

Estudio de mutaciones en los genes *rdxa* y *frxa* de *HELICOBACTER PYLORI* en
biopsias gástricas de una Población del Departamento del Cauca



SULMA MUÑOZ BENITEZ

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Escuela de Ciencias Básicas

Facultad de Salud

Santiago de Cali- Valle

Octubre 2016

Estudio de mutaciones en los genes *rdxa* y *frxa* de *HELICOBACTER PYLORI* en
biopsias gástricas de una Población del Departamento del Cauca

SULMA MUÑOZ BENITEZ

Trabajo de grado

Presentado como requisito parcial, para optar el título de:

Doctor en Ciencias Biomédica

Director: CARLOS HERNAN SIERRA TORRES, PhD.

Asesor: Adalberto Sánchez Gómez, PhD.

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Escuela de Ciencias Básicas

Facultad de Salud

Octubre, 2016

DEDICATORIA

Dedico esta tesis primeramente a Dios, por haberme dado salud para lograr mis objetivos, por su infinito amor y por haberme permitido culminar con éxito este trabajo.

A mi familia, por haberme apoyado en todo momento, por la motivación constante, por la paciencia en los momentos difíciles y el amor que siempre me han demostrado.

A mis amigos, por creer en mí y apoyarme siempre para culminar este proyecto de vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Valle, especialmente al Programa de doctorado en Ciencias Biomédicas, en cabeza del Dr. Julio Cesar Montoya y su excelente Secretaria. Al Doctor Adalberto Sánchez, mi Asesor, por sus orientaciones y apoyo incondicional.

Gracias a la Universidad del Cauca, especialmente, al Decano de la Facultad Ciencias de la Salud, Dr. José Luis Diago y al Departamento de Ciencias Fisiológicas, quienes me apoyaron siempre para lograr este proyecto de vida.

Gracias a mi Director Dr. Hernán Sierra, por su apoyo, orientación y sus sabios consejos. A mi grupo de investigación en Genética Humana y Aplicada (GIGHA), especialmente, a la Magister Patricia Acosta, por darme la oportunidad de trabajar en su proyecto y dedicarme su tiempo y su personal al desarrollo de esta investigación, a quienes también agradezco. Al Magister Andrés Quiroga, por su tiempo y apoyo en el manejo y análisis de las herramientas moleculares y bioinformáticas. Al biólogo Aldair Rosero por su apoyo oportuno en programas sistemáticos. A las Magísteres Rosa Álvarez y Lorena Urbano, por estar siempre, ahí, animándome, y revisando mi proyecto de investigación. Al Señor Walter González, Auxiliar, por su apoyo y colaboración.

A los amigos y por encima de todo y con todo mi amor, a Dios por la vida y las oportunidades que ha puesto en mi camino y a mi Familia, por su amor, paciencias, sacrificio y apoyo incondicional.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ANEXOS	10
GLOSARIO.....	11
RESUMEN.....	15
1. INTRODUCCIÓN.....	19
CAPITULO I	22
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 GENERAL	28
4. JUSTIFICACIÓN	29
CAPITULO II	32
5. MARCO TEORICO Y ANTECEDENTES.....	32
5.1 CANCER GASTRICO (CA)	32
5.1.2 CÁNCER GÁSTRICO DIFUSO:	32
5.1.3 CÁNCER GÁSTRICO INTESTINAL:.....	33
5.1.4 EPIDEMIOLOGÍA.	33
5.1.5 FACTORES DE RIESGO	34
5.1.6 INFECCIÓN POR <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	35
5.1.7 EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR <i>H. PYLORI</i>	35
5.1.8 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR <i>H. PYLORI</i>	36
5.1.9 TRATAMIENTO.....	37
5.1.10 MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS	38
5.1.11 LA RESISTENCIA AL METRONIDAZOL (MTZ)	40
CAPITULO III	43
6. METODOLOGÍA	43
6.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO	43

6.2	EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN POR PCR	44
6.3	ANÁLISIS DE LOS GENES <i>rdxA</i> y <i>frxA</i>	45
CAPÍTULO IV		50
7.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.	50
7.1	CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIO.....	51
7.2	DISTRIBUCIÓN DE MUTACIONES	53
7.2.1	MUTACIONES EN LA PROTEÍNA <i>NITROREDUCTASA RDXA</i> , CODIFICADA POR EL GEN <i>rdxA</i> DE <i>H. PYLORI</i>	53
7.2.2	PROTEÍNA FLAVIN OXIDOREDUCTASA , CODIFICADA POR EL GEN <i>frxA</i> DE <i>H. PYLORI</i>	54
8.	CONCLUSIONES	64
9.	RECOMENDACIONES	65
10.	BIBLIOGRAFIA.....	66
ANEXOS.....		71

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tratamiento erradicación de la Infección *por H. pylori*

Tabla 2. Características sociodemográficas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia mundial de Infección por *H. pylori*.

Figura 2 . Prevalencia de Infección por *H. pylori* en Colombia y el Dpto. del Cauca

Figura 3. Prevalencia de la resistencia bacteriana a metronidazol

Figura 4. Activación del metronidazol

Figura 5. Alineamiento múltiple del Gen FrxA (40 muestras *H. pylori*, Cepa de referencia 26695 y la secuencia de comparación AF322971.

Figura 6. Frecuencias de cambios en la proteína RdxA

Figura 7. Frecuencias de cambios en la proteína FrxA

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Análisis de secuencia y electroforesis de los genes *rdxA* y *frxA*

Anexo 2. Análisis de frecuencia de las mutaciones del gen *rdxA*

Anexo 3. Análisis de frecuencia de las mutaciones del gen *frxA*

Anexo 4. Secuencias de ADN y a.a. y análisis de mutaciones gen *rdxA*

Anexo 5. Secuencias de ADN y a.a. y análisis de mutaciones gen *frxA*

Anexo 6. Análisis y efecto de la proteína FrxA

Anexo 7. Localización de iniciadores usados para la amplificación del gen *frxA*

Anexo 8. Acta de sustentación.

GLOSARIO

ANTIBIÓTICOS: medicamento que se usa para suprimir las infecciones o erradicar las bacterias.

BIOPSIAS GÁSTRICAS: tejido que consiste en tomar una muestra pequeña de tejido del estómago vivo, para su estudio microscópico o por otras técnicas, a través del cual se puede obtener un diagnóstico.

BIOINFORMÁTICA: es una disciplina científica que utiliza información tecnológica para organizar, analizar, y distribuir los resultados de información biológica, para responder preguntas biológicas complejas.

BIOMARCADORES: son cambios o eventos biológicos observables o cuantificables en los individuos que indican alteraciones o cambios en la salud humana/ indicadores de procesos biológicos o patogénicos.

BLOQUEADORES H2: medicamentos usados para tratar la enfermedad del reflujo gastroesofágico (su sigla en inglés es GERD), y que disminuyen la cantidad de ácido producido en el estómago.

CÁNCER GÁSTRICO (CA gástrico): cuando se emplean los términos cáncer de estómago o cáncer gástrico casi siempre se refieren a un adenocarcinoma. Estos cánceres se originan en las células que forman la capa más interna del estómago (conocida como la mucosa).

DISPEPSIA: todo trastorno de la secreción, motilidad gastrointestinal o sensibilidad gástricas que perturben la digestión y designa cualquier alteración funcional asociada al aparato digestivo.

ENDOSCOPIA: es el estudio del interior del cuerpo usando un instrumento flexible e iluminado (endoscopio).

GASTRITIS: es una inflamación de la mucosa gástrica (capa de células) que reviste el estómago por dentro protegiéndolo de la acidez de los jugos gástricos.

FRXA: enzima codificada por el gen *frxA*, llamada NAD(P)H Flavin oxidoreductasa que cataliza la reducción de la flavinas libres usando NADH o NADPH, también está involucrada con la reducción del metronidazol para la formación de hidroxilamina.

GEN: unidad de información o secuencia de nucleótidos del Ácido desoxirribonucleico (ADN) que codifica un producto funcional, como el Ácido ribonucleico (ARN) o las proteínas y es la unidad de herencia molecular.

HELICOBACTER PYLORI (H. pylori): es una bacteria que causa infecciones e inflamación en la mucosa gástrica,

TERAPIA TRIPLE ESTÁNDAR (TTE): es una terapia compuesta por un inhibidor de bomba de protones (IBP 2v/día), combinado con amoxicilina (1gr dos veces al día) y claritromicina (500 mg 2v/día) o metronidazol (500 mg 2v/día), durante 7 ,10 o 14 días

LINFOMA GÁSTRICO TIPO MALT: significa “linfoma del tejido linfoide asociado a las Mucosas”. Llamado también, Maltoma y se define como proliferación neoplásica monoclonal de linfocitos B que infiltran las glándulas gástricas, con típicas lesiones linfoepiteliales.

METRONIDAZOL (Mtz): es un antibiótico y antiparasitario, que se utiliza en el tratamiento de las infecciones debidas a parásitos y bacterias anaerobias.

MUTACIONES: cambios que alteran la secuencia de nucleótidos del ADN. Estas mutaciones en la secuencia del ADN pueden llevar a la sustitución de aminoácidos en las proteínas resultantes.

POLIMORFISMO: significa literalmente «muchas formas». Por lo tanto, los polimorfismos genéticos son las variaciones naturales en un gen, secuencia de ADN, o cromosoma que no tienen efectos adversos en el individuo y se producen con alta frecuencia en la población general. Así pues, el polimorfismo genético, cromosómico o de secuencia del ADN son los responsable de la gran variabilidad existente entre los individuos de una misma especie.

RDxA: enzima codificada por el gen *rdxA*, llamada Nitroreductasa NAD(P)H insensible al oxígeno, que actúa reduciendo componentes nitroaromáticos generando productos como la hidroxilamina produciendo daño al ADN y muerte celular.

ULCERA: es toda lesión abierta de la piel o membrana mucosa con pérdida de sustancia. Las úlceras pueden tener origen y localización muy variada. Las más frecuentes son las que afectan a la pared del estómago o duodeno, llamadas úlceras pépticas.

RESUMEN

La infección por *HELICOBACTER PYLORI* (*H. pylori*) es la causa directa de las gastritis crónicas, cofactor importante en la etiología de las úlceras pépticas, y ha sido asociada a la etiopatogenia del cáncer gástrico y del linfoma gástrico tipo MALT. Se ha estimado que el 50% de la población mundial está infectada y que países en vía de desarrollo como el nuestro, sobrepasa del 80%. Estudios realizados in vitro han demostrado que esta bacteria es sensible a muchos antibióticos pero in vivo su actividad se pierde por muchas condiciones del estómago. El metronidazol (Mtz) es uno de los antibióticos más usados a escala mundial, pero su discriminada utilización en otras patologías ha traído como consecuencia sus altos niveles de resistencia. Los genes *rdxA* y *frxA* son los responsables de esta resistencia de *H. pylori*. El objetivo principal del presente trabajo es estudiar las mutaciones y su efecto en las proteínas que codifican estos dos genes en biopsias gástricas de 127 pacientes con diagnóstico de enfermedades gástricas, a los cuales se les confirmó la presencia *H. pylori* por histopatología y mediante la genotipificación del gen *vacA*. Para la secuenciación se utilizó el primer 460 pb del gen *rdxA-F* y el primer de 450pb del gen *frxA -F*,

los cuales contienen toda la secuencia del marco de lectura. Se realizó evaluación y análisis de las secuencias traducidas a aminoácidos, ;y se comparó con la cepa de referencias AAL37281 (rdxA) y AAL37269.1 (frxA), mediante herramientas bioinformáticas. Los resultados muestran mutaciones puntuales con sentido erróneo y sin sentido; además cambios en la proteína, mostrando inestabilidad que pueden disminuir la actividad de las proteínas, después de las mutaciones. Según estudios, las proteínas RdxA y FrxA contribuyen a la supervivencia de la bacteria; las mutaciones pueden afectar su fenotipo, pero se hace necesario más estudios con herramientas para que permitan hacer una mejor evaluación de los mecanismos de resistencia antibacterial, incluso utilizar biomarcadores, que permitan analizar en conjunto con las mutaciones, los contaminantes emergentes.

PALABRAS CLAVES: *HELICOBACTER PYLORI*, gastritis, cáncer gástrico, infección, resistencia antimicrobiana, metronidazol.

ABSTRACT

Infection with *HELICOBACTER PYLORI* (*H. pylori*) is the main cause of chronic gastritis, an important factor in the etiology of peptic ulcers and has been associated with the pathogenesis of gastric cancer and gastric lymphoma type MALT. It has been estimated that 50% of the world population is infected, and that in developing countries, exceeds 80%. In vitro studies have shown that this bacterium is sensitive to many antibiotics, but its activity is lost by many conditions of the stomach. The metronidazole (Mtz) is one of the most used antibiotics; there is a high resistance of Mtz because of the indiscriminate use in several infections. *rdxA* and *frxA* genes are responsible for Mtz resistance in *H. pylori*. The objective of this work is to study the mutations *frxA* and *rdxA* protein their effects. The gastric biopsies made to 127 patients with diagnosis of gastric diseases, confirmed the presence of *H. pylori* by histopathology and the *vacA* gene genotyping. For the sequencing was used the primer 460pb of *rdxA*-F gene and the primer of the *frxA* gene 450pb - F, which contain the entire sequence of the open reading frame. Evaluation and analysis translated into amino acid sequences were performed and compared with the strain of AAL37281 (*rdxA*) and AAL37269.1 (*frxA*) references, using bioinformatics tools. The results show

missense mutations and nonsense mutations, showing instability that can decrease the activity of proteins, after the mutations and could be related to resistance based in bibliographic literature. According to studies, RdxA and FrxA proteins contribute to the survival of the bacterium; mutations can affect their phenotype, but it becomes necessary to do more studies with tools that allow a better assessment of antibacterial resistance mechanisms; even using biomarkers, that permit analyzing in conjunction with mutations, the emerging contaminants.

Key Words: *HELICOBACTER PYLORI*, gastritis, gastric cancer, infection, antimicrobial resistance, metronidazole. frxA, rdxA.

1. INTRODUCCIÓN

Hace 33 años que Marshall y Warren dieron a conocer a la comunidad científica la presencia de la bacteria *HELICOBACTER PYLORI* en pacientes con gastritis y ulcera péptica (Warren and Marshall 1983), noticia que no fue muy bien aceptada en esa época, ya que se pensaba que en el estómago debido a los ácidos gástricos, no podría sobrevivir ningún microorganismo, pero después de muchas investigaciones, hacia el año 1990, en un Congreso mundial de Gastroenterología, se recomendó que a todo paciente al cual se le identifica la bacteria, había que erradicársele, entonces vienen a organizarse diferentes conferencias de consenso sobre el diagnóstico y tratamiento de la infección de este microorganismo con objetivo principal de su erradicación y en 1994 la oficina internacional de investigación de cáncer clasificó la bacteria *H. pylori* como carcinógena tipo I, ya que es considerado el principal agente etiológico para casi todos los desórdenes gástricos (Cancer and Organization 1994). Además, se reporta que más del 50 % de la población mundial está infectada con este patógeno y que en países en vías de desarrollo la tasa de infección sobrepasa el 80 % de la población ((Ahuja and Sharma 2002). Esta infección inicia en la infancia y si no se trata con antimicrobianos, puede persistir por mucho tiempo, induciendo principalmente el desarrollo de lesiones pre-neoplásicas y neoplásicas gástricas. (Malfertheiner, Megraud et al. 2012; Watari, Chen et al. 2014).

En el 2007, Maastricht III, recomienda como tratamientos de erradicación de la bacteria, el esquema triple que incluye sales de bismuto con amoxicilina y metronidazol e inhibidores de la bomba de protones y dos antimicrobianos como omeprazol y claritromicina y amoxicilina, alcanzando erradicar la infección en un 75 -80% respectivamente (Gisbert, Boixeda et al. 1996; Figueroa, Cortés et al. 2012). Esta erradicación, también está en evaluación continua, ya que se ha reportado, resistencia a estos esquemas de tratamiento, por el programa biológico de la bacteria, debido al manejo inadecuado del tratamiento, el uso de estos en otras patologías, incluso se puede sugerir a la contaminación del agua de consumo humano con estos antimicrobianos.

En el presente estudio, nos hemos propuestos estudiar las mutaciones en los genes *rdxA* y *frxA* relacionados con la resistencia al Metronidazol (Mtz) en pacientes con lesiones gástricas, en una población del Cauca, teniendo en cuenta que el metronidazol, es uno de los antibióticos más utilizados a escala mundial, el cual, por su uso indiscriminado para otras afecciones ha inducido un aumento considerable en la tasa de resistencia (Mégraud and Lehours 2007; Megraud, Coenen et al. 2013)

CAPITULO I

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La infección por *HELICOBACTER PYLORI* (*H. pylori*) es la causa más importante del cáncer de estómago (CA gástrico), del linfoma gástrico de tejido linfoide asociado a la mucosa y en menor riesgo de adenoma esofágico, afectando cerca de dos tercios de la población mundial y su prevalencia está fuertemente relacionada con las condiciones socioeconómicas (Graham and Shiotani 2008). En países en vía de desarrollo como Colombia, afecta a más de 80% de los adultos, en contraste con 20 a 50% en países desarrollados (Suerbaum and Michetti 2002). *H. pylori* se adquiere en la infancia y puede persistir durante toda la vida del individuo, sino se elimina con antimicrobianos (Parsonnet 1998). (Figura1). Las poblaciones con alto riesgo de cáncer gástrico tienen altas tasas de infección por dicha bacteria. En Colombia la prevalencia de la infección es de 69.1%; las zonas con más alta prevalencia son: Manizales, Tunja, Región Andina y la Costa atlántica (Bravo, Cortés et al. 2003). Según un estudio previo de caso-control, realizado por el grupo de investigación en Genética Humana Aplicada (GIGHA), sobre la Epidemiología molecular del cáncer gástrico en el suroccidente colombiano, (Sin publicar) encontró que en el departamento del Cauca, la prevalencia de la infección por *H. pylori* es del 83% en la población control. (Figura 2)

Uno de los más grandes retos de la gastroenterología, es la erradicación de este patógeno. Son muchos los factores que hacen difícil la eliminación de esta infección con antimicrobianos, algunas de ellas inherentes a *H. pylori* y otras a las Infecciones bacterianas en general, por lo tanto, la resistencia a los medicamentos

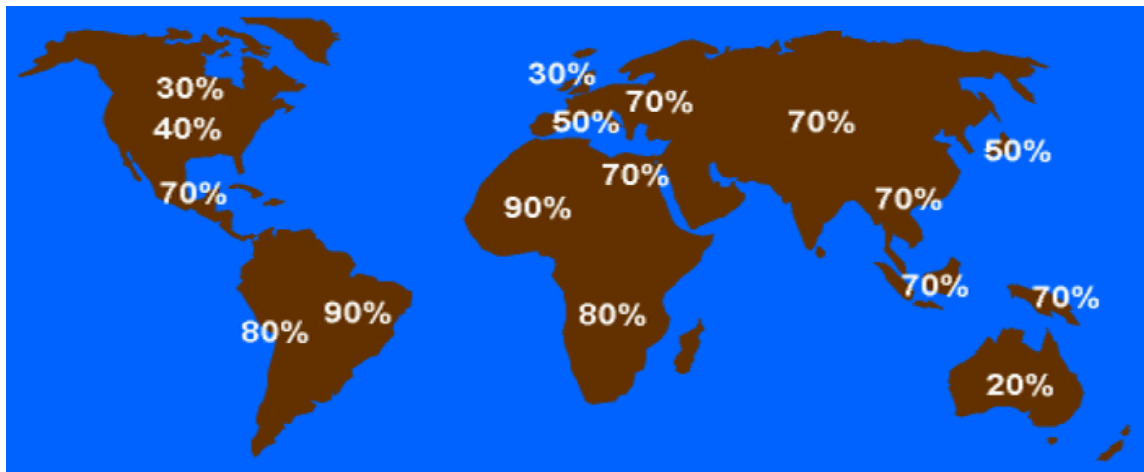


Figura 1. Mapa mundial de prevalencia de Infección por *H. pylori*. Muestra diferencias geográficas.

antimicrobianos es una de las primeras causas del fracaso del tratamiento contra esta bacteria y en gran parte la responsable de la disminución de las tasas de erradicación de este patógeno, por lo tanto, es una de las mayores amenazas para la salud humana. Entre otras, la falla terapéutica, se debe a la rápida aparición de cepas resistente, a la mala adherencia del tratamiento por parte de los pacientes y ahora, los estudios, incluyen los contaminantes emergentes en el agua, como los antibióticos, que han incrementado su producción y consumo, permitiendo grandes descargas sobre los cuerpos de agua con manifestaciones de resistencia microbiana en muchas

zonas.(Parsonnet 1998; Gené, Sánchez-Delgado et al. 2008; Papastergiou, Georgopoulos et al. 2014; Papastergiou, Georgopoulos et al. 2014).

Uno de los mecanismo de resistencia que usan las bacterias, son las mutaciones, y especialmente *H. pylori*, entre pocas bacterias, adquiere su resistencia a todos los antibióticos, mediante mutaciones en genes de su cromosoma

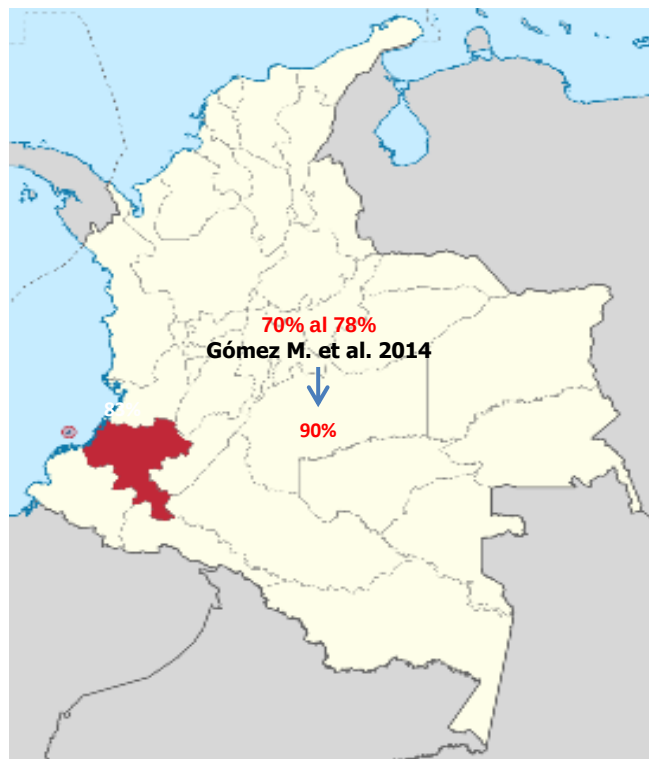


Figura 2 Prevalencia de la infección por *H. pylori* en Colombia y Dpto. del Cauca

Según la literatura científica, el Metronidazol (Mtz), es el antimicrobiano con mayor tasa de resistencia, con cifras que varía en todo el mundo, África 80%, América

del Sur 61.4%, américa del Norte 52.3%, Asia con 33.8 y Europa con 32.5 y en Colombia es de aproximadamente 86%(McNulty, Dent et al. 1988). Figura 3

El metronidazol (Mtz), es un pro-fármaco que ejerce su efecto bactericida sobre *H. pylori*, cuando se reduce químicamente por enzimas nitroreductasas como la nitroreductasa insensible al oxígeno (rdxA) y la NAD(P)H flavin oxidoreductasa (FrxA). Por tanto, la resistencia a Mtz resulta de la inactivación por mutaciones del gen rdxA (cepas tipo I) o por la combinación de esta mutación con una segunda mutación en el gen frxA (cepas tipo II)(Mendz and Mégraud 2002; Megraud 2004; Aldana, Kato et al. 2005; Mirzaei, Poursina et al. 2016) Varios estudios han encontrado diferentes tipos de mutaciones en estos genes, tales como: las inserciones, deleciones, que originan cambio en el marco de lectura por pérdida o ganancia de adenina (A) o de timina (T); mutaciones de sentido erróneo que contienen la sustitución de aminoácidos como la prolina (P) por la leucina (L), la tirosina (Y) por la histidina (H) y la alanina (A) por la valina (V) , entre otras (Jenks, Ferrero et al. 1999; Megraud 2004; Aldana, Kato et al. 2005; Mirzaei, Poursina et al. 2016). El análisis de secuenciación es una técnica que se ha utilizado con éxito en la determinación de mutaciones en especial en áreas geográficas en donde los cultivos de la bacteria no están disponibles. Por lo tanto, las recomendaciones del último Consenso de Maastrich IV (Malfertheiner, Mégraud et al. 2002; Didelot, Bowden et al. 2012; Malfertheiner, Megraud et al. 2012) sugieren que el uso de las terapias de erradicación de la infección debe estar orientado de acuerdo a

estudios de prevalencia de la resistencia a los antimicrobianos en cada región (Gatta, Vakil et al. 2012; Camargo, García et al. 2014).

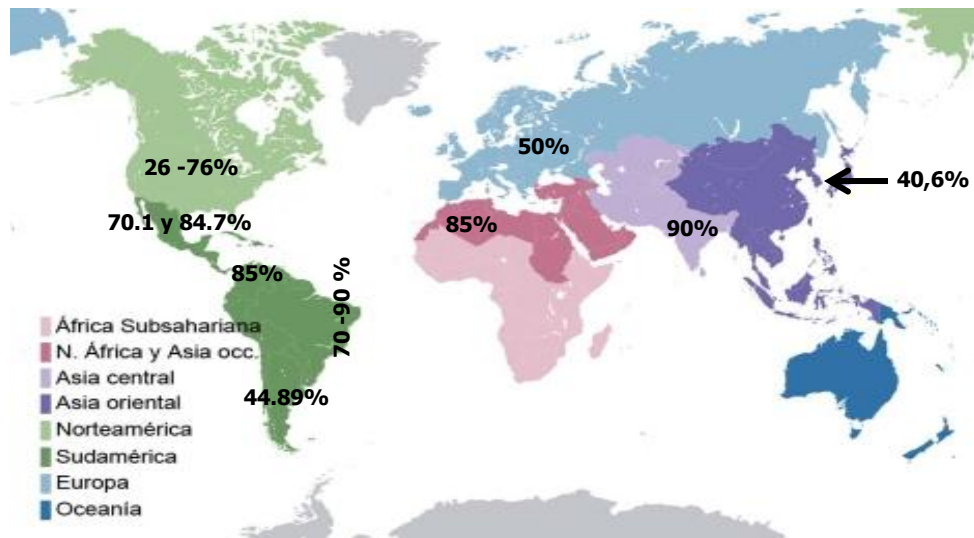


Figura 3 Resistencia de *H. pylori* a metronidazol

Debido a que en Colombia existen pocos estudios que determinen la presencia de mutaciones en los genes de resistencia al metronidazol, el objetivo de este estudio fue analizar las mutaciones encontradas en los genes *rdxA* y *frxA*, su relación con la resistencia y su posible efecto en las proteínas. Por tanto, esta tesis trata de responder las siguientes preguntas relacionadas con el mecanismo de resistencia de *H. pylori* al metronidazol en una población del Departamento del Cauca.- Colombia:

- a. Cuál es el patrón de distribución de las mutaciones de los genes *rdxA* y *frxA* con respecto a las características sociodemográficas en la población de estudio?

- b. Existe una relación entre las mutaciones encontradas en los genes *rdxA* y *frxA* en la población de estudio y la resistencia al metronidazol, según lo reportado por la literatura?

3. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

Analizar las mutaciones en los genes *rdxA* y *frxA* relacionados con la resistencia al Metronidazol (Mtz) en pacientes con lesiones gástricas, en una población del Cauca

3.2 ESPECÍFICOS:

- 1 Identificar las características sociodemográficas y clínicas de la población estudio.
- 2 Amplificar y secuenciar los genes *rdxA* y *frxA* de *HELICOBACTER PYLORI* en biopsias de pacientes con lesiones gástricas.
- 3 Identificar las mutaciones en los genes *rdxA* y *frxA* y determinar las más frecuentes en la población de estudio.

- 4 Analizar las mutaciones sobre la secuencia de las proteínas y describir los cambios que según la literatura podrían estar relacionados con la resistencia al metronidazol.

4. JUSTIFICACIÓN.

Dentro de las infecciones más frecuentes en el ser humano, la más relevante es la causada por la bacteria *HELICOBACTER PYLORI*, la cual ha sido clasificada como carcinógeno del grupo I por la Agencia Internacional de Investigación sobre el cáncer (IARC 1994), y se estima que el 50% de la población mundial está infectada, por lo tanto, se considera un problema de salud pública. Afecta principalmente los países en vía de desarrollo, con una prevalencia hasta del 90% posiblemente por sus condiciones precarias higiénico-sanitarias, presentando tasa altas de infección en la infancia (Trespalacios, Otero et al. 2010; Watari, Chen et al. 2014). En Colombia, la tasa de infección en adultos es alrededor del 70 – 78%, según evaluación endoscópica y serológica (Llodra Calvo, Bravo Pérez et al. 2002; Bravo, Cortés et al. 2003; Garza-González, Perez-Perez et al. 2014), aunque son valores subestimados, ya que en muchas regiones no existen estudios epidemiológicos. Esta infección es la causa fundamental para el desarrollo de lesiones gástricas y se constituye en el cofactor principal del adenocarcinoma y linfoma gástrico (Torres, Acosta et al. 2004; Acosta, Arboleda et al. 2006). En

estudios realizados *in vitro*, se ha demostrado la susceptibilidad de *H. pylori* a una amplia gama de antibióticos, contribuyendo a la erradicación de la bacteria, por ende, disminuyendo el riesgo de recurrencia de lesiones gástricas, úlcera péptica y cáncer gástrico, además de la propagación de la infección (Asaka, Kato et al. 2010; Watari, Chen et al. 2014). Sin embargo, la efectividad de estos tratamientos ha disminuido notablemente, ya que se ha visto comprometida por la aparición de cepas resistente de *H. pylori* a los diferentes antibióticos y la pobre adherencia al tratamiento (Gerrits, van Vliet et al. 2006; Vaira, Zullo et al. 2007; Megraud, Coenen et al. 2013; Wu, Hu et al. 2014), afectando el éxito de los diferentes tratamientos. La tasa de resistencia varía entre las regiones geográficas, sugiriendo ajuste de acuerdo a los patrones de resistencia locales y al uso de estos medicamentos en cada región (Malfertheiner, Megraud et al. 2007; Chuah, Tsay et al. 2011; Selgrad and Malfertheiner 2011).

Dentro de los antibióticos más utilizados mundialmente para la erradicación de *H. pylori*, se encuentra el metronidazol, el cual por su uso indiscriminado en otras patologías ha traído como consecuencia altos niveles de resistencia (Mégraud and Lehours 2007; Megraud, Coenen et al. 2013). A nivel mundial se han observado en aislados clínicos altas tasas de resistencia a metronidazol, en la India de un 90%, Usa y Europa occidental 50% o más, 40,6 en Corea (Vallejos, Cerda et al. 2003; Megraud 2004) en América Latina, en Chile la resistencia al Mtz es de 44,89% (González, García et al. 2001; Vallejos, Garrido et al. 2007), en Colombia la resistencia ha variado del 72, 80 y 97%, (Gutiérrez and Otero 1998; Henao, Sandra et al. 2009), demostrando con esta variación, que otros factores como la

región y aspectos sociodemográficos de los pacientes, se deben tener en cuenta. (Figuras 1 y 2)

Varios estudios han sugerido que las mutaciones en los genes *rdxA* y *frxA* están involucrados en la resistencia de cepas de *H. pylori* al Mtz, estos genes codifican nitroreductasas, que pueden convertir el Mtz en productos como la hidroxilamina que son a la vez bactericida y mutagénicos.

Como ya se conoce, la estructura primaria viene determinada por la secuencia de aminoácidos y estos a su vez, determinados por la secuencia ADN, es así como la secuencia primaria de una proteína determina su estructura tridimensional y su función. Es así como la sustitución de un aminoácido, puede causar una serie de cambios en la estructura de la proteína y por ende su función, por lo tanto, el análisis de la mutación de ADN se ha convertido en un área importante de la investigación de estudios computacionales de proteínas con herramientas bioinformáticas, con el objetivo de estudiar los efectos y consecuencias de la mutación de aminoácidos(Hussain, Shaik et al. 2012; Mirzaei, Poursina et al. 2016) y en el presente trabajo los resultados permiten aportar nuevo conocimiento para buscar o entender los mecanismo de resistencia de *H. pylori* al metronidazol y demás antibióticos. Además, es necesario determinar los niveles de resistencia a los mismos ya que con base en esa información, se podría planear la elección de los antimicrobianos en la práctica clínica.

CAPITULO II

5. MARCO TEORICO Y ANTECEDENTES

5.1 CANCER GASTRICO (CA)

El Cáncer gástrico es la proliferación por divisiones sin control de las células de los tejidos que revisten el estómago. El tumor puede desarrollarse en cualquier parte del estómago y puede extenderse a través del estómago a otros órganos. Aproximadamente del 90% - 95% de los cánceres gástricos son adenocarcinomas, y es este al que dedicamos en esta investigación. El resto corresponde a linfomas no Hodgkin, tumores del estroma gastrointestinal (GIST) y carcinoides. Lauren y Jarvi en 1965, hicieron una clasificación microscópica en de dos tipos con características histológicas, anatomo-patológicas epidemiológicas y clínicas diferentes: un tipo de cáncer gástrico intestinal y otro difuso. (Laitio 1976)

5.1.2 CÁNCER GÁSTRICO DIFUSO:

No tienen una estructura glandular, es mal diferenciado con células en anillo de sello y mucina dispersa por el estroma, tiene un patrón de crecimiento infiltrativo hacia los fascículos y al tejido conjuntivo. Su localización preferencial es en el fondo. Se presenta con frecuencia en pacientes más jóvenes y se asocia más al cáncer hereditario

5.1.3 CÁNCER GÁSTRICO INTESTINAL:

Patológicamente se caracteriza por la tendencia a formar glándulas con células similares a las intestinales. Su localización es generalmente en el antro. Se presenta con mayor frecuencia en personas mayores, hombres, áreas de alto riesgo y secundario a factores ambientales.

Muchas investigaciones han demostrado que el adenocarcinoma gástrico tipo intestinal usualmente es precedido por una secuencia de eventos histológicos que comienzan con la gastritis crónica difusa y que eventualmente llevan a atrofia gástrica, metaplasia intestinal y displasia. (Correa 1992). Los resultados de estas investigaciones también reportan, la infección por *HELICOBACTER PYLORI*, en la inducción de la inflamación gástrica y la progresión del desarrollo de los cambios neoplásicos (Asaka, Takeda et al. 1997)

5.1.4 EPIDEMIOLOGÍA.

El CA gástrico es el cuarto cáncer más común y segundo por muerte en todo el mundo, el cual representa un problema actual de salud pública mundial y Colombia no es la excepción, debido al aumento de su incidencia y la necesidad de disminuir la mortalidad. Se presenta en una amplia región geográfica, donde más de la mitad de los casos está en Japón y China, le sigue Sudamérica, algunos países de Europa del este y algunos países de medio Oriente. Menos frecuente en

Estados Unidos, Australia y África. Algunas variaciones regionales reflejan la diferencia en la prevalencia de la infección por *HELICOBACTER PYLORI*, cuya tendencia en los últimos años ha sido la disminución en la incidencia de su aparición en los países del occidente debido a la menor ingesta de sal y alimentos preservados, el aumento del consumo de frutas y verduras, la invención de la refrigeración y el uso extendido de antibióticos contra *H. pylori*. (Siegel, Naishadham et al. 2012; Siegel, Miller et al. 2015). Sigue observándose que afecta con mayor incidencia a personas de edad avanzada con promedio 69 años y dos veces más en varones que en mujeres. En nuestro país, en hombres, ocupa el segundo lugar en frecuencia, después del cáncer de próstata, mientras que en mujeres la incidencia ocupa el cuarto lugar, después del cáncer de mama y cuello uterino. (Piñeros and Murillo 2004; Piñeros, Ferlay et al. 2006)

5.1.5 FACTORES DE RIESGO

El CA gástrico tiene una etiología multifactorial, donde se ha propuesto que la gastritis crónica y la infección por *H. pylori* serían el factor etiológico inicial del CA gástrico, (Correa, Cuello et al. 1970; Piazzuelo and Correa 2013). Además, esta infección por esta bacterias induciría alteraciones histológicas en la mucosa gástrica, como son la atrofia gástrica (AG), metaplasia intestinal (MI), displasia, que a lo largo de varios años, serían modulados por factores genéticos, dietéticos y ambientales que conducirían al adenocarcinoma intestinal.

5.1.6 INFECCIÓN POR *HELICOBACTER PYLORI*

El H. pylori, es una bacteria en forma de espiral que crece en la capa mucosa que recubre el interior del estómago humano, ha coexistido con el muchísimos años y la infección es común, tanto que ha sido clasificado como carcinógeno del grupo I por la Agencia Internacional de Investigación sobre el cáncer (IARC 1994). Muchos estudios han calculado que dos tercios de la población mundial hospedan la bacteria y la infección es mayor en países en vía de desarrollo que desarrollados. Se sugiere que se propaga por medio de los alimentos y aguas contaminadas, es una de las razones, para encontrar en los estudios epidemiológicos que la pobreza, el estrato bajo, sectores sobrepoblados, la baja educación y baja sanidad, serían factores importantes para la infección. También se ha demostrado que la contaminación se hace de persona a persona, entre familiares, por vía oral – oral y oral- fecal, oral – aguas contaminadas, esta es la razón de encontrar esta bacteria también en una gran población de niños (Kusters, van Vliet et al. 2006)

5.1.7 EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR *H. PYLORI*

La infección por *H. pylori* ha sido demostrada en todo el mundo y afecta a todos los grupos de edad; se estima que el 50% de la población está infectada (13). La infección produce gastritis crónica, pero solo el 20% de ellos tendrá alguna enfermedad clínica (6). Esta infección crónica afecta a casi la mitad de la

población mundial; en los países en desarrollo su prevalencia es tan alta como del 90% mientras que en los países desarrollados, con excepción de Japón, la prevalencia es inferior al 40% (7, 9). En Colombia, las tasas de infección por *H. pylori* en adultos examinados por evaluación histopatológica y métodos serológicos va del 70% al 78% (8-12), siendo en nuestra población del Cauca de 83% (Proyecto ID Epidemiología Molecular del Cáncer Gástrico)

5.1.8 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR *H. PYLORI*.

Existen métodos directos e indirectos. El directo es demostrar la presencia de la bacteria mediante estudio de muestras obtenidas por biopsia gástrica mediante endoscopia. Este método también permite la detección de los cambios morfológicos producidos por la bacteria y los factores que acompañan la infección. Al demostrar la presencia de la bacteria, pueden realizarse cultivos para tipificar el microorganismo y determinar su sensibilidad frente a los agentes antimicrobianos. Estos resultados permiten además, fortalecer los estudios epidemiológicos y conocer el patrón de resistencia ante los diversos tratamientos que se realizan a los pacientes infectados. (Cohen and Laine 1997; Gisbert 2000; Gisbert, Calvet et al. 2013)

El método indirecto se basa en el estudio de ciertas características de la bacteria, como la capacidad de hidrolizar la úrea, llamada prueba de aliento y la otra es mediante la detección de anticuerpos específicos, para medir la respuesta del sistema inmunitario (serología). La prueba de aliento prueba confirma

precozmente la desaparición de la bacteria, tras el tratamiento, por lo tanto será más útil para confirmar su erradicación que la serología, ya que esta solo indica una exposición a la bacteria, pero no da información o no diferencia infección activa y enfermedad o individuos sanos con exposición. (Howden and Hunt 1998; Malfertheiner, Megraud et al. 2007)

5.1.9 TRATAMIENTO

El tratamiento del cáncer gástrico y de las lesiones gástricas ha tenido un gran giro en los años noventa con el descubrimiento del *HELICOBACTER PYLORI* y su relación con la etiopatogenia, el cual contemplaba el tratamiento con inhibidores de la bomba de protones (IBP), anti-H2 o procinéticos. Actualmente el tratamiento depende fundamentalmente de la presencia o no de infección por *H. pylori*. En pacientes positivos para dicha bacteria el pilar del tratamiento es la erradicación de la bacteria. (Tabla 1).

Los Científicos de todo el mundo comprometidos con el diagnóstico y el tratamiento de la infección por *H. pylori* realizan Conferencias Consenso, con el objetivo de actualizar y unificar los diagnósticos y tratamientos adecuados para la infección de este microorganismo. (Gisbert, Calvet et al. 2013).

En la tabla 1 se muestra los tratamientos erradicadores de *H. pylori* de elección y de rescate.

Tabla 1. Tratamiento erradicador de *H. pylori*

Tratamiento	Fármacos	Dosis y posología	Duración (días)
1ª línea (de elección)	IBP	Dosis estándar/12 h	7-10
	Claritromicina	500 mg/12 h	
	Amoxicilina*	1 g/12 h	7-10
2ª línea (tras fracaso de IBP + claritromicina + amoxicilina)	IBP	Dosis estándar/12 h	7-10
	Subcitrate de bismuto	120 mg/6 h	
	Tetraciclina clorhidrato	500 mg/6 h	
	Metronidazol	500 mg/8 h	
	o		
	IBP	Dosis estándar/12 h	10
3ª línea (tratamiento empírico, en ausencia de cultivo, tras haber empleado previamente claritromicina y metronidazol)	Amoxicilina	1 g/12 h	
	Levofloxacino	500 mg/12-24 h	
	o		
	IBP	Dosis estándar/12 h	7-14
	Amoxicilina	1 g/12 h	
	Rifabutina	150 mg/12 h	

IBP: inhibidores de la bomba de protones.

*En caso de alergia a la penicilina, la amoxicilina deberá ser sustituida por metronidazol 500 mg/12 h.

Tomado de Gisbert J. y Argila C. Úlcera péptica e infecciones por *H. Pylori* 3ª. Edición. 2014.

5.1.10 MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

Debido a su alta capacidad de adaptación las bacterias pueden desarrollar mecanismos de resistencia frente a los antibióticos. Existe una resistencia natural o intrínseca en las bacterias si carecen de diana para un antibiótico. La resistencia adquirida es la realmente importante desde un punto de vista clínico: es debida a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer

por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética. La primera puede ir seguida de la selección de las mutantes resistentes, pero la resistencia transmisible es la más importante, estando mediada por plásmidos, transposones o integrones, que pueden pasar de una bacteria a otra (Gutthann, Rodriguez et al. 1997).

Las bacterias se hacen resistentes a los antibióticos desarrollando mecanismos de resistencia que impiden al antibiótico ejercer su mecanismo de acción y esta resistencia es el gran problema en el tratamiento de las infecciones.

Dentro de los mecanismos de resistencia existen fundamentalmente tres:

1) Inactivación del antibiótico por enzimas: La bacteria produce enzimas que inactivan al antibiótico, este es el caso de las más importantes son las betalactamasas y muchas bacterias son capaces de producirlas. En los gram positivos suelen ser plasmídicas, inducibles y extracelulares y en las gram negativas de origen plasmídico o por transposones, constitutivas y periplásmicas. También hay enzimas modificantes de aminoglucósidos y aunque no es éste su principal mecanismo de resistencia, también el cloranfenicol, las tetraciclinas y los macrólidos pueden ser inactivados por enzimas.

2) Modificaciones bacterianas que impiden la llegada del antibiótico al punto diana: Las bacterias producen mutaciones en las porinas de la pared que impiden la entrada de ciertos antibióticos (betalactámicos) o alteran los sistemas de transporte (aminoglucósidos en los anaerobios). En otras ocasiones pueden

provocar la salida del antibiótico por un mecanismo de expulsión activa, impidiendo que se acumule en cantidad suficiente para que actúe eficazmente.

3) Alteración por parte de la bacteria de su punto diana, impidiendo o dificultando la acción del antibiótico. Aquí podemos contemplar las alteraciones a nivel del ADN girasa (resistencia de quinolonas), del ARNr 23S (macrólidos) de las enzimas PBPs (proteínas fijadoras de penicilina) necesarias para la formación de la pared celular (resistencia a betalactámicos). Una misma bacteria puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos de diversas especies bacterianas, todo lo cual complica sobremanera el estudio de las resistencias de las bacterias a los distintos antimicrobianos.

En esta revisión solo presentaremos la resistencia al metronidazol, puesto que realmente es el objetivo principal del presente trabajo.

5.1.11 LA RESISTENCIA AL METRONIDAZOL (MTZ)

Los 5-nitroimidazoles son prodrogras, que necesitan ser activadas dentro de la

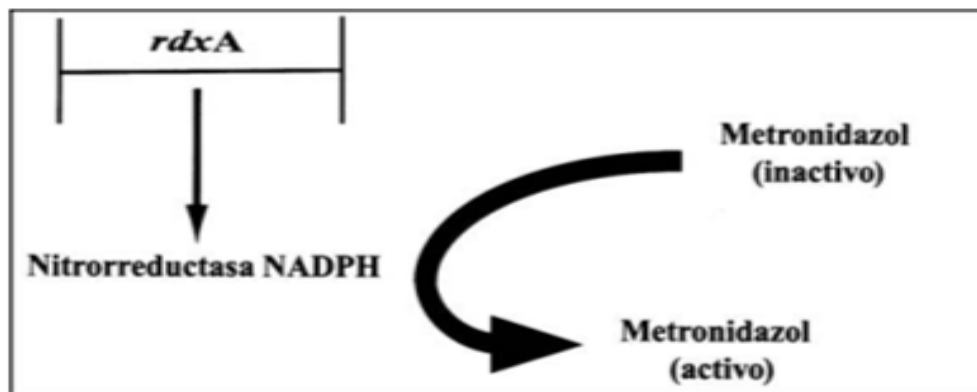


Figura 4. Activación del Metronidazol. Fuente: Kevin LA. Creation Research Society Quarterly, Vol. 41(4)318-326, 2005.

célula blanco. (Figura 4). La reducción del grupo nitro lleva a la generación de productos reactivos, principalmente radicales libres, que dañan estructuras celulares y el ADN por la producción de mutaciones letales. El proceso de activación del medicamento implica un proceso intracelular complejo; ya que el fundamento de la toxicidad selectiva de los 5-imidazoles depende del potencial redox intracelular.

Varios estudios han demostrado que *H. pylori* posee enzimas con características diferentes a las de los microorganismos anaerobios. Algunas investigaciones han demostrado la resistencia de *H. pylori* a los 5-nitroimidazoles y reportaron que las mutaciones en el gen que codifica para una nitroreductasa insensible al oxígeno (*rdxA*) produce resistencia debido a una inactivación de la nitroreductasa (85).

Adicionalmente, Otros reportes indican cuatro mecanismos de inactivación de *rdxA* en aislamientos clínicos de Francia y África del norte: mutaciones en el marco de lectura, mutaciones sin sentido, supresión de bases y presencia de una secuencia de inserción (mini-IS605) (88) Otros trabajos confirman el concepto de múltiples enzimas involucradas en la activación de estos medicamentos, en donde ferredoxin like protein (*fdxB*) y NAD(P)H flavin oxidoreductasa (*frxA*) contribuyen en la activación del metronidazol y que fenotipos resistentes están asociados con mutaciones en estos genes, finalmente ellos concluyen que otros sistemas pueden influir en la resistencia al metronidazol, y que por lo tanto comprender la resistencia de resistencia de *H. pylori* a metronidazol y otros 5-nitroimidazoles

requiere más estudios (18,63,67), recientemente se ha encontrado que la bomba de expulsión TolC juega un papel en la resistencia a este grupo de medicamentos (89 y 90)

Las tasas de resistencia han venido incrementándose mundialmente, con variaciones entre áreas geográficas, oscilando entre 10 – 40 % en países desarrollados y 30 – 90 % en países en vía de desarrollo, en especial cifras elevadas se han detectado en países africanos, de América del sur y Asia, probablemente debido a su frecuente uso como antiparasitario. Las tasas de resistencia tienden a ser más altas en mujeres, probablemente por su utilización previa en infecciones ginecológicas (8,9,19,91). En Colombia un estudio realizado en 1997 encontró una prevalencia de resistencia primaria de 84% (42), otro estudio realizado por Henao en 2009 reportó una prevalencia de 72% en la ciudad de Bogotá (43,84) encontraron 88% y 82% de resistencia en las ciudades de Manizales, Armenia y Pereira (84).

En general lo que se ha observado en Colombia son altas prevalencias de resistencia a metronidazol, influenciado quizás por su utilización en el manejo de infecciones parasitarias e infecciones vaginales, incluso de todos los contaminantes emergentes, los que probablemente suscitan mayor preocupación y estudio en los últimos años son los fármacos y, en particular, los antibióticos. (92)

CAPITULO III

6. METODOLOGÍA

6.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Un total de 627 pacientes remitidos a endoscopia digestiva alta a las unidades de gastroenterología de los Hospitales Universitario San José, Susana López de Valencia y a la Unidad ENDOVIDEO 2000 en la ciudad de Popayán; fueron incluidos prospectivamente desde octubre de 2011 a junio del 2013, con los siguientes criterios de inclusión: mayores de 18 años, nacidos en el departamento del Cauca con síntomas de dispepsia, que no hubiesen recibido tratamiento de erradicación de *H. pylori*, ni antibióticos o sales de bismuto durante el último año. Los pacientes que aceptaron participar en el estudio firmaron consentimiento informado, después de una explicación clara del estudio, según lo dispuesto en la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud. Esta investigación fue aprobada por el Comité de Ética de la Universidad del Cauca y la Pontificia Universidad Javeriana. Adicionalmente, los participantes respondieron un cuestionario estandarizado sobre las variables socio-demográficas y clínicas incluidas en el estudio.

De cada paciente se tomaron dos biopsias del antro (una de la curva mayor y una de la curva menor), dos del cuerpo (una de la curva mayor y una de la curva

menor) y una de la incisura angularis, acorde con la guías internacionales para el estudio del Cáncer Gástrico (Stolte and Meining 2001). El análisis histopatológico se realizó acorde con sistemas de clasificación validados internacionalmente (Dixon, Genta et al. 1996). Adicionalmente, se tomó una muestra de antro, una de incisura angularis y una de cuerpo para la extracción de ADN y detección de *H. pylori*.

6.2 EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN POR PCR

Las muestras de biopsias gástricas fueron colocadas y transportadas en medio de cultivo caldo brucella con 20% de glicerol. El ADN genómico bacteriano fue extraído usando el Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ADN fue reconstituido en 100 µL de solución de rehidratación y almacenadas a – 30 °C hasta su uso.

La calidad del ADN se determinó por medio de la relación de absorbancia A260/A280, usando un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop 2000™.

La presencia de *H. pylori* se determinó por los alelos s y m del gen vacA, según metodología descrita previamente (Acosta, Hurtado et al. 2014). Fue utilizada la prueba PCR múltiplex, empleando el estuche Qiagen Multiplex PCR® para amplificar los genes vacA y

CagA, con las secuencias de cebadores: vacA s F 5' –

ATGGAAATACAACAAACACAC – 3'; R 5' - CTGCTTGAATGCGCCAAAC – 3';

vacA m F 5' - CAA TCT GTC CAA TCA AGC GAG – 3'; R 5' - GCG TCT AAA TAA TTC CAA GG – 3' y cagA F5'-GTTGATAACGCTGTCGCTTC-3', R 5'-GGGTTGTATGATATTTTCCATAA'3'. La reacción incluyó una mezcla de 2 µl de ADN genómico bacteriano, 1x de Qiagen Master Mix®, 0,3 pmol/µl de cada cebador, 2 µl de agua libre de RNAsas en un volumen de 12 µl de reacción. Los productos de amplificación se evidenciaron en geles de agarosa al 1,5 % por tinción con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta, teniendo como referencia las bandas de amplificación de las cepas NCTC 11637 (genotipo: *cagA*, *vacA* s1/m1) y 3062 (genotipo: *cagA* negativo, *vacA* s2/m2) de *H. pylori*.

6.3 ANÁLISIS DE LOS GENES *rdxA* y *frxA*

Para el presente estudio, del banco de muestras de 627 pacientes remitidos a endoscopia, se seleccionaron para los respectivos análisis, 170 muestras para amplificación del gen *rdxA* (nitroreductasa NAPD-H insensible a oxígeno) y 230 del gen *frxA* NAD(P)H Flavin oxidoreductasa, positivas para *H. pylori* definidas por histopatología y mediante la genotipificación del gen *vacA* utilizando los iniciadores *rdxA* F 5'- GACAATTATTAAACGAGCGC-3' y *rdxA* R 5'- CCTCCAATAATGCAACTATC-3' correspondiente a las posiciones 1013697 – 1014157 de la cepa de referencia 26695 acceso genbank (gb|CP003904.1) reportados por Kwon, et al. (Kwon, Hulten et al. 2001), que generan un fragmento de 460pb. Adicionalmente se amplificó un fragmento de 450 pb del gen *frxA* con

los iniciadores frxA-F (FLVN-A) 5'-ACAAGTGGTTGCTTTACAGC-3' y frxA-R (FLVN-B) 5'-GCCGCTGCCATCATCATGTT-3' reportados por Kwon DH, et al 2000 (67) correspondientes a las posiciones del gen HP0642. 687950 – 688399 Acceso gb|CP003904.1.

Para PCR se usó una mezcla con 3,2 U de ADN polimerasa Taq recombinante (Invitrogen™ Brasil), 8 µl de ADN genómico bacteriano, 0,5 pmol/µl de cada cebador, 1,0X de tampón de reacción proporcionado por el fabricante (Invitrogen™ Brasil), 1,5 mmol/l de MgCl₂, 0,5 mmol/l de cada deoxinucleótido trifosfato (dNTP) (Amersham Pharmacia Biotech, Inc.) en un volumen final de 50 µl de reacción.

Las muestras fueron colocadas en termociclador (MyCycler Thermal Cycler™, BIORAD) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial durante 5 min a 95 °C, 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 35 s, hibridación a 53 °C por 45 s y extensión a 72 °C por 35 s, y extensión final a 72 °C durante 7 min.

Los productos de amplificación de 460pb y 450pb se evidenciaron en geles de agarosa al 2 % por tinción con bromuro de etidio bajo luz ultravioleta y por comparación con la banda de amplificación de la cepa de *H. pylori* NCTC 11638.

Las muestras para la evaluación de mutaciones fueron seleccionadas para criterios de amplificación de PCR mediante intensidad de la banda. Estos productos amplificados fueron enviados para purificación y secuenciación en MacroGen® (Corea) Inc. Company. Este proceso se realizó usando el primer

RdxA-F y el primer FrxA-F respectivamente, según recomendación de la página de MacroGen la cantidad de muestra requerida para el análisis de secuencia fue 50uL 20ng/uL de producto de PCR.

Los resultados se hacen disponibles en forma de archivo comprimido depositado en un servidor de forma que el usuario recibe por correo-e un enlace privado, que le permite acceder a dicho archivo. Una vez descomprimido el archivo de resultados se obtiene un archivo individual por cada electroferograma en formato *.ab1, txt, que fue usado para el análisis. Para los análisis de mutaciones y efecto posible de la proteína, de las 230 muestras secuenciadas del gen *frxA* y 170 del gen *rdxA* se escogieron 127 de cada gen, debido a que algunos electroferogramas presentaban especificidades y tuvieron baja homología con la proteína. Se tuvo en cuenta para esta selección, la homología de secuencias entre el 95 -100%, partiendo de los análisis de comparación entre electroforesis (fotos), y cromatogramas. (Anexo 1)

Posteriormente, se realizó en análisis de las secuencias mediante la herramienta BLASTn y BLASTx (Basic Local Alignment Search Tool – <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), usando los archivos en formato FASTA enviados desde Corea. Se anotó las mutaciones y cambios de aminoácidos en la proteína RdxA y FrxA para identificar cambios más frecuentes en las proteínas y aquellos que por la literatura estuvieran asociados con resistencia a Metronidazol, ya sea por altos valores de MIC o por ensayos de mutagénesis dirigida en cepas de

referencia. Por tanto, se utilizó para comparar las cepas reportadas en el gen bank 26695 gi|9858509|gb|AF180408.1| para frxA NP_207436.1 y la cepa gi|17225145| gb|AAL37269.1|AF322971_1, con el fin de comparar las secuencias de nucleótidos de los productos de PCR de la región amplificada con la secuencia reportada en el GenBank HP26695 (Bereswill, Krainick et al. 2003), se registraron los cambios relacionados con codones de parada y mutaciones de cambio de aminoácidos.

Otras comparaciones de secuencias de proteínas y para reportar los cambios más significativos en la nitroreductasa RdxA y la NADPH-flavin oxidoreductase FrxA se utilizó el software CLUSTAL OMEGA W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/>). Y T COFFEE (<http://tcoffee.crg.cat/> (<http://tcoffee.crg.cat/>), útiles para los alineamiento múltiples. (Figura 7).

Para los análisis estadísticos se usó el programa SPSS v19.0 (IBM SPSS Inc, Chicago, IL, USA) para ingresar las variables sociodemográficas,, genotipos vacA y cagA de *H. pylori*. Se realizó un análisis estadístico mediante la prueba χ^2 con y se consideró significativo las diferencias con un valor de $P < 0.05$.

CAPÍTULO IV

7. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

El total de muestras seleccionadas para el estudio de mutaciones y efecto de las proteínas fueron 127 de cada gen, seleccionadas bajo los criterios de electroforesis positivas correspondientes a cromatogramas de buena calidad e información en cuanto a homología. (Ver anexo 1.)

A todos los pacientes incluidos en presente estudio se les diagnosticó la infección por *H. pylori* mediante estudio histopatológico, de acuerdo a normas internacionales y todos son positivos para la infección y se les confirmo la lesión gástrica presente en cada uno de ellos.

Todas las muestras fueron genotipificadas. El genotipo más frecuente en esta población fue *vacA* s1/m1 *cagA* negativo, (48,6 %), seguido por el genotipo *vacA* s1/m1 *cagA* positivo (37.9%) y el resto presentaron diferentes combinaciones de los genotipos *vacA* y *cagA*. Finalmente se encontró un 2 % de infecciones múltiples.

7.1 CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS Y CLÍNICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIO.

Tabla 2 Características sociodemográfico de 127 pacientes de una Población del Dpto. del Cauca.

Característica	n (%)
Genero	
Masculino	51 (40,2)
Femenino	76 (59,8)
Edad	
18 – 40 años	34 (26,8)
41 – 60 años	76 (59,8)
61 – >71 años	17 (13,4)
Procedencia	
Urbano	74 (58,3)
Rural	53 (41,4)
Nivel de educación	
Primaria	63 (49,6)
Secundaria	35 (27,6)
Técnico	6 (4,7)
Superior	18 (14,2)
Etnia	
Indígena	3 (2,4)
Negra	1 (0,8)
Mestiza	123 (96,9)
Antecedentes familiares	
No	55 (43,3)
Si	62 (48,8)
Ns/ Nr	10 (7,9)

Este grupo de pacientes presenta una edad entre 18 y 76 años, promedio $46,9 \pm 12,4$, la mayoría mujeres 76 (59,8%). la mayoría provienen del área urbana 74 (58,3%) y nivel educativo de esta población es de primaria 63 (49,9%) y en su mayoría amas de casa. (Tabla 2)

Los resultados sociodemográficos del presente trabajo coinciden con muchas otras investigaciones, incluyendo los trabajos de investigadores colombianos, los cuales reportan una alta infección por *H. pylori* en lesiones preneoplásicas, asociándose a características como la edad, género, nivel educativo y socioeconómico (Aldana, Kato et al. 2005; Chávez, Caballero et al. 2013; Montaña, Dossman et al. 2013). Sin embargo, existen controversias al respecto de la prevalencia de la infección y los resultados sociodemográficos, principalmente las que se han estudiado en diferentes áreas geográficas (Aldana, Kato et al. 2005). De acuerdo a estos resultados y la de otros investigadores sugiere hacer estudios de prevalencia de la infección teniendo en cuenta las áreas geográficas, mejorar los estudios epidemiológicos y educativos, además hacer seguimiento a los tratamientos tanto de erradicación de *H. pylori* como también a su resistencia.

7.2 DISTRIBUCIÓN DE MUTACIONES

7.2.1 MUTACIONES EN LA PROTEÍNA *NITROREDUCTASA RDXA*, CODIFICADA POR EL GEN *rdxA* DE *H. PYLORI*.

En el anexo 2 y figura 6. Se muestra la frecuencia y tipo de mutaciones en la proteína nitroreductasa RdxA en las diferentes posiciones. Las mutación más relevantes fueron: D59N (118 muestras); R90K (102 muestras); seguido por R131K (91 muestras); en A118T (45); G98S (27 muestras); H97T (22 muestras) y para los codones de parada: Q50*(5) ; 4 en E75*, 4 C159*, en 3 en I160* y 2 en la posición I62*. 127 muestras de 127 (100%), presentaron por lo menos 2 a 3 mutaciones y aproximadamente el 80% relacionadas con la resistencia a metronidazol según la literatura, teniendo en cuenta que se ha encontrado que mutaciones puntuales como R90K y R131K, en la nitroreductasa RdxA están relacionadas con la resistencia a metronidazol (Goodwin, Kersulyte et al. 1998; Kwon, Kato et al. 2000; Mendz and Mégraud 2002; Bereswill, Krainick et al. 2003; Aldana, Kato et al. 2005; Mirzaei, Poursina et al. 2014) y mutaciones que generan codones de parada están asociados con la presencia de valores altos de MIC (Concentración Inhibitoria Mínima) (Goodwin, Kersulyte et al. 1998; Solcà, Bernasconi et al. 2000; Kwon, Hulten et al. 2001).

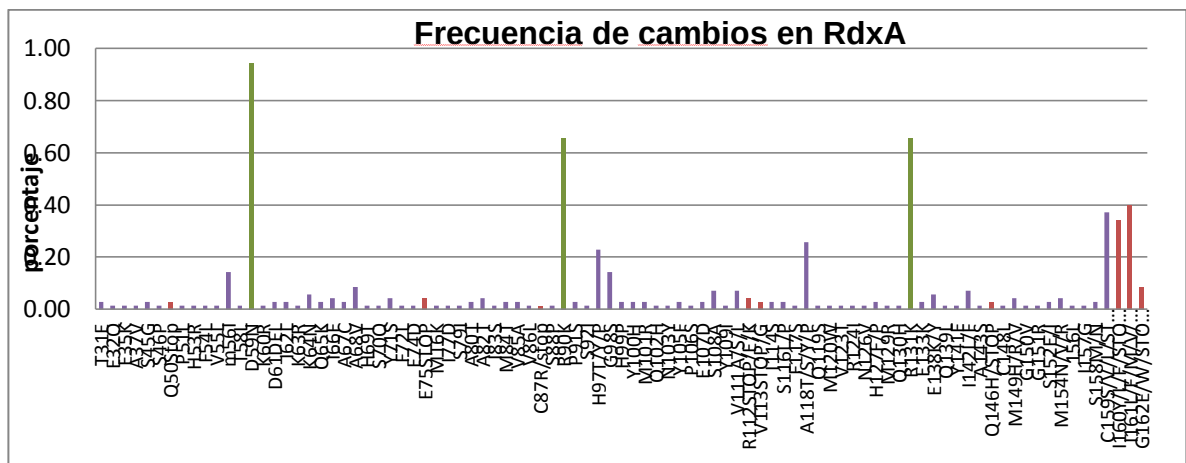


Figura 6 Frecuencia de cambios en RdxA

Mediante el software clustalw, fueron analizados los diferentes cambios en la proteína de las muestras seleccionadas, encontrándose la presencia de al menos un cambio de aminoácido comparando la cepa de referencia 11638 en la secuencia de la nitroreductasa RdxA. Tres regiones de mayor variabilidad en las posiciones R90, H97, R131, se observaron, codones de terminación en las posiciones 50, 78 y 102 y en la posición 133, se encuentra una doble sustitución que forma un cambio en el marco de lectura.

7.2.2 PROTEÍNA FLAVIN OXIDOREDUCTASA , CODIFICADA POR EL GEN frxA DE *H. PYLORI*

En el presente estudio se encontró mutaciones en todas las muestras analizadas, unas con mayor frecuencia que otras en las posiciones 21 a la 155 de la proteína FrxA. Ver Figura 7 y anexo 3.

En el anexo 3 se observan los resultados encontrados con respecto a la frecuencia y tipo de mutaciones de la proteína FrxA, correspondiéndose en algunas muestras, a lo encontrado en la literatura (Young, Muller et al. 1983; Goodwin, Kersulyte et al. 1998; Jenks, Ferrero et al. 1999; Kwon, El-Zaatari et al. 2000; Kwon, Kato et al. 2000; Mendz and Mégraud 2002; Han, Liu et al. 2007; Reyes-Zamora, Hernández-Power et al. 2011; Hussain, Shaik et al. 2012; Mirzaei, Poursina et al. 2016), donde se presenta mutaciones sin sentido, con sentido erróneo, aceptable, parcialmente inaceptable, inaceptable y corrimiento de lectura (frameshift).

Los cambios en la secuencia de la proteína FrxA, algunos reportados en la Literatura y otros nuevos se muestran en el anexo 3. (Goodwin, Kersulyte et al. 1998; Jenks, Ferrero et al. 1999; Kwon, El-Zaatari et al. 2000; Kwon, Kato et al. 2000; Bereswill, Krainick et al. 2003; Marais, Bilardi et al. 2003; Han, Liu et al. 2007; Binh, Suzuki et al. 2015; Mirzaei, Poursina et al. 2016),

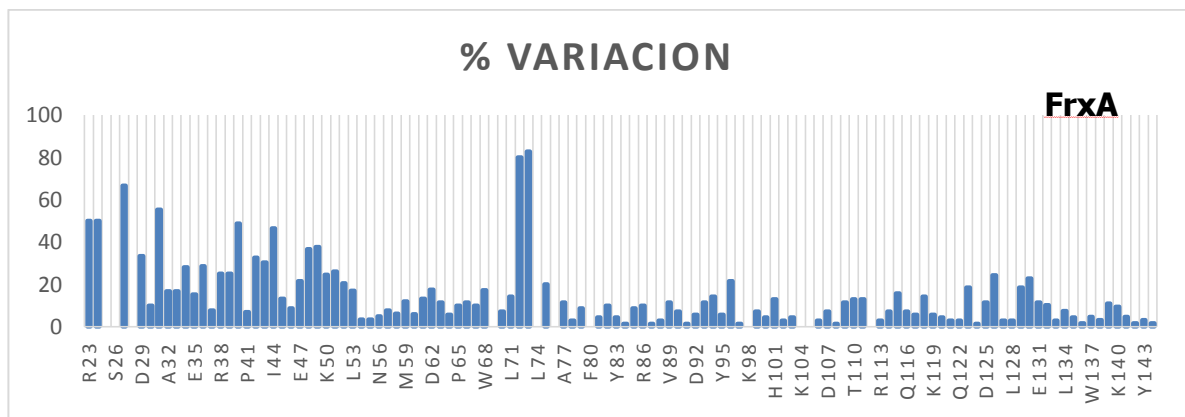


Figura 7. Frecuencias de las mutaciones de la proteína FrxA

Los cambios más representativos y de mayor frecuencia, son S73G (75.7%), S72F (74.29%), V44_ (varios cambios) 55.7%, M126_ (varios cambios) 23%, W49_(varios cambios), 25%, S130_ (varios cambios) 21.4%, M129_ varios cambios) 19%, S42_ (varios cambios) 20% y otras de menor frecuencia mostradas en la figura 1. En el presente estudio también se observó varias mutaciones sin sentido provocando codones de parada en varias posiciones L39*, W49*, K119* (2), E131* (3), W137* y Y143*.

En cuanto a la relación de mutaciones y el estado sociodemográfico que presenta los pacientes del presente estudio se encontró que las mujeres presentaron 57 % de las cepas con mutaciones en los genes *rdxA* y *frdxA* de *H. pylori*, al igual que un mayor número de cepas con mutaciones a partir de los 42 años. La mayoría de las cepas con mutaciones se presentaron en pacientes del área urbana. Dado el

número de los pacientes que presentaban mutación, no se realizó un análisis estadístico comparativo entre los grupos.

7.2.3 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS RELACIONADAS CON LA NITROREDUCTASA RDXA Y FLAVIN OXIDOREDUCTASA FRXA.

Las secuencias obtenidas de los fragmento de los genes *rdxA* y *frxA* se analizaron con el programa blastx (NCBI) teniendo en cuenta una alta identidad con las secuencias de la Nitroreductasa RdxA y Flavin oxidoreductasa *FrxA*. (Similitud >99 %). Anexo 1, 4 y 5

Nuestro estudio mostró un gran número de mutaciones en las muestras analizadas, tanto para RdxA como par FrxA. Para la Nitroreductasa RdxA estos hallazgos son similares a los reportados por Solcà, *et al.* (van Doorn, Glupczynski et al. 2001), en que la proteína RdxA presenta hiper variabilidad en más del 50% de su secuencia, comparada con otros genes constitutivos de *H. pylori*. Las mutaciones relacionadas con el cambio en el marco de lectura (frameshift) fueron asociadas con Inserciones en la posición A- 141; A-135 y A-193 que provocan codones de parada en la proteína RdxA en las posiciones D59* Q50* y E74* respectivamente. Además se presentaron sustituciones C → T en la posición 148 y T → G en la posición 223 ocasionando proteínas truncadas en las posiciones Q

50* y E75* respectivamente. Estos datos solo se describen, no se muestran debido que están en un manuscrito aceptado para publicación.

Se ha sugerido que la resistencia de *H. pylori* a metronidazol se da por la inhibición de la actividad de las nitroductasas, jugando un papel importante las mutaciones en el gen *rdxA*, las cuales comprometen la estabilidad de la proteína, puesto que su actividad enzimática depende de la unión al cofactor FMN (flavin mono nucleotido) (Gerrits, van Vliet et al. 2006; Martínez-Júlvez, Rojas et al. 2012). Las mutaciones que afectan las posiciones V68A, T118A, R90K, R131K, R16H, S88P, H97T, y las que introducen un codón de parada como N73* y Q50*, han sido correlacionadas con los estudios fenotípicos de resistencia, a metronidazol (Goodwin, Kersulyte et al. 1998; Kwon, Kato et al. 2000; Bereswill, Krainick et al. 2003)

Para la Flavin oxidoreductasa *FrdxA*, algunos hallazgos son reportados por varios investigadores (Kwon, Kato et al. 2000; Han, Liu et al. 2007; Mirzaei, Poursina et al. 2016) y se conoce que las mutaciones tienen diferentes efectos sobre las proteínas, y depende del tipo y el aminoácido cambiado, para desestabilizar sus estructuras secundarias, terciarias, etc., y perder su funcionalidad. Las mutaciones abajo relacionadas también han sido reportadas por Mirzaei N (Mirzaei, Poursina et al. 2016), mutaciones como las sustituciones de la posición V44I, R32Q, V34F, V96I son neutras y no tienen ningún impacto en la secuencia de la proteína, mientras que otros, incluyendo A40S, S43I, A138T, Q141K, son deletéreas y

éstas son importantes para la identificación de alelos de resistencia asociado en NADPH proteína flavina oxidoreductasa.

Los resultados de esta investigación son diversos, sugiriendo que muchas de estas mutaciones pueden ser al azar, y otras las más frecuentes y que conservan los mismos cambios, pueden ser de gran importancia para el estudio de resistencia al metronidazol.

Mendz y Megraud en el 2002 y 2003, analizan las mutaciones de los genes *rdxA* y *frxA* y reportaron un buen grupo de mutaciones, que sugiriendo que estas inducen la pérdida de la función de la proteína (Mendz and Mégraud 2002; Megraud, Coenen et al. 2013), estos datos coinciden con los encontrados en nuestro estudio, especialmente las mutaciones en las posiciones 56, 59, 90, 97, y 118 de RdxA y 39, 40, 44, 71,72,73 de FrxA las cuales se han documentado cambios en los diferentes aislamientos.

También se ha reportado que, aunque algunos aislamientos poseen mutaciones asociadas a resistencia, la distribución de las sustituciones en las proteínas RdxA y FrxA son arbitraria y los aislamientos resistentes y sensibles obtenidos del mismo paciente tienen secuencias idénticas. Por lo tanto, esto confirmaría un uso limitado de las mutaciones en *rdxA* y *frxA* como marcador de resistencia a metronidazol en *H. pylori* (Bereswill, Krainick et al. 2003). (Solcà, Bernasconi et al. 2000).

Los resultados genotípicos de los genes y de la proteína RdxA y FrxA son esenciales para la activación de metronidazol, aunque según varios reportes existen otra enzima *RpsU* con función en la resistencia a metronidazol (Binh, Suzuki et al. 2015).

El primer hallazgo importante del presente estudio fue describir por primera vez la frecuencia de las mutaciones en las proteínas nitroreductasa RdxA y la flavin oxidoreductasa FrxA en pacientes infectados por *H. pylori* del departamento del Cauca. En esta zona del país se ha reportado alta prevalencia de *H. pylori*, y se sugiere que los aislamientos circulantes en esta población están expuestos a presión de selección dado el uso indiscriminado de antimicrobianos del tipo nitroimidazoles como tratamiento anti parasitario, en infecciones gastrointestinales, y especialmente infecciones urinarias y vaginales en las mujeres, por lo que se debe realizar estudios para monitorear las tasas de erradicación de *H. pylori* en poblaciones con riesgo de cáncer gástrico (32).

La alta frecuencia de mutaciones en nitroreductasa RdxA (80%) y Flavin oxidoreductasa FrxA (100%), podría estar relacionadas con la resistencia a metronidazol, aunque deben realizarse estudios fenotípicos adicionales para relacionar los resultados de los análisis genéticos obtenidos con las concentraciones mínimas inhibitorias al antibiótico.

Se ha estudiado la combinación de metronidazol con otros antibióticos, pero se ha observado que la resistencia de la bacteria a metronidazol es una causa de la falla terapéutica cuando se utiliza en el esquema de tratamiento convencional frente a las lesiones gástricas (Megraud and Lamouliatte 2003; Malfertheiner, Megraud et al. 2007; Graham and Fischbach 2010; Greenberg, Anderson et al. 2011; Rimbara, Fischbach et al. 2011; Heo and Jeon 2014). (Camargo, García et al. 2014). Trespacios, *et al.* (Trespacios, Otero et al. 2010).

Mediante métodos fenotípicos (dilución en agar) en Bogotá se ha evaluado la resistencia al metronidazol, reportándose una prevalencia del 81% y en Pereira de 88% (Álvarez, Moncayo et al. 2009; Teh, Khosravi et al. 2014), indicando que la prevalencia de resistencia a nitroimidazol en las diferentes poblaciones colombianas alcanza los límites máximos del 40% recomendado por el consenso europeo de Maastricht IV (Malfertheiner, Megraud et al. 2012; Almeida, Donato et al. 2015). De acuerdo a este consenso en áreas geográficas en donde la prevalencia de resistencia sea superior a 40%, el metronidazol no puede ser utilizado en terapias empíricas que contengan este antimicrobiano (Almeida, Donato et al. 2015).

Otros estudios latinoamericanos diferentes a nuestros datos y a los ya descritos anteriormente, se presentaron en Chile reportándose una resistencia a metronidazol de 44.9%, en una región de México del 37.1% evaluado mediante la técnica de E-test (Ogata, Gales et al. 2014) Estas diferencias entre poblaciones,

indican la importancia de monitorear los niveles de resistencia regional y local, ya que por áreas geográficas existen diferencias en la prevalencia de la resistencia, lo que significa que los resultados obtenidos en una región difieren de otras, por lo tanto, es importante conocer los niveles de resistencia del microorganismo a los antibióticos usualmente utilizados en los esquemas de erradicación; con el fin de elegir esquemas eficaces de tratamiento y replantear los esquemas de antibióticos a utilizar como terapia empírica (Camargo, García et al. 2014).

El principal reto para nuevos estudios es poder realizar un análisis de antibiograma de las muestras evaluadas, además, analizar las historias clínicas, que nos permita ver el seguimiento realizado por el médico tratante y relacionar estos datos con nuestros hallazgos en esta investigación. Por lo que se propone realizar cultivo bacteriano como una herramienta necesaria en estos pacientes con falla en el tratamiento según lo recomendado por Malfertheiner, *et al.* (Malfertheiner, Megraud et al. 2012). Sin embargo el análisis de las mutaciones de las proteína RdxA y FrxA es un importante hallazgo que permite analizar la resistencia en un gran número de muestras en poblaciones como Popayán donde los estudios son escasos y además, no se dispone de las condiciones para cultivar la bacteria.

Se plantea que dada la alta tasa de incidencia de enfermedad gastroduodenal en Popayán, Cauca, los resultados encontrados en la presente investigación son de

gran impacto para nuestra región y nuestro país, sugiriendo fuertemente que debemos seguir evaluando la eficacia del metronidazol e investigar nuevos esquemas de tratamiento para erradicar la infección por *H. pylori*.

8. CONCLUSIONES

Este estudio sugiere se establezca un buen diseño para el tratamiento de las infección de *H. pylori* con antimicrobianos antes de iniciarse, para lograr una mejor integración entre la evaluación microbiológica y uso clínico de antimicrobianos, con el fin de contribuir al éxito de la erradicación de *H. pylori*, minimizando así el riesgo de cronicidad y en consecuencia las complicaciones

La caracterización de los mecanismos de resistencia en cada región es un importante objetivo de este tipo de investigaciones, porque permitirán en un futuro, el desarrollo de métodos eficaces de detección de resistencia, lo cual puede ser aprovechado por los clínicos para seleccionar el esquema de tratamiento para controlar la infección.

El presente estudio confirma que las mutaciones en los genes *rdxA* y *frxA* están asociadas a la resistencia de *H. pylori* con metronidazol.

9. RECOMENDACIONES

Los resultados de este trabajo sugieren más estudios que permitan entender la base molecular de los efectos de las variaciones genéticas en el fenotipo en todos los genes de *H. pylori* que son relevantes para la resistencia a los antibióticos recomendados para su erradicación.

Es importante aprovechar las herramientas bioinformáticas, junto con los datos experimentales ya que permiten encontrar evidencia de que la mutación en los genes *rdxA* y *frxA* causa cambios en la estabilidad y la función de la proteína, como lo muestra someramente el presente trabajo

Teniendo en cuenta la alta tasa de resistencia encontrada en el presente estudio, considero que los resultados del presente estudio sugieren que el MTZ no debería ser incluido en las terapias de erradicación de *H. pylori* ya que la prevalencia de la resistencia está por encima del 40% y ello puede afectar negativamente la eficacia del tratamiento.

Es importante para nuestro país que las entidades promotoras de salud, patrocinen este tipo de estudios que permiten seguir la evolución de la resistencia de esta bacteria, para lograr un mejor esquema de tratamiento.

10. BIBLIOGRAFIA

- ACOSTA, C P, et al. (2006). "*HELICOBACTER PYLORI*: Infección y Enfermedad." Popayán, Colombia, Diciembre **15**.
- ACOSTA, C P, et al. (2014). "Determinación de mutaciones de un solo nucleótido en el gen 23S rRNA de *HELICOBACTER PYLORI* relacionadas con resistencia a claritromicina en una población del departamento del Cauca, Colombia." Biomédica **34**(Supl 1): 156-162.
- AHUJA, V y SHARMA, M P (2002). "High recurrence rate of *HELICOBACTER PYLORI* infection in developing countries." Gastroenterology **123**(2): 653-654.
- ALDANA, L P, et al. (2005). "In vitro induction of resistance to metronidazole, and analysis of mutations in rdxA and frxA genes from *HELICOBACTER PYLORI* isolates." Journal of infection and chemotherapy **11**(2): 59-63.
- ALMEIDA, N, et al. (2015). "Beyond Maastricht IV: are standard empiric triple therapies for *HELICOBACTER PYLORI* still useful in a South-European country?" BMC gastroenterology **15**(1): 23.
- ÁLVAREZ, A, et al. (2009). "Antimicrobial susceptibility and mutations involved in clarithromycin resistance in *HELICOBACTER PYLORI* isolates from patients in the western central region of Colombia." Antimicrobial agents and chemotherapy **53**(9): 4022-4024.
- ASAKA, M, et al. (2010). "Guidelines for the management of *HELICOBACTER PYLORI* infection in Japan: 2009 revised edition." Helicobacter **15**(1): 1-20.
- ASAKA, M, et al. (1997). "What role does *HELICOBACTER PYLORI* play in gastric cancer?" Gastroenterology **113**(6): S56-S60.
- BERESWILL, S, et al. (2003). "Analysis of the rdxA gene in high-level metronidazole-resistant clinical isolates confirms a limited use of rdxA mutations as a marker for prediction of metronidazole resistance in *HELICOBACTER PYLORI*." FEMS Immunology & Medical Microbiology **36**(3): 193-198.
- BERESWILL, S, et al. (2003). "Analysis of the rdxA gene in high-level metronidazole-resistant clinical isolates confirms a limited use of rdxA mutations as a marker for prediction of metronidazole resistance in *HELICOBACTER PYLORI*." FEMS Immunology & Medical Microbiology **36**(3): 193-198.
- BINH, T T, et al. (2015). "Search for novel candidate mutations for metronidazole resistance in *HELICOBACTER PYLORI* using next-generation sequencing." Antimicrobial agents and chemotherapy **59**(4): 2343-2348.
- BRAVO, L E, et al. (2003). "*HELICOBACTER PYLORI*: patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia."
- CAMARGO, M C, et al. (2014). "The problem of *HELICOBACTER PYLORI* resistance to antibiotics: a systematic review in Latin America." The American journal of gastroenterology **109**(4): 485-495.
- CANCER, I A F R O y ORGANIZATION, W H (1994). "Schistosomes, liver flukes and *HELICOBACTER PYLORI*." IARC Monogr Eval Carcinog Risk Hum **61**: 177-241.
- COHEN, H y LAINE, L (1997). "Endoscopic methods for the diagnosis of *HELICOBACTER PYLORI*." Alimentary pharmacology & therapeutics **11**(S1): 3-9.
- CORREA, P (1992). "Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process—first American Cancer Society award lecture on cancer epidemiology and prevention." Cancer research **52**(24): 6735-6740.

- CORREA, P, et al. (1970). "Carcinoma and intestinal metaplasia of the stomach in Colombian migrants." Journal of the National Cancer Institute **44**(2): 297-306.
- CHÁVEZ, A R, et al. (2013). "Infección por *HELICOBACTER PYLORI* en pacientes atendidos en el Hospital General Docente Iván Portuondo." Panorama Cuba y Salud **8**(3): 26-32.
- CHUAH, S-K, et al. (2011). "A new look at anti-*HELICOBACTER PYLORI* therapy." World J Gastroenterol **17**(35): 3971-3975.
- DIDELOT, X, et al. (2012). "Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing." Nature Reviews Genetics **13**(9): 601-612.
- DIXON, M F, et al. (1996). "Classification and grading of gastritis: the updated Sydney system." The American journal of surgical pathology **20**(10): 1161-1181.
- FIGUEROA, M, et al. (2012). "Sensibilidad in vitro a amoxicilina y claritromicina de *HELICOBACTER PYLORI* obtenido de biopsias gástricas de pacientes en zona de bajo riesgo para cáncer gástrico." Biomédica **32**(1): 32-42.
- GARZA-GONZÁLEZ, E, et al. (2014). "A review of *HELICOBACTER PYLORI* diagnosis, treatment, and methods to detect eradication." World J Gastroenterol **20**(6): 1438-1449.
- GATTA, L, et al. (2012). "Treatment of *HELICOBACTER PYLORI* in Latin America." The Lancet **379**(9814): 407-408.
- GENÉ, E, et al. (2008). "Manejo de la infección por *HELICOBACTER PYLORI* en atención primaria en España." Gastroenterología y hepatología **31**(6): 327-334.
- GERRITS, M M, et al. (2006). "*HELICOBACTER PYLORI* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications." The Lancet infectious diseases **6**(11): 699-709.
- GISBERT, J (2000). "Diagnóstico de la infección por *HELICOBACTER PYLORI*." Revista clinica espanola **200**(7): 370-372.
- GISBERT, J, et al. (1996). ". POR QUE, CUANDO Y COMO TRATAR LA INFECCION POR *HELICOBACTER PYLORI* EN LA ENFERMEDAD ULCEROSA GASTRODUODENAL?" Revista clinica espanola **196**(9): 610-621.
- GISBERT, J P, et al. (2013). "III Conferencia Española de Consenso sobre la infección por *HELICOBACTER PYLORI*." Gastroenterol Hepatol **36**(5): 340-374.
- GONZÁLEZ, C, et al. (2001). "Susceptibilidad in vitro de cepas de *HELICOBACTER PYLORI*: aislamiento de cepas resistentes a claritromicina." Revista médica de Chile **129**(6): 643-646.
- GOODWIN, A, et al. (1998). "Metronidazole resistance in *HELICOBACTER PYLORI* is due to null mutations in a gene (rdxA) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase." Molecular microbiology **28**(2): 383-393.
- GRAHAM, D Y y FISCHBACH, L (2010). "*HELICOBACTER PYLORI* treatment in the era of increasing antibiotic resistance." Gut: gut. 2009.192757.
- GRAHAM, D Y y SHIOTANI, A (2008). "New concepts of resistance in the treatment of *HELICOBACTER PYLORI* infections." Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology **5**(6): 321-331.
- GREENBERG, E R, et al. (2011). "14-day triple, 5-day concomitant, and 10-day sequential therapies for *HELICOBACTER PYLORI* infection in seven Latin American sites: a randomised trial." The Lancet **378**(9790): 507-514.
- GUTIÉRREZ, O y OTERO, W (1998). "Resistencia de *HELICOBACTER PYLORI* al metronidazol en Colombia." Rev Col Gastroenterol **12**: 31-35.
- GUTTHANN, S P, et al. (1997). "Individual nonsteroidal antiinflammatory drugs and other risk factors for upper gastrointestinal bleeding and perforation." Epidemiology: 18-24.

- HAN, F, et al. (2007). "Alterations in rdxA and frxA genes and their upstream regions in metronidazole-resistant *HELICOBACTER PYLORI* isolates." Research in microbiology **158**(1): 38-44.
- HENAO, R, et al. (2009). "Resistencia primaria a metronidazol en aislamientos de *HELICOBACTER PYLORI* en pacientes adultos de Bogotá, Colombia." Revista Colombiana de Gastroenterología **24**(1): 10-15.
- HEO, J y JEON, S W (2014). "Optimal treatment strategy for *HELICOBACTER PYLORI*: Era of antibiotic resistance." World journal of gastroenterology: WJG **20**(19): 5654.
- HOWDEN, C W y HUNT, R H (1998). "Guidelines for the management of *HELICOBACTER PYLORI* infection." The American journal of gastroenterology **93**(12): 2330-2338.
- HUSSAIN, M R M, et al. (2012). "In silico analysis of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in human BRAF gene." Gene **508**(2): 188-196.
- JENKS, P, et al. (1999). "The role of the rdxA gene in the evolution of metronidazole resistance in *HELICOBACTER PYLORI*." Journal of antimicrobial chemotherapy **43**(6): 753-758.
- KUSTERS, J G, et al. (2006). "Pathogenesis of *HELICOBACTER PYLORI* infection." Clinical microbiology reviews **19**(3): 449-490.
- KWON, D-H, et al. (2000). "Analysis of rdxA and involvement of additional genes encoding NAD (P) H flavin oxidoreductase (FrxA) and ferredoxin-like protein (FdxB) in metronidazole resistance of *HELICOBACTER PYLORI*." Antimicrobial agents and chemotherapy **44**(8): 2133-2142.
- KWON, D, et al. (2001). "DNA Sequence Analysis of rdxA and frxA from 12 Pairs of Metronidazole-Sensitive and-Resistant Clinical *HELICOBACTER PYLORI* Isolates." Antimicrobial agents and chemotherapy **45**(9): 2609-2615.
- KWON, D H, et al. (2000). "Frame-shift mutations in NAD (P) H flavin oxidoreductase encoding gene (frxA) from metronidazole resistant *HELICOBACTER PYLORI* ATCC43504 and its involvement in metronidazole resistance." FEMS microbiology letters **188**(2): 197-202.
- LAITIO, M (1976). "Early carcinoma of the gallbladder." Beiträge zur Pathologie **158**(2): 159-172.
- LLODRA CALVO, J C, et al. (2002). "Encuesta de salud oral en España (2000)." RCOE **7**(ESP): 19-63.
- MALFERTHEINER, P, et al. (2002). "Current concepts in the management of *HELICOBACTER PYLORI* infection—The Maastricht 2-2000 Consensus Report." Alimentary pharmacology & therapeutics **16**(2): 167-180.
- MALFERTHEINER, P, et al. (2012). Management of *HELICOBACTER PYLORI* infection—the Maastricht IV/Florence consensus report. Gut. **61**: 646-664.
- MALFERTHEINER, P, et al. (2007). "Current concepts in the management of *HELICOBACTER PYLORI* infection: the Maastricht III Consensus Report." Gut **56**(6): 772-781.
- MARAIS, A, et al. (2003). "Characterization of the genes rdxA and frxA involved in metronidazole resistance in *HELICOBACTER PYLORI*." Research in microbiology **154**(2): 137-144.
- MARTÍNEZ-JÚLVEZ, M, et al. (2012). "Structure of RdxA—an oxygen-insensitive nitroreductase essential for metronidazole activation in *HELICOBACTER PYLORI*." FEBS Journal **279**(23): 4306-4317.
- MCNULTY, C A, et al. (1988). "Inhibitory antimicrobial concentrations against *Campylobacter pylori* in gastric mucosa." Journal of antimicrobial chemotherapy **22**(5): 729-738.
- MEGRAUD, F (2004). "H pylori antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing." Gut **53**(9): 1374-1384.
- MEGRAUD, F, et al. (2013). "*HELICOBACTER PYLORI* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption." Gut **62**(1): 34-42.

- MEGRAUD, F y LAMOULIATTE, H (2003). "Review article: the treatment of refractory *HELICOBACTER PYLORI* infection." Alimentary pharmacology & therapeutics **17**(11): 1333-1343.
- MÉGRAUD, F y LEHOURS, P (2007). "*HELICOBACTER PYLORI* detection and antimicrobial susceptibility testing." Clinical microbiology reviews **20**(2): 280-322.
- MENDZ, G L y MÉGRAUD, F (2002). "Is the molecular basis of metronidazole resistance in microaerophilic organisms understood?" Trends in microbiology **10**(8): 370-375.
- MIRZAEI, N, et al. (2016). "The Bioinformatics Report of Mutation Outcome on NADPH Flavin Oxidoreductase Protein Sequence in Clinical Isolates of *H. pylori*." Current microbiology **72**(5): 596-605.
- MIRZAEI, N, et al. (2014). "The mutation of the *rdxA* gene in metronidazole-resistant *HELICOBACTER PYLORI* clinical isolates." Advanced biomedical research **3**: 90.
- MONTAÑO, J I, et al. (2013). "*HELICOBACTER PYLORI* y estrés psicosocial en pacientes con gastritis crónica."
- OGATA, S K, et al. (2014). "Antimicrobial susceptibility testing for *HELICOBACTER PYLORI* isolates from Brazilian children and adolescents: comparing agar dilution, E-test, and disk diffusion." Brazilian Journal of Microbiology **45**(4): 1439-1448.
- PAPASTERGIOU, V, et al. (2014). "Treatment of *HELICOBACTER PYLORI* infection: meeting the challenge of antimicrobial resistance." World J Gastroenterol **20**(29): 9898-9911.
- PAPASTERGIOU, V, et al. (2014). "Treatment of *HELICOBACTER PYLORI* infection: Past, present and future." World J Gastrointest Pathophysiol **5**(4): 392-399.
- PARSONNET, J (1998). "*HELICOBACTER PYLORI*: the size of the problem." Gut **43**(Suppl 1): S6.
- PIAZUELO, M B y CORREA, P (2013). "Gastric cancer: overview." Colombia Medica **44**(3): 192-201.
- PIÑEROS, M, et al. (2006). "Cancer incidence estimates at the national and district levels in Colombia." Salud pública de México **48**(6): 455-465.
- PIÑEROS, M y MURILLO, R (2004). "Incidencia de cáncer en Colombia: importancia de las fuentes de información en la obtención de cifras estimativas." Rev Colomb Cancerol **8**(1): 5-14.
- REYES-ZAMORA, O, et al. (2011). "Mutaciones que confieren resistencia a metronidazol y tetraciclina en *HELICOBACTER PYLORI*, su detección en aislados cubanos." Revista CENIC Ciencias Biológicas **42**(1): 29-34.
- RIMBARA, E, et al. (2011). "Optimal therapy for *HELICOBACTER PYLORI* infections." Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology **8**(2): 79-88.
- SELGRAD, M y MALFERTHEINER, P (2011). "Treatment of *HELICOBACTER PYLORI*." Current opinion in gastroenterology **27**(6): 565-570.
- SIEGEL, R, et al. (2012). "Cancer statistics, 2012." CA: a cancer journal for clinicians **62**(1): 10-29.
- SIEGEL, R L, et al. (2015). "Cancer statistics, 2015." CA: a cancer journal for clinicians **65**(1): 5-29.
- SOLCÀ, N M, et al. (2000). "Mechanism of Metronidazole Resistance in *HELICOBACTER PYLORI*: Comparison of the *rdxA* Gene Sequences in 30 Strains." Antimicrobial agents and chemotherapy **44**(8): 2207-2210.
- STOLTE, M y MEINING, A (2001). "The updated Sydney system: classification and grading of gastritis as the basis of diagnosis and treatment." Canadian journal of gastroenterology= Journal canadien de gastroenterologie **15**: 591-598.
- SUERBAUM, S y MICHETTI, P (2002). "original." New England Journal of Medicine **347**(15): 1175-1186.
- TEH, X, et al. (2014). "Functional and Molecular Surveillance of *HELICOBACTER PYLORI* Antibiotic Resistance in Kuala Lumpur."

- TORRES, M M, et al. (2004). "Genetic susceptibility and risk of gastric cancer in a human population of Cauca, Colombia." Biomédica **24**(2): 153-162.
- TRESPALACIOS, A, et al. (2010). "Resistencia de *HELICOBACTER PYLORI* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos." Rev Col Gastroenterol **25**(1): 31-38.
- VAIRA, D, et al. (2007). "Sequential therapy versus standard triple-drug therapy for *HELICOBACTER PYLORI* eradication: a randomized trial." Annals of Internal Medicine **146**(8): 556-563.
- VALLEJOS, C, et al. (2003). "Resistencia antimicrobiana en *HELICOBACTER PYLORI*: aspectos clínicos y moleculares." Revista médica de Chile **131**(11): 1313-1320.
- VALLEJOS, C, et al. (2007). "Prevalencia de la resistencia a metronidazol, claritromicina y tetraciclina en *HELICOBACTER PYLORI* aislado de pacientes de la Región Metropolitana." Revista médica de Chile **135**(3): 287-293.
- VAN DOORN, L-J, et al. (2001). "Accurate prediction of macrolide resistance in *HELICOBACTER PYLORI* by a PCR line probe assay for detection of mutations in the 23S rRNA gene: multicenter validation study." Antimicrobial agents and chemotherapy **45**(5): 1500-1504.
- WARREN, J R y MARSHALL, B (1983). "Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis." The Lancet **321**(8336): 1273-1275.
- WATARI, J, et al. (2014). "*HELICOBACTER PYLORI* associated chronic gastritis, clinical syndromes, precancerous lesions, and pathogenesis of gastric cancer development." World Journal of Gastroenterology: WJG **20**(18): 5461.
- WU, T-S, et al. (2014). "Eradication of *HELICOBACTER PYLORI* infection." The Kaohsiung journal of medical sciences **30**(4): 167-172.
- YOUNG, S W, et al. (1983). "Computed tomography: beam hardening and environmental density artifact." Radiology **148**(1): 279-283.

ANEXOS