticuerpos anti-CagA, sensibilidad antibiótica y úlcera péptica en pacientes con infección por *Helicobacter pylori*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003; 21(3): 137-41.
13. Trespalacios AA, Otero W, Mercado MM. Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. *Revista Colombiana De Gastroenterología*. 2010; 25: 31-38.
14. Tomb J.F, White O, Kerlavage A.R, Clayton R.A, Sutton G.G, Fleischmann R.D, Ketchum K.A, Klenk H.P, Gill S, Dougherty B.A, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness E.F, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak H.G, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald L.M, Lee N, Adams M.D, Hickey E.K, Berg D.E, Gocayne J.D, Utterback T.R,

- Peterson J.D, Kelley J.M, Cotton M.D, Weidman J.M, Fujii C, Bowman C, Wathley L, Wallin E, Hayes W.s, Borodovsky M, Karpk P.D, Smith H.O, Fraser C.M, Venter J.C. The Complete Genoma Secuence of Pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*.1997; 338;539-547.
15. Dunn B.E. Phadnis S.H. Structure, Function and Localization of *Helicobacter pyloni* Urease. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 1999; 71: 63-73.
16. Atherton J.C. *H. pylori* virulence factors. *British Medical Bulletin* 1998;54 (1): 105-120.
17. Justin T. Schwartz and Lee-Ann H. Allen. Role of urease in megasome formation and *Helicobacter pylori* survival in macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 2006; 79: 1214-1225.
18. Montecucco C, Rappuoli R. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001; 2: 457-466.
19. Yamaoka. Roles of *Helicobacter pylori* BabA in gastroduodenal pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. 2008. 14(27): 4265-4272.
20. Backstrom A, Lundberg C, Kersulyte D, Berg D.E, Borén T, Arnqvist A. Metastability of *Helicobacter pylori* bab Adhesion Genes and Dynamics in Lewis b Antigen Binding. *PNAS*. 2004; 101(48): 16923–16928.

21. Aspholm-Hurtig M, Dailide G, Lahmann M, Kalia A, Ilver D, Roche N, Vickström S, Sjöström R, Lindén S, Bäckström A, Lundberg C, Arnqvist A, Mahdavi J, Nilsson U.J, Velapatiño B, Gilman R.H, Gerhard M, Alarcon T, López-Brea M, Nakazawa T, Fox J.G, Correa P, Dominguez-Bello M.G, Carlstedt G, Oscarson S, Teneberg S, Berg D.E, Borén T. Functional adaptation of BabA, the *H.pylori* ABO blood group antigen binding adhesin. *Science*. 2004; 305 (23): 519-522.
22. Audibert C, Burucoa C, Janvier B, Fauchere J.L. Implication of the Structure of the *Helicobacter pylori* cag Pathogenicity Island in Induction of Interleukin-8 Secretion. *Infection and Immunity*. 2000; 1625-1629.
23. Kutter S, Buhrdorf R, Haas J, Schneider-Brachert W, Haas R, Fischer W. Protein Subassemblies of the *Helicobacter pylori* Cag Type IV Secretion System Revealed by Localization and Interaction Studies. *Journal of Bacteriology*. 2008; 190: 6 2161-2171.
24. Busler V.J, Torres V.J, McClain M.S, Tirado O, Friedman D.B, Cover T.L. Protein-Protein Interactions among *Helicobacter pylori* Cag Proteins. *Journal of Bacteriology*. 2006; 188:13: 4787-4800.
25. Backert S, Selbach M. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cellular Microbiology*. 2008; 10: 8: 1573-1581.
26. Hatakeyama M. Oncogenic Mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nature Reviews Cancer*. 2004; 4: 688-694.
27. Hatakeyama M, Higashi H. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci*. 2005; 93 (12); 835-843.

28. Arévalo G. A, Trespalacios A.A, Otero W. Importancia de la proteína *cagA* en infección por *Helicobacter pylori*. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 2009; 24 (4): 388-395.
29. Saadat I, Higashi H, Obuse C, Umeda M, Murata-Kamiya N, Sait Y, Lu H, Ohnishi N, Azuma T, Suzuk A, Ohno S, Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature*. 2007; 447: 330-333.
30. Wen S, Moss S.F. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Letters*. 2009; 1-8.
31. Ohnishi N, Yuasa H, Tanaka S, Sawa H, Miura M, Matsui A, Higashi H, Musashi M, Iwabuchi K, Suzuki M, Yamada G, Azuma T, Hatakeyama M. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *PNAS*. 2008; 105 (3): 1003-1008.
32. Cover T.L, Tummuru M.K.R, Cao P, Thompson S.A, Blaser, M.J. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269 (14): 10566-10573.
33. Ogiwara H, Graham D, Yamaoka Y. *vacA* i.Region subtyping. Correspondence. *Gastroenterology* 2008;134:1267–1276.
34. Cover T.L, Blanke S.R. *Helicobacter pylori vacA*, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nature Reviews Microbiology*. 2005; 2-14.
35. Peek R.M, JR. Microbes and Microbial Toxins: Paradigms for Microbial-Mucosal Interactions IV. *Helicobacter pylori* strain-specific activation of

- signal transduction cascades related to gastric inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001; 280: 525-530.
36. Kidd M, Peek R M, Lastovica A.J, Israel D.A, Kummer A.F, Louw J.A. Analysis of *iceA* genotypes in South African *Helicobacter pylori* strains and relationship to clinically significant disease. *Gut* 2001;49:629–635.
37. Figueiredo C, Quint W.G.V, Sanna R, Sablon E, Donahue J.P, Xu Q, Miller G.G, Peek Jr. R.M, Blaser M.J, van Doorn L-J. Genetic organization of the *iceA* locus of *Helicobacter pylori*. *An International Journal on Genes, Genomes and Evolution.* 2000; 246: 59-68.
38. Donahue J.P, Peek. Jr. R.M, van Doorn L-J, Thompson S.A, Xu Q, Blaser M.J, Miller G.G. Analysis de *iceA1* transcription in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 2000; 5 (1): 1-12.
39. Del Giudice G, Michetti P. Inflammation, Immunity and Vaccines for *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 2004; 9: supl.1: 23-28.
40. Wilson KT, Crabtree JE. Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. *Gastroenterology.* 2007; 133: 288-308.
41. O’Keeffe J, Moran A.P. Conventional, Regulatory, and unconventional T Cell in the immunology Response to *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 2008; 13:1-19.
42. Versalovic J. *Helicobacter pylori* Patology and Diagnostic Strategies. *Am J Clin Pathol.* 2003; 119: 1-7.
43. Otero R. W, Gómez A. M, Castro D. Carcinogenesis gástrica. *Revista Colombiana de Gastroenterología.* 2009; 24 (3): 314-329.

44. Kandel G. *Helicobacter* and Disease: Still more Questions than Answers. *Surgical Biology for the Clinician*. 2000; 43 (5); 339-346.
45. Yamaoka Y. Roles of the plasticity regions of *Helicobacter pylori* in gastroduodenal pathogenesis. *J Med Microbiology*. 2008; 57: 545-553.
46. Nogueira C, Figueiredo C, Carneiro F, Taveira Gomes A, Barreira R, Figueira P, Salgado C, Belo L, Peixoto A, Bravo J.C, Bravo L.E, Realpe J.L, Plaisier A.P, Quint W.G.V, Ruiz B, Correa P, van Doorn L-J. *Helicobacter pylori* Genotypes may Determine Gastric Histopathology. *American Journal of Pathology*. 2001; 158 (2): 647-654.
47. Miehlik S, Yu J, Schuppler M, Frings C, Kirsch C, Negraszus N, Morgner A, Stolte M, Ehninger G, Bayerdorffer E. *Helicobacter pylori vacA, iceA* and *cagA* Status and Pattern of Gastritis in Patients with Malignant and Benign Gastroduodenal Disease. *The American Journal of Gastroenterology*. 2001; 96 (4): 1008-1013.
48. Zambon C-F, Navaglia F, Basso D, Rugge M, Plebani M. *Helicobacter pylori babA2, cagA*, and *s1 vacA* genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. *J Clin Pathol*. 2003; 56: 287-291.
49. Chin-Lin Perng, Hwai-Jeng Lin, Wen-Ching Lo, Guan-Ying Tseng, I-Chen Sun, Yueh-Hsing Ou. Genotypes of *Helicobacter pylori* in patients with peptic ulcer bleeding. *World Journal of Gastroenterology*. 2004; 10 (4): 602-605.
50. Seok-Yong Kim, Chan Won Woo, Young-Min Lee, Bo Ra Son, Ji Won Kim, Hee Bok Chae, Sei Jin Youn, Seon Mee Park. Genotyping *cagA vacA* subtype, *iceA1* and *babA* of *Helicobacter pylori* isolates from Korea

- Patients, and Their Association with Gastroduodenal Diseases. *J Korean Med Sci.* 2001; 16: 579-584.
51. Chomvarin CH, Namwat W, Chaicumpar K, Mairiang P, Sangchan A, Sripa B, Tor-Udom S, Vilaichone R. Prevalence of *Helicobacter pylori* *vacA*, *cagA*, *cage*, *iceA* and *babA2* genotypes in Thai dyspeptic patients. *International Journal of Infectious Diseases.* 2008; 12: 30-36.
52. Moncayo, J.I, Santacruz, J.J. Detección del Gen *cagA* y Tipificación del Gen *vacA* en Cepas de *Helicobacter pylori* Aisladas, de Pacientes con Enfermedad Úlcero-Péptica en Risaralda / Detection of *cagA* gene and typing of the *vacA* gene in *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with ulcer disease in Risaralda. *MedUNAB.* 2000; 3(8): 69-75.
53. D.M, Huertas G.M, Martínez J.D, Oliveros R, Posso H, Bravo M.M, Orozco O. Los Genotipos de *Helicobacter Pylori* en Gastritis no Atrófica Difieren de los Encontrados en Úlcera Péptica, Lesiones Premalignas y Cáncer Gástrico. *Colombia. Rev. Med. Chile.* 2002; 130 (2): 1-12.
54. Fennerty M.B. *Helicobacter pylori*: Why it still matters in 2005. *Cleveland Clinic journal of Medicine.* 2005; 72: Suppl 72. 1-7.
55. Malaty H.M. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* 2007; 21 (2): 205-214.
56. Bruce M.G, Maaros H.I. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2008; 13:Suppl 1. 1-6.
57. Fernández M.H. Más sobre el *Helicobacter pylori* en Colombia: Gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal y costumbres de tratamiento. *Rev. Col Gastro.* 2007; 4-6.

58. Höcker M, Hohenberger P. *Helicobacter pylori* virulence factors-one part of a big picture. *The Lancet*. 2003; 362: 1231-33.
59. Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical Microbiology Reviews*. 2007; 20(2):280-322.
60. Megraud F, Lehn N, Lind T, Bayerdorffer E, O'morain C, Spiller, Unge P, Sander Veldhuyzen Van Zanten, Michael Wrangstadh, Carl Fredrik Burman. Antimicrobial Susceptibility Testing of *Helicobacter pylori* in a Large Multicenter Trial: the MACH 2 Study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999; 43(11): 2747-2752.
61. Concepción J. Puerta B. Claudia P. Ureña P. Practicas de Biología Molecular. Editorial Javeriana. 2005: 1-100.
62. Gerrits M. M, Vliet A, Kuipers E, Kusters J.G. *Helicobacter pylori* and Antimicrobial Resistance: Molecular Mechanisms And Clinical Implications. *Lancet Infect*. 2006; 6:699-709.
63. P Malfertheiner, F Megraud, C O'Morain, F Bazzoli, E El-Omar, D Graham, R Hunt, T Rokkas, N Vakil, E J Kuipers, The European Helicobacter Study Group. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*. 2007; 56: 772-781.
64. Sugimoto M, Yamaoka Y. Virulence Factor Genotypes of *Helicobacter pylori* affect cure rates of eradication therapy. *Arch. Immunol. Ther*. 2009; 57: 45-56.
65. Pelayo Correa, Leen-Jan van Doorn, Juan C. Bravo Bernardo Ruiz, Luis E. Bravo, J. Luis Realpe. Unsuccessful Treatment Results in Survival of Less

- Virulent Genotypes of *Helicobacter pylori* in Colombian Patients. *AJG*. 2000; 95 (2): 564- 566.
66. Opavski N, Spuran M, Djukić S, Mijac V, Ranin L. Comparison of Three Diagnostic Methods to Confirm *Helicobacter pylori* Infection. *Srp Arh Celok Lek*. 2007; 135 (1-2): 26-30.
67. Cittelly D. M, Henao S. C, Orozco O, Martínez J D. Detección de *Helicobacter pylori* en Colombia: Diferentes Metodologías Aplicadas en una Población de Alto Riesgo. *Rev Col Gastro*. 1999; 14 (3): 146-50.
68. Moncayo JI, Santacruz JJ. Comparación de métodos diagnósticos en la infección por *Helicobacter pylori* en Quindío, Colombia. *Colombia Médica* 2006; 37 (3).
69. Kitos Cm, Stanlander CTK-H. *Helicobacter pylori* in liquid culture: evaluation of growth rates and ultrastructure. *Curr Microbiol*. 1998; 37:88-93.
70. Xia HX, English L, Keane CT, O'Morian CA. Enhanced cultivation of *Helicobacter pylori* in liquid media. *J Clin Pathol*. 1993; 46: 750-3.
71. Nedeskov P. Nutritional requirements for growth of *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol*. 1994; 60: 3450-3.
72. Umit H, Tezel A, Bukavaz S, Unsal G, Otkum M, Soyulu A.R, Tucer D, Otkum M, Bilgi S. The Relationship Between Virulence Factors of *Helicobacter pylori* and Severity of Gastritis in Infected Patients. *Dig Dis Sci*. 2009; 54 (1): 103-10.
73. Muñoz Angela, Trespalacios Alba, Navarro Juliana, Mercado Marcela. Evaluación de la Resistencia a Claritromicina y Metronidazol en Genotipos

- cagA* y *vacA* de Aislamientos Clínicos de *Helicobacter pylori*. Tesis. 2007; 1-96.
74. Ribeiro M.L, Ortiz Godoy M.P, Borges Y. H, Mendonca S, Pedrazzoli J. Clinical Relevance of the *cagA*, *vacA* and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* in Brazilian Clinical Isolates. *Immunology and Medical Microbiology*. 2003; 36: 181-185.
75. Oliveira A.G, Santos A, Becattini Guerra A, Aguiar Rocha G, Camargos A.M, Oliveira C.A, Demas Alvares M.M, Ferreira Nogueira A.M.M, Magalhaes Queiroz D.M. *babA2*- and *cagA*- Positive *Helicobacter pylori* Strains Are Associated with Duodenal Ulcer and Gastric Carcinoma in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41 (8) 3964-3966.
76. Martinez Echavarría M. T, Gonzalez Torres M. Ferreira Capote R. Mas Paez J A. Genotipo *cagA*+ en cepas de *Helicobacter pylori* Asociadas a Ulcera Péptica, Gastritis Crónica y Cáncer Gástrico. *Rev Cubana Med*. 2008; 47 (2): 1-8.
77. Torres L.E, Melián K, Moreno A, Alonso J, Sabatier C.A, Hernández M, Bermúdez L, Rodríguez B.L. Prevalence of *vacA*, *cagA* and *babA2* genes in Cuban *Helicobacter pylori* isolates. *World Journal Gastroenterology*. 2009; 15 (2) 204-210.
78. Rudi J, Rudy A, Maiwald M, Kuck D, Sieg A, Stremmel W. Direct Determination of *Helicobacter pylori vacA* Genotypes and *cagA* Gene in Gastric Biopsies and Relationship to Gastrointestinal Diseases. *American Journal of Gastroenterology*. 1999. 94(6): 1526-1531.
79. Soltermann A, Koetzer S, Eigenmann F, Komminoth. Correlation of *Helicobacter pylori* virulence genotypes *vacA* and *cagA* with histological

- parameters of gastritis patients age. *Modern Pathology*. 2007; 20(8): 878-883.
80. Lopez Vidal Y, Ponce-de-Leon S, Castillo-Rojas G, Barreto-Zuñiga R, Torre-Delgadillo A. High Diversity of *vacA* and *cagA* *Helicobacter pylori* Genotypes in Patients with and without Gastric Cancer. *Genetics in Gastric Cancer*. 2008; 3(12): 3849-3850.
81. Erzin Y, Koksall V, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, Dirican A, Kocazeybek B. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA*, *cage*, *babA2* Genotypes and Correlation with Clinical Outcome in Turkish Patients with Dyspepsia. *Helicobacter*. 2006; 11: 574-580.
82. Lobo Gatti L, Fagundes E. K, Ramos K, Lemos de Souza E, Vicentini L.R, da Silva L.C, Cardoso Smith M.A, Marques Payao S.L. *cagA vacA* alleles and *babA2* genotypes of *Helicobacter pylori* associated with gastric disease in Brazilian adult patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2005; 231-235.
83. Paniagua G.L, Monroy E, Rodriguez R, Arroniz S, Rodriguez C, Cortes J.L, Camacho A, Negrete E, Vaca S. Frequency of *vacA*, *cagA* and *babA2* Virulence markers in *Helicobacter pylori* Strains Isolated From Mexican Patients with Chronic Gastritis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2009; 8(14): 2-6.
84. Peek RM Jr, Thompson SA, Donahue JP, Tham KT, Atherton JC, Blaser MJ, Miller GG. Adherence to Gastric Epithelial Cells Induces Expression of *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is Associated with Clinical Outcome. *Proc Assoc Am Physicians*. 1998. 110(6): 531-544.

85. Morales Espinosa R, Castillo Rojas G, Gonzalez Valencia G, Ponce S, Cravioto A, Atherton J, Lopez Vidal Y. Colonization of Mexican Patients by Multiple *Helicobacter pylori* Strains with Different *vacA* and *cagA* Genotypes. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999; 37(9): 3001-3004.
86. Garcia A, Barra R, Delgado C, Kawaguchi F, Trabal N, Montenegro S, Gonzalez C. 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. *Rev Med Chile*. 2006; 134:981-988.
87. Figueiredo C, Van Doorn LJ, Nogueira C, Soares JM, Pinho C, Figueira P, Quint WG, Carneiro F. *Helicobacter pylori* Genotypes are Associated with Clinical Outcome in Portuguese Patients and Show a High Prevalence of Infections with Multiple Strains. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2001 36 (2): 128-135.
88. Blaser MJ. The Versatility of *Helicobacter pylori* in the adaptation to the Human Stomach. *J Physiol Pharmacol*. 1997; 48(3): 307-314.
89. Chang YW, Han YS, Lee DK, Kim HJ, Lim HS, Moon JS, Dong SH, Kim BH, Lee JI, Chang R. Role of *Helicobacter pylori* Infection Among Offspring or Siblings of Gastric Cancer Patients. *Int J Cancer*. 2002. 101(5):469-474.
90. Yamaoka Y, Malaty H.M, Osato M.S, Graham D. Conservation of *Helicobacter pylori* Genotypes in Different Ethnic Groups in Houston, Texas. *The Journal of Infectious Disease*. 2000; 181: 2083-2086.
91. Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Boren T, Rad R, Schepp W, Miehle S, Classen M, Prinz C. Clinical Relevance of the *Helicobacter pylori* Gene for Blood-Group Antigen-Binding Adhesin. *PNAS*. 1999; 96(22): 12778-12783.

92. Ramandan Ashour A.A, Birchal Collares G, Nogueira M.E, Ribeiro V, Magalhaes Queiroz D.M, Prazeres Magalhaes P, Sales Tales A, Oliveira C.A, Ferreira Nogueira A.M.M, Aguiar Rocha G, Camargos Rocha A.M. *iceA* Genotypes of *Helicobacter pylori* Strains Isolated from Brazilian Children and Adults. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001; 39(5): 1746-1750.

**ANEXOS****Anexo A: Erradicación de *Helicobacter pylori*: Triple terapia con levofloxacina.****CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Estimado paciente:

Usted ha sido enviado por su médico tratante para realizarle una endoscopia de vías digestivas altas, la cual será realizada por gastroenterólogos expertos y al final de la misma como es usual, estos profesionales, le darán un resultado. Teniendo en cuenta que en el momento los profesionales de esta unidad de gastroenterología, están realizando una investigación, nos parece muy importante que usted conozca lo siguiente:

***Helicobacter pylori*** es una bacteria que infecta el estómago de los seres humanos y produce gastritis crónica, la cual generalmente no produce ninguna molestia, sin embargo la infección puede producir úlceras en una de cada seis personas y ocasionalmente también puede producir tumores aunque en una menor proporción que puede ser aproximadamente en uno de cada 100 personas infectadas. Actualmente existen varias combinaciones de antibióticos para eliminar esta infección, pero cada día esta bacteria, desarrolla resistencia a los antibióticos y por ello un grupo de investigadores, expertos en la infección por ***Helicobacter pylori*** de la Universidad Javeriana y de la Universidad Nacional de Colombia, están realizando una investigación con el propósito de estudiar si una nueva combinación de antibióticos es más eficaz que la combinación que tradicionalmente ha sido utilizada para tratar esta infección. Para este estudio se incluirán 300 pacientes. Si usted tiene la infección, este grupo de investigadores, lo invita a participar en el estudio, el cual consiste en lo siguiente:

1. Durante la endoscopia, le serán tomadas unas biopsias (unas muestras muy pequeñas del tejido que recubre el estómago) para determinar si usted tiene la infección por ***Helicobacter pylori***, y también se le tomarán otras muestras para estudiar si la bacteria que usted tiene en su estómago, es resistente o no a los antibióticos que se utilizan como los de primera línea para tratar la infección.
2. Si se comprueba que usted tiene la infección, a usted se le dará uno de tres esquemas de tratamiento con eficacia comprobada para esta infección. Estos antibióticos serán medicamentos originales, que no tendrán para usted ningún costo. Cualquiera de ellos se considera que son excelentes pero para los propósitos de la investigación, los investigadores y usted sólo sabrán que recibió la combinación #1, # 2 o # 3, que tendrán una duración de diez días. En cada grupo habrá aproximadamente 100 pacientes. Lo antibióticos que hacen parte de estos esquemas son Amoxicilina, Claritromicina y Levofloxacina los cuales se combinarán con otro medicamento llamado esomeprazol, el cual se utiliza para el tratamiento de

úlceras y del reflujo gastroesofágico. Todos estos medicamentos se utilizan de manera rutinaria en pacientes con diversas infecciones y por lo tanto no

son sustancias experimentales. Lo que se desea es ver si en Colombia estos antibióticos todavía son útiles para eliminar la infección.

3. Una vez usted haya sido confirmado como apto para participar en el estudio será citado para entregarle el medicamento y en ese momento se le tomará una muestra de sangre con la que se realizará una prueba serológica para buscar anticuerpos específicos contra *Helicobacter pylori*. La muestra será guardada en los laboratorios de la Universidad Javeriana con el fin de conformar un banco de muestras para posteriores análisis relacionados con la patología en estudio.
4. Usted será contactado por teléfono al cuarto y al décimo día de su tratamiento con el fin de verificar el manejo que le ha dado a su tratamiento y se le hará un interrogatorio sobre los posibles efectos adversos que pueda causar el tratamiento.
5. Ocho semanas después de terminar el tratamiento, a usted se le pedirá una muestra de materia fecal para realizarle una prueba que se llama “antígenos fecales”, que determinará si la infección fue curada. Esta prueba también se realizan de manera rutinaria en todo el mundo y simplemente se va a seguir utilizando en su caso.
6. Al finalizar el estudio, a usted se le informará sobre los resultados de su caso, así como también sobre la eficacia o no de los medicamentos en toda la población de pacientes que participaron en el mismo.
7. El beneficio de esta investigación es múltiple: en su caso recibir un tratamiento eficaz para erradicar la infección y para el país poder determinar si *Helicobacter pylori* en nuestro medio, responde mejor a uno de los tres esquemas o si todos son iguales. Con base en esos resultados, otros colombianos se beneficiarán de las conclusiones de esta investigación.

Si usted no desea participar en el estudio, su atención médica no se modificará y se le atenderá con la misma ética, dedicación y alta calidad independientemente de que no participe. Aunque los medicamentos que usted recibirá son utilizados rutinariamente, nadie sabe si usted pueda tener algún efecto colateral (diarrea, alergias, sabor metálico, alteraciones de las pruebas

del hígado, etc.) y por lo tanto, se le llenará una encuesta para determinar la frecuencia de estos.

En cualquier momento usted es libre de retirarse de la investigación, sin detrimento en la calidad de su atención médica. Cualquier información adicional, gustosamente será suministrada por nosotros.

La decisión que Ud. tome es voluntaria y no influirá en el tratamiento que recibe esta institución.

NOMBRE DEL PACIENTE: \_\_\_\_\_

HC: \_\_\_\_\_

DIAGNOSTICO: \_\_\_\_\_

FECHA: \_\_\_\_\_

Luego de conocido el objetivo de la presente, yo \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ identificado con C.C. \_\_\_\_\_,

Acepto mi participación voluntaria en el estudio a realizar.

Firma \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

Testigos:

**ANEXO B. FORMATO DE REGISTRO DE INFORMACIÓN  
ERRADICACIÓN *Helicobacter pylori*: TRIPLE TERAPIA CON  
LEVOFLOXACINA  
INVESTIGADOR PRINCIPAL: ALBA ALICIA TRESPALACIOS  
PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS – DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**

Las preguntas que se presentan a continuación corresponden a una información requerida para la realización de un estudio que llevarán a cabo La Pontificia Universidad Javeriana en asocio con la Universidad Nacional de Colombia, sobre erradicación de la infección causada por *Helicobacter pylori*. El estudio evaluará la eficacia a tres antibióticos (claritromicina, amoxicilina y levofloxacina), y estudiará las mutaciones que confieren resistencia a estos tres antibióticos.

Agradecemos de antemano su colaboración.

Número de Encuesta    Fecha:       GRUPO   
dd mm aaaa

**1. Características sociodemográficas**

**Nombres** \_\_\_\_\_ **y**  
**Apellidos:** \_\_\_\_\_

**C.C:**

**Teléfono residencia:**

**Teléfono oficina:**

**Centro hospitalario:**

1. Clínica fundadores
2. Clínica Carlos Lleras
3. Centro de enfermedades digestivas

**Región de procedencia:**

1. Andina
2. Pacífica
3. Oriental
4. Caribe
5. Amazonía
6. Insular

**Sexo:**

1F 2 M

**Edad:**

**Peso**    Kg

**Talla**    cm

**Estrato:**

1I      2II      3III      4IV      5V      6VI      7NHD      8NS

**FUMA**

1 Si      2. No

Diariamente cuantos cigarrillos fuma

1. 1-5      2. 6 – 10      3. 11-20      4. Mas de 20

Total paquetes al año:

**Número de personas del grupo familiar:**

**Nivel de escolaridad:** 

1. Primaria incompleta                      2. Primaria    3. Secundaria Incompleta 4.  
 Secundaria 5. Técnica    6. Universitaria Incompleta                      9. Universitaria  
 10. Postgrado

**2. Antecedentes Familiares:**

**Algún miembro de su familia hasta tercer grado de consanguinidad ha presentado alguna enfermedad gastroduodenal?**

0No            1Si    7NHD 8NS

**Cuál**

1Gastritis    2Úlcera péptica                      3Dispesia funcional

**Algún miembro de su familia hasta tercer grado de consanguinidad ha padecido cáncer gástrico?**

0No            1Si    7NHD 8NS

**Cuál**

1Ca gástrico                      2linfoma tipo MALT

**3. Antecedentes clínicos:**

**El paciente ingresa al estudio por presentar**

1. Dispepsia            2. Reflujo            3. Anemia            4 Disfagia            5. Pérdida de peso  
 6. Otros

**Años de evolución**

**Ha recibido tratamiento en los últimos 2 años**

0No    1Si    7NHD 8NS

**Cuántas veces ha sido tratado**

**Con cual esquema ha sido tratado**

- 0 (Metronidazol+amoxicilina+inhibidor de la bomba de protones)  
 1 (Clarithromicina+amoxicilina+inhibidor de la bomba de protones)  
 2 Otro esquema diferente  
 3 NS

**(Guiar al paciente a la lista adjunta de inhibidores de la bomba de protones)**

**4. Pruebas de laboratorio**

Test de Ureasa al inicio del tratamiento

0Negativo    1positivo

Test de antígenos fecales al inicio del tratamiento

0Negativo    1positivo

Cultivo bacteriano   
 0Negativo 1positivo

Número de cepas aisladas   
 Antibiograma cepa 1  
 0 Resistente 1 Intermedio 2 Sensible  
 Amoxicilina   
 Claritromicina   
 Levofloxacin

Antibiograma cepa 2  
 0 Resistente 1 Intermedio 2 Sensible  
 Amoxicilina   
 Claritromicina   
 Levofloxacin

Antibiograma cepa 3  
 0 Resistente 1 Intermedio 2 Sensible  
 Amoxicilina   
 Claritromicina   
 Levofloxacin

### Pruebas moleculares

Presencia de mutación para amoxicilina   
 0No 1Si

cual \_\_\_\_\_  
 Presencia de mutación para levofloxacin   
 0No 1Si

cual \_\_\_\_\_  
 Presencia de mutación para claritromicina   
 0No 1Si

Cual   
 0A2142C 1A2142G 2ª2143G

### 5. Evaluación del desenlace

Test de Ureasa 8 semanas depuse del tratamiento   
 0Negativo 1positivo

Test de antigenos fecales 8 semanas después del tratamiento   
 0Negativo 1positivo

Erradicación del *H. pylori*

0NO 1SI

1. Diagnostico endoscópico:

Tumor esofágico: No, Si: tercio superior, tercio medio, tercio inferior,  
Biopsias siempre

Lesiones elevadas subepiteliales: No Si: tercio superior, medio, inferior

Diverticulo de Zenker:

0NO 1SI

Diverticulo Epifrenico:

0NO 1SI

Moniliasis esofágica:

0NO 1SI

Papilomas esofágicos:

0NO 1SI

Esofagitis erosiva

0NO 1SI grados: A, B, C, D

Hernia hiatal:

0NO 1SI

Gastritis Cronica:

0NO 1SI

antral,

0NO 1SI

Corporoantral

0NO 1SI

Biopsias: dos del cuerpo, dos del antro

Gastritis Nodular:

0NO 1SI

Lesiones elevadas subepiteliales:

0NO 1SI Ubicación (similar a la de ulcera gástrica, ver más abajo)

Ulcera gástrica:

0NO 1SI Tamaño: menos de 10 mm, 10 a 20 mm, > 20 mm

Ubicación: Biopsias siempre

Cuerpo proximal: Curva mayor, curva menor, pared anterior, pared posterior

Cuerpo medio: pared anterior, pared posterior, curva mayor, curva menor

Cuerpo distal: pared anterior, pared posterior, curva menor, curva mayor

Antro: pared anterior, pared posterior, curva mayor, curva menor

Úlcera duodenal:

0NO 1SI Ubicación: Hemicirculo anterior, Hemicirculo posterior  
Tamaño: menos de 10 mm, 10 a 20 mm, mayor de 20 mm

Tumor gástrico,

0NO 1SI

Ubicación: repetir lo de la úlcera gástrica: Biopsias siempre

Tumor duodenal:

0NO 1SI

Prueba de ureasa rápida en biopsia del antro:

0NO 1SI

## 2. Resultado de patología

Gastritis crónica, Clasificación de Sydney

*Helicobacter pylori* (hematoxilina Eosina, Giemsa):

Positivo

Negativo

### **Anexo C. Preparación de agar wilkins chalgren modificado para *Helicobacter pylori***

- Suspender 24 gramos del medio wilkins Chalgren (Pronadisa), 14 gramos de Caldo Brucella (BBL) y 702 gramos de agar-agar (Scharlau) en un litro de agua destilada.
- Calentar agitando frecuentemente y llevar a ebullición.
- Después de hervir la suspensión anterior, agregar 4 gramos de carbón activado y mezclar vigorosamente.
- Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 libras de presión durante 15 minutos.
- Una vez autoclavado el medio, dejar a temperatura a 56 °C.
- Adicionar al medio de cultivo:
  - \* 5% -10% de sangres de cordero
  - \* 10 mL de antibiótico (SUPLEMENTO SELECTIVO DE *Helicobacter pylori*, OXOID).
  - \* 4 mL de Isovitalax (BBL).

**Anexo C.1: Componentes Agar Wilkins – Chalgren (BBL)**

Digerido Pancreático de caseína	10.0 g
Peptona	10.0 g
Extracto de Levadura	5.0 g
Dextrosa	1.0 g
Cloruro Sódico	5.0 g
L-Arginina	1.0 g
Piruvato Sódico	1.0 g
Agar	15.0 g
Hemina	5.0 g
Vitamina K <sub>1</sub>	0.5 g

**Anexo C.2: Componentes Caldo Brucella (BBL)**

Caseína digerida por enzimas pancreáticas	10.0 g
Tejido animal digerido por enzimas pépticas	10.0 g
Dextrosa	1.0 g
Extracto de Levadura	2.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Bisulfito sodio	0.1 g

**Anexo D: Isovitalex (BD)**

Suplemento enriquecido que se usa como aditivo para los medios de cultivo de microorganismos nutricionalmente exigentes.

Adenina Sulfato	10.0g
Acido <i>p</i> -aminobenzoico	13mg
Cocarboxilasa	2.0mg
L-Cisteina HCL	25.9 g
L-Cisteina	1.1g
Nicotinamina	Adenina 0,25mg
Dinucleótico	
Nitrato Férrico	0.02g
L-Glutamina	10g
Guanina HCL	0.03g
Tiamina HCL	3.0mg
Vitamina B <sub>12</sub>	0.01g
Dextrosa	100g
Tiamina pirofosfato	0,1g

Preparación: El liofilizado se reconstituye con 10 ml del diluyente acompañante con jeringa estéril y se agita la solución hasta homogenización completa. Se agrega 2ml por cada 500ml de medio.

### **Anexo E: Suplemento selectivo para *H.pylori* (DENT) (OXOID)**

Vancomicina 5.0mg

Trimetropim 2.5mg

Cefsulodin 2.5mg

Anfotericina B 2.5mg

Preparación: El liofilizado se reconstituye con 2 ml de agua destilada estéril y se agregan 2ml por cada 500ml de medio.

### **Anexo F: Preparación de urea para prueba de ureasa**

- Suspender 1 gramo de Urea (Sigma) en 10 mL de agua destilada estéril.
- A parte, suspender 0.001 gramos de rojo de fenol en 10 mL de agua destilada estéril.
- Para 10 mL de solución de urea, agregar 1 mL de la solución de rojo de fenol. (Rojo de fenol 0.01%)

PH 6.9 amarillo

PH 8.2 rojo

### **Anexo G: DNAzol®:**

Es una solución lisadora, cuyo proceso de lisis se fundamenta en el uso de detergente-guanidina que permite la precipitación selectiva del DNA de la célula lisada. Durante la obtención de DNA la muestra biológica es lisada en DNAzol y el DNA es precipitado con etanol al 100% por 15 minutos a -70°C, posteriormente se “lava” el DNA con etanol al 75% y luego se solubiliza en NaOH al 8mM

## **Anexo H. PRUEBA DE ELISA PARA DETECCION DE ANTIGENOS FECALES (RIDASGREEN®)**

1. Se hace una dilución de la materia fecal (aprox 200mg) en 1ml de diluyente provisto por la casa comercial, se agita durante 15 minutos en vortex y luego se centrifuga por 5 minutos a 5000rpm, para obtener el sobrenadante que es el que se usara para el análisis.
2. Se pipetea 50ul de control positivo, control negativo y de los sobrenadantes de las muestras en su respectivo pozo. Luego se pipetea 50ul de conjugado directamente sobre los controles y sobre las muestras. La microplaca se incuba en un vibrador oscilante durante 60 minutos a temperatura ambiente.
3. Transcurrida la incubación se vacían los pozos, se sacude la placa sobre una toallita absorbente para eliminar restos de humedad y se procede a realizar los lavados con la solución de lavado provista por la casa comercial, previa dilución 1:10 con agua destilada. Se realizan 5 lavados con 300ul de buffer de lavado, al terminar los lavados la placa debe ser sacudida sobre otra toalla absorbente.
4. Posteriormente se añaden 100ul de solución de sustrato a cada uno de los pozos y se incuba durante 10 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, trascurridos los cuales se añade 100ul de solución de parada en cada pozo para finalizar la reacción.
5. La reacción se mide a una longitud de onda de 450 nm.
6. Lectura de los controles a 450nm: Control negativo: menor a 0,14 y Control positivo: mayor a 1,04.

