

Colonización múltiple de *Helicobacter pylori* en mucosa gástrica de pacientes con gastritis crónica de Túquerres y Tumaco (Nariño).



ANDRES JENUER MATTA Bsc

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
POSTGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
SANTIAGO DE CALI
2013

Colonización múltiple de *Helicobacter pylori* en mucosa gástrica de pacientes con gastritis crónica de Túquerres y Tumaco (Nariño).



ANDRES JENUER MATTIA Bsc

Trabajo de investigación presentado para optar al título de magister en Ciencias-
Biomedicas

LUIS EDUARDO BRAVO MD, M.SC

Director

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BASICAS
POSTGRADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
SANTIAGO DE CALI
2013

Nota de aceptación:

Los integrantes del jurado, designados por el comité de postgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad del Valle, abajo firmantes, revisaron y aprobaron el presente trabajo de investigación presentado por el estudiante **ANDRES JENUER MATTA**, para optar al título de magister en Ciencias Biomédicas, el día ____ de _____ de 2013.

Firma del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

DEDICATORIA

A mi mamá Rosaura Miramar Cordoba.

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis no hubiera sido posible sin la ayuda y el apoyo de muchas personas.

A mi maestro de investigación el Doctor Luis Eduardo Bravo, por permitirme formar parte de este grupo, por darme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación y brindarme la oportunidad de formarme científicamente con sus enseñanzas y valiosa ayuda.

Al Doctor Alvaro Pazos, por orientarme en el trabajo y por brindarme su amistad.

A mis compañeros del Laboratorio de Patología molecular: Javier Andres Bustamante, Fabián Fernández, Adrian Dario Prieto, Mercedes Figueroa, Luis Carlos del castillo por su apoyo incondicional y compartir conmigo muchos momentos en el laboratorio.

A mi universidad y todos mis compañeros del grupo RPCC, en especial a Luz Stella Garcia por su amistad y colaboración en todo este proceso.

Finalmente agradezco de todo corazón a mi mamá y mi familia por estar presente en todo momento dándome ánimo, a mi Diana Carolina por estar siempre dispuesta a escuchar, ayudar, y por su paciencia durante la realización de esta investigación.

CONTENIDO

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. JUSTIFICACIÓN.....	5
4. MARCO TEÓRICO.....	7
4.1. Generalidades de <i>H. pylori</i>	7
4.2. Características microbiológicas de <i>H. pylori</i>	8
4.3. Características moleculares.....	8
4.4. Factores de <i>H. pylori</i> involucrados en la colonización de la mucosa gástrica.....	9
4.4.1. Flagelos y motilidad.....	10
4.4.3. Catalasa.....	10
4.4.4. Adhesinas.....	11
4.5. Patogenicidad de <i>H. pylori</i>	11
4.6. Islote de patogenicidad.....	13
4.7. Proteína <i>CagA</i>	14
4.7.1. Método de acción de la proteína <i>CagA</i>	14
4.8. Citotoxina vacuolizante.....	15
4.8.1. Mecanismo de acción de la proteína <i>VacA</i>	16
4.8.2. Polimorfismo del gen <i>vacA</i>	17
4.9. Papel de la respuesta inmune en la infección por <i>H. pylori</i>	19
4.10. Epidemiología de <i>H. pylori</i>	20
4.11. Prevalencia de <i>H. pylori</i> en el mundo.....	22
4.12. Prevalencia de la infección por <i>H. pylori</i> en Colombia.....	23
4.13. Diversidad genética de <i>H. pylori</i>	24
4.14. Marcadores genéticos para el estudio de la diversidad en <i>H. pylori</i>	26
4.13.1. Electroforesis por campos pulsados (PFGE).....	26
4.13.2. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).....	27
4.13.3. RFLP-Southern blot.....	27
4.13.4. RFLP-PCR.....	27
4.13.5. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción amplificados por PCR (AFLP-PCR).....	28
4.13.6. Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD).....	28

5. OBJETIVOS.....	30
5.1. Objetivo general.	30
5.2. Objetivos específicos.....	30
6. Variabilidad genética de los aislados de <i>H. pylori</i> según los factores de virulencia <i>cagA</i> y <i>vacA</i> . 31	
6.1. Materiales y métodos.....	32
6.1.1. Descripción general del estudio – objetivo 1.	32
6.1.2. Criterio de selección.	33
6.1.2.2. Criterio de exclusión.	33
6.1.3. Histopatología.	34
6.1.4. Procedimientos microbiológicos.	34
6.1.4.1. Aislamiento y cultivo de <i>H. pylori</i> a partir de biopsias de mucosa gástrica.....	34
6.1.4.2. Purificación de los aislados de <i>H. pylori</i>	35
6.1.4.3. Identificación de <i>H. pylori</i>	35
6.1.4.3.1. Prueba de oxidasa.	35
6.1.4.3.2. Prueba de catalasa.	35
6.1.4.3.3. Prueba de detección de ureasa.	35
6.1.5. Métodos de biología molecular.	36
6.1.5.1. Extracción de ADN de aislados de <i>H. pylori</i>	36
6.1.5.2. Amplificación del gen <i>ureA</i>	37
6.1.5.3. Detección del islote de patogenicidad <i>cag</i> -PAI por amplificación del gen <i>cagA</i>	37
6.1.5.3.1. Evaluación de la ausencia del <i>cag</i> -PAI por PCR <i>empty-site</i>	38
6.1.5.4. PCR para detección del gen <i>vacA</i> alelos <i>m1</i> y <i>m2</i>	38
6.1.5.5. PCR del gen <i>vacA</i> alelos <i>s1</i> y <i>s2</i>	39
6.2. Resultados.....	40
6.2.1. Descripción de las poblaciones de estudio.	40
6.2.2. Características socio demográficas de las poblaciones	41
6.2.3. Caracterización molecular de <i>H.pylori</i>	42
6.2.3.1. Detección de <i>H. pylori</i> por amplificación por PCR del gen estructural <i>ureA</i>	42
6.2.3.2. Detección del gen <i>cagA</i>	42
6.2.3.3. Identificación del gen <i>vacA</i>	44
6.2.3.4. Genotipos de virulencia de <i>H. pylori</i> en las poblaciones.	47

6.2.3.5. Colonización de la mucosa gástrica por múltiples aislados de <i>H. pylori</i> según genotipos de virulencia.....	48
3. Discusión.....	50
6.3.1. Prevalencia de los factores de virulencia en aislamientos de <i>H. pylori</i>	50
6.3.2. Prevalencia del gen <i>cagA</i>	50
6.3.3. Prevalencia del gen <i>vacA</i>	51
6.3.4. Prevalencia de genotipos virulentos en las poblaciones de estudio.	51
6.3.5. Colonización de la mucosa gástrica por múltiples cepas de <i>H. pylori</i> con diferencias en sus genotipos de virulencia.....	52
7. Comparación de los patrones de variabilidad genómica de los aislados de <i>H. pylori</i> entre y dentro de las regiones intragástricas (antro y cuerpo) evaluadas, en pacientes de las poblaciones de Tumaco y Túquerres.....	53
7.1 Materiales y métodos.....	54
7.1.1. Aislamiento y cultivo de <i>H. pylori</i> a partir de biopsias de mucosa gástrica.....	54
7.1.2. Extracción de ADN de aislados de <i>H. pylori</i>	54
7.1.3. Amplificación del gen estructural <i>ureA</i> de <i>H. pylori</i>	54
7.1.4. PCR – RAPD.....	55
7.1.5. Electroforesis de los amplificados.	55
7.1.6. Plan de análisis estadístico del objetivo específico 2.....	56
8. Resultados.....	57
9. Discusión.....	64
10. Conclusiones.....	67
11. Recomendaciones.....	68
12. BIBLIOGRAFIA.	69
13. Anexos.....	82
13.1. Anexo 1 . Cebadores y secuencias para genotipificación de <i>H. pylori</i>	82
13.2. Anexo 2. Aval del comité de ética proyecto tesis de maestría.....	83
13.4. Anexo 4 . Pruebas de identificación para <i>H.pylori</i>	86

Lista de abreviaciones

ADN: ácido desoxirribonucleico
AFLP: amplified fragment length polymorphism
cag PAI: cytotoxin-associated gene pathogenicity island
cagA: cytotoxin associated gene A
EPIYA: Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala
LPS: Lipopolysaccharide
MALT: mucosa-associated lymphoid tissue
MAK-kinase: mitogen-activated protein kinases
MAPK: mitogen-activated protein kinase
NADPH oxidase: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
NFAT: nuclear factor of activated T-cells
NF- κ B: nuclear factor- κ B
PCR: polymerase chain reaction
PFGE: pulsed-field gel electrophoresis
PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor- γ
PPI: proton pump inhibitor
PRRs: pattern recognition receptors
RAPD: random amplified polymorphism ADN
RFLP: restriction fragment length polymorphism
RNS: reactive nitrogen species
T4SS: type IV secretion system
TCR: T-cell receptor
Th1: T-helper 1
Th2: T-helper 2
TLRs: toll-like receptors
TNF- α : tumor necrosis factor-alpha
Treg: Regulatory T cells
VacA: vacuolating cytotoxin A

1. RESUMEN.

El Cáncer Gástrico (CG) es la principal causa de muerte por cáncer en Colombia; no obstante, los avances científicos de los últimos tiempos, aún se considera un tumor letal y la supervivencia a cinco años es baja, 20%, es de etiología multifactorial, en el que la dieta, la infección por *H. pylori* y la susceptibilidad al cáncer del hospedero juegan un papel preponderante en el desenlace del proceso de carcinogénesis. En la mayoría de los casos, la infección por *H. pylori* se adquiere en la infancia y provoca una inflamación crónica, que persiste toda la vida, a menos que se tratase. La infección por cepas virulentas de *H. pylori* es uno de los factores de riesgo más importante para el desarrollo de lesiones precursoras de CG y carcinoma gástrico. Estudios previos, en Nariño-Colombia, describieron localidades con alta prevalencia de la infección por *H.pylori* (>80%), pero con diferente riesgo para el desarrollo de CG. como se ha visto en Tumaco (bajo riesgo) y Túquerres (alto riesgo), estos resultados sugieren características diferentes a nivel genético de las cepas circulantes, con distintos grados de patogenicidad entre las regiones anatómicas en un mismo paciente, fenómeno conocido como colonización múltiple.

El objetivo de esta investigación fue: Evaluar la colonización múltiple de aislados de *H. pylori* en pacientes con gastritis crónica provenientes de las poblaciones con contraste en el riesgo de desarrollar Cáncer gástrico: Tumaco-Nariño, bajo riesgo; Túquerres-Nariño alto riesgo, quienes se sometieron a una endoscopia digestiva superior en el proyecto “Susceptibilidad antimicrobial según factores de virulencia de aislados de *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis crónica”, que incluyó 409 pacientes de ambos géneros de las poblaciones, con síntomas de dispepsia entre los 18 y 65 años de edad. De los cuales se obtuvieron fragmentos de mucosa gástrica de las regiones de antro y cuerpo, para para el diagnóstico histopatológico, cultivo, genotipificación (*cagA*, *vacA*) y PCR-RAPD.

Los aislamientos de *H. pylori* obtenidos de las tres biopsias de las regiones anatómicas (antro y cuerpo) de cada uno de los pacientes, (41/203) y (31/206), de Tumaco y Túquerres respectivamente fueron sometidos a pruebas de identificación fenotípica y genotípicas. La genotipificación de los aislados, evidenció una alta prevalencia del genotipo *cagA*-positivo/*vacA* *s1m1*. 70.7% en Tumaco y 63.4 % en Túquerres y colonización múltiple de

52.8%. Los grados de variabilidad de la diversidad del ADN genómico entre los aislados clínicos obtenidos con la PCR – RAPD con los cebadores 1281 y 1254, basado en una clara distinción de los patrones con diferencias en las bandas revelan que: 4 pacientes albergan una única cepa de *H.pylori*, mientras que 37 mostraron huellas heterogéneas de ADN que indican infección por múltiples cepas en distintos sitios anatómicos en el mismo pacientes en la población de Tumaco. En la población de Túquerres 30 pacientes albergan diversas cepas en el mismo paciente en diferente región anatómica. En la población de Tumaco el dendrograma que se realizó con el método UPGMA, estaba compuesto por 10 grupos, con un cociente de similitud de 0.07. En la población de Túquerres el dendrograma se conformó con siete grupos, con un cociente de similitud de 0.13. En ninguno de los conglomerados, fue significativa la segregación de los aislados por sitio anatómico, edad, sexo, tipo de gastritis.

Los resultados confirman que es elevada la proporción de los genotipos virulentos en las poblaciones de estudio 94% en Tumaco y 99% en Túquerres y en la población de alto riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico (Túquerres) es mayor la probabilidad de presentar colonización múltiple (55.3%), y los análisis de diversidad genética confirman que es mayor la diversidad entre los aislados de Túquerres (0.13) que en los de Tumaco (0.07).

Palabras claves: Cáncer gástrico, *H. pylori*, Islote de patogenicidad, *cagA*, *vacA*, Colonización múltiple, PCR-RAPD.

2. INTRODUCCIÓN

El Cáncer gástrico es la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo GLOBOCAN 2008 (1), y ocurre la mayoría de casos en países en vía de desarrollo (2). En el año 2.008 fueron reportados cerca de 12.6 millones de casos de cáncer, de éstos el 7.8% fue por Cáncer gástrico (3). Este cáncer presenta una prevalencia de 10.1 /100.000 habitantes (hombres y mujeres) por año. Además es la primera causa de muerte por cáncer, con 5.073 casos, y el segundo en incidencia con 6.635, casos para el año 2.008 (3).

Se han descrito diversos factores de riesgo para el desarrollo de Cáncer gástrico, entre los que la infección por *H. pylori*, se ha considerado como el principal factor de riesgo (4); siendo clasificado como carcinógeno tipo I por la OMS (Organización Mundial de la Salud) en 1994 (IARC: *International Agency for Research on Cancer*)(5). Otros factores asociados con Cáncer gástrico incluyen las dietas ricas en carnes rojas, la ingesta de condimentos irritantes (pimienta), el exceso de sal, el consumo de alimentos ahumados y preparados con vinagre (6), el consumo de tabaco (7) y la obesidad (8). El género y la edad son factores de riesgo, aunque es más prevalente en hombres (5).

La infección por *H. pylori* afecta a más de la mitad de la población mundial, pero es prevalente en países en desarrollo (9). Ésta se adquiere en la niñez y persiste a lo largo de la vida si no es tratada; Esta presencia hasta la adultez se asocia con la aparición de patologías gástricas como: gastritis crónica, úlcera péptica, Cáncer gástrico y linfoma tipo MALT (*Mucosa-associated lymphoid tissue*) (4). En Colombia el riesgo de Cáncer gástrico varía de acuerdo con las zonas geográficas: en las zonas andinas el riesgo es 2.1 mientras que para las zonas costeras es de 0.47 (10), y coexisten regiones de alto y bajo riesgo para desarrollo de cáncer. Este contraste en el riesgo en poblaciones cercanas, con prevalencia de infección por *H. pylori* similar: Pasto 74% y Tumaco 80% (11), se explica por la alta diversidad genética de la bacteria, con niveles de compromiso variable en la patogenicidad

(12).

Investigaciones previas describen diversidad de cepas bacterianas de *H. pylori*, con diferencias en sus factores de virulencia como el gen asociado con citotoxicidad (*cagA*) (12) y el gen relacionado con la producción de toxina vacuolizante (*vacA*) (13). Por otro lado, está establecido que cepas de *H. pylori* que poseen el islote de patogenicidad *cag* (PAI) se consideran virulentas y están más asociadas con úlcera péptica y el Cáncer gástrico que cepas que no tienen este locus (14,16).

La erradicación del *H. pylori* de la mucosa gástrica es el pilar fundamental en el tratamiento de patologías como la gastritis crónica, úlcera péptica, metaplasia y displasia (16). El tratamiento de primera línea recomendado por el consenso de Maastricht (17), para su erradicación, es la triple terapia que consiste en un inhibidor de bomba de protones acompañado de claritromicina y amoxicilina o metronidazol, no obstante, el fracaso terapéutico es inherente y puede atribuirse a factores humanos y bacterianos entre los 1 que se destacan: dosis inadecuadas de los medicamentos, insuficiente tiempo de uso o abandono del tratamiento, disminución de su actividad por interacciones con otras sustancias, colonización de la mucosa gástrica por múltiples cepas de *H. pylori* (virulentas y no virulentas) y la coexistencia con aislados bacterianos susceptibles y resistentes a los antimicrobianos empleados (18).

3. JUSTIFICACIÓN.

En países en vía de desarrollo, como Colombia, las enfermedades como la gastritis, úlcera péptica y el Cáncer gástrico constituyen un problema significativo de salud pública. Los conocimientos recientes indican que estas afecciones están asociadas con la infección por *H. pylori*. En nuestro país, coexisten regiones de alto y bajo riesgo para el desarrollo de Cáncer gástrico, aunque la prevalencia de la infección es similar (>80%) (11), como se ha visto en Tumaco (bajo riesgo) y Túquerres (alto riesgo), estos resultados sugieren características diferentes a nivel genético de las cepas circulantes, con distintos grados de patogenicidad entre las regiones anatómicas en un mismo paciente, fenómeno conocido como colonización múltiple. Si bien la diferencia en el riesgo se ha asociado con la virulencia de la cepa infectante, se considera necesaria la persistencia de la infección y su interrelación con agentes ambientales como estímulos previos para el desarrollo de lesiones precancerosas y finalmente la aparición del carcinoma gástrico, que puede ser evitado mediante la erradicación del agente infeccioso en estadios tempranos de la infección. Por esta razón, la información sobre la sensibilidad o resistencia de este microorganismo a los agentes de erradicadores empleados con mayor frecuencia, es de vital trascendencia, al igual que los mecanismos moleculares que se encuentran involucrados.

Para explicar la asociación entre el *H. pylori* y Cáncer gástrico se proponen varias hipótesis pero, la más aceptada es la que sugiere que la bacteria, por infectar la mucosa gástrica, provoca una gastritis crónica atrófica multifocal, asociada con hipoclorhidria, lo que facilita el sobre crecimiento bacteriano y el aumento de nitrosaminas y nitrosamidas, que tienen alta capacidad mutagénica las cuales son las responsables de las lesiones pre malignas (19).

Aún no se ha hallado el tratamiento ideal posiblemente porque la mucosa gástrica de un hospedero puede estar colonizada por múltiples cepas de *H. pylori* (virulentas y no virulentas) y que, además coexistan aislados bacterianos susceptibles y resistentes a los antimicrobianos (18), o que ocurra un cambio de genotipo de *H. pylori* de virulento: *cagA* positivo a no virulento: *cagA* negativo que implique pérdida del islote de patogenicidad

inducida por la presión ambiental de los antimicrobianos. Este fenómeno, no estudiado en Colombia, dificulta la erradicación del microorganismo, como estrategia en los esquemas de tratamiento y prevención de las lesiones precursoras de Cáncer gástrico.

Si se tienen en cuenta estas evidencias, es menester contar con la genotipificación de los aislados de *H. pylori* obtenidos de las distintas localizaciones gástricas (antro y cuerpo) para evaluar la colonización múltiple de cepas de *H. pylori*, mediante el análisis de la diversidad genética, en pacientes con gastritis provenientes de dos zonas del departamento de Nariño con contraste en el riesgo de desarrollar Cáncer gástrico;(Tumaco- bajo riesgo y Túquerres - alto riesgo).

4. MARCO TEÓRICO.

Estudios en diferentes poblaciones y en modelos animales, muestran que *H. pylori* está asociado con el desarrollo de Cáncer gástrico (20). En la historia natural de la carcinogénesis gástrica en humanos se establece la siguiente evolución: gastritis crónica superficial => gastritis crónica atrófica (GCA) => metaplasia intestinal (MI) => displasia (leve - moderada - severa) => Cáncer gástrico (CG). *H. pylori* desencadenaría una cascada de eventos que implican finalmente el CG. Por tanto existe mayor probabilidad de desarrollo mientras más temprana sea la etapa en la que se adquiere la infección. Los pacientes infectados con *H. pylori* que llegan a padecimientos severos, como úlcera péptica y Cáncer gástrico, son el grupo ideal para la erradicación de la infección (The Maastricht Consensus 1997); sin embargo, actualmente no es posible identificar pacientes asintomáticos infectados con *H. pylori* que tengan un alto riesgo para desarrollar dichas patologías. La prevalencia de la infección es mayor en países en vías de desarrollo (90%) en comparación con la observada en países desarrollados que es del 53% (21). Aproximadamente, el 1% de los pacientes infectados con *H. pylori* desarrollará Cáncer gástrico (22). Se detecta con mayor frecuencia en pacientes con Cáncer gástrico en etapas tempranas, que en aquellos con etapas avanzadas de la enfermedad, porque posiblemente la bacteria no coloniza epitelios.

4.1. Generalidades de *H. pylori*.

Esta bacteria descrita por primera vez en el año de 1981 por Marshall y Warren, coloniza más de la mitad de la población mundial (4), donde la infección ocurre en la infancia, y en individuos que viven en condiciones precarias y de hacinamiento (23; 24). Las principales vías de transmisión de la infección son: las vías fecal-oral, oral-oral y gastro-oral (25,26). Se presume que en infantes la mayor vía de la infección es fecal-oral. En condiciones de hacinamiento y precarias de vida; la infección puede persistir a lo largo de la vida, hasta generar lesiones precancerosas y finalmente el Cáncer gástrico, si no es detectado a tiempo

y tratado de forma oportuna. Cuando la infección ocurre por primera vez en adultos causa gastritis con hipoclorhidria, malestar gástrico y náuseas (4, 27).

Se ha observado que la mayoría de los países en vía de desarrollo tienen una prevalencia de la infección por *H. pylori* de un 90% o más, con cerca del 50% de la población infectada (9); la prevalencia de la infección por *H.pylori* en Colombia es muy alta en todo el país, como: Bogotá; en Tunja y Manizales la prevalencia de la infección es de 99.1% y 85.5%, respectivamente, Túquerres (85.4%), Tumaco (88.7%) (28)

4.2. Características microbiológicas de *H. pylori*.

H. pylori es un bacilo Gram-negativo, de 0.5 a 1 μm de ancho y 3 μm de largo, posee de 2 a 6 flagelos monopolares, y crece en ambientes microaerófilos. Su morfología característica es espiral; sin embargo, puede observarse en forma cocoide en condiciones no favorables para su crecimiento (29).

La temperatura óptima de crecimiento para *H. pylori* es 37 °C, aunque puede desarrollarse en un rango de 35 a 39 °C en microaerofilia. Para su cultivo se requieren medios suplementados con suero o sangre entre el 5% y 10%, que actúan como fuentes adicionales de nutrientes; usualmente se emplean con más frecuencia para su cultivo los medios sólidos Agar Mueller-Hinton y Agar Columbia, pero puede ser cultivada en medios líquidos y con menor dificultad a partir de caldo de *Brucella*, infusión cerebro-corazón, Mueller-Hinton y tripticasa soja, todos ellos suplementados con nutrientes (30).

4.3. Características moleculares.

Se han secuenciado distintas cepas de *H. pylori* (31), lo que ha permitido conocer que su genoma se encuentre estructurado en un solo cromosoma circular de entre 1,5-1,8 Mb y alrededor de 1.590 secuencias codificadoras (32).

La diversidad genética entre cepas se debe a la capacidad que posee este microorganismo para mutar, transformarse y recombinarse con otras cepas, variantes clonales o incluso otras especies (33, 34, 35) Ejemplos de estas capacidades incluyen el intercambio de alelos de genes de virulencia como *cagA*, la pérdida de una parte de ellos como en ocasiones ocurre con la isla de patogenicidad *cagA* o la recombinación con otras cepas que provocan cambios fenotípicos en la expresión de proteínas como VacA (36).

Es posible que algunas cepas mutantes sobrevivan en el estómago de un individuo, que actúan como reservorio de elementos genéticos para las demás bacterias con las que cohabita y se selecciona el clon dominante según la presión que ejerza el medio (31, 37).

De esta forma, incluso una única cepa puede generar múltiples variantes y seleccionarse aquellas que mejor se adaptan al hospedero y al medio durante la colonización a largo plazo (38).

Por otro lado, esta elevada diversidad genética facilita su recombinación y mutación para sobrevivir en medios hostiles y, le permite hacer resistencias frente a antibióticos utilizados en la clínica.

4.4. Factores de *H. pylori* involucrados en la colonización de la mucosa gástrica.

Entre los factores en *H. pylori* involucrados en la colonización de la mucosa gástrica, se diferencian aquellos asociados con el daño tisular y con la supervivencia de la bacteria. Se considera que los flagelos, la ureasa, y adhesinas son factores esenciales en la colonización de la mucosa gástrica, los mutantes de *H. pylori* para estas características son incapaces de colonizar la mucosa gástrica en animales de laboratorio (38).

4.4.1. Flagelos y motilidad.

La morfología en espiral y los flagelos polares, le permiten a *H. pylori* penetrar en la capa de mucina y tiende a incrementar su actividad cuando la viscosidad del medio es mayor, y se reduce en ambientes con pH inferior a 4 (38).

4.4.2. Ureasa.

La ureasa es una de las enzimas clave en la patogénesis de *H. pylori*. Tiene un peso molecular de 550 kDa y se compone de tres subunidades de 26.5 kDa (Ure A), 61 kDa (Ure B), y 13 kDa (Ure C) (84, 100). La ureasa cataboliza la hidrólisis de la urea presente en el estómago en amonio y dióxido de carbono; Se crea un microambiente de pH neutro (pH 6 - 7) alrededor de la bacteria, lo que le facilita la supervivencia en el medio ácido del estómago y su migración al epitelio gástrico. Cuando alcanza la superficie de las células de la mucosa o en un medio con pH 6-7, se inactiva el transportador *UreI* en la membrana, que permite la entrada de la urea al citoplasma de la bacteria e inhibe su hidrólisis (38).

El amonio producido, a partir de la hidrólisis de la urea, induce necrotización del tejido profundo y colabora en el desarrollo de gastritis atrófica crónica y facilita el incremento de infecciones virales y la carcinogénesis (39).

4.4.3. Catalasa.

En el proceso infeccioso de *H. pylori* se presenta una fuerte respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos y macrófagos, por lo que la bacteria presenta la enzima superóxido dismutasa que cataliza la formación de peróxido de hidrógeno a partir del superóxido producido por estos polimorfonucleares y macrófagos. Este peróxido de hidrógeno es sustrato de la catalasa, que le descompone en agua y oxígeno (38).

4.4.4. Adhesinas.

La adherencia a las células epiteliales gástricas es un prerrequisito para la colonización del estómago por *H. pylori* (40), para evitar la erradicación vía el intercambio de la mucosa y el peristaltismo gástrico. Se requiere el contacto íntimo con las células epiteliales para que se ejerzan los efectos patogénicos producidos por *H. pylori* en la mucosa gástrica, como son cambios morfológicos e inducción de una respuesta inflamatoria (41).

En aproximadamente el 1% de la población con *H. pylori*, esta se adhiere a las células epiteliales, mientras que el resto de las bacterias se encuentran en la capa de moco (42). En *H. pylori* se han estudiado dos adhesinas: la adhesina A (BabA2), de unión al antígeno de los grupos sanguíneos A, B y O (43, 44), y la adhesina de unión al ácido siálico, SabA (43). BabA2 es una proteína de membrana externa que interactúa con el antígeno del grupo sanguíneo Lewis b, en las células epiteliales, el producto del gen *babA1* es idéntico al de *babA2*, excepto por diez nucleótidos menos en su secuencia, BabA1 no puede interactuar con el antígeno Lewis b, para colonizar el epitelio gástrico, mientras que BabA2, que es la única activa, está asociada con el riesgo de desarrollar úlcera péptica o Cáncer gástrico y su ausencia se relaciona con formas no complicadas de gastritis (45).

4.5. Patogenicidad de *H. pylori*.

A pesar de la alta incidencia de la infección por *H. pylori* en el ámbito mundial, la frecuencia de patologías gástricas, como Cáncer gástrico, es variable (46), al parecer, este fenómeno puede estar relacionado con la respuesta inmunológica del huésped, factores ambientales, nutricionales o de virulencia del *H. pylori* (46). Muchos genes de *H. pylori* asociados con virulencia han sido identificados, como el gen *cagA* y gen *vacA* entre otros, los cuales tienen una función determinante en el avance de la enfermedad (47). Existe un considerable polimorfismo inter e intrapoblacional en los factores virulencia de las cepas de *H. pylori* que infectan las múltiples poblaciones humanas.

Un factor de virulencia es la presencia del gen *cagA* que codifica para la proteína asociada con citotoxicidad *CagA* (48). El loci del gen *cagA* es un marcador del islote de patogenidad (cag-PAI), un inserto de 40 kb dentro del cromosoma del *H. pylori* que codifica para proteínas que aumentan la virulencia de las cepas, aunque no está presente en todos los aislados. Cuando está presente, que es en más del 50% de las cepas aproximadamente, se asocia con eventos clínicos severos, daño inflamatorio y aumento del riesgo de Cáncer gástrico y úlcera duodenal (48). La proteína de membrana externa denominada Citotoxina asociada a gen A (*CagA*), es altamente inmunogénica, lo que está documentado por estudios en los que detectaron niveles elevados de anticuerpos IgG por ELISA contra *CagA* en pacientes con úlcera duodenal, con úlcera gástrica, con dispepsia no ulcerosa (49) y adenocarcinoma o linfoma gástrico (50). Además, es oportuno citar que todas las cepas de *H. pylori* tienen el gen *vacA*, que codifica para una citotoxina de 87 kDa que causa la vacuolización de las células epiteliales y está asociada con virulencia (51), aunque sólo entre el 50 y el 65% de las cepas de *H. pylori* producen la proteína citotóxica (52). La infección múltiple por cepas de *H. pylori* con diferentes alelos de *vacA* es común en países en desarrollo (53, 54).

En Colombia el genotipo predominante es *s1b*, comparable con lo encontrado en Costa Rica y Perú (54) países en los que hay una baja frecuencia de cepas con el genotipo *s1a* (55). En Colombia es común la infección mixta, la detección simultánea por PCR de genotipos *vacA s1a* y *vacA s1b* en muestras de biopsias de mucosa gástrica fue común, en comparación con la baja frecuencia de los mismos alelos cuando la muestra fue aislada con cepas cultivadas (54).

Una posible explicación sobre la distribución de genotipos de *vacA* en poblaciones y áreas geográficas diferentes sería la hipótesis que sostiene que a través del tiempo las cepas de un solo genotipo han originado genotipos diversos como el resultado de adaptaciones a un huésped con particulares características.

4.6. Islote de patogenicidad.

La isla de patogenicidad *cagPAI* es uno de los factores de virulencia más relevante para la patogénesis de la bacteria. La isla de patogenicidad es un segmento de 40 kb, con un contenido de G+C del 35% que es menor que el 39% calculado para el genoma total de *H. pylori* (56). Lo anterior indica que la isla no se originó en *H. pylori* y que pudo adquirirse por transferencia horizontal a partir de un antecesor de momento desconocido e integrado en el gen cromosómico de la glutamato racemasa (57), esta isla de patogenicidad codifica un sistema de secreción tipo IV (SST4) que es el encargado de inyectar la proteína CagA, el peptidoglicano y posiblemente otras sustancias en las células hospedadoras (58, 59). Los SST4 son un amplio grupo de complejos sistemas transportadores descritos en bacterias Gram negativas, relacionadas ancestralmente con sistemas de conjugación, y para los cuales, el descrito en *Agrobacterium tumefaciens* (oncobacteria que afecta a células vegetales), es el prototipo de referencia.

La isla tiene 27 marcos de lectura abiertos entre los que se encuentra *cagA* (56). Aunque los genes *vacA* y *cagA* no están juntos en el cromosoma, existe una asociación significativa entre la presencia de *cagA* y *vacA* s1 (53), las cepas *cagPAI* negativas rara vez expresan el genotipo *vacA* s1 (60). Las cepas de *H. pylori* se dividen en dos tipos: las tipo I son *cagA*⁺/*vacA*⁺ y las tipo II son *cagA*⁻/*vacA*⁻ (61). Las cepas tipo I son más virulentas que las tipo II que no tienen la isla de patogenicidad y poseen el genotipo *vacA* s2 y no son citotóxicas (57). Las cepas tipo II no están asociadas con patologías gástricas (61). Las cepas *cagPAI* se encuentran con mayor frecuencia en pacientes con úlcera péptica y Cáncer gástrico (62) La expresión de CagA se ha considerado como un marcador de la presencia de la isla y es una de las proteínas más inmunogénica de *H. pylori* (60).

4.7. Proteína *CagA*.

Es una proteína con un peso molecular aproximado que varía de 120 a 145 kDa, conocida como citotoxina asociada con el gen *A* (o *CagA*), con una región carboxilo terminal variable (57), se encuentra en aproximadamente el 60% de los aislamientos de *H. pylori* (63). El gen *cagA* se localiza al final de la isla de patogenicidad *cagPAI* (57). El gen *cagA* se utiliza como un marcador de la isla, con lo que las cepas se dividen en *cagA*⁺ y *cagA*⁻ (64). La unión de *H. pylori cagA*⁺ en células epiteliales humanas en cultivo induce su dispersión y alargamiento y un re-arreglo del citoesqueleto (65). Se ha propuesto que la translocación de *cagA* en las células depende de los genes de virulencia del sistema de secreción tipo IV que se encuentran en la isla de patogenicidad *cagPAI* (56). *H. pylori* es conocido por su marcada diversidad genética inter e intrapoblacional, adicionalmente los genes *cagA* y *vacA* son polimórficos y representa implicación clínica dependiente de la cepa que infecten una población humana en particular (66).

4.7.1. Método de acción de la proteína *CagA*.

H. pylori se une a la célula diana e inyecta la proteína *CagA* en su interior. Una vez en el interior busca la cara interna de la membrana celular que es donde tiene lugar la fosforilación (59). Las proteínas encargadas de ello son de la familia de las Src quinasas (c-Src, Fyn, Lyn, Yes...) (67, 68) y las regiones fosforiladas son secuencias específicas de aminoácidos: glutamato (E), prolina (P), isoleucina (I), tirosina (Y), alanina (A) denominadas “EPIYA motifs”. Esta fosforilación ocurre directamente sin ningún estímulo previo que, probablemente indica que estas quinasas son activas constitutivamente en las células epiteliales de la mucosa gástrica.

Una vez fosforilada la proteína *CagA* interacciona con una tirosinfosfatasa, la proteína SHP-283, (69). Esta proteína contiene dos dominios SH2 que normalmente se encuentran unidos al centro catalítico de la enzima. Por interaccionar con la proteína *CagA* fosforilada,

las secuencias EPIYA se unen a los dominios SH2 y se activa su función fosfatasa. Así, son desfosforilados sustratos celulares que inducen un fenotipo celular alargado y un reordenamiento del citoesqueleto (*hummingbird cells*) (70) y, potencian la activación mantenida de la vía fisiológica de ERK MAP quinasas, vía que regula tanto el crecimiento celular (por lo que se considera el gen *cagA* como oncogénico) como su morfología, y contribuye al aumento de células con el fenotipo *hummingbird*.

Aunque *CagA* activa vías fisiológicas humanas no se ha encontrado similitud con ninguna proteína de mamíferos. Pero sí se ha relacionado la activación prolongada de estas vías con la progresión de fase G1 a S, por lo que *CagA* podría estar implicada en una mayor predisposición de la célula gástrica porque descontrola su crecimiento (71). Estos mecanismos conllevan una grave alteración y daño en el hospedador, por lo que *H. pylori* ha desarrollado un mecanismo *feed-back* que controla su acción para mantener un cierto equilibrio: la proteína *CagA* fosforilada, además de unirse a la fosfatasa SHP-2 puede interaccionar con los dominios SH2 de las Src quinasas, que fosforila las proteínas Src e impide así que sigan activando a más proteína *CagA* (72).

Además de estos efectos regulados por la fosforilación, la proteína *CagA* puede por vías independientes, activar otras vías (en interacción por ejemplo con Grb2 o c-Met) (45), alterar la unión celular de la mucosa gástrica (en interacción con ZO-1) (39) o bien la regulación de ciertos factores de transcripción entre los que se encuentran el nuclear kappaB90 que induce la producción de IL-8 (también inducido por el peptidoglicano inyectado por el SST4 codificado por *cagA* PAI) (73).

4.8. Citotoxina vacuolizante.

Es una proteína codificada por el gen *vacA* que induce la vacuolización y posterior destrucción de las células epiteliales gástricas.

El gen se encuentra presente en todas las cepas y aunque casi todas producen la proteína

VacA (74), menos del 50% expresa la citotoxina en su forma más activa: una exotoxina compuesta por dos subunidades (p33 y p55) implicadas en la acción tóxica e interacción con la membrana respectivamente (75).

VacA está adaptada al pH ácido del estómago (76) donde se une a un receptor de tirosinfosfatasa necesario para que induzca la formación de úlcera gástrica, según los datos obtenidos en estudios con ratones transgénicos (77), para ser introducida en el citosol que es su lugar de acción (78).

4.8.1. Mecanismo de acción de la proteína VacA.

El mecanismo exacto por el que se produce la vacuolización no está descrito en su totalidad pero se ha reportado que implica alteraciones en la membrana que afectan a la vía endosomal-lisosomal y formación de canales selectivos de iones en esa misma membrana (79).

Por otro lado, la proteína VacA, además de desencadenar la vacuolización celular, interfiere en la presentación de antígeno (80), aumenta la permeabilidad de capas epiteliales polarizadas (81) e induce apoptosis mediante la liberación de citocromo C y de las caspasas de las mitocondrias (82, 83).

VacA amplifica la respuesta inflamatoria de la mucosa gástrica aumenta la expresión de ciclooxygenasa 2, en las células T, neutrófilos y macrófagos, que a su vez pueden activar la producción del factor de crecimiento vascular endotelial y provocar procesos tumorgénicos. Aunque no están definidos los mecanismos por los que la respuesta inmune inducida por *H. pylori* contribuye a la carcinogénesis gástrica, la sobreexpresión de COX-2 y el aumento de citoquinas proinflamatorias originan alteraciones morfológicas que pueden llevar gastritis atróficas y metaplasia intestinal (84). Al mismo tiempo, interrumpe la maduración de los fagosomas en los macrófagos, por lo que la bacteria sobrevive dentro de los mismos (85).

4.8.2. Polimorfismo del gen *vacA*.

Aun cuando el 80% de las cepas de *H. pylori* poseen un gen funcional, el efecto citotóxico sólo se detecta en un 50% de la población infectada (86). La diferente toxicidad de esta proteína se asocia con la idea de que el gen *vacA* tiene una estructura mosaico que le permite varias formas de presentación: se pueden distinguir 2 familias (*s1* y *s2*) con base en el análisis de la secuencia del extremo 5' del gen (codifica la región señal N-terminal de la proteína) y otras 2 familias adicionales (*m1* y *m2*) que analizan la región media que codifica parte de la subunidad de unión a células epiteliales p55 (15, 87).

Recientemente, ha sido descrita una nueva región intermedia (tipo *i1* o *i2*) con actividad reguladora, así como varias subfamilias *s1* (*a*, *b* y *c*), *m1* y *m* (88).

Entre las tres regiones son posibles todas las combinaciones. El mecanismo por el que las distintas formas predispone a las diversas enfermedades no se ha descrito pero sí la relación entre cada una de ellas:

4.8.2.1. Región señal (*s*).

Numerosos estudios (58, 89), describen la úlcera péptica es más frecuente en pacientes con *H. pylori* que presenta el tipo *s1* frente a los que presentan el *s2*, aunque este hecho se mantiene en menor medida en países orientales (90). Algunos estudios sugieren que el tipo *vacA s2* sea relativamente no citotóxico (91) o incluso que sea capaz de disminuir la capacidad de la proteína para formar canales en la membrana celular (92).

4.8.2.2. Región media (*m*).

Alelo que codifica un fragmento de la subunidad de unión p55 (86). La diferencia entre ambos tipos de proteína (*m1* y *m2*) son alrededor de 30 aminoácidos incluidos en esta región (74).

El tipo *m1* ha sido asociado con un mayor daño epitelial que el tipo *m2* en ensayos con determinadas líneas celulares (93). Sin embargo otros estudios demuestran que las cepas *m2* pueden ser igualmente tóxicas, con excepción de la línea celular *HeLa* con la que tiene dificultades de interacción. Probablemente, las distintas formas de la toxina posean dominios de unión (40). La codificada por el tipo *m1* es la que se asocia con vacuolización en una mayor variedad de células (94), pero es preciso tener en cuenta que la región media parece tener una implicación más relevante en la interacción con las células gástricas que con la acción tóxica propiamente dicha (95).

Se han encontrado híbridos *m1m2* (*m1* proximal, *m2* distal) en los que la capacidad de vacuolización parece similar a las cepas *m1* (96).

4.8.2.3. Combinaciones (s/m).

Todas las combinaciones son posibles, aunque la combinación *s2m1* es poco frecuente. El genotipo *s1m1* se asocia con patologías más graves: úlcera (97) y Cáncer gástrico (15). Mientras que las cepas con el alelo *m2* suelen presentar baja asociación con estas patologías, especialmente *s2m2*. Sin embargo, la forma *s1m2* (98), ha sido descrita en casos de úlcera péptica y el alelo *m2* es muy prevalente en China donde la úlcera y el Cáncer gástricos son frecuentes.

4.8.2.4. Región intermedia (i).

Se encuentra entre la región *s* y la *m* y cumple una función reguladora. Con base en su secuencia aminoacídica se han descrito dos fenotipos, *i1* e *i2*. Algunos estudios realizados en Irán (87) sugieren que las cepas *s1m1* (las más virulentas) suelen ser *i1*, mientras que las *s2m2* (las menos virulentas) suelen ser *i2*. Además, en el caso de la combinación *s1m2*, la presencia de *i1* se relaciona con mayor citotoxicidad y la de *i2* con su ausencia. Parece que las cepas *i1* son frecuentes en China y Japón donde la prevalencia de Cáncer gástrico es

elevada (31). Esto indicaría la capacidad reguladora y predictora de patogenicidad de la región intermedia, aunque son necesarios más estudios que lo confirmen.

4.9. Papel de la respuesta inmune en la infección por *H. pylori*.

La infección estimula tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa (99). El paso inicial en este proceso es el reconocimiento del microorganismo a través de Nod1 (*Nucleotide-binding oligomerization domain protein 1*), que identifica un muropéptido de los peptidoglicanos de estas bacterias (99). Después del reconocimiento por Nod1, numerosas células inflamatorias infiltran el epitelio colonizado, agudizan la inflamación y participan en la generación de una respuesta inmune adaptativa (99). Así, la respuesta innata es un factor determinante en la gravedad de la enfermedad y la carcinogénesis gástrica.

La respuesta inmune adaptativa a *H. pylori* es mediada por células LT-CD4⁺ Th1, asociada con la liberación de citoquinas proinflamatorias IL1, IL2, IFN γ y la activación de macrófagos. Esta respuesta de linfocitos LT-CD4⁺Th1, se asocia con gastritis y atrofia gástrica, en contraste con la respuesta mediada por citoquinas anti-inflamatorias IL4, IL10, característica de la respuesta de linfocitos LT-CD4⁺Th2, que parece ser protectora. La respuesta de linfocitos LT-CD4⁺Th1, es “equivocada”, por cuanto *H. pylori* es una bacteria extracelular que, al igual que microorganismos similares, debería desencadenar una respuesta LT-CD4⁺Th2 (100). La respuesta LT-CD4⁺Th1 produce interferón gamma (IFN γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), IL-12, IL-18 (99). Estas citocinas tipo I activan los macrófagos, los cuales, a su vez, secretan factores pro-inflamatorios y adquieren mayor capacidad bactericida en comparación con su activación por respuesta celular LT-CD4⁺Th2 (99). La gravedad de la gastritis crónica se correlaciona con el número de células que secretan IFN γ (101). La diferenciación de la respuesta inmune del tipo LT-CD4⁺Th1 es influida por la bacteria misma y por factores ambientales (102). Las infecciones por parásitos que inducen respuesta LT-CD4⁺Th2 se ha sugerido como un factor que explica la

menor incidencia de cáncer gástrico en regiones de África “enigma africano” (46), e incluso en Colombia, se ha documentado en niños de Tumaco, una región de menor prevalencia de Cáncer gástrico, comparada con Pasto (116). La respuesta LT-CD4⁺Th2 produce IL-4, IL-5, IL-10 y factor de crecimiento transformante β de fibroblastos, IgA de mucosas e IgE, y disminuye la inflamación causada por LT-CD4⁺Th1 en respuesta al *H. pylori* (103), que afecta la progresión de gastritis crónica a atrofia, displasia y cáncer. De esta manera, la helmintiasis en los niños promueve la polarización a LT-CD4⁺Th2, que altera la respuesta usual a la infección por *H. pylori*, que puede disminuir el riesgo de Cáncer gástrico más tarde en la vida de esos individuos. La infección tiene un largo período subclínico, durante el cual produce inflamación y daño progresivo de la mucosa gástrica. No obstante que las diferentes cepas de *H. pylori* difieren en su capacidad para producir inflamación (104), el desenlace clínico depende de la interacción entre las características genéticas del huésped, el medio ambiente y el microorganismo (105).

4.10. Epidemiología de *H. pylori*.

El hábitat específico de *H. pylori* es la mucosa gástrica del hombre, aunque pueden existir otros reservorios animales como primates, y gatos domésticos (106). El agua no clorada también ha sido descrita por algunos autores como reservorio natural y posible medio de transmisión del microorganismo (107)

La infección por *H. pylori* se produce en todas las regiones del mundo, de forma que alrededor de un 50% de la población está colonizada (108). Sin embargo, sólo entre un 10% y un 15% de los individuos infectados sufrirá *ulcus* peptídico y hasta un 1-3% desarrollarán Cáncer gástrico. No se conoce con exactitud el mecanismo de transmisión pero se cree que se deba al contacto interpersonal (oral-oral, oral-fecal) ya que la edad (109), el nivel de desarrollo de la zona y factores socioeconómicos individuales parecen influir en la adquisición del microorganismo (110):

Se ha descrito la infancia como la edad en la que se adquiere con mayor frecuencia el microorganismo aunque existen diferencias entre los países industrializados y en vías de desarrollo: en los primeros la seroprevalencia en la niñez es baja y se incrementa con la edad y en los últimos la infección se produce con una tasa elevada durante la infancia.

En países en vías de desarrollo, en los que la falta de estructura sanitaria y el hacinamiento facilitan la transmisión, las tasas de prevalencia tanto en niños como en adultos son más elevadas que en países industrializados (111). Al mismo tiempo, se ha comprobado que existe una variabilidad genética que también tiende a organizarse geográficamente.

En primer lugar, parece demostrado que esta variabilidad es baja cuanto menor es la distancia geográfica con África oriental, lugar donde se supone surgió el hombre moderno y donde probablemente se dieron las primeras colonizaciones por *H. pylori*. A partir de entonces, y con las migraciones desde África al resto del mundo hace alrededor de 58 000 años, comenzaría la coexistencia y evolución de ambas especies que se verían sometidas a las presiones del medio y condiciones que las rodeaban (112) En el año 2003 la revista *Science* publica un estudio basado en resultados obtenidos mediante MLST (*Multilocus sequence typing*) de 370 cepas procedentes de distintas partes del mundo, en el que los autores son capaces de distinguir hasta 7 poblaciones distintas que concuerdan con estas migraciones del ser humano desde el continente africano al resto del mundo (113).

En segundo lugar, diversos estudios confirman la incidencia de las patologías causadas por *H. pylori* según el área geográfica estudiada. Por ejemplo, la incidencia del adenocarcinoma gástrico es mucho más elevada en Asia Oriental, Centro y Sudamérica que en otros lugares del mundo (114). Estos datos, coinciden con el hecho de que también en estas áreas la presencia de determinados factores de virulencia como la isla de patogenicidad *cagA* es más prevalente (alrededor del 90% (57) frente al 40-60% de otras regiones (49).

4.11. Prevalencia de *H. pylori* en el mundo.

América Latina alcanza una media del 60% en población sintomática de infección por *H. pylori*, con variación entre 30 y 90% (46).

Los factores de riesgo pueden variar no sólo en países sino entre poblaciones; el factor de riesgo de vivir en estrato socioeconómico bajo, ha facilitado diseñar estudios epidemiológicos para determinar prevalencias y diferenciar el nivel de desarrollo de cada país o, de cada continente (46). Se estima una prevalencia en niños en el contexto mundial del 30 %, con cifras de seroconversión de 24 % entre los 3 y 5 años, y del 45 % entre los 16 a 20 años (10).

En menor escala influyen la edad, la etnia y el género. En Estados Unidos las diferencias entre poblaciones son mayores. Se observa que en blancos la prevalencia de la infección es < 10%, en caucásicos, africanos, indígenas autóctonos y latinos es del 50%, principalmente en ancianos. En inmigrantes la prevalencia de la infección sobrepasa el 60 % (115).

Es evidente que entre múltiples estudios de sero-prevalencia realizados en el mundo, México reporta un incremento progresivo de la prevalencia de la infección, puesto que parte en menores de un año con 20%, cifra que asciende 5% progresivamente hasta los 10 años, hasta alcanzar un 80% entre 18 a 20 años (116). Otros estudios reportan cifras controversiales sobre la prevalencia de *H. pylori* en infantes. Varía entre 8.9% a 72.8% en países desarrollados y en desarrollo respectivamente como lo registran España y Austria (15.8% y 28,3%) (117), en contraste con países latinoamericanos como México, Brasil, Ecuador, Cuba (47.6%, 48.8%, 63.3% 67.7%) (10), Colombia (36.7%), y en el Medio Oriente Israel, Turquía e Irán (49.7%, 57% y 82%). Estudios de prevalencia en preadolescentes entre 11 y 14 años, registran hasta un 40.6 %, en adolescentes entre 15 a 17 años de 48.6 %, y en adultos jóvenes del 59.8 % entre 18 a 24 años. Otro estudio hecho en infantes de Puebla, México, de diferentes estratos socioeconómicos, reporta prevalencia de *H. pylori* de 24.46 %, 18.08% y 2.12% en los niños de estrato bajos, medio y alto, respectivamente. De allí se infiere que en la sero-prevalencia influye la edad y el estrato socioeconómico (10).

4.12. Prevalencia de la infección por *H. pylori* en Colombia.

Según *Bravo y cols*, (9), la prevalencia de la infección por *H. pylori* es muy alta en todo el país, sobre todo en ciudades como Pasto, Túquerres, Tumaco, Bogotá, Tunja y Manizales (99.1% y 85.5%). En general es evidente que en los grupos con bajo nivel socioeconómico y en los países "en desarrollo" la prevalencia global aumenta hasta 80%. En el caso de Colombia, existen reportes altos de seroprevalencia (96.3%), principalmente desde la juventud (96%), en el grupo de 18-24 años. La seroprevalencia es mayor a medida que se aumenta de edad, lo que indica un alto índice y riesgo de adquirir la infección por *H. pylori* durante la edad temprana en todas las regiones geográficas de Colombia, sin depender de la variedad étnica, (118), aunque en ciertas poblaciones de un mismo país existan variaciones significativas, debidas a las diferencias étnicas y nivel socioeconómico, en especial durante la infancia (46).

Es evidente que en zonas de alta mortalidad por Cáncer gástrico, la seroconversión o infección es más temprana, lo que indica que en Colombia existe un gran riesgo ecológico para adquirir tempranamente la infección por *H. pylori*. En nuestro país, en general en las poblaciones montañosas, las tasas de Cáncer gástrico son altas, en contraste con la costa pacífica y atlántica donde la prevalencia de esta neoplasia es muy baja; de manera similar en el departamento de Nariño se documenta prevalencia de la infección por *H. pylori* hasta del 90%, tanto en Túquerres (con altitud >2800 mts s.n.m), como en Tumaco, localizado en la costa pacífica. La incidencia de Cáncer gástrico para poblaciones de las altitudes de Nariño es de 150 por 100.000 habitantes en contraste con la incidencia de 2.6 por 100.000 para personas que viven en Cartagena (46). En un estudio de casos y controles en Nariño se reporta un riesgo relativo de Cáncer gástrico de 2.1 para sujetos que viven por encima de los 2.000 m sobre el nivel del mar, comparado 0.47 para sujetos que viven entre 1000 y 2000 mts (9). identifican al departamento de Nariño como una de las regiones colombianas con mayor prevalencia de Cáncer gástrico, (46).

4.13. Diversidad genética de *H. pylori*.

Una de las características más notables de *H. pylori* es su enorme diversidad genética. El tamaño del genoma se encuentra en el rango de 1.5 a 1.8 Mb, para las diferentes cepas descritas, su diversidad incluye variación en la adición de genes, orden génico cromosomal, despliegue de repeticiones de ADN, variación de secuencias (en promedio 6%) en genes conservados, genes de virulencia (*cagA* y *vacA*), homoplasias, genes de fase variable y ADN móvil. No obstante esta diversidad, se mantienen similitudes entre las cepas basadas en los orígenes de poblaciones humanas. *H. pylori* genera diversidad a través de mutaciones puntuales; recombinación intragenómica e intergenómica (119) fenómenos que son mejorados por su estructura poblacional panmítica (120), la presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno (RNS) desde lesiones inflamatorias inducidas por *H. pylori*; y selección de segundo orden, que involucra variación en genes mutadores. En todo esto se crea un sistema no lineal para diversificación (121).

El alto grado de diversidad que se observa en *H. pylori* lo facilita su competencia natural para transformar ADN. En contraste con otras bacterias, la competencia natural en *H. pylori* no es mediada por el pili tipo IV o proteínas como pili tipo IV, sino por el T4SS que es codificado por el operón *comB*. Las proteínas ComB8, ComB9 y ComB10 corresponden a las proteínas VirB8, VirB9 y VirB10 de *Agrobacterium tumefaciens* y constituyen los componentes básicos de un T4SS. *H. pylori* por lo tanto, posee dos T4SS funcionalmente independientes, uno para la secreción proteica y traslocación dentro de la célula del hospedero que es codificado por el *cag* PAI, y uno para la captación de ADN. Además, un tercer grupo de genes para secreción tipo IV fue recientemente descubierto y parece estar presente sólo en un subconjunto de cepas. El significado funcional de este grupo se desconoce (122).

La identificación de plásmidos crípticos en aproximadamente la mitad de todas las cepas de *H. pylori* ha dado lugar a la especulación de que la transferencia conjugativa de nuevas

secuencias portadas en plásmidos podría ser otro medio de transferencia genética horizontal y, por lo tanto, de diversidad de cepas en *H. pylori*. En apoyo a estas hipótesis, se ha observado que algunos de estos plásmidos contienen puntos calientes para la recombinación sitio-específica, elementos codificados en zonas de plasticidad cromosomal y pueden ser móviles. Esto indica que el intercambio de material genético entre estos plásmidos y el cromosoma bacteriano puede ocurrir, y que estos plásmidos pueden ser movilizados y dispersarse rápidamente en la población. Así, la diversidad genética, que conduce a diversidad antigénica, puede ser una estrategia usada por *H. pylori* para evadir la vigilancia inmune (122).

Por otra parte, el hecho de que los factores de virulencia en *H. pylori* estén ligados con enfermedad implica que ellos son una característica fija, pero este no es el caso. La variación en genotipos relevantes a través de la recombinación intragenómica (por ejemplo, número de motivos EPIYA en la proteína CagA) probablemente refleja la selección local por fenotipos particulares de *H. pylori*. Las cepas de *H. pylori* pueden también adaptarse (o repararse) por recombinación con otras cepas o con variantes clónales de la misma cepa. Ejemplos de la presunta adaptación incluyen cepas que intercambian alelos *cagA* o pérdida completa o parcial del *cag* PAI durante la infección. La recombinación intragenómica con otras cepas puede afectar otros factores de interacción con el hospedero, por ejemplo, cambios en el genotipo y fenotipo de VacA. Una posibilidad es que múltiples variantes menores de una cepa pueden sobrevivir en el estómago de un individuo, cada una actúa como potencial reservorio de elementos genéticos para sus co-habitantes, con los clones dominantes apropiados y seleccionados por presiones ambientales. Las implicaciones para la patogénesis son inciertas pero significativas (15).

La creciente complejidad de la variación de *H. pylori* ha sido expuesta por la publicación de secuencias genómicas completas de seis aislados a la fecha. Sin embargo, si las variaciones de fase y polimorfismos similares son independientes, el número de variantes potenciales es enorme, parecido a las poblaciones de “cuasiespecies” de virus ARN, tales como HIV y HCV, dos organismos que persisten en sus hospederos. Como disminuyen los costos de secuenciación de los genomas, la secuenciación paralela de aislados de diferentes partes del

estómago de un individuo podría mejorar el entendimiento de la diversidad funcional en relación con los fenotipos del hospedero; múltiples cepas (competidoras) a menudo están presentes dentro de un hospedero pero cooperan a través de un *quórum sensing* y recombinación, entre otras propiedades. Una aproximación relacionada es el uso de secuenciación de alto rendimiento para comprender la abundancia y diversidad de otras especies bacterianas (como también sus genes) en personas con y sin *H. pylori* en estados saludables y específicos de enfermedad (15).

4.14. Marcadores genéticos para el estudio de la diversidad en *H. pylori*.

Los marcadores genéticos son variaciones en el genoma que se usan para entender eventos genéticos. Para que un marcador sea útil, la variación genética debe ser polimórfica y, existir dos o más variaciones comunes en la población objeto de estudio. Un marcador genético puede ser un gen funcional, porque lo importante no es la función, sino las variaciones en la estructura del ADN que se reflejan en diferencias funcionales entre los alelos. Estos marcadores genéticos proporcionan información útil para estudios epidemiológicos y para conocer la estructura genética de las poblaciones. Las técnicas más comúnmente utilizadas para estudiar los marcadores genéticos son Electroforesis por campos pulsados (PFGE), Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), Polimorfismo de los fragmentos de restricción amplificados por PCR (AFLP-PCR), Ribotipificación y Amplificación de ADN polimórfico (RAPD).

4.13.1. Electroforesis por campos pulsados (PFGE).

La electroforesis por campos pulsados es una técnica que permite la comparación de largos fragmentos de ADN genómico después de la digestión con una enzima de restricción. Difiere de la electroforesis convencional en agarosa en que la orientación del campo eléctrico a lo largo del gel cambia periódicamente en comparación con la electroforesis estándar, que es unidireccional constante y permite que los fragmentos de ADN de alto peso

molecular se realineen en la nueva dirección del campo eléctrico. La variabilidad en el campo eléctrico permite a la PFGE separar fragmentos muy largos (>600 kb) (123).

4.13.2. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).

Es una técnica en la que el ADN se corta en fragmentos, utiliza enzimas de restricción que reconocen una secuencia genética (en ocasiones flanquean la región polimórfica) que ocurre repetidamente, de tal forma que los organismos pueden ser diferenciados por el análisis en los patrones derivados de la digestión enzimática de su ADN (124). Si dos microorganismos difieren en la distancia entre los sitios de restricción de una enzima en particular en su genoma, debido a una mutación que generó o eliminó un sitio de restricción enzimática, la longitud de los fragmentos producidos será diferente, lo que representa el polimorfismo. Los fragmentos de ADN se separan de acuerdo con su tamaño por medio de electroforesis en geles de agarosa. La similitud de los patrones generados puede usarse para diferenciar una especie de otra e, incluso, entre cepas (124).

4.13.3. RFLP-Southern blot.

Cundo se determinan los patrones de migración, los fragmentos se pasan mediante transferencia por capilaridad (*Southern blot*) a una membrana de Nylon. Se utiliza una sonda capaz de reconocer específicamente el polimorfismo en estudio, para visualizar las secuencias complementarias a los fragmentos de ADN (124).

4.13.4. RFLP-PCR.

Es una técnica que detecta polimorfismos en el ADN en un locus particular. Después de amplificar el locus de interés mediante PCR, los fragmentos generados se cortan con enzimas de restricción, los polimorfismos se detectan por diferencias en la longitud de los fragmentos de restricción, que se separan mediante electroforesis en geles de agarosa (125).

4.13.5. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción amplificados por PCR (AFLP-PCR).

Esta técnica permite la identificación a través de la amplificación por PCR de los polimorfismos de los fragmentos genómicos cortados con enzimas de restricción. Se ha utilizado para mapeo genético de plantas y animales, diagnóstico médico, estudios filogenéticos y tipificación microbiana (126). Para el análisis del AFLP se requieren pequeñas cantidades de ADN genómico purificado, que es digerido con dos enzimas de restricción, una con una frecuencia regular de corte (como *EcoRI*) y una segunda con una frecuencia alta de corte (como *MseI* o *TaqI*). Se diseñan desoxioligonucleótidos adaptadores complementarios, de tal manera que el sitio de restricción inicial no se restablezca después de la ligación. De acuerdo con el tamaño del genoma, la restricción-ligación produce miles de fragmentos adaptados. Las secuencias del extremo de cada fragmento adaptado constan de una secuencia adaptador y la parte restante de la secuencia de restricción. Para obtener la amplificación selectiva de este subconjunto de fragmentos, estas secuencias finales sirven como moldes para el diseño de los desoxioligonucleótidos específicos para los adaptadores, los cuales en el extremo 3' tienen de uno a tres nucleótidos arbitrarios después del sitio de restricción. Dicha extensión de uno, dos o tres nucleótidos arbitrarios reduce el número de fragmentos amplificados por un factor de 4, 16 y 64 respectivamente (127). Se observan de 40 a 200 bandas cuando se analiza en electroforesis en geles de poliacrilamida.

4.13.6. Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD).

Son fragmentos de ADN amplificados por PCR con el uso de desoxioligonucleótidos cortos, generalmente de 10 pb y diseñados con secuencias azarasas. Estos desoxioligonucleótidos sirven como iniciadores sentido y anti-sentido que amplifican fragmentos en 3 a 10 sitios genómicos simultáneamente. Se usan bajas concentraciones de ADN molde (5-50 ng por reacción) y para el diseño de los desoxioligonucleótidos no se

requiere conocer la secuencia del ADN. Los fragmentos amplificados (0.5-5 kb) son separados por electroforesis en geles de agarosa y los polimorfismos son detectados como la presencia o ausencia de bandas de determinado tamaño. Estos polimorfismos se deben a la variación en los sitios de alineamiento de los desoxioligonucleótidos (128). Los RAPD se han utilizados con múltiples propósitos, desde estudios individuales (ej. identidad genética) hasta estudios en los que se involucran especies relacionadas.

5. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo general.

Evaluar la colonización múltiple de aislados de *H. pylori* en pacientes con gastritis crónica provenientes de las poblaciones con contraste en el riesgo de desarrollar Cáncer gástrico: Tumaco-Nariño, bajo riesgo; Túquerres-Nariño alto riesgo.

5.2. Objetivos específicos.

5.2.1. Objetivo específico 1. Caracterizar la variabilidad genética en los aislados de *H. pylori* según los factores de virulencia *cagA* y *vacA* de las poblaciones: Tumaco-Nariño (bajo riesgo); Túquerres-Nariño (alto riesgo).

Hipótesis objetivo específico 1. *H. pylori* es un factor de riesgo para el desarrollo de Cáncer gástrico, Por tal razón se espera encontrar diferencias entre la proporción de los factores de virulencia *cagA* y *vacA* en los aislados de *H. pylori* de los pacientes procedentes de las poblaciones con contraste en el riesgo para desarrollar Cáncer gástrico: Tumaco-Nariño, bajo riesgo; Túquerres-Nariño alto riesgo.

5.2.2. Objetivo específico 2. Evaluar los patrones de variabilidad genómica de los aislados de *H. pylori* obtenidos dentro y entre las regiones gástricas (antro y cuerpo) evaluadas, en pacientes procedentes de poblaciones con contraste en el riesgo para desarrollar Cáncer gástrico.

Hipótesis objetivo específico 2. Si los pacientes de las poblaciones de estudio se encuentran colonizados por múltiples cepas de *H. pylori* se espera encontrar diferencias significativas entre los patrones de variabilidad genómica entre las regiones anatómicas (antro y cuerpo), de cada uno de los pacientes del estudio.

6. Variabilidad genética de los aislados de *H. pylori* según los factores de virulencia *cagA* y *vacA*.

La infección por cepas virulentas de *H. pylori*, es uno de los factores de riesgo más importante para el desarrollo de lesiones precursoras de CG y carcinoma gástrico, los factores de virulencia de *H. pylori* (13), la presencia del gen *cagA* y del alelo s1/m1 del gen *vacA*, se relacionan con procesos patológicos graves como la úlcera péptica y con alta incidencia de CG (129).

Se observan marcadas diferencias en la virulencia de las cepas prevalentes en distintas regiones del mundo (53) y se asocia su presencia con variabilidad en el riesgo de Cáncer gástrico. Este estudio tiene como objetivo caracterizar la variabilidad genética en los aislados de *H. pylori* según los factores de virulencia *cagA* y *vacA* de las poblaciones: Tumaco-Nariño (bajo riesgo); Túquerres-Nariño (alto riesgo).. El estudio incluyó ADN de *H. pylori* obtenido a partir de aislados de biopsias de mucosa gástrica (antro curvatura mayor y menor y cuerpo curvatura mayor), de 203 pacientes de Tumaco y 206 pacientes de Túquerres con síntomas de dispepsia quienes se sometieron a una endoscopia digestiva superior en el proyecto “Susceptibilidad antimicrobial según factores de virulencia de aislados de *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis crónica”. Se encontró que la frecuencia de genotipos virulentos fue significativamente mayor con $p=0.001$ en aislados de *H. pylori* de pacientes de Tumaco, que la frecuencia de éstos, en pacientes de Túquerres. Y que la colonización múltiple esta asociada al lugar de procedencia siendo mayor en la población de alto riesgo (Túquerres) $p=0.027$

.

6.1. Materiales y métodos.

6.1.1. Descripción general del estudio – objetivo 1.

Con ADN de aislados de *H. pylori* obtenidos a partir de biopsias de mucosa gástrica (antro curvatura mayor y menor y cuerpo curvatura mayor), de 203 pacientes de Tumaco y 206 pacientes de Túquerres que participaron en el proyecto “Susceptibilidad antimicrobial según factores de virulencia de aislados de *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis crónica”, se evaluaron los factores de virulencia.

Los factores de virulencia se analizaron con la amplificación de los genes *cagA* alelo *cagA* positivo con los cebadores específicos (CagAF y CagAF), y *vacA* alelos (s1/s2, m1/m2), con los cebadores específicos: VacA alelos s1/s2, (VA1F y VA1R), y VacA alelos m1/m2 (Hpmgf- Hpmgr). (Anexo 1).

Los aislados negativos para la amplificación del gen *cagA* se confirmaron por un ensayo de PCR *empty-site* con los cebadores (ES-F (+) - ES-R (-)). (Anexo 1).

Los productos de la PCR de los cebadores específicos se visualizaron en geles de agarosa al 2%. De acuerdo con el perfil electroforético obtenido en las pruebas moleculares se estableció la colonización múltiple en la mucosa gástrica por *H. pylori* a través de la variabilidad en los factores de virulencia (*cagA* y *vacA*).

6.1.2. Criterio de selección.

6.1.2.1. Criterio de inclusión.

Para realizar esta investigación se incluyó ADN de aislados de *H. pylori*, obtenido a partir de las biopsias de los sitios anatómicos (antro y cuerpo) de mucosa gástrica de pacientes con gastritis crónica, hombres y mujeres adultos con síntomas de dispepsia residentes en Túquerres y Tumaco (Nariño) participantes del proyecto "Susceptibilidad antimicrobial según factores de virulencia de aislados de *H. pylori* en pacientes con gastritis crónica", con resultados positivos para:

1. Aislamiento positivo de *H. pylori* en las tres biopsias de los sitios anatómicos, (antro y cuerpo).
2. Las pruebas bioquímicas de identificación fenotípica de *H. pylori* (oxidasa, catalasa, ureasa).
3. La amplificación del gen estructural *ureA* con los cebadores especie específicos ANDU1 y ANDU2.

El proyecto macro y esta investigación tienen el aval del Comité Institucional de Revisión de Ética Humana (CIREH) de la Universidad del Valle. (Anexo 2).

6.1.2.2. Criterio de exclusión.

No se incluyeron los pacientes con cultivo de mucosa gástrica negativo para *H. pylori* de alguna de las tres biopsias, resultado negativo para las pruebas de identificación fenotípica y genotípica.

6.1.3. Histopatología.

Las muestras de mucosa gástrica (antro y cuerpo) se transportaron en formol al 10% y luego se procesaron con un protocolo estándar de deshidratación con inclusión final en parafina. Secciones histológicas cortadas en micrótomos (Accu-Cut® SRM) de 6µ, se colorearon con hematoxilina-eosina (H & E), de acuerdo con el sistema de clasificación de Sydney (130). Cada uno de los fragmentos se evaluó por separado. Las categorías fueron gastritis no atrófica (GNA), gastritis atrófica multifocal sin metaplasia intestinal (GAM), metaplasia intestinal (MI) y displasia. Para determinar la presencia de *H. pylori* se utilizó la tinción de Giemsa modificada en busca de bacilos curvos y espirilados. Los casos con diagnóstico discordante fueron nuevamente revisados.

6.1.4. Procedimientos microbiológicos.

6.1.4.1. Aislamiento y cultivo de *H. pylori* a partir de biopsias de mucosa gástrica.

Se empelaron fragmentos de mucosa gástrica (dos de antro y uno de cuerpo) para el aislamiento primario de *H. pylori*, y extracción de ADN, los fragmentos de mucosa gástrica fueron homogenizados en 200 µL de solución salina estéril 0.89% con un homogenizador (Kimble-Kontes, Vineland, NJ, USA). El homogenizado se depositó en platos de agar Columbia (Oxoid Ltd, Hampshire, England) con sangre desfibrinada de cordero al 7% más suplemento selectivo para *Helicobacter pylori* (Dent) con Vancomicina (10 mg/L), Cefsulodina de sodio (5 mg/L), Lactato de Trimetoprim (5 mg/L) y Anfotericina B (5 mg/L) (Oxoid Ltd, Hampshire, England). Los platos de agar fueron incubados en condiciones microaerófilas (6% O₂, 6% CO₂, 88% N₂, con el uso de CampyPak Plus (BBL) a 37°C de 4 a 8 días hasta observar pequeñas colonias grises traslúcidas.

6.1.4.2. Purificación de los aislados de *H. pylori*.

Las colonias consistentes con *H. pylori* se transfirieron a una plato que contenía agar columbia con sangre de cordero al 10%, sin suplemento Dent, para lograr cultivos axénicos antes del proceso de identificación molecular por PCR. Se incubó y se verificó el crecimiento en condiciones iguales a las descritas anteriormente (131).

6.1.4.3. Identificación de *H. pylori*.

En el ámbito macroscópico se identificaron colonias pequeñas, traslúcidas, a manera de gotas de rocío (131) y se hicieron pruebas de identificación (Anexo 4).

6.1.4.3.1. Prueba de oxidasa.

Se extendió con asa de argolla un inóculo de *H. pylori* sobre una tira de oxidasa (Oxoid Ltd, Hampshire, England). Se consideró la prueba positiva cuando la tira se tornó de color violeta que evidenció por formación de un complejo púrpura que indicó la oxidación de la N,N-Dimetil-p-fenilendiamina por parte de la citocromo oxidasa al cabo de 5 a 10 s.

6.1.4.3.2. Prueba de catalasa.

Se emulsionaron colonias del cultivo en un porta objetos con dos gotas de peróxido de hidrógeno al 10% (Carlo Erba®). La presencia de burbujas indicó una reacción positiva para catalasa.

6.1.4.3.3. Prueba de detección de ureasa.

De un cultivo de *H. pylori* se tomó una colonia con asa de transferencia y se inóculó a un tubo Nunc con 1 ml de solución de urea (Promega®) al 10% con rojo de fenol (Carlo Erba®), como indicador de pH. La prueba es positiva si hay un cambio de color amarillo a fucsia y es negativa si el color no varía.

6.1.5. Métodos de biología molecular.

6.1.5.1. Extracción de ADN de aislados de *H. pylori*.

De un cultivo puro en plato petri se tomó un inóculo con asa de argolla (Fisherbrand®), y se re-suspendió en 1.0 ml de PBS 1X pH 7.2 (preparado de la siguiente manera: 8g de NaCl, 0.2g de KCl, 1.44g de Na₂HPO₄, 0.24g de KH₂PO₄ en 800ml de agua MilliQ), contenido en un ependorff (Kontes®) de 1.5 ml estéril. La suspensión de bacterias se centrifugó a 13000 RPM x 2 minutos (Forma Scientific®) a temperatura ambiente. Después de descartar el PBS sobrenadante, el botón celular se re-suspendió en 300µl de buffer de extracción (Tabla 1). El botón celular se homogenizó y se llevó al baño maría a 56⁰C por 18 horas, con el fin de lisar las bacterias, posteriormente se inactivó la proteinasa K a 76⁰C por 10 minutos y se agitó en vortex por 10 segundos, se adicionó NaCl a una concentración final de 5M para separar los residuos celulares y proteínas, después de homogenizar en vortex por 15 segundos, y posterior centrifugación a 13000 rpm por 5 min. El sobrenadante fue transferido a otro tubo en el que se adicionaron 2 volúmenes etanol absoluto a temperatura ambiente. Se centrifugó a 13000 RPM por 20 min a 4 °C. Después de descartar el sobrenadante, se precipitó por adición de 2 volúmenes de etanol absoluto al 70% y se mezcló, por inversión, varias veces. Se centrifugó por 5 min a 13000 RPM y se descartó el sobrenadante. El ADN colectado se secó por inversión del tubo a temperatura ambiente por 10 min. El ADN precipitado se re-suspendió en 100 µl de buffer TE (Tris 10 mMol, EDTA 1 mMol) y se almacenó a 4⁰C o a -20⁰C por largo tiempo. (132).

Tabla 1. Buffer de extracción.

Reactivo (stock)	Concentración final	Volumen para una muestra
Tris-HCl 1M pH 8,0	10 mM pH 8,0	3 µl
EDTA 0,5M	5 mM	3 µl
Agua bidestilada	Hasta 10 ml	276 µl
SDS 10%	0,5 %	15 µl
ProteinasaK 10mg/ml	100 µg/ml	3 µl
Total		300 µl

6.1.5.2. Amplificación del gen *ureA*.

La identificación molecular de *H. pylori* se realizó mediante la amplificación por PCR del gen *ureA*. La reacción se realizó en un termociclador (Swift MiniPro™, Esco), y se adicionaron los siguientes reactivos a un tubo de 0.2 mL: 1X de buffer de PCR (Buffer green 5X Promega®), 1 µM de MgCl₂ (Promega®), 0.25 mM de dNTPs (desoxirribonucleosídeos 5'-trifosfato – dATP, dCTP, dGTP y dTTP – Promega®), 50 pmol/µL de cada cebador (sentido 3'-AAGACATCACTATCAACG-5'/ anti-sentido 5'-CCCGCTCGCAATGTCTAA-3'), 0.5 unidades de GoTaq ADN polimerasa (Promega®); y 25 ng de ADN genómico de *H. pylori* en un volumen final de 25 µL. La amplificación se realizó por una desnaturalización inicial a 95 °C/2 min, seguida de 35 ciclos [95 °C/1 min, 54°C/1 min y 72 °C/1 min] y una extensión final a 72 °C/ 15 min. Los productos de amplificación fueron obtenidos por electroforesis de 80 voltios por 1h en una cámara horizontal (spectroline bio-o-visión®). Éstos se visualizaron mediante fluorescencia en luz U.V. (260/280 nm) en un transiluminador (spectroline bio-o-visión®) en geles de agarosa (sigma®) al 2% teñida con 1µL de bromuro de etidio (0.5µg/mL). Para determinar el tamaño de los amplificados de los genes se empleó un marcador de peso de 100pb (Fermentas ®); el tamaño del amplicón correspondió a 106pb (fragmento esperado mediante el análisis in silico y respecto a la distancia de migración del marcador de pares de bases).

6.1.5.3. Detección del islote de patogenicidad *cag*-PAI por amplificación del gen *cagA*.

La PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl de una solución compuesta por 50 pmol de cada cebador CagAF (+) 5'-TTG ACC AAC AAC CAC AAA CCG AAG-3' y CagAF (-) 5'-CTT CCC TTA ATT GCG AGA TTCC-3', 0.2 mM de cada dNTP (Promega®), 2.5 mM de MgCl₂ y 0.5 U de Go Taq ADN polimerasa (Promega™). 1 µl de ADN genómico bacteriano se adicionó a la mezcla de reacción. La PCR se hizo en un termociclador automático (MJ Research PTC-100®) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 1 min, 52°C

por 1 min y a 72°C por 1 min, seguido por una extensión final de 5 min a 72°C. La visualización de una banda de 183 pb en el gel de agarosa al 2% fue el indicador de la presencia del *cag*-PAI. En cada experimento se incluyó un control negativo a la cepa de referencia *H. pylori* Tx30a (ATCC 51932), un control positivo cepa *H. pylori* 700392 (ATCC 26695), junto con controles de inhibición de cada muestra. Estos últimos, utilizados para descartar resultados falsos negativos.

6.1.5.3.1. Evaluación de la ausencia del *cag*-PAI por PCR *empty-site*.

Los aislados negativos para la amplificación del gen *cagA* se confirmaron por un ensayo de PCR *empty-site*. La reacción se hizo con adición de los siguientes reactivos a un tubo de 0,2 ml: 0.5 U de Go *Taq* ADN polimerasa (Promega®); 5 µl de tampón de PCR 5X (10 mM de Tris-HCl pH 8.0 y 50 mM de KCl– Promega®), 2.5 mM de MgCl₂ (Promega®), 0.2 mM de dNTP (Promega®), 50 pmol de cada cebador ES-R(-) (5'- TCA TGC GAG CGG CGA TGT G- 3'); ES- F(+) (5' - AAG AGA GAG TGG TGC GAT -3') y 5.7 µl de agua milliQ. Al final de la mezcla se adicionó 1 µl de ADN de bacteriano y se totalizó un volumen final de 25 µl. Las condiciones de amplificación consistieron en desnaturalización inicial a 95°C por dos minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C por un minuto, alineamiento a 60°C por un min y extensión a 72°C por un minuto, seguida de una extensión final a 72°C por cinco minutos. El tamaño de los amplicones esperados es de 106 pb.

6.1.5.4. PCR para detección del gen *vacA* alelos *m1* y *m2*.

Se efectuó una PCR para determinar genotipos correspondientes al gen *vacA* m (*m1/m2*), la reacción se realizó en un volumen final de 25 µl de una solución compuesta por Buffer de PCR (Tris 10 mM PH 9.0, Kcl 50 mM, Triton X100 0.1%), dNTPs 0.2 mM, 10 pico moles de cada cebador HPMGF y HPMGR, MgCl₂ 1.5 mM, Taq polimerasa 1.5 unidades. La PCR se elaboró en un termociclador, con el siguiente programa: 9 minutos de pre incubación a 95°C, seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 50°C, 45

segundos a 72⁰C. Posteriormente, se realizó una extensión final de 72⁰C por espacio de cinco minutos. Finalmente, los productos de la amplificación fueron visualizados por electroforesis en agarosa al 2 %. Los tamaños de los amplicones de 401 pb y 476 pb para *vacA* m1 y *vacA* m2, respectivamente (55).

6.1.5.5. PCR del gen *vacA* alelos *s1* y *s2*.

Para determinar los genotipos correspondientes al gen *vacS* (*s1/s2*) se elaboró una PCR que se llevó a cabo en una mezcla de 25 µl que contenía Buffer de PCR (Tris 10 mM PH 9.0, KCl 50 mM, Tritón X100 0.1%), dNTPs 0.2 mM, 10 pico moles de cada cebador VA1F y VA1R, MgCl₂ 1.5 mM, Taq polimerasa 1.5 unidades. La PCR se hizo con las siguientes condiciones: dos minutos de pre incubación a 95⁰C, seguido por 40 ciclos de 1 minuto a 95⁰C, un minuto a 52⁰C, un minuto a 72⁰C. Posteriormente una extensión final de 72⁰C por espacio de cinco minutos. Finalmente, los productos de la amplificación se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Los tamaños de los amplicones de 176 pb y 203 pb para *vacA* s1 y *vacA* s2, respectivamente (55).

6.1.6. Plan de análisis estadístico del objetivo específico 1

Los aislados de *H. pylori* se clasificaron como virulentos cuando se detecto la amplificación del alelo *cagA* (+), y de baja virulencia si se detectaba la ausencia del alelo *cag*, por *Empty site cagA* (-).

Para exminar la colonización multiple con respecto a la virulencia en los aislados de *H. pylori*, los pacientes se subagruparon de acuerdo a las siguientes caracteriscas: sexo, edad, tipo de gastritis y riesgo de cáncer. Se realizo un análisis univariado y bivariado, utilizando la prueba de *ji*-cuadrado. Se consideraron las diferencias entre las frecuencias significativas cuando $p < 0,05$. Posteriormente se evaluó el riesgo de presentar colonización multiple de acuerdo a las caracteriscas de la población mediante Odds Ratio con un índice de confianza del 95%. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SAS, versión 9.

6.2. Resultados.

6.2.1. Descripción de las poblaciones de estudio.

En el estudio “Susceptibilidad antimicrobial según factores de virulencia de aislados de *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis crónica”, se incluyeron 203 pacientes de la población de Tumaco, 180 (88.66%), tuvieron un diagnóstico positivo para *H. pylori* por histología, 172(84.72%) se le logro aislar *H. pylori*, a 41(19.70%) se les pudo aislar *H. pylori* de los tres sitios anatómicos (antro- menor, antro – mayor y cuerpo- mayor) de mucosa gástrica (Tabla 2). Participaron 206 pacientes de la población de Túquerres, 178(86.40%) positivos para *H. pylori* por pruebas histológicas, 165(80,09%) positivos para aislamiento de *H. pylori* y 31(15.04%) con aislamiento positivo en los tres sitios anatómicos de mucosa gástrica antro- menor, antro – mayor y cuerpo- mayor) (Tabla 2).

Tabla 2. Descripción de la población de estudio

Procedencia	Histología	Aislamiento	Aislamiento en las tres biopsias
	n (%)	n (%)	n (%)
Tumaco n= 203	180(88.7)	172(84.7)	41(20.2)
Túquerres n=206	178(86.4)	165(80.1)	31(15.0)

6.2.2. Características socio demográficas de las poblaciones

De los 41 pacientes de Tumaco, de los evaluados 70,8% eran mujeres y el 29.2% fueron hombres, con edades comprendidas entre 19 y 68 años. Se encontró que 90.24% de los pacientes tiene gastritis no atrófica y el 9.75% presento gastritis atrófica (Tablas 3). De los 31 pacientes de la población de Túquerres, 54,8% eran mujeres y 45.2% hombres, con edades comprendidas entre 19 y 68 años. El 93.5% tiene gastritis no atrófica y el 6.5% gastritis atrófica. (Tabla 3).

Tabla 3. Características socio demográficas de las poblaciones de Tumaco y Túquerres.

Característica	Tumaco		Túquerres	
	n (41)	%	n (31)	%
Sexo				
Hombre	12	29.2	14	45.2
Mujer	29	70.8	17	54.8
Edad				
18-35	17	41.5	11	35.4
36-47	10	24.4	13	42.0
48-68	14	34.1	7	22.6
Tipo de gastritis				
No atrófica	37	90.24	29	93.5
Atrófica	4	9.75	2	6.5

6.2.3. Caracterización molecular de *H.pylori*.

6.2.3.1. Detección de *H. pylori* por amplificación por PCR del gen estructural *ureA*.

Se obtuvieron en total 216 aislados de *H. pylori* de 41 pacientes de Tumaco y 31 de Túquerres. Las pruebas de identificación bioquímicas fueron positivas para oxidasa, catalasa y ureasa. Se realizó la amplificación por PCR de un fragmento de 167 pb del gen estructural *ureA* para corroborar su identificación molecular (Figura 1).

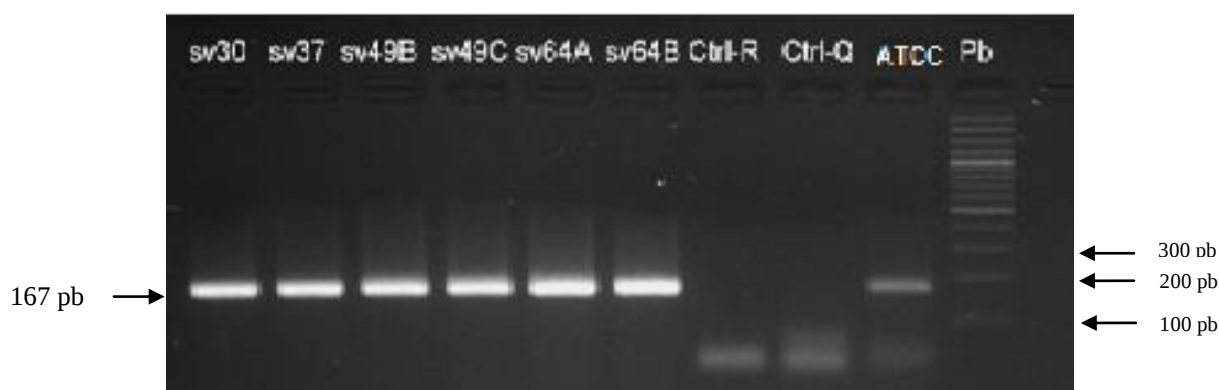


Figura 1. Electroforesis del producto de la amplificación por PCR de un fragmento del gen estructural *ureA* de *H. pylori*. Se observan bandas de 167pb, ctrl-R y ctrl-Q son controles de amplificación, el ATCC control positivo (ATCC 51932) y el pb marcador de 100 pb.

6.2.3.2. Detección del gen *cagA*.

En la población de Tumaco se encontró que la prevalencia del alelo de virulencia *cagA* (+) (Figura 2) en los tres sitios anatómicos antro-menor (85.37%), antro-mayor (97.56%) y cuerpo-mayor (100%) fue significativamente mayor que el alelo *cagA* (-) (Figura 3) con $p= 0.002$. (Tabla 4).

En la población de Túquerres la prevalencia del alelo de virulencia *cagA* (+) en los tres sitios anatómicos antro-menor (96.77%), antro-mayor (100%) y cuerpo-mayor (100%) fue mayor que el alelo *cagA* (-) con $p= 0.364$. (Tabla 5).

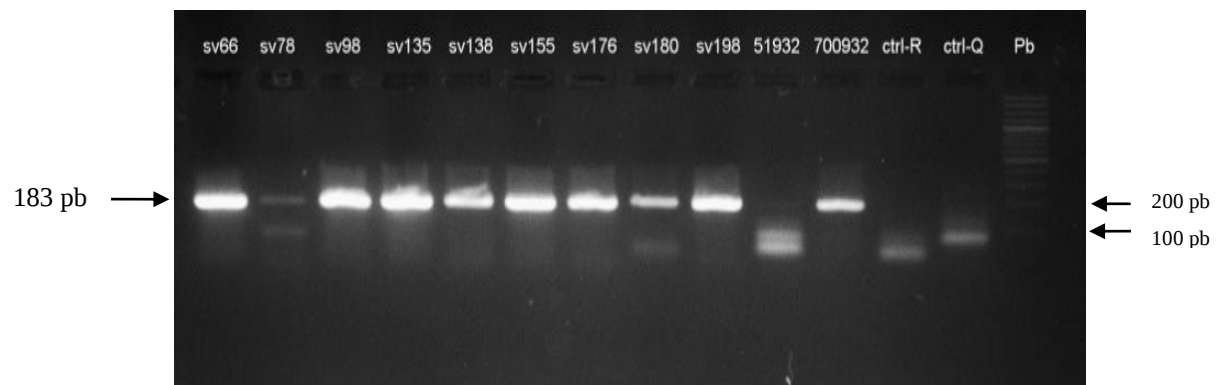


Figura 2. Electroforesis del gen *cagA*. Se observan bandas de 183 pb correspondientes a los aislados de *H. pylori cagA* positivos. ATCC51932 control negativo y ATCC700932 control positivo, ctrl-R, ctrl-Q controles de amplificación y pb el marcador de ADN de 100 pb.

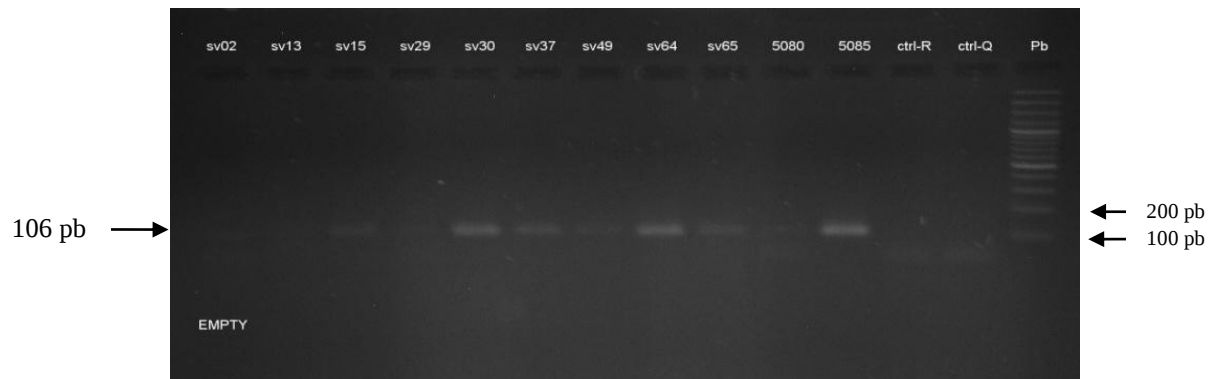


Figura 3. Electroforesis de la PCR del marcador *cagA* negativo (*Empty site*). Se observan bandas de 106 pb correspondientes a los aislados *cagA* negativos. Los carriles ATCC5080 y ATCC5085 corresponden al control negativo y positivo respectivamente. Los carriles ctrl-R y ctrl-Q son controles de amplificación y pb marcador de 100 pb.

6.2.3.3. Identificación del gen *vacA*.

En la población de Tumaco la prevalencia del alelo *m1* fue de mayor en los tres sitios anatómicos antro-menor (73.17%), antro-mayor (78.05%) y cuerpo-mayor (70.73%), con respecto al alelo *m2*; no se presentaron diferencias significativas $p=0.36$. (Tabla 4). El alelo *s1* se presentó con mayor prevalencia que el alelo *s2* (Figura 5) en los tres sitios anatómicos antro-menor (80.49%), antro-mayor (78.05%) y cuerpo-mayor (80.49%) con un valor $p=0.732$. (Tabla 4).

En la población de Túquerres la prevalencia del alelo *m1* fue de mayor en los tres sitios anatómicos antro-menor (70.97%), antro-mayor (61.29%) y cuerpo-mayor (58.06%), con respecto al alelo *m2*; no se obtuvieron diferencias significativas $p=0.257$. El alelo *s1* se presentó con mayor prevalencia que el alelo *s2* en los tres sitios anatómicos antro-menor (74.19%), antro-mayor (80.65%) y cuerpo-mayor (64.52%) con un valor $p=0.44$. (Tabla 5).

Tabla 4. Prevalencia de alelos *cagA* y *vacA* de *H. pylori* Tumaco.

Alelos	Antro menor		Antro- mayor		Cuerpo – mayor		<i>p</i>
	n (41)	%	n (41)	%	n (41)	%	
<i>cagA</i>							
<i>cagA</i> (+)	35	85.37	40	97.56	41	100	0.002
<i>cagA</i> (-)	6	14.63	0	0	0	0	
<i>vacA m</i>							
<i>m1</i>	30	73.17	32	78.05	29	70.73	0.36
<i>m2</i>	11	26.83	9	21.95	10	24.39	
<i>vacA s</i>							
<i>s1</i>	33	80.49	32	78.05	33	80.49	0.732
<i>s2</i>	8	19.51	8	19.51	8	19.51	

Tabla 5. Prevalencia de alelos *cagA* y *vacA* de *H. pylori* Túquerres.

Alelos	Antro menor		Antro- mayor		Cuerpo – mayor		<i>p</i>
	n (31)	%	n (31)	%	n (31)	%	
<i>cagA</i>							
<i>cagA</i> (+)	30	96.77	31	100	31	100	0.364
<i>cagA</i> (-)	0	0	0	0	0	0	
<i>vacA m</i>							
<i>m1</i>	22	70.97	19	61.29	18	58.06	0.257
<i>m2</i>	4	12.9	7	22.58	11	35.48	
<i>vacA s</i>							
<i>s1</i>	23	74.19	25	80.65	20	64.52	0.44
<i>s2</i>	6	19.35	6	19.35	8	25.81	

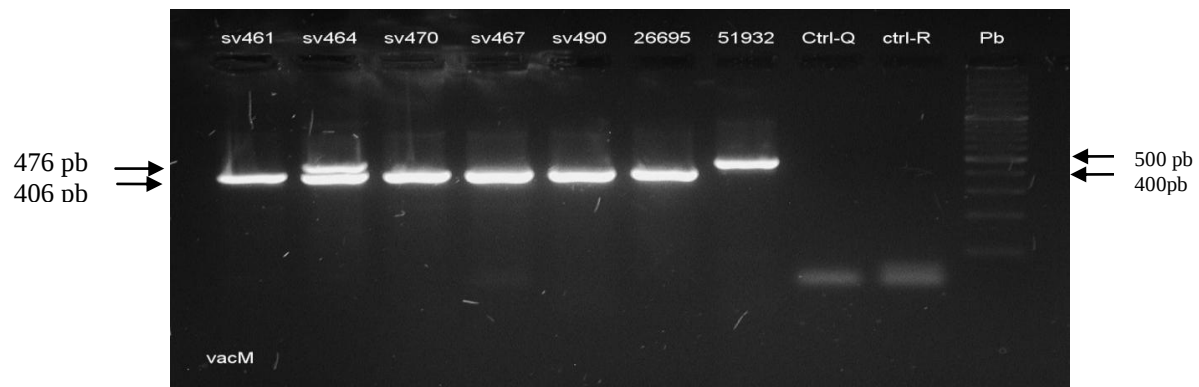


Figura 4. Electroforesis de productos de amplificación por PCR de los alelos *m1/m2* del gen *vacA*. Se observa la presencia de bandas de 406 y 476 pb correspondientes a *vacA m1/m2*. Los carriles ATCC corresponden a los controles positivos *m2* (ATCC51932) y *m1* (ATCC26695), respectivamente. Los carriles ctrl-Q y ctrl-R son controles de amplificación y el carril pb, marcador de peso molecular de 100 pb.

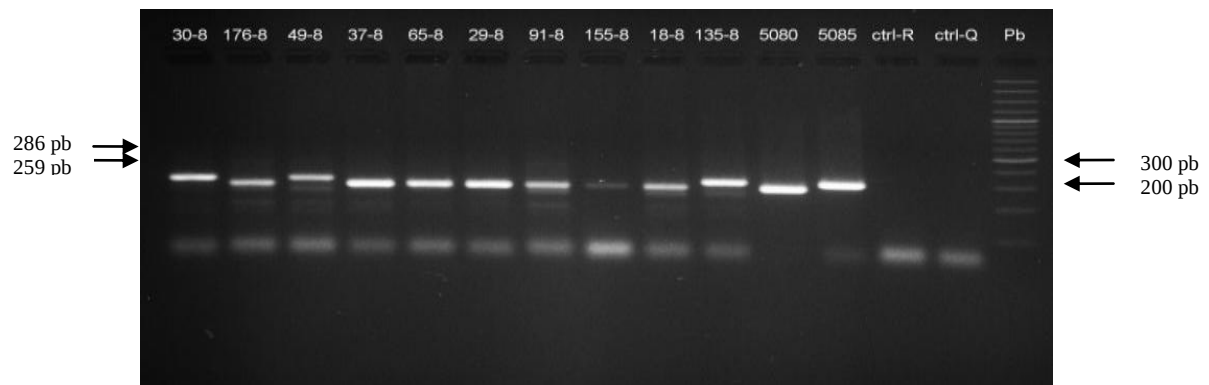


Figura 5. Electroforesis de productos de amplificación por PCR de los alelos *s1/s2* del gen *vacA*. Se observa la presencia de bandas de 259 pb (alelo *s1*) y 286 pb (alelo *s2*). Los carriles marcados con 5080 y 5085 corresponden a las ATCC controles positivos *s2* y *s1* respectivamente, y los carriles ctrl-R y ctrl-Q controles de amplificación y el pb marcador de peso molecular de 100 pb.

6.2.3.4. Genotipos de virulencia de *H. pylori* en las poblaciones.

Se calificaron como virulentos a los aislados que presentaran en alelo *cagA* positivo y como de baja virulencia aquellos aislados que no presentaran el *cagA* positivo, que en las pruebas moleculares fueran *cagA* negativo. En la población de Tumaco los genotipos virulentos *cagA*+/m1/s1 (70.7%), *cagA*+/m1/s2 (2.4%), *cagA*+/m2/s1 (6.5%), *cagA*+/m2/s2 (12.2%), se presentaron con mayor prevalencia, a diferencia de los genotipos de baja virulencia, al igual que en la población de Túquerres los genotipos virulentos *cagA*+/m1/s1 (63.4%), *cagA*+/m1/s2 (4.3%), *cagA*+/m2/s1 (8.6%), *cagA*+/m2/s2 (19.4%), fueron más prevalentes.

Se encontró que el porcentaje de genotipos virulentos para la población de bajo riesgo (Tumaco) fue (80.5%), con respecto a la población de alto riesgo (Túquerres) 65.0 %, con un valor $p=0.001$. (Tabla 6).

Tabla 6. Genotipos de virulencia en las poblaciones de Túquerres y Tumaco.

Genotipos	Túquerres		Tumaco		<i>P</i>
	n (93)	%	n (123)	%	
<i>cagA</i> +/m1s1	59	63.4	87	70.7	0.128
<i>cagA</i> +/m1s2	4	4.3	3	2.4	0.222
<i>cagA</i> +/m2s1	8	8.6	8	6.5	0.280
<i>cagA</i> +/m2s2	18	19.4	15	12.2	0.074
<i>cagA</i> -/m1s1	4	4.3	0	0	0.010
<i>cagA</i> -/m1s2	1	1.1	0	0	0.124
<i>cagA</i> -/m2s1	4	4.3	1	0.8	0.045
<i>cagA</i> -/m2s2	1	1.1	5	4.1	0.093
Genotipo					
Virulento	61	65.6	99	80.5	0.001
Baja virulencia	18	19.4	21	17.1	
No determinado	14	15.1	3	2.4	

6.2.3.5. Colonización de la mucosa gástrica por múltiples aislados de *H. pylori* según genotipos de virulencia.

En total este estudio se realizó con ADN de aislado de *H. pylori* de 72 pacientes, 41 de Tumaco y 31 de Tuquerres, entre los rangos de edades de 18 y 63 años, con el análisis bivariado se encontró que la infección con múltiple cepa no fue significativa con respecto a la edad $p = 0.063$, siendo mayor entre los pacientes que estaban en los rangos de 18 a 35 y 36 a 47 (36.8%), también se observó que la infección con cepas de múltiple genotipo fue mayor entre mujeres que en hombres (52.6 y 47.4%) sin ser esta diferencia estadísticamente significativa $p = 0.067$, se observaron diferencias significativas con $p = 0.027$ entre la colonización múltiple entre las dos poblaciones, siendo mayor en la población de Túquerres (55.3%) que en la de Tumaco (44.7%), y este estudio encontró que la de la infección con múltiple cepa no fue significativa $p = 0.203$ con respecto al tipo de lesión gástrica. (Tabla 7).

Con el análisis multivariado no se encontraron diferencias significativas entre los **OR** al comparar el riesgo de presentar colonización con múltiple cepa y las características de la población, pero se observó que el riesgo es (2.477) más en hombres que en mujeres, que el riesgo de la colonización múltiple es (1.40) mayor en el intervalo de edad comprendido entre 36 a 47 años, que entre los otros dos intervalos. Dependiendo del lugar de procedencia el riesgo de la colonización múltiple también aumenta (2.721) siendo mayor en la población de Tuquerres (alto-riesgo) con $p = 0,056$, mientras que el riesgo de la múltiple colonización disminuye con respecto al tipo de gastritis, siendo menor el riesgo en la gastritis atrófica. (Tabla 8).

Tabla 7. Colonización de la mucosa por múltiples aislados.

Características	Tipo de colonización			<i>p</i>
	Única	Múltiple	Total	
	n=34 %	n=38 %	n=72 %	
Edad (años)				0.633
18-35	41.2	36.8	38.9	
36-47	26.5	36.8	31.9	
48-63	32.4	26.3	29.2	
Sexo				0.067
Hombre	26.5	47.4	37.5	
Mujer	73.5	52.6	62.5	
Riesgo de Cáncer				0.027
Bajo (Tumaco)	70.6	44.7	56.9	
Alto(Túquerres)	29.4	55.3	43.1	
Tipo de gastritis				0.203
No atrófica	79.4	89.5	84.7	
Atrófica	20.6	7.9	13.9	

Tabla 8. Descripción del riesgo de presentar colonización múltiple

Característica	Odds Ratio	[95% Conf. Interval]		P>z
Sexo				
Mujer	1.000			
Hombre	2.477	0.858	7.154	0.094
Edad (años)				
18-35	1.000			
36-47	1.401	0.412	4.769	0.589
48-63	1.160	0.330	4.076	0.816
Riesgo de Cáncer				
Bajo (Tumaco)	1.000			
Alto (Túquerres)	2.721	0.973	7.609	0.056
Tipo de gastritis				
No atrófica	1.000			
Atrófica	0.325	0.066	1.594	0.166

3. Discusión.

la prevalencia de la infección es alta y similar en las dos poblaciones: 88,7% en Tumaco y 85,4% en Túquerres (11). La colonización por *H. pylori* se produce en alrededor de un 50% de la población mundial, sin embargo, sólo un pequeño porcentaje de los individuos colonizados desarrollará alteraciones que afecten significativamente su salud, estas alteraciones pueden ir desde una gastritis crónica superficial, hasta un cáncer de estómago o linfoma tipo MALT, pasando por las úlceras gástricas y duodenales (133).

6.3.1. Prevalencia de los factores de virulencia en aislamientos de *H. pylori*.

6.3.2. Prevalencia del gen *cagA*.

En las poblaciones de Tumaco y Túquerres se encontró la frecuencia del gen *cagA* 94% y 99% respectivamente, que concuerda con los hallazgos previos reportados en otros estudios realizados en Europa, Centro y Sur América, y Asia del Este donde se reportó una alta presencia del gen *cagA* (67% o más). (53)

Desde un punto de vista patológico, las cepas *cagA* positivas se relacionan, con el desarrollo de una sintomatología más grave en forma de gastritis severa, atrofia de la mucosa o alto riesgo de úlcera o Cáncer gástrico (115). Se ha propuesto como hipótesis que explica esto, que las cepas *cagA* positivas son más sensibles a la acidez, de forma que para librarse de ella deben colonizar la zona más cercana al epitelio donde el pH es alrededor de 7, lo que aumenta de esta forma la interacción con las células del huésped y produce así una mayor respuesta inflamatoria (133).

6.3.3. Prevalencia del gen *vacA*.

En la población de Tumaco la presencia del alelo *m1* fue de 74% y en la población de Túquerres fue de 68%, también se observó una alta presencia del alelo *s1* en las dos poblaciones 80% y 65%, respectivamente, todas las combinaciones entre ambas regiones son posibles. Estos resultados están de acuerdo con otras investigaciones en las cuales se encontró una alta frecuencia de los alelos *s1* y *m1* en las poblaciones estudiadas. (134, 135, 136). Los alelos *s1* y *m1* están asociados a la producción de la citotoxina y alta virulencia, por tanto, es difícil evaluar la importancia relativa de cada marcador, debido a que *s1* es predominante en países con bajo riesgo de Cáncer gástrico, no sorprende que también predomine en la zona de bajo riesgo de este estudio. Algunas teorías sugieren que la región *m*, es más implicada en la interacción con las células gástricas que con la acción tóxica (95), y que la región *s* sea más frecuente en cepas que además poseen otros factores de virulencia como la isla de patogenicidad PAI (137) otras hipótesis sugieren que las cepas *s* sean capaces de transcribir mayor cantidad de proteína y translocarla a través de la membrana (138)

6.3.4. Prevalencia de genotipos virulentos en las poblaciones de estudio.

En este estudio, se encontró la prevalencia de cepas más virulentas en la población de Tumaco 80.5% que en la población de Túquerres 65.6%, con un valor de $p = 0.001$, y también se encontró que las cepas más virulentas genotipo *cagA* positivo/*vacA s1m1* son más prevalentes en la población de bajo riesgo, aun que no se presentaron diferencias significativas ($p=0,128$). Resultados que difieren de otras investigaciones (11. 139) en las cuales se reportó que la prevalencia de cepas virulentas de *H. pylori* fue significativamente mayor en la población de alto riesgo (Túquerres), también, se debe tener en cuenta que las diferencias en la incidencia de cáncer gástrico, no son completamente explicadas por las diferencias en la prevalencia de cepas virulentas, lo que indica que factores etiológicos como los polimorfismos humanos y la dieta también juegan un papel importante.

6.3.5. Colonización de la mucosa gástrica por múltiples cepas de *H. pylori* con diferencias en sus genotipos de virulencia.

La infección múltiple se encontró en el 52.8% de todos los casos analizados, y fue significativamente mayor en la población de Túquerres 55.3% que en la Tumaco 44.7% ($p=0.027$), otros reportes de colonización con múltiple cepas de *H. pylori* en el mismo paciente en diferentes regiones geográficas incluyen: Corea (60%), México (65%), Chile (32%), Portugal (30%) y Brasil (15%) (140, 141, 142, 143, 144).

En este estudio la colonización múltiple fue independiente de la edad, sexo y el tipo de gastritis lo que sugiere que los polimorfismos en el hospedero no están asociados con la duración de la infección, sin embargo, la colonización no fue independiente de la región, siendo mayor en la población de alto riesgo, Túquerres es una población cerrada donde predominan mestizos (mezcla de ancestros americanos nativos y españoles) y ha tenido poco entrecruzamiento con otros grupos étnicos, lo que ha limitado la mezcla con otros aislados de *H. pylori* externos a los que circulan dentro de la comunidad, disminuyendo la capacidad de adquirir por transferencia horizontal genes de resistencia, pero la condición socioeconómica de los pobladores de esta región, les permite mayor uso de antibióticos, y se cree que el efecto de la presión antibiótica induce en la mayoría de los casos a rearrreglos genéticos dentro de la región variable 3' *cagA* de la bacteria fundadora que produce una alteración no direccionada (pérdida o ganancia) de motivos EPIYA que puede afectar el nivel de fosforilación de la tirosina impactando en sus efectos celulares y llevar a la divergencia de subclones de *H. pylori cagA*-positivo, lo cual en conjunto podría alterar el proceso patogénico de *H. pylori* . Estos cambios genéticos hipotéticamente podrían ser dirigidos por recombinación homóloga intraespecífica permitiendo a la bacteria adaptarse rápidamente a las condiciones cambiantes (145).

7. Comparación de los patrones de variabilidad genómica de los aislados de *H. pylori* entre y dentro de las regiones intragástricas (antro y cuerpo) evaluadas, en pacientes de las poblaciones de Tumaco y Túquerres.

La diversidad genética entre las cepas de *H. pylori* es más marcada que para otra especie de bacterias (146), la principal razón es que la recombinación entre cepas es el más alto que se ha descrito. A pesar de este nivel de recombinación, las comparaciones entre las cepas, basada en el análisis de secuencias, ha demostrado que la agrupación no se destruye por completo (146). Se ha planteado la hipótesis de que los grupos clónales están asociados con la severidad de la enfermedad. Esta diversidad genética permite una fácil adaptación en nuevos hospederos y su persistencia en el contexto mundial. En este estudio realizo la comparación de los patrones de variabilidad genómica de los aislados de *H. pylori* entre y dentro de las regiones gástricas (antro y cuerpo) de los pacientes de las poblaciones de Tumaco y Túquerres, para ello se caracterizó el ADN extraído de aislados de *H.pylori*, de 41 pacientes de Tumaco y de 31 pacientes de Túquerres que cumplieron con los criterios de inclusión planteados para esta investigación y que fueron tenidos en cuenta para el desarrollo del primer objetivo específico, con la técnica de PCR-RAPD, que ha demostrado ser un método confiable para la discriminación de características genómicas bacterianas individuales.

Los análisis de RAPD mostraron una mayor similitud genética entre los aislados de *H. pylori* de los pacientes de la población de Tumaco (0.07) que entre los de Túquerres (0.13), y además, en la población de Túquerres se observa una mayor diversidad en el ACM por la formación de un grupo menos homogéneo. La mayor diversidad entre los aislados de Túquerres puede deberse a que el origen filogeográfico de *H. pylori* que colonizan los habitantes de la región andina es Europeo con características más virulentas y que las personas que viven en la costa del Pacífico Nariñense están infectadas con cepas de origen africano menos virulentas, que presumiblemente, adquirieron cuando sus ancestros las trajeron al nuevo mundo durante el comercio de esclavos, es posible que las cepas de origen europeo, por mecanismos no conocidos, incidieron en la desaparición gradual de las cepas nativas (11).

7.1 Materiales y métodos.

7.1.1. Aislamiento y cultivo de *H. pylori* a partir de biopsias de mucosa gástrica.

Se utilizaron dos fragmentos de mucosa gástrica de antro y uno de cuerpo para el aislamiento primario de *H. pylori* y extracción de ADN, los fragmentos de mucosa gástrica fueron homogenizados completamente en condiciones de esterilidad en 200 µL de solución salina estéril 0.89% con un homogenizador (Kimble-Kontes, Vineland, NJ, USA). El homogenizado fue puesto en platos de agar Columbia (Oxoid Ltd, Hampshire, England) con sangre desfibrinada de cordero al 7% más suplemento selectivo para *Helicobacter pylori* (Dent) que contenía Vancomicina (10 mg/L), Cefsulodina de sodio (5 mg/L), Lactato de Trimetoprim (5 mg/L) y Anfotericina B (5 mg/L) (Oxoid Ltd, Hampshire, England). Los platos de agar fueron incubados en condiciones microaerófilas (6% O₂, 6% CO₂, 88% N₂, con CampyPak Plus (BBL) a 37°C de 4 a 8 días hasta observar pequeñas colonias grises traslúcidas. Las colonias típicas fueron cultivadas y posteriormente identificadas como *H. pylori* por su morfología, tinción de Gram y análisis bioquímico para la actividad oxidasa, catalasa y ureasa.

7.1.2. Extracción de ADN de aislados de *H. pylori*.

El ADN bacteriano fue extraído a partir de cultivos puros de *H. pylori* siguiendo el protocolo de extracción de ADN, previamente descrito para el objetivo específico 1, en el numeral 6.1.5.1 de este documento.

7.1.3. Amplificación del gen estructural *ureA* de *H. pylori*.

La identificación de *H. pylori* se complementó mediante la amplificación por PCR del gen constitutivo *ureA*, que se realizó en un volumen de 25 µl de una solución compuesta por 50 pmol de los cebadores ANDU-1 y ANDU-2, 0,2 mMol de cada dNTP; 1,5 mM de MgCl₂,

0,25 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Promega®) y 1µl de ADN genómico de *H. pylori*, La amplificación se hizo en un termociclador automático (MJ Research PTC-100®), con las condiciones de amplificación descritas anteriormente en materiales y métodos del objetivo 1 en el numeral 6.1.5.2.

7.1.4. PCR – RAPD.

La amplificación por PCR se realizó en reacciones separadas para los siguientes cebadores. 1281 (5'-AACGCGCAAC- 3') y 1254 (5'- CCGCAGCCAA- 3') (66), en las siguientes condiciones de amplificación: dos ciclos de: desnaturalización a 94°C, cinco min; amplificación a 36°C, 1.30 min y extensión a 72°C, cinco min; 40 ciclos de: desnaturalización a 94°C, un min, amplificación a 36°C, durante 1.30 min, extensión a 72°C, dos min; un ciclo final de: extensión a 72°C, 10 min. (Nahar et al. 2008,). Se utilizó buffer de PCR (Tris 10 mM PH 9.0, KCl 50 mM, Triton X100 0.1%) 1X, 3 mM de MgCl₂, (Promega®), 0.2 mM de dNTP (desoxirribonucleosídeos 5'-trifosfato – dATP, dCTP, dGTP y dTTP – Promega®), 25 pmol del primer 1281, 25 pmol del primer 1254, 1µl de ADN genómico bacteriano, 0.2 unidades de enzima *Taq* ADN polimerasa (Promega®), agua milliQ estéril para completar el volumen de 12.5 ml. Se empleó como control negativo una reacción sin ADN, la amplificación se realizó en un termociclador (Swift MiniPro™, Esco). El tamaño de las bandas fue estimado con un marcador de ADN de 100 pb (Fermentas International, Inc). Cada aislado fue probado con los cebadores descritos en similares condiciones, al menos dos veces y sólo las bandas evidentes y reproducibles fueron valoradas.

7.1.5. Electroforesis de los amplificadas.

Todos los amplificados obtenidos en las reacciones de PCR-RAPD, se corrieron en un gel de agarosa (SeaKim®) al 2%, teñida con bromuro de etidio (Invitrogen®) a 0.5 µg/mL, en una cámara de electroforesis (Fotodyne®) a un voltaje de 75V por 40 minutos que fue

proporcionado por una fuente de poder y se visualizaron los amplificados con una lámpara UV (Spectroline Bio-O-Vision®) en un rango de 260/280 nm. El soporte fotográfico se realizó con una cámara digital (Nikon Cool-Pix 990®) con filtro ultravioleta.

7.1.6. Plan de análisis estadístico del objetivo específico 2.

Las imágenes de los amplificados obtenidos por PCR-RAPD, fueron analizadas mediante el programa *Gel-Pro Analyzer 4.5* para Windows (Media Cybernetics, Inc.). Los pesos moleculares de las bandas de patrón único fueron analizadas con este programa y se construyó una matriz de datos binarios con base en la presencia (1) y ausencia (0) de las bandas observadas entre los aislados.

Las relaciones entre los aislamientos fueron establecidas mediante un análisis de conglomerados y un ACM “análisis de correspondencia múltiple”, por medio del cual evaluó las semejanzas entre los individuos en términos de sus perfiles moleculares cuyos resultados se muestran en gráficas tridimensionales, en las cuales, la distancia entre cada par de individuos es proporcional a sus diferencias moleculares. Los dendogramas fueron diseñados con el método de agrupamiento UPGMA y la estimación de las distancias entre cada par o grupo de aislados de *H. pylori* fue calculada con la similaridad de Neid 1973. El análisis de los conglomerados fue evaluado con una prueba exacta de *ji*-cuadrado, con el paquete estadístico SAS, versión 9. La significancia estadística fue aceptada con $p \leq 0.05$.

8. Resultados.

La amplificación por PCR-RAPD dio como resultado de 2 a 10 bandas de ADN bien definidas con cada uno de los cebadores, 1281, 1254, y los pesos en pb de estas bandas variaron entre 100pb y 1000 pb (Figuras 6 y 7).

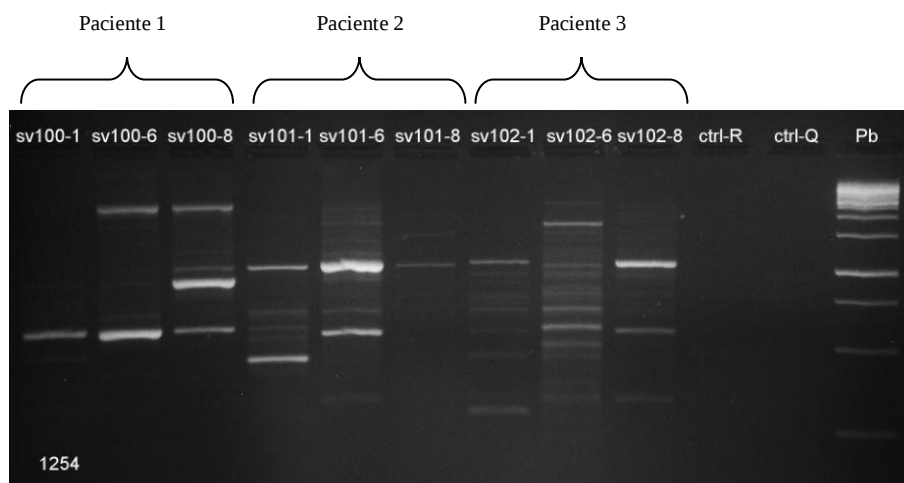


Figura 6. Perfiles representativos del ADN cromosómico de *Helicobacter pylori*, aislado de los pacientes de las poblaciones de estudio obtenido con RAPD-PCR con el primer 1254, los carriles Ctr-R y Ctr-Q son controles de amplificación, y pb marcador de peso.

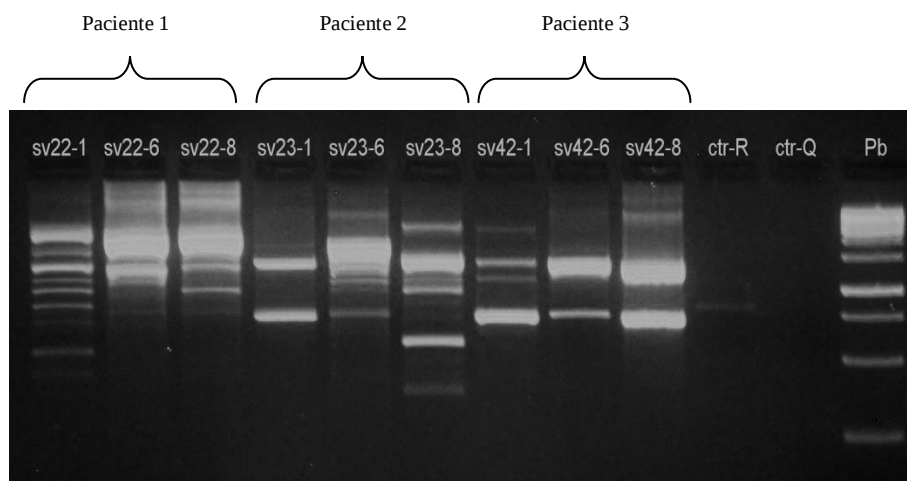


Figura 7. Perfiles representativos del ADN cromosómico de *H. pylori*, con el uso de RAPD-PCR con el primer 1281, ctrl-R y ctrl-Q controles de amplificación y pb marcador de pb.

En los 123 aislados de Tumaco y 93 aislados de Túquerres la RAPD -PCR, reflejo divergencias en las características del ADN bacteriano obtenido. Muchos aislados presentaron variación leve en los patrones de bandeo Ejemplo: bandas que se perdían o bandas que parecían con diferente intensidad o con diferencia leve en los pesos.

El análisis del dendrograma realizado con el método de clasificación UPGMA y el coeficiente de similitud de Neid, mostro que no existe una relación entre los agrupamientos formados y alguna de las características de la población como son sexo, edad y tipo de gastritis aun nivel de similitud de 0.07, en la población de Tumaco, el dendrograma se conformó con 10 grupos. (Figura 8).

El grupo uno conformado por 35 aislamientos, de los cuales 33 fueron de pacientes con gastritis crónica no atrófica y dos de pacientes con gastritis crónica atrófica, el grupo dos estaba compuesto por 47 aislamientos entre los que estaban cuatro de pacientes con gastritis crónica atrófica y 43 de pacientes con gastritis crónica no atrófica; el grupo tres conformado por nueve aislamientos de pacientes con gastritis crónica no atrófica; el grupo cuatro lo conformaban 16 aislamientos, entre los que uno era de un paciente con gastritis crónica atrófica y los restantes fueron de pacientes con gastritis crónica no atrófica, el grupo cinco se conformó por siete aislamientos de pacientes con gastritis no atrófica, el grupo seis se conformó de tres aislamientos de pacientes con gastritis atrófica, el grupo siete también se conformó por tres aislamientos de los que dos fueron de pacientes con gastritis no atrófica y uno de paciente con gastritis atrófica, los grupos 8, 9, 10 se conformaron por un aislamiento de un paciente con gastritis no atrófica.

Mediante el método multivariado “análisis de correspondencia múltiple” ACM, que es una representación tridimensional de la agrupación de los aislados de la población de Tumaco evaluados (Figura 9), se confirma que no existe relación entre los agrupamientos y las características de la población, pero se muestra una baja variación entre los aislados de Tumaco por la formación de un grupo relativamente homogéneo.

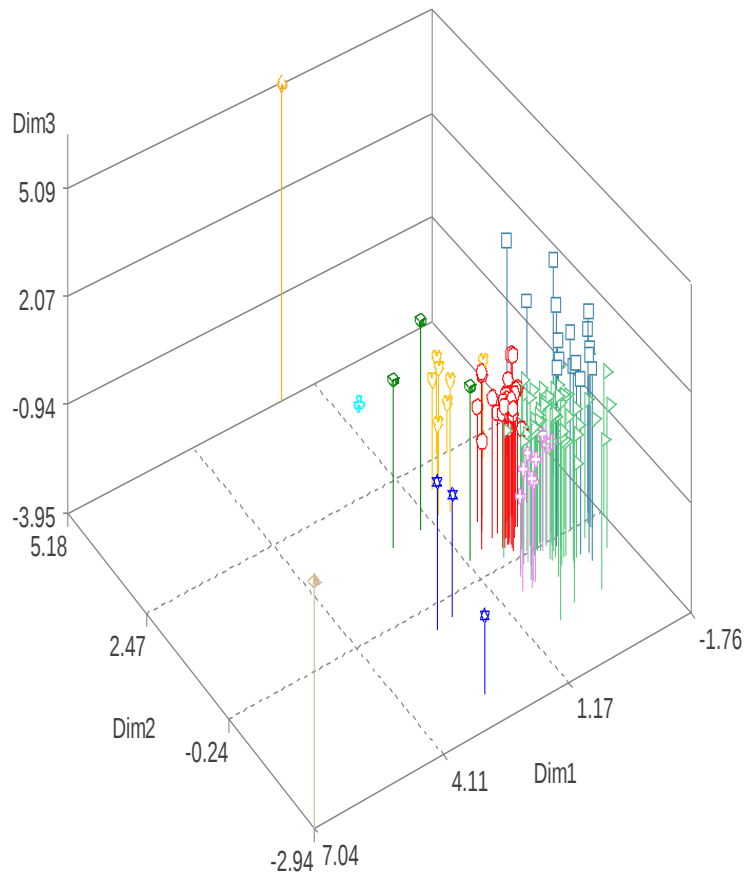


Figura 9. Distribución espacial de las bandas de ADN de los aislamientos de *H. pylori* con base a un ACM (análisis de correspondencia múltiple). Se evaluó las semejanzas entre los individuos en términos de sus perfiles moleculares, los resultados muestran una baja variación entre los 10 grupos de aislamientos por la formación homogénea. En la población de Tumaco

En la población de Túquerres el dendrograma se conformó por siete grupos, y no se encontró relación entre la segregación de los aislados en los grupos y alguna de las características de la población a un nivel aproximado de similitud de 0.13 (Figura 10).

El grupo uno conformado por 30 aislamientos de los cuales 27 fueron de pacientes con gastritis crónica no atrófica y tres de pacientes con gastritis crónica atrófica, el grupo dos se conformó por 16 aislamientos entre los cuales se encontró uno de un paciente con gastritis crónica atrófica y 15 de pacientes con gastritis crónica no atrófica, el grupo tres conformado por 13 aislamientos de pacientes con gastritis crónica no atrófica y 2 de pacientes con gastritis crónica atrófica, el grupo cuatro conformado por tres aislamientos de pacientes con gastritis crónica no atrófica, el grupo cinco se conformó por cinco aislamientos, de los que uno era de un paciente con gastritis crónica atrófica, los grupos seis y siete se conformaron de tres y dos aislamientos de pacientes con gastritis crónica no atrófica respectivamente. Mediante el ACM (Figura 9), se confirma que no existe relación entre los agrupamientos y las características de la población, pero se muestra una mayor variación entre los aislados de Túquerres por la formación de un grupo menos homogéneo. (Figura 11).

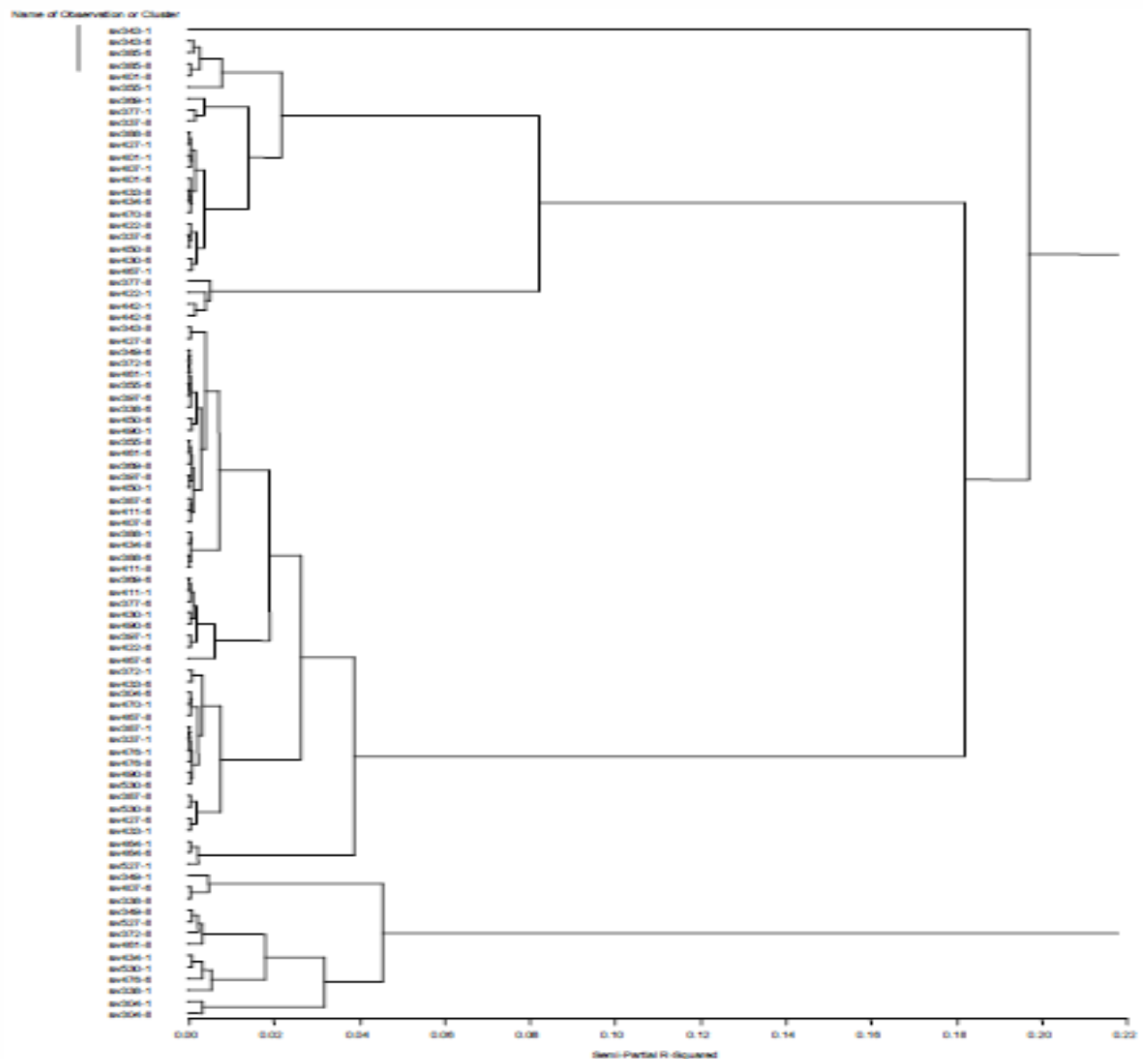


Figura 10. Dendrograma del perfil de RAPDs generado en aislamientos de *H. pylori* obtenidos en la población de Túquerres. El dendrograma se conformó por siete grupos, con un cociente de similitud de 0.13. No existe relación en la segregación de los aislados según sitio anatómico, sexo, edad, tipo de gastritis. El dendogramas fue diseñado con el método de agrupamiento UPGMA y la estimación de las distancias entre cada par o grupo de aislados de *H. pylori* fue calculada con la similitud Neid. El análisis de los conglomerados fue evaluado con una prueba exacta de ji-cuadrado

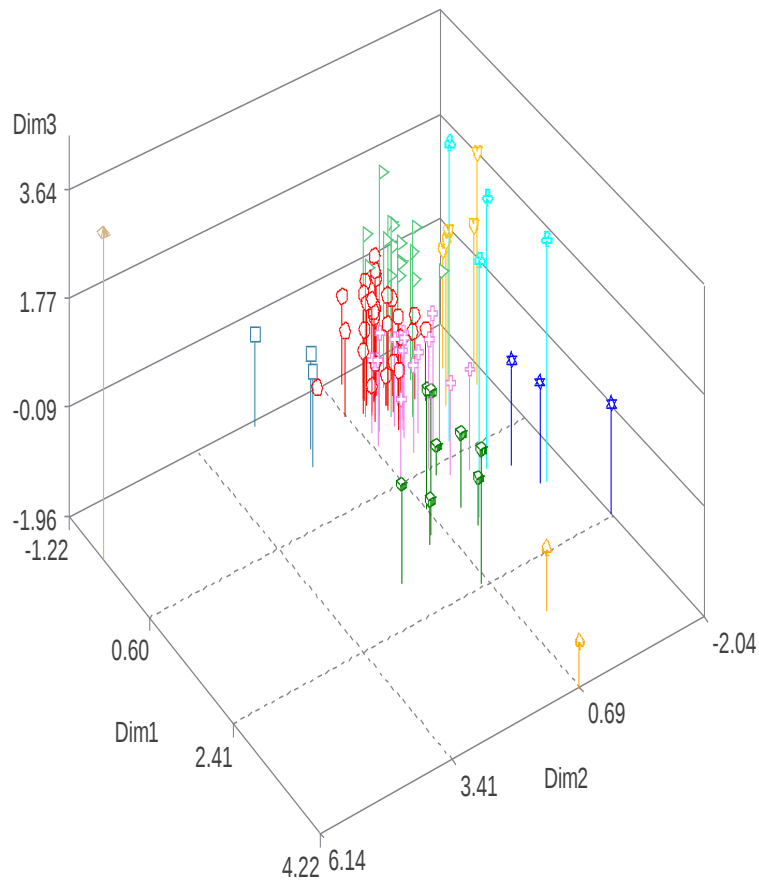


Figura 11. Distribución espacial de las bandas de ADN de los aislamientos de *H. pylori* con base a un ACM (análisis de correspondencia múltiple) en la población de Túquerres. Se evaluó las semejanzas entre los individuos en términos de sus perfiles moleculares. La forma de la figura con menor homogenidad con respecto a la observada en la población de Tumaco, se debe a la mayor variación entre los siete grupos de aislamientos en la población de Túquerres.

9. Discusión.

Los resultados de esta investigación mostraron una mayor similitud genética entre los aislados de *H. pylori* de los pacientes de la población de Tumaco (0.07) que entre los de Túquerres (0.13), y además, en la población de Túquerres se observa una mayor diversidad en el ACM por la formación de un grupo menos homogéneo. La mayor diversidad entre los aislados de Túquerres puede deberse a que el origen filogeográfico de *H. pylori* que colonizan los habitantes de la región andina es Europeo con características más virulentas y que las personas que viven en la costa del Pacífico Nariñense están infectadas con cepas de origen africano menos virulentas, que presumiblemente, adquirieron cuando sus ancestros las trajeron al nuevo mundo durante el comercio de esclavos, es posible que las cepas de origen europeo, por mecanismos no conocidos, incidieron en la desaparición gradual de las cepas nativas (11).

Un estudio previo con esta técnica se ha encontrado que *H. pylori* es genéticamente heterogénea, con variación entre paciente y paciente (147). Esta diversidad genómica la puede reflejar un proceso de acumulación persistente de mutaciones en las cepas como resultado de mutaciones espontáneas o transferencia horizontal e incorporación de ADN. La acumulación persistente de mutaciones, principalmente en los genes de los factores de virulencia, provee de un conjunto de variantes a *H. pylori* que pueden seleccionarse para una óptima colonización de nichos gástricos particulares (13).

Se tienen dos opiniones opuestas a cerca de las características genómicas de las cepas de *H. pylori* que coloniza la mucosa gástrica. Un paciente puede ser colonizado con una sola cepa o con cepas genéticamente predominantes con un mismo ADN genómico, o por diferentes cepas que muestran una alta heterogeneidad genómica debido a las secuencias de ADN encontradas en distintos sitios anatómicos de pacientes (148).

Cuando todos los individuos en una población microbiana son idénticos, el concepto matemático de establecimiento en el hospedero es relativamente simple; sin embargo la variación microbiana y las diferencias entre regiones en la mucosa gástrica de un mismo hospedero con lleva una relación más compleja.

Las respuestas del hospedero a estas señales pueden variar y crear defensas locales contra los microorganismos. Estas variaciones en la respuesta local hacia los microorganismos

representan una presión medioambiental para las cepas de *H. Pylori*, residente en la mucosa gástrica. Dichas presiones selectivas afectarán las proporciones relativas de los individuos en la población o pueden implicar afecciones en alelos de genes importantes y causar el desplazamiento del punto de equilibrio hacia nuevos puntos. La continua tasa de mutación asegura que se mantenga el equilibrio dinámico de dicha población.

Una condición más compleja se presenta cuando dos o más cepas de *H. pylori* colonizan una misma mucosa gástrica, ya que se presenta un espacio para propiciar la recombinación genética que da origen a nuevos genotipos más resistentes a las condiciones ambientales y compiten con sus cepas precursoras. Cada célula bacteriana puede crear señales independientes en el hospedero y desencadenar respuestas puntuales; sin embargo, una potente respuesta localizada del huésped podría afectar a todas las células bacterianas del microambiente. Esta presión selectiva podría influenciar negativamente en el desarrollo de la mayoría de las células bacterianas comunes pero las nuevas células bacterianas recombinadas sobreviven porque son más aptas para sobrevivir en ambientes hostiles, pueden formar estructuras poblacionales mas organizadas y optimizar el uso de recursos del hospedero.

Los resultados de la comparación genotípica por RAPD-PCR entre aislados colectados de diferentes pacientes y del mismo paciente en distintos sitios anatómicos, es un método seguro para el estudio de la variabilidad de las características genómicas

En esta investigación los grados de variabilidad de la diversidad del ADN genómico entre los aislados clínicos obtenidos con los cebadores 1281 y 1254, basados en una clara distinción de los patrones con múltiples diferencias en las bandas revelan que: cuatro de 41 pacientes albergan una única cepa de *H.pylori*, mientras que 37 mostraron huellas heterogéneas de ADN que indican infección por múltiples cepas en diferentes sitios anatómicos en el mismo paciente en la población de Tumaco. En la población de Túquerres 30 pacientes albergan cepas distintas en el mismo paciente.

Cellini *et al.* (146), reportaron resultados similares en una población con diferentes cepas de *H. pylori* que mostraron variación genotípica, en el mismo paciente. La diversidad genética de *H. pylori* puede deberse también a las múltiples especies en todo el mundo. Un

gran número de variantes coexisten o reportan transformación natural y re arreglos genéticos o alteraciones durante el proceso de adaptación y colonización en el hospedero; sin embargo, la evidencia de las mismas puede ser el resultado de la evolución continua, la cual ocurre cuando se infecta el estómago de la persona, ya que pueden ocurrir mutaciones de nucleótidos, escisiones en la isla de patogenicidad *cagA*, transposición e inserción de elementos *cag PAI*, recombinación con ADN de cepas aledañas que no están involucradas en la enfermedad y transmisión horizontal de genes nuevos (149). Aunque no se ha estimado la tasa de mutación de *H. Pylori* durante la colonización aguda o crónica, la gran diversidad entre las especies sugiere que es grande el tamaño en la población. Se propone que esta diversidad también refleja una sorprendente falta de competencia directa entre la mayoría de las cepas, aunque sean residentes en diferentes personas en la misma comunidad. La diversidad se acentúa por la gran separación geográfica de muchos pueblos del mundo y por lo tanto una separación de las cepas de *H. pylori* (150).

La divergencia entre las cepas de *H. pylori* se aumentaría aún más, por las diferencias entre las características de las personas y los rasgos individuales de las cepas (151). Estos rasgos podrían incluir los tipos de antígenos de Lewis para la adhesión de *H. pylori*, la especificidad y la intensidad de la respuesta inmunológica inflamatoria, y la compleja regulación de la secreción de ácido gástrico.

10. Conclusiones.

La prevalencia del marcador de virulencia *cagA* positivo de *H. pylori* fue alto en los aislados de las poblaciones.

- Tumaco: 94%.
- Túquerres: 99%.

La prevalencia del genotipo *cagA* positivo/*s1m1* fue mayor en la población de bajo riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico (Tumaco).

- Tumaco : 80.5%.
- Tuquerres: 65 %.

En Túquerres (mayor riesgo de cáncer gástrico) hubo mayor probabilidad de presentar colonización múltiple.

- Tumaco: 44.7%.
- Túquerres: 55.3%.

Basados en los análisis de los resultados de la PCR – RAPD, se encontró mayor similitud genética en los aislados de *H. pylori*, en la población de bajo riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico.

- Tumaco: 0.07.
- Túquerres: 0.13.

11. Recomendaciones.

Helicobacter pylori es un bacilo Gram-negativo, afecta a sujetos de cualquier edad. El bacilo es capaz de inducir la transformación de las células gástricas epiteliales, en un proceso definido, hasta la generación del Cáncer gástrico. Actualmente, es necesario efectuar varias pruebas de moleculares para establecer el genotipo de la cepa. Debido a esto se recomienda el desarrollo de marcadores moleculares tipo SCAR *Séquense Caracterizad Amplified Regions* (amplificación de regiones de secuencia caracterizada), STS *Sequence-Tagged Sites* (secuencias indicadoras de un sitio específico) y CAPS *Cleaved Amplified Polymorphic Sequence* (secuencia amplificada y clivada polimórfica) que permitan mayor rendimiento operativo.

12. BIBLIOGRAFIA.

1. GLOBOCAN. Incidencia del cáncer gástrico en el mundo para ambos sexos. 2008[En línea]<http://globocan.iarc.fr/map.asp?selection=24050ytile=Stomachysex=0ytype=0ystatistic=2ymap=5ywindow=1ysize=1ycolor=1yscale=0ysubmit=%A0Execute%A0>) citado 12 junio del2012.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Cancer incidence and mortality worldwide: IARC cancer base no. 10. International Agency for Research on Cancer [internet]. 2013 [Citado 2013]. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.
3. GLOBOCAN (B). Incidencia y mortalidad para ambos sexos de los diferentes tipos de canceres para Colombia en el año 2008. 2008[En línea].http://globocan.iarc.fr/bar_pop.asp?selection=41170ytile=Colombiaysex=0ystatistic=0ywindow=1ygrid=1yinfo=1ycolor1=18ycolor1e=ycolor2=9ycolor2e=yorientation=1ysubmit=%A0Execute%A0 citado 12 junio del2012.
4. Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. J Clin Invest. 2004; 113:321-33.
- 5 International Agency for Research on Cancer (IARC) Working Group. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon (France): IARC; 1994. p. 177–240.
6. D'Elia L, Rossi G, Ippolito R, Cappuccio FP, Strazzullo P. Habitual salt intake and risk of gastric cancer: a meta-analysis of prospective studies. Clin Nutr. 2012; 31(4): 489-98.
7. Forman D, Burley VJ. Gastric cancer: global pattern of the disease and an overview of environmental risk factors. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2006; 20(4):633-49.
8. Yang P , Zhou Y, Chen B, Wan HW, Jia GQ, Bai HL, Wu XT. Overweight, obesity and gastric cancer risk: results from a meta-analysis of cohort studies. Eur J Cancer. 2009; 45(16):2867-73.
9. Bravo LE, Cortes A, Carrascal E, Jaramillo R, Garcia LS, Bravo PE, Badel A, BravoPA. *Helicobacter pylori*: patología y prevalencia en biopsias gástricas en colombia. Colom med. 2003; 34:124-31.
10. Camargo MC, Lazcano-Ponce E, Torres J, Velasco-Mondragon E, Quiterio M, Pelayo C. Determinants of *helicobacter pylori* seroprevalence in mexican adolescents. *Helicobacter*. 2004; 9(2): 106–14.

11. Pazos A, Ancestros filogeográficos, susceptibilidad antimicrobial y marcadores de virulencia de *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis crónica. [Tesis doctoral]. Universidad del valle. 2012.
12. Tomasini ML, Zanussi S, Sozzi M, Tedeschi R, Basaglia G, Paoli P. Heterogeneity of *cag* genotypes in *helicobacter pylori* isolates from human biopsy specimens. J Clin Microbiol. 2003; 976-980.
13. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *helicobacter pylori*. Association of specific vaca types with cytotoxin production and peptic ulceration. J Biol Chem. 1995; 270(30):17771-7.
14. Domingo D, Alarcon T, Vega AE, Garcia JA, Martinez MJ, Lopez M. Microbiological factors that influence the eradications of *helicobacter pylori* in adults and children. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2002; 20(9):431-34.
15. Atherton JC, Blaser MJ. Coadaptation of *helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. J Clin Invest. 2009; 119(9):2475-87.
16. Bayerdorffer E, Neubauer A, Rudolph B, Thiede C, Lehn N, Eidt S, Stolte M.. Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *helicobacter pylori* infection. Malt lymphoma study group. Lancet. 1995; 345(8965):1591-4.
17. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, *et al*. Current concepts in the management of *helicobacter pylori* infection: Gut. 2007; 56(6):772-81.
18. Ende S, Van Doorn LJ, Rooijackers S, Feller M, Tytgat G, Dankert J. Clarithromycin susceptible and resistant *helicobacter pylori* isolates with identical randomly amplified polymorphic ADN-pcr genotypes cultured from single gastric biopsy specimens prior to antibiotic therapy. J Clin Microbial. 2001; 39(7): 2648-51.
19. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Zavala D, Fontham E, Zarama G. Gastric precancerous process in a high risk population. Cancer res .1990; 50:4737-40.
20. Asaka M, Takeda H, Sugiyama T, Kato M. What role does *helicobacter pylori* play in gastric cancer?. Gastroenterology. 1997; 113:S56-60.
21. Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Helicobacter pylori*: Physiology and Genetics. ASM Press; 2001. Chapter 38.
22. Farthing MJ. *Helicobacter pylori* infection: an overview. Br Med Bull.1998; 54(1):1-6.

23. Stone MA, Patel H, Panja KK, Barnett DB, Mayberry JF. Results of helicobacter pylori screening and eradication in a multi-ethnic community in central england. *Eur J Gastroenterology*. 1998; 10: 957-62.
24. Vela FF, Vitor JMB. Transmission pathway of helicobacter pylori: does food play a role in rural and urban areas?. *Int J Food Microbiol*. 2010; 13(8): 1–12.
25. Dowsett S, Archilal A, Segretov A, Gonzalezc R, Silva A, Vastolak A, Bartizekr D, Kowolik MJ. Helicobacter pylori infection in indigenous families of central america: sero status and oral and fingernail carriage. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 2456-60
26. Ahmed S, Khan A, Ahmed I. Prevalence study to elucidate the transmission pathways of helicobacter pylori at oral and gastro duodenal sites of a south indian population. *Med J*. 2006; 47(4): 291-6.
27. Graham DY, Alpert LC, Smith JL, Yoshimura HH. Iatrogenic campylobacter-pylori infection is a cause of epidemic achlorhydria. *Am J Gastroenterology*. 1988; 83:974–80
28. Cortez AB, FigueroaMM, Bravo LE, Mancilla L, Pazos A, Bustamante JA, Fernandez FF, Matta AJ. Informe a Colciencias. 2012; 1106-493-26237
29. Amieva MR, El-Omar EL. Host bacterial interactions infection. *Gastroenterology*. 2008; 134: 306–23.
30. Mégraud F. Diagnosis of helicobacter pylori. *Clin Gastroenterology*. 1995; 9: 507–18.
31. Arachchi HSJ, Kalra V, Lal B, Bhatia V, Baba CS, Chakravarthy S, *et al*. Prevalence of duodenal ulcer-promoting gene (dupa) of helicobacter pylori in patients with duodenal ulcer in north indian population. *Helicobacter*. 2007;12:591-7.
32. Tomb J, White O, Kerlavage A, Clayton R, Sutton G. The complete genome sequence of the gastric pathogen *H. pylori*. *Nature*. 1997; 388:539-47.
33. Levine SM, Lin EA, Emara W, Kang J, Dibenedetto M, Ando T, *et al*. Plastic cells and populations: ADN substrate characteristics in helicobacter pylori transformation define a flexible but conservative system for genomic variation. *Faseb J*. 2007; 21:3458-67.
34. Blaser MJ, Berg DE. Helicobacter pylori genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest*. 2001; 107:767-73.
35. Suerbaum S, Josenhans C. Helicobacter pylori evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nat Rev Microbiol*. 2007; 5:441-52.

36. Argent RH, Thomas RJ, Aviles-Jimenez F, Letley DP, Limb MC, El-Omar EM, *et al.* Toxigenic *H. pylori* infection precedes gastric hypochlorhydria in cancer relatives, and *H. pylori* virulence evolves in these families. *Clin Cancer Res.* 2008; 14:2227-35.
37. Argent RH, Hale JL, El-Omar EM, Atherton JC. Differences in helicobacter pylori cag A tyrosine phosphorylation motif patterns between western and east asian strains, and influences on interleukin-8 secretion. *J Med Microbiol.* 2008; 57:1062-67.
38. Hatakeyama M, Higashi H. Helicobacter pylori cag A: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Science.* 2005; 96:835-43.
39. Bauerfeind P, Garner R, Dunn BE, Lmoblely H. Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low ph, *Gut,* 1997; 40: 25-30.
40. Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A, Tompkins LS, Nelson WJ, Falkow S. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* cag A. *Science.* 2003; 300:1430-4.
41. Boyanova L, Nikolov R, Lazarova E, Gergova G, Katsarov N, Kamburov V, *et al.* Antibacterial resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from bulgarian children and adult patients over 9 years. *J Med Microbiol.* 2006; 55:65-8.
42. Hussein NR. Helicobacter pylori and gastric cancer in the middle east: a new enigma?. *World J Gastroenterol.* 2010; 16 (26):326-34.
43. Wang TC, Dangler CA, Chen D, Goldenring JR, Koh T, Raychowdhury R, *et al.* Synergistic interaction between hypergastrinemia and *Helicobacter* infection in a mouse model of gastric cancer. *Gastroenterology.* 2000; 118:36-47.
44. atwood kc. bacteria, ulcers, and ostracism? h. pylori and the making of a myth. skeptical inquirer. 2004;28. disponible en la dirección web: http://www.csicop.org/si/show/bacteria_ulcers_and_ostracism_h.pylori_and_the_making_of_a_myth/
45. Mimuro H, Suzuki T, Tanaka J, Asahi M, Haas R, Sasakawa C. Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* cag A protein activities. *Mol Cell.* 2002; 10:745-55.
46. Bravo LE, Doorn LJ, Realpe JL, Correa P. Virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori*: do they explain the african enigma?. *Am J Gastroenterol;* 2002; 97(11):2839-42.
47. Fox JG, Correa P, Taylor NS, Thompson N, Fontham E, Janney F, *et al.* High prevalence and persistence of cytotoxin18 positive helicobacter pylori strains in a population with high prevalence of atrophic gástritis. *Am J Gastroenterol.* 1992; 87(11):1554-60.

48. Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastric diseases. *Bmj*.1998; 316:1507–10.
49. Cover T, Glupczynski Y, Lage A, Burette A, Tummuru MR, Perez-Perez G, *et al*. Serologic detection of infection with *cag A*+ *Helicobacter pylori* strains. *J Clin Microbiol*. 1995; 33:1496-500.
50. Blaser M, Perez-Perez G, Kleanthous H, Cover T, Peek R, Chyou P, *et al*. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cag A* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res*. 1995;55: 2111-5.
51. Schmitt W, Haas R. Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the Iga protease type of exported protein. *Mol Microbiol*. 1994; 12:307-19.
52. Hou P, Tu ZX, Xu GM, Gong YF, Ji XH, Li ZS. *Helicobacter pylori* vac A genotypes and *cag A* status and their relationship to associated diseases. *World J Gastroenterol*. 2000; 6:605-7.
53. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Mégraud F, Pena S, Midolo P, Queiroz DMM, *et al*. Geographic distribution of vac A allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol*. 1999; 116:823-30.
54. Young C, Kwak M, Gutierrez O, Graham D, Yamaoka D. Comparison of genotyping *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens and genotyping from bacterial cultures. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(7):3336–8.b.
55. Van Doorn LJ, Figueiredo C, Cannar W, Pena S, Midolo P, Atherton J, *et al*. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* vac A. *J Clin Microbiol*. 1998; 36:2597-603.
56. Fischer W, Püls J, Buhrdorf R, Gebert B, Odenbreit S, Haas R. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island: essential genes for *cag A* translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol Microbiol*. 2001; 42:1337-48.
57. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, *et al*. *Cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I specific and disease associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci*. 1996; 93:14648-53.
58. Rudi J, Kolb C, Maiwald M, Kuck D, Sieg A, Galle P, *et al*. Diversity of *Helicobacter pylori* vac A and *cag A* genes and relationship to vac A and *cag A* protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. *J Clin Microbiol*. 1998;36:944-8.
59. Covacci A, Telford JL, Del GG, Parsonnet J, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*. 1999; 284:1328–33.

60. Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelman H. Risk for gastric cancer in people with cag A positive or cag A negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut*. 1997; 40: 297-301.
61. Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, Telford JL, Figura N, Rappuoli R, *et al.* Analysis of expression of cag A and vac A virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that cag A is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun*. 1995; 63:94-98.
62. Maeda S, Yoshida H, Ikenoue T, Ogura K, Kato N, Shiratori Y, *et al.* structure of cag pathogenicity island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates. *Gut*. 1999; 44:336-41.
63. Tummuru MKR, Cover TL, Blaser MJ. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun*. 1993; 51:1799-809.
64. Kuipers EJ, Perez-Perez GI, Meuwissen SG, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and atrophic gastritis: importance of the cag A status. *J Natl Cancer Inst*. 1995; 87:1777-80.
65. Segal ED, Cha J, Lo J, Falkow S, Tompkins LS. Altered states: involvement of phosphorylated cag A in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci Usa*. 1999; 96:14559-64.
66. Correa P, Piazuelo MB. Natural history of *Helicobacter pylori* infection. *Digest Liver Dis*. 2008; 40:490-6.
67. Selbach M, Moese S, Hauck CR, Meyer TF, Backert S. Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* cag A protein in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 2002; 277:6775-8.
68. Stein M, Bagnoli F, Halenbeck R, Rappuoli R, Fantl WJ, Covacci A. C-src/lyn kinases activate *Helicobacter pylori* cag A through tyrosine phosphorylation of the epiya motifs. *Mol Microbiol*. 2002; 43:971-80.
69. Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T, *et al.* Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor cag A is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci Usa*. 2002; 99:14428-33.
70. Neel BG, Gu H, Pao L. The 'shp'ing news: sh2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci*. 2003; 28:284-93.
71. Roovers K, Assoian RK. Integrating the map kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *Bioessays*. 2000; 22:818-26.

72. Tsutsumi R, Higashi H, Higuchi M, Okada M, Hatakeyama M. Attenuation of *Helicobacter pylori* cag A shp2 signaling by interaction between cag A and c-terminal src kinase. J Biol Chem. 2003; 278:3664–70.
73. Brandt S, Kwok T, Hartig R, Konig W, Backert S. Nf-b activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* cag A protein. Proc Natl Acad Sci Usa. 2005; 102:9300–5.
74. Mitsushige S, Yamaoka Y. Virulence factor genotypes of *Helicobacter pylori* affect cure rates of eradication therapy. Arch Immunol Ther Exp. 2009; 57:45- 56.
75. Ji X, Fernández T, Burrioni D, Pagliaccia C, Atherton JC, Reytrat JM, *et al.* Cell specificity of *Helicobacter pylori* cytotoxin is determined by a short region in the polymorphic mid region. Infect Immun. 2000; 68:3754-7.
76. Torres VJ, McClain MS, Cover L. Interactions between p-33 and p-55 domains of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (vac A). J Biol Chem. 2004; 279:2324-31
77. Fujikawa A, Shirasaka D, Yamamoto S, Ota H, Yahiro K, Fukada M, *et al.* Mice deficient in protein tyrosine phosphatase receptor type z are resistant to gastric ulcer induction by vac A of *Helicobacter pylori*. Nat Genet. 2003; 33:375-81.
78. De Bernard M, Burrioni D, Papini E, Rappuoli R, Telford J, Montecucco C. Identification of the *Helicobacter pylori* vac A toxin domain active in the cell cytosol. Infect Immun. 1998; 66:6014-6.
79. Czajkowsky Dm, Iwamoto H, Cover TL, Shao ZF. The vacuolating toxin from *Helicobacter pylori* forms hexameric pores in lipid bilayers at low ph. Proc Natl Acad Sci Usa. 1999; 96:2001-6.
80. Molinari M, Salio M, Galli C, Norais N, Rappuoli R, Lanzavecchia A, *et al.* Selective inhibition of ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin vac A. J Exp Med. 1998; 187:135-40.
81. Papini E, Satin B, Norais N, Bernard M, Telford JL, Rappuoli R, *et al.* Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. J Clin Investig. 1998;102:813-20.
82. Galmiche A, Rassow J, Doye A, Cagnol S, Chambard JC, Contamin S, *et al.* The n-terminal 34 kda fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. Embo J. 2000; 19:6361-70.
83. Cover TL, Krishna U, Israel DA, Peek RM jr. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. Cancer Res. 2003; 63:951-7.

84. Rudnicka A, Chimela M. Inflammation and host immune response in *Helicobacter pylori* infections. *Curr Trends Immunol*. 2004; 6:1-19.
85. Atherton J. The clinical relevance of strain types of *Helicobacter pylori*. *Gut*. 1997; 40:701-3.
86. Pagliaccia C, De Bernard M, Lupetti P, Ji X, Burroni D, Cover TL, *et al*. The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. *Proc Natl Acad Sci Usa*. 1998; 95:10212-7.
87. Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Hosseini ME, *et al*. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology*. 2007; 133:926-6.
88. Van Der Hulst RW, Weel JF, Verheul SB. Treatment of *Helicobacter pylori* infection with low or high dose omeprazole combined with amoxycillin and the effect of early retreatment. *Aliment Pharmacol Ther*. 1996; 10:165–71.
89. De Gusmao VR, Nogueira Mendes E, De Magalhaes Queiroz DM, Aguiar Rocha G, Camargos Rocha AM, Ramadan Ashour AA, *et al*. Vac A genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from children with and without duodenal ulcer in brazil. *J Clin Microbiol*. 2000; 38:2853-7.
90. Pan ZJ, Berg DE, Hulst WV, Su WW, Raudonikiene A, Xiao SD, *et al*. Prevalence of vacuolating cytotoxin production and distribution of distinct vac A alleles in *Helicobacter pylori* from china. *J Infect Dis*. 1998; 178:220-6
91. Letley DP, Atherton JC. Natural diversity in the n terminus of the mature vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* determines cytotoxin activity. *J Bacteriol*. 2000; 182:3278-80.
92. McClain MS, Cao P, Iwamoto H, Vinion-Dubiel AD, Sszabo GZ, Shao Z, *et al*. A 12-amino-acid segment, present in type s2 but not type s1 *Helicobacter pylori* vac A proteins, abolishes cytotoxin activity and alters membrane channel formation. *J Bacteriol*. 2001; 183:6499-508.
93. Atherton JC, Peek RM, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. *Gastroenterology*. 1997; 112:92-9.
94. Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, *et al*. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 1999; 397:176-180.
95. Letley DP, Rhead JL, Twells RJ, Dove B, Atherton JC. Determinants of nontoxicity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem*. 2003; 278:26734-41.

96. Vamaoka Y. Roles of the plasticity regions of *Helicobacter pylori* in gastroduodenal pathogenesis. J Med Microbiol. 2008; 57:545-53.
97. Moss SF, Malfertheiner P. Helicobacter and gastric malignancies. Helicobacter. 2007; 12:23-30.
98. Go MF, Cissell L, Grayham DY. Failure to confirm association of vac A gene mosaicism with duodenal ulcer disease. J Gastroenterol, 1998; 33:132-6.
99. Girardin SE, Travassos LH, Hervé M, Blanot D, Boneca IG, Philpott DJ, *et al.* Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by nod1 and nod2. J Biol Chem. 2003; 278(43):41702-8.
100. Ma J, Chen T, Mandelin J, Ceponis A, Miller NE, Hukkanen M, *et al.* Regulation of macrophage activation. Cell Mol Life Sci. 2003; 60(11):2334-46.
101. Malaty HM. Epidemiology of *Helicobacter pylori*. Best Pract Res Clin Gastroenterology. 2007; 21:205-14.
102. Correa P, Schneider BG. Etiology of gastric cancer: what is new?. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005; 14:1180-6.
103. Ghary MT, Sundina N, Bravo LE, Bravo JC, Piazuolo MB, Camargo MC, *et al.* Intestinal helminthiasis in colombian children promotes a th2 response to *Helicobacter pylori*: possible implications for gastric carcinogenesis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005; 14(6):1464-9.
104. Ernst PB, Peura DA, Crowe SE. The translation of *Helicobacter pylori* basic research to patient care. Gastroenterology. 2006; 130(1):188-206.
105. Wu MS, Chen CJ, Lin JT. Host environment interactions: their impact on progression from gastric inflammation to carcinogenesis and on development to new approaches to prevent and treat gastric cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005; 14(8):1878-82
106. López-Brea M. La infección por *Helicobacter pylori*: premio nobel de medicina. Rev Esp Quimioterap. 2005; 18:271-272.
107. Ahmed KS, Khan AA, Ahmed T, Tiwari SK. Impact of household hygiene and water source on prevalence and transmission of *Helicobacter pylori*. Singapore Med J. 2007; 48:543-9.
108. Marshall B, Goodwin C. Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. Inf J Syst Bacteriol. 1987; 37:68.

109. Talarico S, Gold BD, Fero J, Thompson DT, Guarner J, Czinn S, Salama NR. Pediatric *Helicobacter pylori* isolates display distinct gene coding capacities and virulence gene marker profiles. J Clin Microbiol. 2009; 6:1680-8.
110. Parra T, Carballo F. Reservorios y vías de transmisión de la infección por *Helicobacter pylori*. Anales Sis San. 1998; 21:19-26
111. Vallejos C, Ceda O, Valenzuela M, Toledo H. Aantimicrobial resistance of *Helicobacter pylori*: clinical and molecular aspects. Rev Med Chile. 2003; 131;1313-20.
112. Linz B, Balloux F, Moodley Y, *et al.* An african origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. Nature. 2007; 445:915-8.
113. Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, *et al.* Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. Science. 2003; 299:1582- 5.
114. McClain MS, Shaffer CL, Israel DA, Peek RM, Cover TL. Genome sequence analysis of *Helicobacter pylori* strains associated with gastric ulceration and gastric cancer. BMC Genomics. 2009; 10:3.
115. Pajares Garcia jm, Pajares-Villarrolla R. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance. 2007. Rev Esp Enferm Dig. 2007; 99:63-70.
116. Torres J, Leal-Herrera Y, Perez-Perez G, Gomez A, Camorlinga-Ponce M, Cedillo-Rivera R, *et al.* A community-based sero epidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. J Infect Dis. 1998; 178,1089–94.
117. Calva-Rodríguez R, Luna-Alcántara JJ, Lagunes-Yannelli B, Rivera-Domínguez E, Santos-Marcial E. Prevalence and risk factors of *Helicobacter pylori* infection in three populations of children in Puebla Mexico. Rev Gastroenterol Mex. 2006; 71(4): 440-5.
118. Rothenbacher D, Bode G, Peschke F, Berg G, Adler G, Brenner H. Active infection with *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population of middle aged to elderly people. Epidemiol Infect. 1998; 120:297-303.
119. Suerbaum S, Josenhans C. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. Nat Rev Microbiol. 2007;5(6):441-52.
120. Peek RM jr, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. Nat Rev Cancer. 2002;2(1):28-37.
121. Atherton JC, Blaser MJ. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. J Clin Invest. 2009;119(9):2475-87

122. Monack DM, Mueller A, Falkow S. Persistent bacterial infections: the interface of the pathogen and the host immune system. *Nat Rev Micro*. 2004;2(9):747-65.
123. Townsend KM, Dawkins HJ. Field alternation gel electrophoresis status quo. *J Chromatogr*. 1993; 618:223-49.
124. Neale DB, Williams CG. Restriction fragment length polymorphism mapping in conifers and applications to forest genetics and tree improvement. *Can J Res*. 1991; 21:545-54.
125. Deng GR. A sensitive non-radioactive pcr-rflp analysis for detecting point mutations at 12th codon of oncogene c-ha-ras in ADNs of gastric cancer. *Nucleic Acids Res*. 1988; 16:6231.
126. Savelkoul P, Aarts H J, Dijkshoorn L, Duim B, Otsen M, Rademaker J, Schouls L, and Lenstra J. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *J Clin Microbiol*. 1999;37:3083-3091
127. Mueller UG, Wolfenbarger LL. Aflp genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol Evol*. 1999; 14:389-94.
128. Soll DR, Lockhart SR, Pujol C. Laboratory procedures for epidemiological analysis. *american society for microbiology*. 2003; 139-161.
129. Figueroa G, Troncoso M, Toledo MS, Faundez G, Acuna R. Prevalence of serum antibodies to *Helicobacter pylori* vac A and cag A gastric disease in chile. *J Med Microbiol*. 2002; 51(4):300-4.
130. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P, The participants in the international workshop on the histopathology of gástritis. Classification and grading of gástritis: the updated sydney system. *Am J Surg Pathol*. 1996; 20(10):1161-81
131. Pruszkowski J, Ziolkowski G, Gonciarz Z, Besser P. Isolation of *Helicobacter pylori* from gastric mucosa depending on the growth medium used. *Med Dosw Microbiol*. 1994; 46(4):305-11.
132. Ho SA, Hoyle JA, Lewis FA, Secker AD, Cross D, Mapstone NP, *et al*. Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. *J Clin Microbiol*. 1991; 29:2543-49.
133. Sanz-Pelaez O, Santana-Rodriguez E, Maroto AA, Carranza-Rodriguez C, Pisos-Alamo E, Perez-Arellano JL. *Helicobacter pylori* and cag A seroprevalence in sub-saharian immigrants recently scand. *J Infect Dis*. 2008; 40:756-8.

134. Figueiredo C, Quint W, Nouhan N, van den Munckhof H, Herbrink P, Scherpenisse J, de Boer W, Schneeberger P, Perez-Perez G, Blaser MJ, van Doorn LJ. Assessment of *Helicobacter pylori* *vacA* and *cagA* genotypes and host serological response. J Clin Microbiol 2001;39: 1339-1344.
135. Chen XJ, Yan J, Shen YF. Dominant *cagA/vacA* genotypes and coinfection frequency of *H. pylori* in peptic ulcer or chronic gastritis patients in Zhejiang Province and correlations among different genotypes, coinfection and severity of the diseases. J Chin Med .2005; 118: 460-467.
136. García A, Barra R, Delgado C, Kawaguchi F, Trabal N, Montenegro S, González C. Genotyping of clinical isolates of *Helicobacter pylori* by *cagA*, *vacA* and *babA2* virulence associated genes. First detection of a *babA2* positive strain in Chilean patients. Rev Med Chil. 2006; 134: 981-988.
137. Karita M, Blaser MJ. Acid tolerance response in *Helicobacter pylori* and differences between *cagA*⁺ and *cagA*⁻ strains. J Infect Dis. 1998; 178:213-9.
138. Ogura K, Maeda S, Nakao M, Watanabe T, Tada M, Kyutoku T, *et al.* Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in mongolian gerbil. J Exp Med. 2000; 192:1601-10.
139. Sicinschi LA, Correa P, Peek RM, Camargo MC, Delgado A, Piazuelo MB, *et al.* *Helicobacter pylori* genotyping and sequencing using paraffin-embedded biopsies from residents of colombian areas with contrasting gastric cancer risks. Helicobacter. 2008; 13(2):135-45.
140. Ashour AA, Magalhaes PP, Mendes EN, Collares GB, de Gusmao UV, Queiroz DM, Nogueira AM, Rocha GA, and de Oliveira CA. Distribution of *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian adult patients with gastritis, duodenal ulcer or gastric carcinoma. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2002; 33:173–178.
141. Figueiredo C L, Van Doorn J, Nogueira C, Soares J, Pinho C, Figueira P, Quint G, and Carneiro F. *Helicobacter pylori* genotypes are associated with clinical outcome in Portuguese patients and show a high prevalence of infections with multiple strains. Scand. J Gastroenterol. 2001; 36:128–135.
142. Kim SY, Woo CW, Lee YM, Son BR, Kim JW, Chae HB, Youn SJ, and Park SM.. Genotyping *CagA*, *VacA* subtype, *IceA1*, and *BabA* of *Helicobacter pylori* isolates from Korean patients, and their association with gastroduodenal diseases. J Korean Med. Sci.2001;16:579–584.
143. Morales-Espinosa RG, Gonzalez-Valencia G, Ponce de Leon S, Cravioto A, Atherton JC, and Lopez-Vidal Y. Colonization of Mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strains with different *vacA* and *cagA* genotypes. J Clin Microbiol.1999; 37:3001–3004.

144. Van Doorn L J, Figueiredo C, Rossau R, Jannes G, van Asbroek M, Sousa JC, Carneiro F, and Quint WG. Typing of *Helicobacter pylori* *vacA* gene and detection of *cagA* gene by PCR and reverse hybridization. J Clin Microbiol. 1998; 36:1271–1276.
145. Bustamante-Rengifo JA, Matta AJ, Pazos A, Bravo LE. *In vitro* effect of amoxicillin and clarithromycin on the 3' region of *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates Gastroenterol. latinom. 2012; 23(4):S35-s37.
146. Cellini L, Grande R, Di Campli E, Di Bartolomeo S, Capodicasa S, Marzio L. Analysis of genetic variability, antimicrobial susceptibility and virulence markers in *Helicobacter pylori* identified in central Italy. J Gastroenterol. 2006; 41(3):280-7.
147. Go MF, Chan KY, Versalovic J, Koeuth T, Graham DY, Lupski JR. Cluster analysis of *Helicobacter pylori* genomic ADN fingerprints suggests gastroduodenal disease – specific associations. J Gastroenterol. 1995; 30:640-646.
148. Makristathis A, Barousch W, Pasching E, Binder C, Kuderna C, Apfalter P, *et al.* two enzyme immunoassays and pcr for detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens from pediatric patients before and after eradication therapy. J Clin Microbiol. 2000; 38:3710-4.
149. Achtman M. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. Mol Microbiol. 1999; 32:459–70.
150. Kersulyte D. Differences in genotypes of *Helicobacter pylori* from different human populations. J Bacteriol. 2000; 182:3210–8.
151. Dubois A. Individual host specificity of *Helicobacter pylori* strains and host responses in experimentally challenged non-human primates. Gastroenterology. 1999; 116:90–6.

13. Anexos.

13.1. Anexo 1 . Cebadores y secuencias para genotipificación de *H. pylori*.

Gen y región de ADN amplificada	Secuencia del cebador (5'→ 3')	Nombre del cebador	Tamaño del amplicon. pb
<i>cagA</i> (+)	TTGACCAACAACCACAAACCGAAG CTTCCCTTAATTGCGAGATTCC	CagAF (+) CagAF (-)	183
<i>cagA</i> (-) <i>Empty site</i>	AAGAGAGAGTGGTGCGAT TCATGCGAGCGGCGATGTG	ES-F (+) ES-R (-)	106
<i>vacA</i> s1/s2	ATGGAAATACAACAAACACAC CTGCTTGAATGCGCCAAAC	VA1F VA1R	259/286
<i>vacA</i> s1a	GTCAGCATCACACCGCAAC CTGCTTGAATGCGCCAAAC	SS1-F VA1-R	190
<i>vacA</i> s1b	AGCGCCATACCGCAAGAG CTGCTTGAATGCGCCAAAC	SS3-F VA1-R	187
<i>vacA</i> m1/m2	CACAGCCACTTTCAATAACGA CGTCAAAATAATTCCAAGGG	HPMGF HPMGR	401/476
<i>ureA</i>	AAGACATCACTATCAACG CCCGCTCGCAATGTCTAA	ANDU-1 ANDU-2	167

13.2. Anexo 2. Aval del comité de ética proyecto tesis de maestría

Comité Institucional de Revisión de Ética Humana Facultad de Salud		
ACTA DE APROBACIÓN N° 04-012		
Proyecto: COLONIZACIÓN MULTIPLE DE HELICOBACTER PYLORI EN MUCOSA GÁSTRICA DE PACIENTES CON GASTRITIS CRÓNICA PROCEDENTES DE DOS POBLACIONES COLOMBIANAS CON CONTRASTE EN EL RIESGO DE DESARROLLAR CÁNCER GÁSTRICO, TUQUERRES Y TUMACO (NARIÑO).		
Sometido por: LUIS EDUARDO BRAVO/ANDRES J. MATTÁ/ALVARO PAZOS M./JAVIER A. BUSTAMANTE R.		
Código Interno: 022-012	Fecha en que fue sometido: 16 02 2012	
El Consejo de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, ha establecido el Comité Institucional de Revisión de Ética Humana (CIRESH), el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión en 2002, y el Código de Regulaciones Federales, título 45, parte 46, para la protección de sujetos humanos, del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos 2000.		
Este Comité certifica que:		
1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:		
☒ Resumen del proyecto	☒ Protocolo de investigación	
☐ Formato de consentimiento informado	☒ Instrumento de recolección de datos	
☐ Folleto del investigador (si aplica)	☒ Cartas de las instituciones participantes	
☐ Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)		
2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité.		
3. Según las categorías de riesgo establecidas en el artículo 11 de la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, el presente estudio tiene la siguiente Clasificación de Riesgo:		
☒ SIN RIESGO	☐ RIESGO MENOR	☐ RIESGO MAYOR DEL MÍNIMO
4. Que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas.		
5. La forma de obtener el consentimiento informado de los participantes en el estudio es adecuada.		
6. Este proyecto será revisado nuevamente en la próxima reunión plenaria del Comité, sin embargo, el Comité puede ser convocado a solicitud de algún miembro del Comité o de las directivas institucionales para revisar cualquier asunto relacionado con los derechos y el bienestar de los sujetos involucrados en este estudio.		
7. Informará inmediatamente a las directivas institucionales:		
a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.		
b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.		
8. Informará inmediatamente a las directivas institucionales toda información que reciba acerca de:		
a. Lesiones a sujetos humanos.		
Calle 4B 36-00 edificio Decanato Teléfono: 5185677 email: eticasalud@univalle.edu.co		



- Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
- b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por el Comité.
9. El presente proyecto ha sido aprobado por un periodo de **1 año** a partir de la fecha de aprobación. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.
10. El investigador principal deberá informar al Comité:
- a. Cualquier cambio que se proponga introducir en este proyecto. Estos cambios no podrán iniciarse sin la revisión y aprobación del Comité excepto cuando sean necesarios para eliminar peligros inminentes para los sujetos.
 - b. Cualquier problema imprevisto que involucre riesgos para los sujetos u otros.
 - c. Cualquier evento adverso serio dentro de las primeras 24 horas de ocurrido, al secretario(a) y al presidente (Anexo D).
 - d. Cualquier conocimiento nuevo respecto al estudio, que pueda afectar la tasa riesgo/beneficio para los sujetos participantes.
 - e. cualquier decisión tomada por otros comités de ética.
 - f. La terminación prematura o suspensión del proyecto explicando la razón para esto.
 - g. El investigador principal deberá presentar un informe al final del año de aprobación. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.

Firma:

Laure E. Piedrahita S.

Fecha:

16

03

2012

Nombre:

LAURE E. PIEDRAHITA S.

Capacidad representativa:

PRESIDENTA

Teléfono:

5165677

CERTIFICACIÓN DE LA FACULTAD DE SALUD DE LA UNIVERSIDAD DEL VALLE

Por medio de la presente, certifico que la Facultad de Salud de la Universidad del Valle aprueba el proyecto arriba mencionado y respeta los principios, políticas y procedimientos de la Declaración de Helsinki de la Asamblea Médica Mundial, de la Resolución 8430 de 1995 del Ministerio de Salud y de la reglamentación vigente en Investigación de la Universidad del Valle.

Firma:

Nombre:

HERNAN J. PIMIENTA J.

Fecha:

16

03

2012

Capacidad representativa:

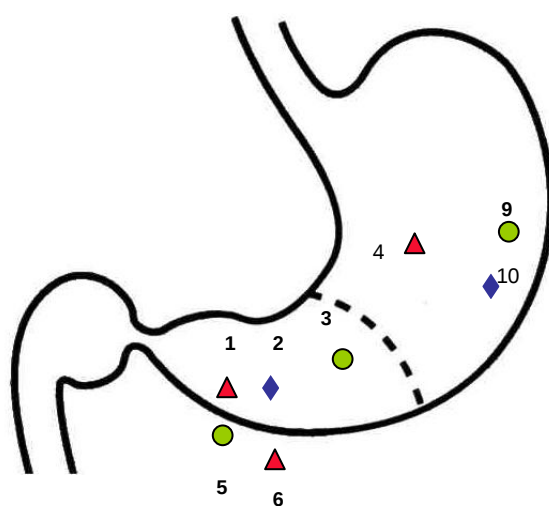
VICEDECANO DE LA FACULTAD DE SALUD

Teléfono:

5185680

13.3. Anexo 3. Protocolo para la toma de biopsias por endoscopia del proyecto “Susceptibilidad antimicrobial según factores de virulencia de aislados de *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis crónica”

Espécimen	Medio de recolección	Procedimiento
Dos muestras de mucosa gástrica antral, curvatura menor y mayor.	Tioglicolato con glicerol	Aislamiento de <i>H. pylori</i> y PCR de marcadores de virulencia CIM
Cuatro muestras: dos de antro y dos de cuerpo	Formol al 10%	Análisis histopatológico
Dos muestras de mucosa gástrica de cuerpo: curvatura mayor y menor	Tioglicolato con glicerol	Aislamiento de <i>H. pylori</i> y PCR de marcadores de virulencia CIM
Una muestra de mucosa gástrica de cuerpo pared anterior media y otra de antro curvatura menor.	Tioglicolato con glicerol	Preservación a -70°C



● **Formol 10% Histología**

- 3. Incisura angularis
- 5. Antro, curvatura mayor a 3 cm del píloro
- 7. Cuerpo, curvatura mayor a 10 cm del Cardias
- 9. Cuerpo, pared anterior, media

▲ **Congelar en tioglicolato. Cultivo *H. pylori*.**

- 1. Antro, curvatura menor a 3 cm del píloro
- 4. Cuerpo curvatura menor a 4 cm de incisura
- 6. Antro, curvatura mayor a 3 cm del píloro
- 8. Cuerpo, curvatura mayor a 10 cm del Cardias.

◆ **Congelar (preservar a -70°C):**

- 2. Antro, curvatura menor a 3cm del píloro
- 10. Cuerpo, pared anterior, media

13.4. Anexo 4 . Pruebas de identificación para *H.pylori*

Identificación de *Helicobacter pylori*.

A nivel macroscópico se identificaron colonias pequeñas traslucidas, no hemolíticas, convexas a manera de gotas de rocío a las que se les realizó las siguientes pruebas de identificación:

Prueba de oxidasa:

Se extendió con un ansa (plástica) de argolla un inoculó de aislado de *H. pylori* sobre una tira de oxidasa (Oxoid®). Se observó la formación de un complejo púrpura, que indicó reacción positiva(figura1). Las bacterias que contienen esta enzima catalizan rápidamente la oxidación de la N- dimetil-p-fenilendiamina producto coloreado en presencia de oxígeno (Dorado et al 2004)

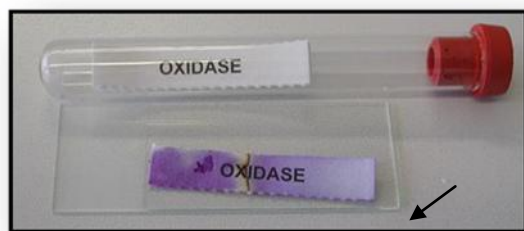


Figura 1. Prueba de oxidasa positiva para aislados de *H. pylori*. Se observa la coloración violeta, resultado positivo para actividad oxidasa.

Prueba de catalasa:

Se colocó un inoculó del aislado de *H pylori* en lámina porta-objeto estéril y se adicionó dos gotas de peróxido de hidrógeno al 10% (Carlo Erba ®) .Se interpretó como positiva la inmediata formación de burbujas producida por la liberación de oxígeno y producción de agua a partir de peróxido de hidrógeno, reacción catalizada por la enzima catalasa de *H.pylori* (figura 2).

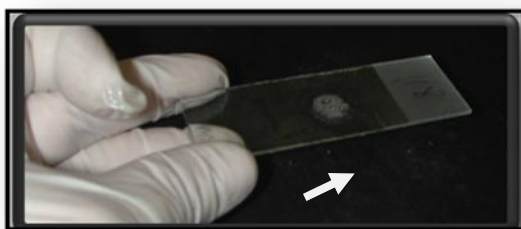


Figura 2. Prueba de Catalasa positiva para aislados de *H. pylori*. Se observa la formación de burbujas en presencia de peróxido de hidrogeno y cepas de *H. pylori*.

Prueba de detección de ureasa

Del cultivo de *H. pylori* se tomó un inóculo con una ansa de transferencia y se le adicionó a un tubo Nunc con 1 mL de solución de urea (Promega®) al 10% con rojo de fenol (Carlo Erba®) como indicador de pH. Interpretadas cada minuto durante los primeros cinco minutos, y una lectura final a los 20 minutos. Los resultados fueron considerados como positivos, cuando las muestras que se tornaron de color fucsia durante la prueba (figura 3). La reacción se representa por la acción de la ureasa que hidrolizará la urea para convertirla en amonio y en dióxido de carbono. Esta reacción es alcalina, por lo tanto modificará el color del indicador rojo de fenol añadido, que cambiará de amarillo a fucsia, señalando un resultado positivo y negativo si permanece del mismo color.

$$\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2 \xrightarrow{\text{ureasa}} 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2$$

Urea Amonio.



Figura 3. Prueba de ureasa positiva para aislados de *H. pylori*. Se observa el cambio de coloración de amarillo a fucsia del rojo fenol, generado por la alcalinización del medio como resultado de la degradación de la Urea por la enzima ureasa de *H. pylori*.