



Universidad Central de Venezuela  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Biología  
Departamento de Biología Celular  
Trabajo Especial de Grado



Identificación de genes de virulencia de *Helicobacter pylori* en  
pacientes con lesiones gástricas precancerosas.

Br. Verónica Goncalves A.  
C.I: 17531106  
**Tutor:** Lic. Diana Ortiz Princz.

## Resumen

*Helicobacter pylori* es una bacteria Gram negativa, de gran variabilidad genética y de alta prevalencia en Venezuela y el mundo, que coloniza la capa de moco de las células del epitelio estomacal, desencadenando una respuesta inflamatoria local de intensidad y extensión variables asociada con el desarrollo de diversas enfermedades gástricas severas como lo son gastritis crónica, úlcera péptica y cáncer gástrico.

La isla de patogenicidad *cag*, las variantes alélicas del gen *vacA* (*s1/s2* y *m1/m2*) y el gen *babA* son factores de virulencia asociados al desarrollo de estas patologías. Sus productos de expresión son transportados hasta al interior de las células epiteliales causando alteraciones importantes en su estructura y función.

El objetivo de este trabajo fue identificar genes de *Helicobacter pylori* asociados a virulencia y además evaluar algunos parámetros inmunológicos en pacientes con lesiones precancerosas del Hospital Universitario de Caracas.

A partir de las biopsias gástricas y del cultivo de *H. pylori* se realizó la extracción de ADN y posteriormente con una PCR multiplex, se amplificaron los genes de virulencia *vacAm1/m2* (567/642 pb), *vacAs1/s2* (259/286 pb). Con una PCR sencilla se amplificaron los genes *ureC* (294 pb), *cagA3'* (642 pb) y *babA* (832 pb). Además se determinaron anticuerpos específicos IgG anti *H. pylori* en suero y anticuerpos secretores IgA en saliva, mediante inmunoensayo de ELISA, en pacientes que asistieron a consulta de gastroenterología del Hospital Universitario de Caracas.

De la población estudiada, un 72% fue positiva para *H. pylori*. La combinación alélica del gen *vacA* más frecuente fue, *vacA m1/s1* con un 25%. Los resultados obtenidos sugieren una baja frecuencia del gen *babA*. El 9% de la población fue *cagA* positivo, no encontrándose diferencias significativas con las lesiones precancerosas halladas. El porcentaje de coinfección en esta investigación osciló entre el 4% y el 9% en cepas *vacAm1/m2* y *vacAs1/s2*, respectivamente.

La presencia de *H. pylori* fue detectada en 30% (13/43) de las lesiones negativas para malignidad, 40% (17/43) de las lesiones indefinidas para displasia, mientras que en ningún caso de displasia de bajo grado se observó la presencia de la bacteria.

En cuanto a la respuesta inmune observada se obtuvo un 70% (40/57) de positividad al determinar anticuerpos IgA secretores en muestras de saliva, además fue estandarizada una ELISA casera para la determinación de anticuerpos IgG séricos anti *H. pylori*.

## Índice

Resumen .....	ii
Índice de figuras .....	v
Índice de Tablas .....	vi
Introducción.....	1
Marco teórico.....	4
Características generales de <i>H. pylori</i> . .....	4
Desarrollo de enfermedades gástricas. ....	6
Vías de transmisión .....	11
Diagnóstico .....	12
Prevalencia a nivel mundial. ....	13
Situación en Venezuela. ....	16
Factores de virulencia de <i>H. pylori</i> .....	18
Respuesta inmune.....	22
Asociación de genes de virulencia con patologías gástricas. ....	25
Antecedentes .....	27
Objetivos .....	32
Objetivo general: .....	32
Objetivos específicos: .....	32
Materiales y Métodos .....	33
Cultivo de <i>Helicobacter pylori</i> . ....	34
Extracción de ADN con proteinasa K a partir de biopsias gástricas y de cultivos de <i>Helicobacter pylori</i> . ....	35
PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	38
Electroforesis en gel de agarosa para la visualización del ADN. ....	41
ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas). ....	42
Protocolo para la determinación de IgA secretora específica anti- <i>Helicobacter pylori</i> en saliva.....	42
Protocolo para la determinación de IgG en suero. ....	43
Resultados .....	46

Cultivo de Biopsias gástricas .....	47
Diagnóstico molecular de <i>H. pylori</i> . .....	48
Patologías encontradas por estudio histopatológico. ....	54
Respuesta inmune.....	57
Discusión.....	62
Conclusiones.....	71
Recomendaciones.....	73
Bibliografía .....	74
Anexos .....	100
Anexo 1 .....	101
Anexo 2 .....	102
Anexo 3 .....	103

## Índice de figuras

Figura 1: Prevalencia mundial de la infección por <i>H. pylori</i> .....	15
Figura 2: Prevalencia de infección de <i>H. pylori</i> en Venezuela.....	17
Figura 3: Mecanismos de colonización de <i>H. pylori</i> :.....	19
Figura 4: Registro fotográfico de la corrida electroforética de los productos de PCR Multiplex de <i>vacA m1/m2</i> y <i>vacA s1/s2</i> .....	49
Figura 5: Registro fotográfico de la corrida electroforética de los amplificados de <i>ureC</i> .....	50
Figura 6: Registro fotográfico de la corrida electroforética de los amplificados de <i>cagA3'</i> .....	51
Figura 7: Registro fotográfico de la corrida electroforética de los amplificados de <i>babA</i> .....	52
Figura 8: Frecuencia de genes de <i>H. pylori</i> , en población estudiada.....	53
Figura 9: Frecuencia de las combinaciones alélicas del gen <i>vacA (m/s)</i> de <i>H. pylori</i> en la población estudiada.....	54
Figura 10: Resultados histopatológicos de biopsias gástricas de los pacientes evaluados.....	55
Figura 11: Distribución de las patologías gástricas y las variantes alélicas de <i>vacA m/s</i> encontradas en la población evaluada .....	57
Figura 12: Placa de 96 pozos de ELISA, para determinación de IgA secretora específica anti- <i>H. pylori</i> .. .....	58
Figura 13: Niveles de IgAs anti <i>H. pylori</i> de acuerdo a las patologías gástricas encontradas en los pacientes evaluados.....	59
Figura 14: Niveles de IgG sérica anti- <i>H. pylori</i> de acuerdo a las patologías gástricas encontradas en los pacientes evaluados.....	60

## Índice de Tablas

Tabla 1: Cebadores usados para la amplificación de los genes de virulencia de <i>H. pylori</i> . .....	39
Tabla 2: Condiciones de Amplificación. ....	40
Tabla 3: Clasificación de Graffar modificada para Venezuela por Hernán Méndez Castellano, para la población estudiada. ....	46
Tabla 4: Resultados de cultivos de <i>H. pylori</i> y prueba rápida de ureasa.....	47
Tabla 5: Presencia de <i>Helicobacter pylori</i> detectado por PCR en las distintas patologías gástricas. ....	56
Tabla 6: Niveles de anticuerpos IgA anti- <i>H. pylori</i> en la población estudiada. ....	59
Tabla 7: Valores promedio y desviación estándar de anticuerpos IgA secretores de acuerdo a la positividad por cultivo y PCR. ....	61
Tabla 8: Valores promedio y desviación estándar de anticuerpos IgG séricos de acuerdo a la positividad por cultivo y PCR. ....	61

## Introducción

*Helicobacter pylori* es una bacteria Gram negativa, de gran variabilidad genética y de alta prevalencia en Venezuela y el mundo, considerándose en la actualidad uno de los patógenos humanos de mayor importancia, que infecta el mucus de las células del epitelio estomacal (Marshall y Goodwin, 1987; Berroteran y col., 2002a). A pesar de que no invade la célula, causa inflamación de la mucosa gástrica con polimorfonucleares neutrófilos y linfocitos, lo cual desencadena una respuesta inflamatoria local de intensidad y extensión variables asociadas con el desarrollo de diversas enfermedades gástricas severas como lo son gastritis crónica, úlcera péptica y cáncer gástrico (Ortiz y col., 2002; Suerbaum y Michetti, 2002). Es por esta razón que ha sido identificada como agente causal de la úlcera péptica y la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1994, la clasificó como carcinógeno tipo I (IARC, 1994).

Estas patologías están asociadas a dos factores de gran importancia como: genes de virulencia de la bacteria que expresan proteínas específicas como adhesinas, citotoxinas, entre otras, que contribuyen a la colonización y establecimiento de la bacteria en el mucus del epitelio gástrico y, a interacción entre la bacteria y el huésped que determina las consecuencias clínicas de la infección por *H. pylori*. A este respecto, el sistema inmune y la susceptibilidad del individuo juega un papel importante en prevenir o promover la enfermedad (Parsonnet y col., 1991; Olivares y Gisbert, 2006).

El modo de transmisión de este patógeno ha sido fuertemente debatido y hasta el momento no se ha determinado con exactitud (Engstrand, 2001; Kivi y Tindberg, 2006; Azevedo y col., 2007). Dado que este microorganismo coloniza el tracto gastrointestinal y que además, se ha demostrado la presencia de formas potencialmente infecciosas en la placa dental y heces de individuos infectados, se han propuesto dos rutas de transmisión: la fecal-oral, mediante aguas contaminadas y la oral-oral, mediante la saliva por contacto persona a persona e intrafamiliar (Drumm y col., 1990; Thomas y col., 1992; Madinier y col., 1997; Parsonnet y col., 1999; Leclerc y col., 2002).

Distintos genes de *H. pylori* se han asociado con virulencia y mayor riesgo de enfermedad gástrica grave; en particular se han estudiado genes relacionados con la producción de citotoxina bacteriana, la inducción de citocinas proinflamatorias y la adhesión de la bacteria al epitelio (Atherton, 1998). Los genes responsables de esta virulencia son, la isla de patogenicidad *cag*, las variantes alélicas del gen *vacA* (*s1/s2* y *m1/m2*) y el gen *babA*, asociados al desarrollo de las patologías mencionadas anteriormente. Los productos de expresión de estos genes son transportados hasta al interior de las células epiteliales causando alteraciones importantes en su estructura y función. En base a estas características se dice que existen cepas con alto o bajo grado de virulencia (Atherton y col., 1995; Censini y col., 1996; Sharm y col., 1998; Quiroga y col., 2005).

En Venezuela existe una alta prevalencia de infección por *H. pylori* y de cepas altamente virulentas, por esta razón el objetivo de este trabajo es identificar



genes asociados a virulencia y además evaluar algunos parámetros inmunológicos en pacientes con lesiones precancerosas del Hospital Universitario de Caracas.

Los resultados de este estudio contribuirán con la identificación de los genotipos más frecuentes en lesiones precancerosas en Caracas y lograr así un mejor entendimiento de la infección, desarrollar técnicas de diagnóstico que permitan la prevención eficaz, un adecuado tratamiento y seguimiento del individuo infectado, sobretodo en poblaciones donde la incidencia de enfermedades gástricas severas es elevada, contribuyendo en un futuro, al desarrollo de una vacuna para la prevención de la infección por esta bacteria.

## Marco teórico

### Características generales de *H. pylori*.

*Helicobacter pylori* es un bacilo Gram negativo de morfología helicoidal con cuatro a seis flagelos polares que le dotan de movilidad, mide entre 0,6 – 0,9 $\mu$  de diámetro y 2 - 5  $\mu$  de longitud. Su crecimiento óptimo se produce a 37 °C en ambientes microaerófilos, es productor de catalasa, ureasa y oxidasa. Habita en la capa de moco del estómago y posee diversos factores de patogenicidad que contribuyen a la colonización y al daño de la mucosa gástrica (Dore y col., 2001; Díaz y col., 2005).

La presencia de microorganismos espirilados en la mucosa gástrica fue descrita hace casi 100 años pero su real importancia sólo empieza a tenerse en cuenta a finales de 1970 cuando el australiano Warren notó su presencia sobre la mucosa gástrica, en especial si había inflamación. En 1981, Marshall inicia la investigación logrando cultivar la bacteria a partir de biopsias gástricas, realizando estudios prospectivos y administrando pautas terapéuticas con antibióticos y sales de bismuto. Se pensó que podía ser una nueva especie dentro del género *Campylobacter* por su aspecto en la tinción de Gram y su requerimiento microaerófilico, aunque presentaba ciertas características atípicas así que identifican a la bacteria como *Campylobacter-like* (Pajares y Gisbert, 2006).

En 1984, Marshall logra cumplir los postulados de Koch con la autoinoculación por ingestión de un cultivo de la bacteria que le origina gastritis,

que posteriormente fue tratada y curada con sales de bismuto y metronidazol (Pajares y Gisbert, 2006). En colaboración con microbiólogos demostraron que la bacteria encontrada era realmente un miembro diferente que no pertenecía al género *Campylobacter*, sino que presentaba características morfológicas y estructurales bioquímicas mas parecidas al género *Helicobacter*, así que clasifican la nueva bacteria, dentro del género *Helicobacter*, como *pylori*. (Pajares y Gisbert, 2006).

Desde entonces, se han desarrollado numerosas investigaciones para conocer a esta bacteria de manera detallada, sus características metabólicas, patogenicidad, interrelación con la mucosa gástrica, su microambiente, su mecanismo de transmisión, infección y reinfección (Bravo y col., 2003).

Los estudios genómicos modernos, especialmente el análisis de secuencias del ácido ribonucleico ribosomal 16S (ARNr), permitieron demostrar que *Campylobacter* y la bacteria encontrada eran dos géneros diferente. Taxonómicamente se demuestra que *Campylobacter* y la bacteria encontrada, nombrada luego *Helicobacter* son los miembros principales de un grupo distinto de bacterias (rRNA Superfamilia IV) que está relacionado lejanamente con eubacterias, y lo único que tienen en común estos dos géneros es la forma espiral, uno o mas flagelos, crecimiento en ambientes microaerófilicos y su adaptación de vivir en el medio ácido gástrico (Pounder, 1995).

El genoma de *H. pylori* tiene un tamaño aproximado de 1,67Mb. La composición promedio de guanina y citosina (G+C) es de 35,2 % (Beji y col., 1988). Los genes tienen localización variable en el mapa genético, lo cual refiere la

extensa reorganización que ocurre en el genoma de *H. pylori*, es decir tiene una alta variabilidad genética (Bukanov y col., 1994; Taylor y Parsonett, 1995; Jiang y col., 1998).

La diversidad genética entre cepas de varias poblaciones se ha explicado por los puntos de mutación, sustituciones amplias, inserciones, deleciones (que involucran a uno o más genes) y segmentos multigénicos (que incluye restricción/modificación de genes o al menos una isla de patogenicidad). Entre 6 y 7% de los genes del *H. pylori* son específicos para cada cepa y casi la mitad de ellos se agrupan en una misma región hipervariable (Blaser y Berg, 2001).

Cabe destacar que diversas investigaciones han reportado la existencia de plásmidos transmisibles de *H. pylori* que es posible que confieran a la bacteria propiedades que complementan su capacidad para colonizar ambientes adversos, favorecen el intercambio genético intracelular, y garantizan la diseminación horizontal de genes de resistencia a antibióticos, y de otras funciones, entre géneros distintos (Narváez y col., 2005).

### **Desarrollo de enfermedades gástricas.**

*H. pylori* coloniza sólo mucosa de tipo gástrico en humanos, debido a la estrecha relación con la excreción de urea y posiblemente a la expresión de receptores en ese epitelio, causando gastritis crónica y considerándose como un importante factor de riesgo para la enfermedad gastrouduodenal, incluyendo úlcera péptica y carcinoma gástrico (Parsonett y col., 1991; Graham y Go, 1993). En las

lesiones duodenales, la colonización inicial se realiza en focos de metaplasia gástrica y nunca en epitelio intestinal, lo cual denota un alto grado de adaptación al nicho gástrico (O'Rourke y col., 1992; Gold y col., 1997).

La infección aguda por *H. pylori* puede causar una enfermedad clínica transitoria caracterizada por náuseas y dolor abdominal que puede durar varios días y se relaciona con gastritis histológica aguda con presencia de polimorfonucleares. Después de que se resuelven estos síntomas, se piensa que la mayor parte progresa a infección crónica con inflamación caracterizada por inflamación difusa de la mucosa con polimorfonucleares neutrófilos y linfocitos. La inflamación puede estar limitada al epitelio gástrico superficial o extenderse de manera profunda en las glándulas gástricas, produciendo como resultado grados variables de atrofia glandular (gastritis atrófica) y metaplasia del epitelio gástrico al epitelio de tipo intestinal (Ortiz y col., 2002).

En la gastritis atrófica crónica, se observa una reducción o ausencia de las glándulas gástricas normales, un grado variable de inflamación y en ocasiones se observa metaplasia intestinal. La metaplasia intestinal es el reemplazo de las células gástricas normales por células que semejan el epitelio intestinal. A menudo, estas dos entidades coexisten, pero existen casos de metaplasia intestinal aislada sin más hallazgos patológicos. Se conocen dos tipos de metaplasia, el tipo I o tipo completo, que se asemeja a la mucosa del intestino delgado con un ribete en cepillo que contiene todas las enzimas habituales presentes en el epitelio intestinal, pero carece de vellosidades, el tipo II o incompleta se subdivide en 2 grupos; el tipo IIA conocida como metaplasia de células caliciales, y el tipo IIB, en que se

aprecia un mayor grado de diferenciación celular y que es la que se ha asociado en mayor grado con el cáncer gástrico (Walker, 2003).

Además produce alteración en los mecanismos de regulación de la secreción ácida gástrica por inhibición de la relación entre somatostatina y gastrina, lo cual trae como consecuencia, cambios de la motilidad antro-piloro-duodenal, pudiendo ocasionar síntomas, aunque un gran número de individuos se mantiene asintomático (El-Omar y col., 2001).

*H. pylori* ha sido considerado como carcinógeno humano por la Agencia Internacional de Investigaciones sobre cáncer IARC (International Agency for Research on Cancer, 1994) por su asociación directa con el desarrollo de gastritis crónica activa, úlcera péptica y adenocarcinoma gástrico.

La hipótesis corriente que relaciona *H. pylori* con el desarrollo de cáncer gástrico de tipo intestinal, se basa en un daño progresivo inducido por la presencia prolongada de la bacteria, que lleva a lesiones que evolucionan de una gastritis superficial, gastritis crónica, gastritis atrófica y en esta última etapa, hay cambios inflamatorios importantes con agregados foliculares linfoides que destruyen la mucosa a tal grado, que ocurre pérdida de la función y se induce una metaplasia intestinal, displasia y eventualmente cáncer (Correa, 1992). La metaplasia intestinal puede ser considerada como una estrategia defensiva contra *H. pylori*, ya que esta bacteria sólo coloniza el epitelio gástrico (Filipe, 1989; Rokkas y col., 1991).

Estos cambios inflamatorios podrían iniciarse como una inflamación aguda, caracterizada por un infiltrado polimorfonuclear en la lámina propia que puede

llegar hasta el epitelio (Hazell y col., 1986). No obstante, en pacientes con infecciones masivas hay pérdida de la mucogénesis y aparecen parches de mucosa necrosada y zonas de erosión epitelial, a través de las cuales las células inflamatorias pasan a la luz del estómago. Más aún, esta bacteria puede invadir hasta la submucosa en individuos que sufren del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Meiselman y col., 1988).

El cáncer gástrico ocupa el segundo lugar entre las neoplasias gástricas de diagnóstico más frecuente a nivel mundial y desafortunadamente en países en vías de desarrollo el diagnóstico se realiza generalmente en estadíos avanzados, lo que se asocia con una alta tasa de mortalidad (Rugge, 1994).

El adenocarcinoma gástrico se clasifica en dos tipos histológicos distintos: uno intestinal y otro difuso. El primero predomina en poblaciones de alto riesgo y es más común en personas de edad avanzada. Es precedido por continuos cambios histológicos, tales como gastritis activa, atrofia intestinal, metaplasia y displasia. El tipo difuso es menos común, las lesiones precancerosas no han sido bien definidas y se presenta en poblaciones de menor riesgo, compuesta generalmente por grupos de jóvenes (Lauren, 1965; Correa, 1992). La evolución histológica del adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal, lleva implícitos los cambios histológicos descritos en las infecciones por *H. pylori*, por lo que este agente se ha relacionado con la etiología del cáncer gástrico (Rivas-Traverso y Hernández, 2000).

Según la clasificación histológica de Viena y Padova, las neoplasias de la mucosa gástrica se pueden agrupar en 5 categorías (Schlemper y col., 2000;

Rugge y col., 2000):

- Negativo para malignidad/displasia: en esta categoría se incluye la mucosa normal, los cambios reactivos (gastritis), regenerativos, atrofia y presencia de metaplasia intestinal (Schlemper y col., 2000; Rugge y col., 2000).
- Indefinido para neoplasia/displasia: encierra aquellos casos en los que la calidad del material o los factores de distorsión estructural y atipia nuclear están presentes creando duda sobre la naturaleza displásica de las células que proliferan. Esta categoría comprende la hiperproliferación foveolar caracterizada por células elongadas con núcleos hipercromáticos, membrana nuclear irregular, nucleolo prominente y mitosis evidentes; y la metaplasia intestinal hiperproliferativa donde se encuentran células de metaplasia con mitosis, pseudoestratificación, núcleos elongados, hipercromáticos e irregulares, y excesiva proliferación (Schlemper y col., 2000; Rugge y col., 2000).
- Neoplasia de bajo grado (no invasiva): Más que una categoría es una lesión donde se observa ausencia de invasión del estroma y se encuentra pseudoestratificación, hipercromasia, nucleolo prominente, células elongadas y la secreción de mucina es mínima (Schlemper y col., 2000; Rugge y col., 2000).
- Neoplasia de alto grado (no invasiva): esta categoría reconoce la presencia temprana de invasión epitelial local. Engloba otras variantes



aparte de la displasia de alto grado: Carcinoma in situ o no invasivo y carcinoma sospechoso de invasión (Schlemper y col., 2000; Rugge y col., 2000).

- Neoplasia invasiva: en esta categoría se evidencia invasión del estroma o metástasis (Schlemper y col., 2000; Rugge y col., 2000).

### **Vías de transmisión.**

Las vías de transmisión de la bacteria aún no están claras, se sabe que el reservorio esencial es el humano. La transmisión de *H. pylori* parece ser directamente de persona a persona, sin embargo alguna otra vía no puede ser excluida. Dos rutas de transmisión han sido propuestas: fecal-oral y oral oral, basados en los siguientes argumentos: *H. pylori* ha sido identificado en muestras de heces y parece sobrevivir en agua en formas no cultivables (Mégraud, 1995), sin embargo estos estudios no han sido concluyentes.

Estudios más recientes han evidenciado que el ambiente acuático puede ser un reservorio de *H. pylori*. Sin embargo ninguna ruta *per se* es capaz de explicar con exactitud su transmisión (Cellini y col., 2004; Carbone y col., 2005).

*H. pylori* también se ha presentado en una forma cocoide viable pero no cultivable. Se especula que la forma cocoide sea una forma de resistencia capaz de soportar las condiciones adversas que encuentra *H. pylori* en el medio ambiente, reversible a la forma espiral en el momento en que vuelvan a darse las condiciones óptimas (Dore y col., 2001).

En respuesta a condiciones de estrés ambiental algunas bacterias adoptan un estado que se ha definido como viable no cultivable (VNC); viable porque mantiene la capacidad de realizar funciones metabólicas, y no cultivable porque no puede aislarse mediante métodos de cultivo en el laboratorio. Si las condiciones ambientales vuelven a ser favorables, el microorganismo puede retornar al estado cultivable (Borroto, 1998; Cellini y col., 2004; Oliver, 2005).

Al entrar en contacto con el agua, *H. pylori* es capaz de adoptar el estado VNC, transformándose de la forma típica espiral a una forme cocide que probablemente dificulta su cultivo (Oliver, 2005; Bellack y col., 2006). Sin embargo estas investigaciones no son concluyentes, y por ende se asume que la vía de transmisión más común es la oral-oral, debido a lo reportado en diversas investigaciones donde evidencian que individuos pertenecientes a un mismo núcleo familiar se ven infectados por *H. pylori*.

## **Diagnóstico**

Existen diferentes métodos para el diagnóstico de la infección, invasivos y no invasivos. Los métodos no invasivos disponibles incluyen la prueba del carbono marcado o prueba del aliento con urea, en la cual el paciente ingiere urea marcada con  $^{14}\text{C}$  o  $^{13}\text{C}$ , produciéndose posteriormente (debido al metabolismo de la bacteria) dióxido de carbono marcado, el cual es detectado en la respiración; otro método comúnmente utilizado es la serología, que detecta anticuerpos específicos en una muestra de sangre (IgG, IgM séricos) del paciente y además la

determinación de antígenos específicos de *H. pylori* en heces. Los niveles de IgG e IgM sérica aparecen con la infección y se mantienen altos o disminuyen gradualmente tras la erradicación de *H. pylori* mediante la terapia antimicrobiana después de los 6 meses de tratamiento, sin embargo pueden mantenerse positivos por largo tiempo. (Hernández, 2001). Cabe destacar que la prueba del carbono marcado, actúa como marcador de la infección activa, a diferencia de la serología. Esta prueba no suele realizarse de rutina, debido a su alto costo.

Por otra parte, los métodos invasivos requieren la recolección de biopsias que son tomadas durante los procesos endoscópicos superiores, a partir de las cuales es posible detectar la ureasa activa en la muestra extraída (el denominado "test rápido de la ureasa") al incluirla en un medio con urea; realizar cultivo, realizar exámenes histológicos que identifiquen la bacteria y las posibles lesiones del tejido gástrico, también se puede realizar PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa), uno de los métodos de detección más sensibles para la identificación de genes de virulencia de la bacteria como por ejemplo, *cagA*, *vacA*, *babA* y genes de resistencia a antibióticos *gyrA* y *gyrB* (Hernández, 2001).

### **Prevalencia a nivel mundial.**

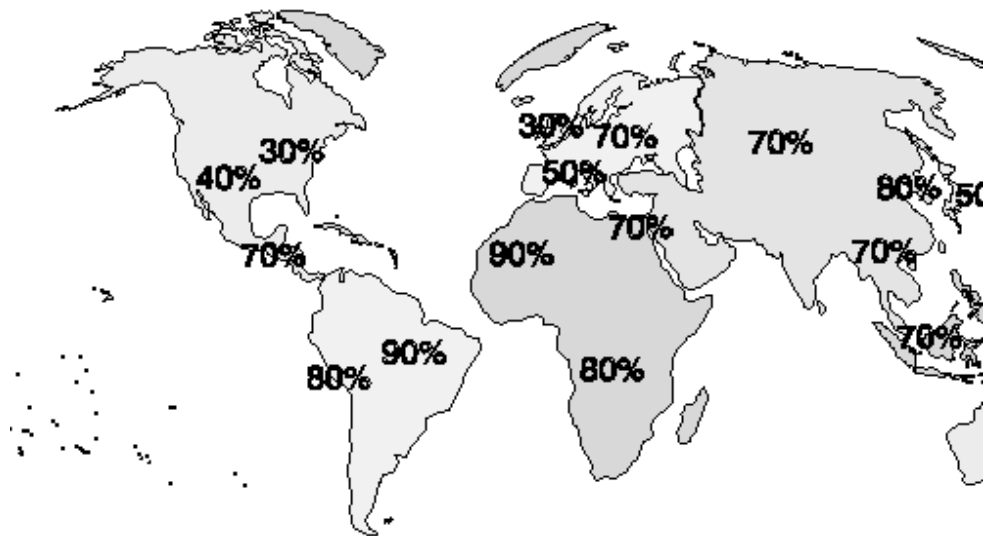
Más del 50% de la población mundial se encuentra infectada por *H. pylori*, con proporciones superiores a 90% en países en vías de desarrollo, donde la mayoría de los casos son asintomáticos (Frenck y Clemens, 2003).

Se ha postulado que la infección por *H. pylori* se puede adquirir durante la

infancia, siendo mayor su prevalencia en grupos familiares grandes con alto hacinamiento y bajos niveles socioeconómicos y educacionales, asociándose directamente al desarrollo del país (Graham y col., 1991; Mendall y col., 1994; Parsonnet, 1995; Malaty y col., 2002). En Estados Unidos existe un 20% de prevalencia de la infección por *H. pylori* en adolescentes, siendo esta poco significativa al compararla con las tasas de infección superiores al 90% en niños menores de 5 años en países en vías de desarrollo (Frenck y Clemmens, 2003).

Se estima que la prevalencia de la infección es alta en poblaciones con alta incidencia de cáncer gástrico; sin embargo, existen poblaciones con altas cifras de prevalencia de la infección y muy bajas tasas de cáncer gástrico, hecho que señala que no todas las infecciones con *H. pylori* incrementan el riesgo de cáncer gástrico. (Holcombe y col., 1992; Correa, 2003).

La figura 1 muestra la frecuencia de la infección por *H. pylori* en el mundo. Un pequeño grupo de países desarrollados, presenta prevalencias que oscilan entre el 20 y 40%, mientras un gran grupo de países, pertenecientes al mundo en vías de desarrollo, presentan frecuencias entre el 70 y 90%. Estas diferencias se relacionan con los niveles de saneamiento ambiental, hacinamiento y nivel socio-económico, que son los principales determinantes del riesgo de contraer la infección (Rollán, 2002).



**Figura 1:** Prevalencia mundial de la infección por *H. pylori*. (Rollán, 2002).

Los estudios han revelado respuesta serológica positiva en escolares y adolescentes con diferencias marcadas entre países. Así tenemos que en Inglaterra, Noruega y Alemania es 8-20% mientras que en países pobres como Nigeria, India, Sudáfrica oscilan entre 60 y 80%. Ahora bien en el caso de la población infantil se estima que el 30% de los niños en el mundo están infectados por *H. pylori* y la seroconversión ocurre entre 3 y 5 años, no encontrándose diferencias significativas entre varones y hembras (Bajarano y col., 1999; Frenck y col., 2003).

Existe alta prevalencia de úlceras duodenales en Escocia, África, Etiopía, el sur de la India, el sur de China, el este de Japón y Australia (Lam, 1993; Hu y col., 1995). Japón tiene una alta incidencia de cáncer gástrico (Maeda y col., 1997), seguida de el norte de China (Mervis, 1995), el norte de Italia (Gasbarrini y col., 1995), el sur de México (Halperin, 1988) y la región Andina (Correa y col., 1976).

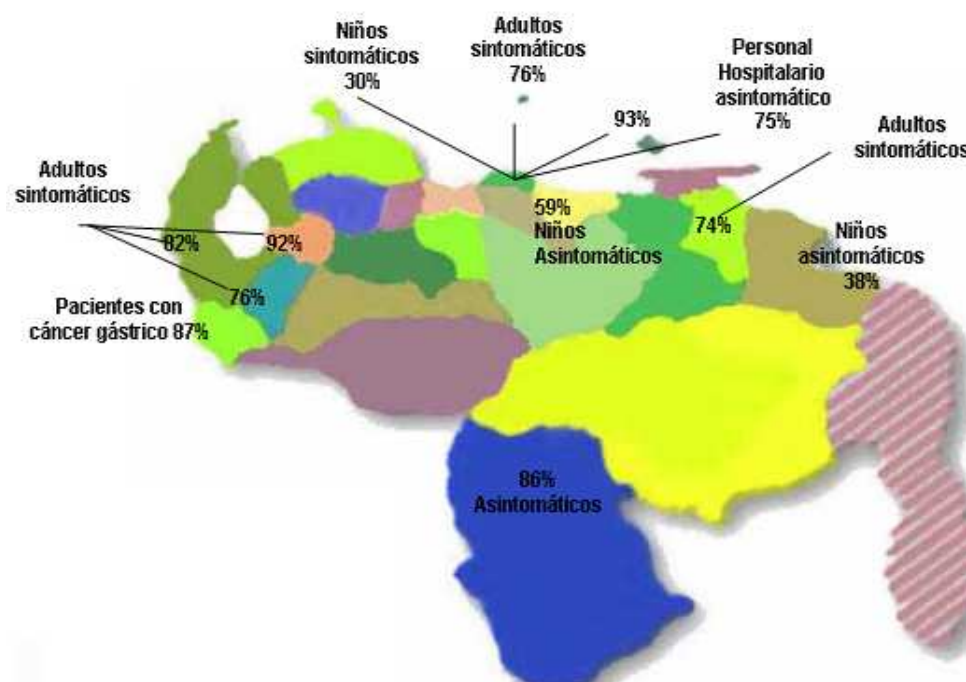
En América Latina el comportamiento clínico de esta infección presenta notables diferencias de un país a otro, lo cual está en relación con las variaciones en las condiciones geográficas, demográficas y socioeconómicas con relación al comportamiento de la infección (Vaz Coelho y col., 2000).

### **Situación en Venezuela.**

Estudios han evidenciado que en Venezuela, existe un 66% de seroprevalencia en poblaciones infantiles de bajo nivel socioeconómico, y variaciones de 40% a 90% en adultos de diferentes estados del país. (Ortiz y col., 2001). Además se ha encontrado una asociación entre la producción de IgAs anti-*H. pylori* determinada en saliva y la forma activa de la gastritis crónica en pacientes *H. pylori* positivos (Ortiz y col., 2002).

En Venezuela, la mayoría de los estudios sobre *H. pylori* han sido realizados en pacientes que asisten a consultas de gastroenterología por presentar síntomas gástricos, sin embargo, son pocos y puntuales los estudios realizados a nivel de la comunidad. En Caracas, se han desarrollado estudios pioneros destinados a conocer la incidencia y prevalencia de la infección por *H. pylori* tanto en niños como en pacientes adultos, estudios que también incluyen diferentes regiones del país, destinado a conocer la seroprevalencia en Venezuela (Ortiz y col., 2003). Los trabajos de investigación que se han realizado hasta ahora sugieren que la distribución de la infección en la población venezolana no es homogénea, y que existen grupos o áreas geográficas cuya prevalencia es

mucho más acentuada, los cuales presentan también casuísticas muy elevadas de patologías digestivas, benignas y malignas (Ortiz y col., 2003). Sin embargo, la mayoría de estos trabajos se han desarrollado empleando muestras pequeñas, por lo que aún no se dispone de estudios epidemiológicos que indiquen la prevalencia de la infección y su verdadera relación con el desarrollo de trastornos digestivos, en todas las regiones del ámbito nacional (Figura 2), (Gerrits y col., 2006).



**Figura 2:** Prevalencia de infección de *H. pylori* en Venezuela. Datos propios Laboratorio de Microbiología Molecular, Instituto de Biomedicina (Cavazza y col., 2003)

Asimismo, en Venezuela el cáncer gástrico es la primera causa de muerte por cáncer (Pisani y col., 1999). Observándose una mayor prevalencia de cáncer

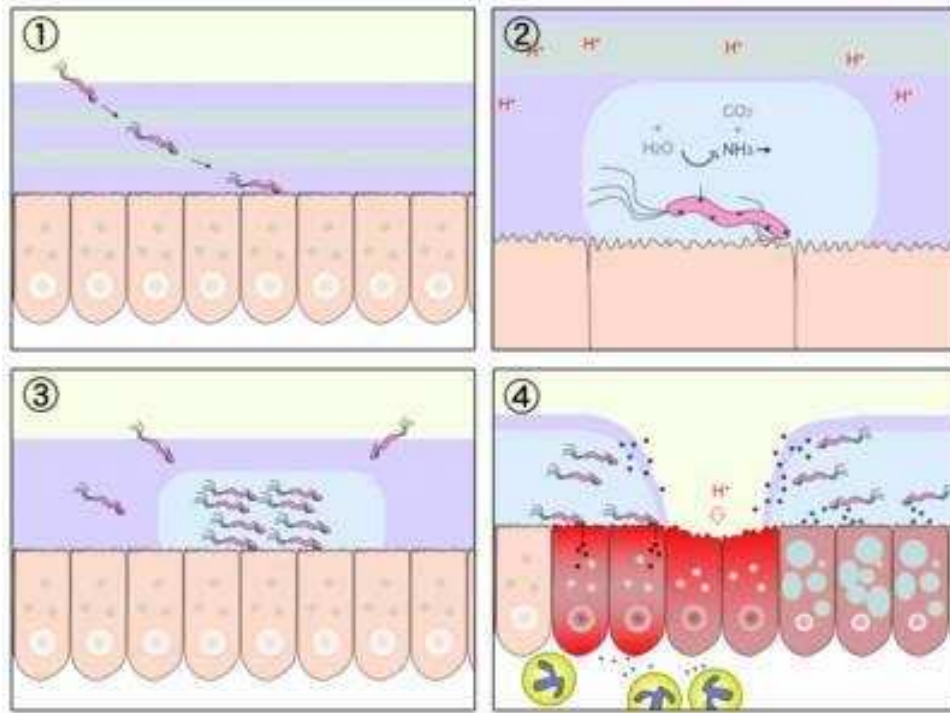
gástrico en la región andina (Plummer y col., 2000). Estudios realizados en el estado Táchira, reportaron la existencia de la relación entre *H. pylori* y el desarrollo de cáncer gástrico (Plummer y col., 2000).

### **Factores de virulencia de *H. pylori*.**

*H. pylori* presenta diferentes factores de virulencia y todos los sucesos que ocurren en la mucosa gástrica (Figura 3) van a depender de estos factores y de la capacidad de respuesta inmune del individuo (Rivera y col., 2004).

Dentro de los factores de virulencia se encuentran: 1) La forma y los movimientos espirales (motilidad). 2) Enzimas y proteínas de adaptación (ureasas, catalasas, proteína inhibidora de la secreción de ácido gástrico). 3) Habilidad para adherirse a las células de la mucosa gástrica (adhesinas bacterianas y receptores para células epiteliales) (Rivera y col., 2004).





**Figura 3:** Mecanismos de colonización de *H. pylori*: 1) La bacteria se establece en la superficie de las células del epitelio gástrico. 2) Neutralización del medio ácido del estómago y producción de amoníaco, a partir de urea. 3) Migración y proliferación de la bacteria al foco de la infección. 4) Daño celular producido por los ácidos del estómago, desarrollo de la úlcera gástrica. Tomado de: (<http://bligoo.com/media/users/0/31628/images/H%20pylori%20mecanismo.jpg>)

Estos mecanismos patógenos de la bacteria, le va a permitir sobrevivir en el medio ácido hostil del estómago y por otra parte, producir el daño en la barrera mucosa gástrica (Rivera y col., 2004).

De manera más detallada; los mecanismos patógenos principalmente implicados son: producción de toxinas (citotoxinas, ureasas, mucinasa, lipasa, lipolisacaridasa, hemolisinas, fosfolipasas; mediadores de inflamación (activación de neutrófilos, activación de monocitos y macrófagos, leucotrienos, fenómenos

autoinmunes, infiltración y degranulación de eosinófilos) y capacidad de contribuir con el incremento de la actividad ácido-péptica gástrica (Rivera, 2004).

*H. pylori* es muy activo y móvil, lo cual es resultado de su forma espiral y de los flagelos unipolares que le confieren una gran movilidad y le permiten llegar a la mucosa y no ser eliminado por los mecanismos defensivos del huésped. Se ha sugerido que el flagelo es determinante como sensor de cambios de pH entre la luz gástrica y la capa de moco. La ureasa producida en cantidades muy altas por *H. pylori*, es esencial para su supervivencia, puesto que bacterias mutantes ureasa-deficientes no logran colonizar el estómago. El gen *ureC* es el responsable de la codificación de la proteína ureasa, la actividad de esta proteína permite el desdoblamiento rápido y permanente de la urea en el jugo gástrico, moco y mucosa, a substratos principales en la producción de amonio; aparentemente estos procesos proveen a la bacteria de la habilidad de exportar iones de hidrógeno desde dentro del citoplasma, regulando así el pH, y creando también un microambiente alcalino que lo protege de la acidez del estómago. Además de la ureasa, también produce superóxido-dismutasa y otras moléculas diversas que se encuentran involucradas en la adhesión específica a las células epiteliales del estómago. *H. pylori* posee gran variedad de adhesinas que reconocen de forma específica a los receptores de la mucosa gástrica y se unen a ellos comenzando la colonización bacteriana (Tummuru y col., 1993).

En general, la adhesión es ventajosa para la supervivencia del patógeno y para favorecer la liberación de las toxinas de las bacterias directamente sobre las células epiteliales (Mai y col., 1992).

Entre los factores de virulencia bacterianos responsables de las manifestaciones clínicas, están las adhesinas (BabA), la citotoxina vacuolizante VacA y los productos de la isla de patogenicidad *cag* (Yamaoka y col., 2008).

Las proteínas asociadas a estos genes de virulencia de la bacteria que han sido caracterizadas son: la ureasa que permite la colonización en el medio ácido del estómago e induce daño en las células del epitelio gástrico, la citotoxina (VacA) que produce la formación de vacuolas en las células gastrointestinales, la proteína codificada por el gen asociado con la citotoxina CagA, que al igual que VacA está fuertemente asociada con el desarrollo de las úlceras; las adhesinas BabA (codificada por el gen *babA*), que se une al epítipo Lewis del huésped y la catalasa que permite a la bacteria resistir el ataque de las células inflamatorias del hospedero. Todas las proteínas anteriores, excepto la catalasa, son producidas por *H. pylori* y absorbidas por el epitelio gastrointestinal, lo que desencadena un grupo de señales proinflamatorias que culminan con el reclutamiento y activación de las células inflamatorias (Hernández, 2001).

El gen *vacA*, es uno de los genes de mayor virulencia de *H. pylori*, es altamente conservado y está presente en la mayoría de las cepas, codifica para la citotoxina vacuolizante (VacA). Este gen es altamente polimórfico, capaz de inducir la formación de vacuolas en numerosas células epiteliales aisladas y ulceraciones superficiales en estómagos de animales de estudio. Posee regiones variables, como la región señal, que puede ser *s1* (*s1a*, *s1b*, *s1c*) o *s2*, y la región media, que puede ser *m1* o *m2*, lo que permite múltiples combinaciones alélicas que se asocian a diferencias en la producción de la citotoxina (Atherton

y col., 1995; Heikkinen y col., 1.998; Ortiz y col., 2002; Schmidt y Hensel, 2004).

Otro factor de virulencia es la proteína CagA, codificada por el gen *cagA*, que se encuentra dentro de una secuencia de genes específica de aproximadamente 40kb llamado “isla de patogenicidad” (PAI) y no está presente en todas las cepas de *H. pylori*. PAI codifica alrededor de 30 genes distintos, que modulan la respuesta inflamatoria local y la producción de citoquinas. Codifica un Sistema Secretor tipo IV que transfiere a la proteína CagA dentro de las células del hospedador (Atherton y col., 1995; Hatakeyama, 2006).

Según el análisis de expresión de estas proteínas y sus genes, *H. pylori* puede ser clasificado en dos tipos: tipo I aquellas que tienen el gen *cagA* y expresan la proteína CagA y el tipo II, aquellas que no tienen el gen *cagA* y no expresan por consiguiente la proteína CagA (Zulio y col., 2004).

### **Respuesta inmune.**

La infección por *H. pylori* induce una respuesta inmunológica humoral sistémica y a nivel de la mucosa gástrica. La producción de anticuerpos no conduce a la erradicación de la infección pero puede contribuir a la disminución del daño tisular. En otros casos se ha reportado que algunos pacientes infectados tienen autoanticuerpos directamente contra la ATPasa de las células parietales lo cual se correlaciona con incremento de la atrofia del cuerpo gástrico (Negrini y col., 1997).

La respuesta inmune, tanto innata como adquirida, es importante para el

control de la inflamación causada por el microorganismo y la infección resultante.

La infección produce una infiltración masiva de la mucosa gástrica por neutrófilos y linfocitos (Wyatt y Rathone, 1988) y niveles elevados de anticuerpos específicos en suero, saliva, jugo gástrico y heces (Luzza, y col., 1995). A pesar de la respuesta inmune contra la infección por *H. pylori*, la bacteria es rara vez eliminada del estómago y la infección persiste de por vida. No obstante, en ratones inmunizados con ureasa de *H. pylori* se ha observado una correlación entre la IgA secretora (IgAs) de las mucosas frente a la ureasa y protección contra la colonización con *H. felis* (Lee y col., 1995).

Por otra parte, la infección por *H. pylori* desencadena una respuesta humoral a partir de linfocitos B presentes en la inflamación y los folículos linfoides formados en respuesta a la infección (Suerbaum y Michetti, 2002). Los linfocitos B responden a la infección produciendo inmunoglobulinas de clase IgA e IgG contra *Helicobacter*. Los anticuerpos de clase IgA inhiben la movilidad y adherencia bacteriana, neutralizan las sustancias bacterianas biológicamente activas, bloquean la activación del complemento e inhiben la vacuolización de las células epiteliales inducida por citoquinas (Piqué, 2004).

Al ser incapaz la respuesta inmune de limitar el proceso inflamatorio agudo, éste progresa con el tiempo a una inflamación crónica de predominio antral, inicialmente superficial, en la que se aprecia un aumento del número de células inflamatorias, linfocitos y plasmocitos, con algunos eosinófilos, en la lámina propia. Este infiltrado inflamatorio puede ocupar toda la superficie de la mucosa foveolar, pero no afecta o afecta mínimamente la zona glandular. El epitelio de

revestimiento puede mostrar irregularidades de las células cilíndricas, con alteraciones de los núcleos y aparición de algunas células caliciformes. En la progresión de la inflamación, el infiltrado inflamatorio se extiende a toda la profundidad de la mucosa llegando a formar folículos linfoides. Asociada a esta reacción inflamatoria no es infrecuente observar disminución de la capa de moco y aparición de erosiones en el epitelio de superficie. Con el tiempo la gastritis crónica progresa a atrofia gástrica en la cual se observa la pérdida de túbulos glandulares y el colapso entramado reticulínico. Junto con la atrofia glandular suele coexistir la metaplasia intestinal (Piqué, 2004), explicada anteriormente.

La inflamación producida por la colonización de *H. pylori* está relacionada con una alta producción de citoquinas como interleuquinas (IL6, IL8) factor de necrosis tumoral alfa (TNF alpha), factor de activación plaquetaria (PAF), interferón gamma (INF gamma); lo cual se ha visto incrementado en cepas que presentan *cagA* y las variantes alélicas más virulentas de *vacA m1/s1* más que en cepas *cagA* negativas *vacA m2/s2* (Ortiz y col., 2002; Rivera y col., 2004).

*H. pylori* determina una importante reacción inflamatoria local, la evolución de esta respuesta inmune local y su regulación constituyen probablemente un elemento clave para determinar las consecuencias de la infección. Factores producidos por la bacteria inducen la producción de interleuquina 8 (IL-8) por parte de células del epitelio gástrico, lo que contribuye al reclutamiento local de neutrófilos y a la activación de macrófagos, los que a su vez contribuyen al reclutamiento y activación de linfocitos a través de múltiples citoquinas. La respuesta inmune celular asociada a *H. pylori* es predominantemente a expensas

de linfocitos T ayudadores de tipo 1 (Th1), que se asocia a la activación de macrófagos y citotoxicidad, lo que parece ser clave en la generación del daño tisular y en la persistencia de la infección donde la generación de una respuesta Th2 juega un papel importante (Rollán, 2002).

### **Asociación de genes de virulencia con patologías gástricas.**

Se ha descrito que, cepas que expresan el alelo *s1* de *vacA* se asocian con úlcera péptica, mayor inflamación gástrica y mayor producción de citotoxina, comparado con cepas *s2*. Asimismo, las cepas *s1/m1* producen más citotoxina que las cepas *s1/m2* (Rollán, 2002).

Además, entre el 80-95% de los pacientes con enfermedad ulcerosa o con cáncer gástrico están infectados por cepas de *H. pylori cagA* (+), pero la frecuencia de *cagA* (+) en la población general supera el 60%, lo que lo hace poco eficiente como predictor único de patología clínicamente significativa (Rollán, 2002). Los mecanismos de la lesión y la inflamación pueden estar relacionados en parte, con los productos de dos genes *vacA* y *cagA*. (Ortiz y col., 2002; Schmidt y col., 2004).

En Taiwan, *H. pylori* con *vacA s1a* y *cagA* positivo están presentes en la mayoría de los pacientes con cáncer gástrico y gastritis crónica. Se ha demostrado que *vacA* interrumpe la maduración de los fagosomas en los macrófagos como también modula e interfiere con las funciones inmunológicas de los linfocitos T; adicionalmente, las células infectadas por *H. pylori* expresan receptores A y B para

IL-8 lo cual puede contribuir al aumento de la respuesta inflamatoria. Numerosas evidencias relacionan la variación genética de la respuesta inflamatoria producida por *H. pylori* con el mayor riesgo de carcinoma (Rivera y col., 2004).



## Antecedentes

En 1875, científicos alemanes descubrieron bacterias espirales en el epitelio del estómago humano (Pajares y Gisbert, 2006). Estas bacterias no podían ser cultivadas, y por consiguiente este descubrimiento se olvidó en aquel momento. En 1892, el investigador italiano Giulio Bizzozero describió una serie de bacterias espirales que vivían en el ambiente ácido del estómago de perros (Blaser, 2005).

El profesor Walery Jaworski, de la Universidad de Jagiellonian en Cracovia, investigó sedimentos de lavados gástricos obtenidos de humanos en 1899. Además de unas bacterias alargadas, también encontró bacterias con una característica forma espiral, a las cuales llamó *Vibrio rugula*. Este investigador fue el primero en sugerir la participación de este microorganismo en enfermedades gástricas (Baron, 1996).

En 1975 el doctor Robin Warren, patólogo del Hospital Royal Perth de Australia, encargó a uno de sus estudiantes, el doctor Barry Marshall, el estudio de una serie de pacientes con gastritis o úlcera péptica, en cuyas biopsias se habían observado bacilos curvados. El análisis de esos pacientes les llevó con el doctor Stewart Goodwin, encargado del departamento de microbiología de ese Hospital. Luego de una serie de intentos fallidos, en 1979 se logró aislar *H. pylori*, cuyo éxito es un verdadero ejemplo de serendipia: primero, la observación microscópica de los cortes histológicos reveló la presencia de bacterias curvadas, lo cual hizo pensar en *Campylobacter*, y se trató de aislar tal agente, en microaerobiosis

(Marshall, 1988). No obstante, los primeros intentos fracasaron; pero nuevamente otro hecho azaroso ocurrido en 1981, les favorecería: se olvidaron unas jarras con placas de cultivo en la incubadora durante las festividades de Semana Santa; al revisarlas cinco días más tarde, en vez de 48 horas como venían haciendo, y que es lo indicado para el aislamiento de *Campylobacter* spp, encontraron que se habían desarrollado pequeñas colonias transparentes, de bacilos curvados gramnegativos, similares a *Campylobacter* sp. Las bacterias resultaron oxidasa y catalasa positivas, lo que reforzaba las sospechas de que se trataba de *Campylobacter* (Marshall, 1988).

La demostración de que *Helicobacter* podía ser causa de enfermedad se constata de manera fehaciente cuando en 1985 Barry Marshall ingiere un inóculo bacteriano de *Campylobacter pyloridis*, bacteria hoy conocida como *Helicobacter pylori*, con lo cual se produce una gastritis que sirve de base para demostrar los postulados de Koch: Post tratamiento la bacteria fue erradicada y la gastritis revirtió (López-Brea, 2005).

A partir de esto comenzaron a aparecer informes de otros lugares, revelando el aislamiento de ese agente que fue denominado “Organismo similar a *Campylobacter*”, cuyas siglas del inglés - CLO - le distinguieron por un tiempo, hasta que se propuso el nombre de *Campylobacter pylori*, y fue cambiado a este, acorde con las reglas de la Comisión Internacional de Taxonomía Bacteriana (Marshall y Goodwin, 1987).

Por estudios en la implicación de *Helicobacter pylori* en la gastritis crónica activa tipo B y en la úlcera péptica, los doctores australianos Barry Marshall y

Robin Warren, fueron acreedores del premio Nobel de Medicina y Fisiología en el año 2.005 (López-Brea, 2005).

La caracterización de las propiedades del organismo incluyeron estudios de secuencias del ácido ribonucleico, los cuales indicaron que esta bacteria no podía ser incluida en el género *Campylobacter*. Fue considerada también, una posible relación en el género *Wolinella* pero las diferencias fenotípicas indicaban lo contrario, entonces el microorganismo fue renombrado *Helicobacter pylori*, representante de un nuevo género propuesto (Goodwin y Armstrong, 1990).

La forma de transmisión de *H. pylori* es desconocida. Se ha demostrado que la bacteria es excretada en las heces de individuos infectados y se ha detectado en moscas domésticas que habitualmente se desarrollan y alimentan de los excrementos (Gruber y col., 1997). Diferentes estudios muestran resultados contradictorios para la ruta fecal-oral así como también otros tipos de transmisión. En efecto esto puede ser explicado por las diferencias que existen en cada población. La dificultad del estudio está ligada a la falta de marcadores específicos para las posibles rutas de transmisión (Hunt, 1998).

Se ha comprobado que la carcinogénesis gástrica inducida por *H. pylori* depende de la interacción que existe entre la bacteria y el huésped; puesto que, la inflamación es intensa y tiene efectos negativos en las células epiteliales. Esto puede ser producto de la colonización por cepas de mayor interacción: las cepas *cag+* inducen mayor inflamación y efectos en el ciclo celular, y las cepas *vacA s1/m1* producen un mayor daño directamente en el epitelio. Las citocinas producidas en el huésped, pudieran regular las respuestas inflamatorias. Los

factores ambientales, así como fumar y dietas altas en sales, incrementan el riesgo de ser colonizado por la bacteria (Blaser, 2005).

La asociación entre la infección por *H. pylori* y cáncer gastroduodenal es tan estrecha que en 1994 la Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) y la OMS lo clasificaron como carcinógeno de clase I dentro de los agentes causales (IARC, 1994).

La prevalencia de la infección por *H. pylori* se ha estimado en 60% en los países en vías de desarrollo. Generalmente la adquisición ocurre cerca de un 10% de niños por año, por consiguiente, la mayoría se encuentra infectado en la adolescencia (Hernández, 2001).

En los países desarrollados, la infección por este agente patógeno es poco frecuente en niños y aumenta gradualmente en función de la edad, llegando a alcanzar niveles del 30% de infestación a los 30 años de edad, valor que se mantiene constante a edades mayores. En los países en vías de desarrollo, la mayor parte de sus habitantes se encuentran infectados en la edad adulta, llegando esta infestación a valores cercanos al 70 % (Hernández, 2001).

La situación en Venezuela no es diferente con respecto al resto de los países en vías de desarrollo, se ha reportado la detección de *H. pylori* en un 95 a 100% de úlceras duodenales y en un 70 a 80% de úlceras gástricas (Rivera, 2004).

En el estado Táchira existe una de las más altas prevalencias de infección en Venezuela (90 a 96%) y es allí donde también se reporta alta incidencia de carcinoma gástrico que se ha asociado a la presencia de *H. pylori* en numerosos estudios (Rivera, 2004).

La alta seroprevalencia en el estado Táchira, ha sido comprobada al realizar pruebas serológicas de anticuerpos anti- *H. pylori* relacionándolas con diagnóstico histopatológico demostrando una prevalencia general de la infección del 94% (Muñoz y col., 1996).

## Objetivos

### Objetivo general:

- Identificar genes de virulencia de *Helicobacter pylori* en pacientes con lesiones gástricas precancerosas.

### Objetivos específicos:

- Realizar cultivos de *H. pylori* a partir de biopsias gástricas de pacientes con lesiones precancerosas.
- Extraer ADN de cultivo bacteriano de *H. pylori* y de biopsias gástricas con el objetivo de identificar a la bacteria y detectar los genes de virulencia.
- Identificar genes de virulencia (*ureC*, *cagA3'*, *vacA m1/m2*, *vacA s1/s2*, *babA*) de ADN aislado de biopsias y cultivos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Estandarizar un PCR multiplex para la detección de *vacA m/s*.
- Determinar anticuerpos IgG específicos en suero e IgA secretoras en saliva anti *H. pylori* mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

## **Materiales y Métodos**

La población de estudio estuvo conformada por 57 pacientes que asistieron a consulta de gastroenterología del Hospital Universitario de Caracas, entre los meses de diciembre 2009 y marzo 2010. Los pacientes evaluados fueron de ambos sexos, con edades comprendidas entre 16 y 78 años (edad promedio  $51,3 \pm 14,2$  años), que previo consentimiento informado (Anexo1) aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Biomedicina, fueron sometidos a estudios endoscópicos de las vías superiores, y que por diagnóstico histopatológico presentaron lesiones precancerosas y/o gastritis crónica. A estos pacientes se les tomaron 2 biopsias gástricas antrales de aproximadamente 2mm de diámetro. Una de estas biopsias fue utilizada para cultivo (y posteriormente fue incluida en un medio de ureasa rápida) y la otra biopsia fue destinada para el diagnóstico molecular. Conjuntamente a cada paciente se le tomó 1 muestra de saliva y 1 muestra de sangre venosa. Adicionalmente, se utilizó un instrumento de recolección de datos para obtener la información socioeconómica del paciente para realizar la determinación del Graffar (Méndez y Méndez, 1986) (Anexo 2).

La muestra de saliva fue tomada, introduciendo en la boca del paciente un algodón estéril, el cual se impregnó de saliva y posteriormente fue colocado en el embolo de una inyectadota y vertido su contenido en un tubo con EDTA.

La muestra de sangre, se procesó en el laboratorio, centrifugando las muestras, obteniendo así el suero que será almacenado.

### **Cultivo de *Helicobacter pylori*.**

El cultivo se realizó a partir de una biopsia gástrica extraída de una endoscopia previa. Esta biopsia fue transportada en solución salina estéril a una temperatura de 4°C aproximadamente, con la finalidad de mantener la viabilidad de la bacteria.

La biopsia fue sembrada en placas con agar Columbia (OXOID, England) más 7% de sangre humana y suplemento selectivo de antibióticos para *H. pylori* (OXOID, England), según indicaciones del fabricante.

Posteriormente la biopsia fue incluida en un medio con urea para la determinación de ureasa. De ser positivo, el medio se colorea de color púrpura en un periodo de tiempo menor a 24 horas.

Las placas fueron incubadas en estufa a 37°C y en condiciones de microaerofilia (7% de CO<sub>2</sub>) durante cinco a siete días. Una vez crecidas las colonias sospechosas fueron identificadas por sus características morfológicas y se comparó con los resultados obtenidos en la prueba de ureasa rápida. Posteriormente el cultivo fue almacenado para realizar la extracción de ADN; y repicado en placas adicionales para así obtener mayor cantidad de colonias de *H. pylori*.



## **Extracción de ADN con proteinasa K a partir de biopsias gástricas y de cultivos de *Helicobacter pylori*.**

Se utilizó el siguiente protocolo de extracción de ADN con proteinasa K, a partir de biopsias, tomando como base protocolos estándar del Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto de Biomedicina.

### **Fase de lisis**

1. Se incubaron las biopsias gástricas durante 3 horas a 65°C en un tubo eppendorf de 1,5 ml con 100 µl de Buffer Lisis (Tris-HCl 10mM, pH: 8,0 + Sarcosina 0,1%) y 100 µl de proteinasa K (1mg/ml).

### **Fase de extracción**

2. Se agregó un volumen igual de Cloroformo: Fenol: Isoamílico. Se agitó durante 10 segundos aproximadamente y se centrifugó a 14.000g durante 10 minutos.
3. Se tomó la fase acuosa y se transfirió a otro tubo eppendorf agregando un volumen igual de cloroformo, se mezcló por inversión y centrifugó a 14.000g durante 10 minutos.

### **Fase de precipitado y resuspensión**

4. Se tomó la fase acuosa y se transfirió a otro tubo eppendorf. Luego se agregaron 1/10 volúmenes de acetato de amonio o de sodio 3M y el doble

de volumen de etanol absoluto frío. Se mezcló suavemente por inmersión y se dejó precipitando toda la noche a -20°C.

5. Al día siguiente se centrifugó a 14.000g durante 20-30 minutos.
6. Se colocaron los tubos en posición invertida en la estufa a 37 °C durante 20 minutos hasta secarse las paredes de los mismos.
7. Se resuspendió el sedimento en 50 µl de agua destilada libre de nucleadas y se colocaron los tubos en estufa a 37 °C por 20 minutos.
8. Posteriormente se guardaron los tubos a -20°C hasta el momento de su uso.

Para la extracción de ADN de *H. pylori* a partir de cultivo, se utilizó el siguiente protocolo, tomando como base protocolos estándar del Laboratorio de Microbiología Molecular del Instituto de Biomedicina.

1. Se centrifugaron las células tomadas del cultivo a 14.000g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavaron las células de restos de agar con 300 µl de solución salina (0,85 %) y se centrifugó de nuevo a 14000 g durante 5 minutos, para luego volver a descartar el sobrenadante.
2. Se resuspendió el sedimento bacteriano en 400 µl de buffer STE (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0) + 20 µl lisozima (100 µg/ml frío) (392 µl buffer STE + 8 µl lisozima 50 mg/ml).
3. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.
4. Posteriormente se añadieron 40 µl de SDS al 10% y se mezcló por inversión.

5. Se incubó durante 10 minutos a 65°C.
6. Luego se añadió 10,5 µl de proteinasa K y se incubaron las muestras durante 2 horas a 55°C.
7. Posteriormente se agregó 1 volumen de cloroformo-fenol-isoamílico (469µl aproximadamente) y se mezcló con un vortex durante 10 segundos.
8. Se centrifugó a 14.000g durante 10 minutos.
9. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf, y se agregó 1 volumen de cloroformo (450 µl aproximadamente).
10. Se centrifugó de nuevo a 14000g durante 10 minutos.
11. Se transfirió la fase acuosa (aproximadamente 400 µl) a un nuevo tubo eppendorf.
12. Se agregaron 1/10 volúmenes de acetato de amonio (3M pH 5.2).
13. Se añadieron 2 volúmenes y medio de etanol a 100%.
14. Se incubó a -20°C durante toda la noche.
15. Al día siguiente se centrifugó a 14.000g por 30 minutos.
16. Se descartó el sobrenadante y se lavó con 300 µl de Etanol 75%, y se centrifugó nuevamente a 14.000g durante 10 minutos.
17. Se descartó el sobrenadante y se colocaron los tubos en posición invertida en la estufa a 37°C por 20 minutos o hasta secarse las paredes de los mismos.
18. Se resuspendió el sedimento en 100 µl de agua destilada libre de nucleadas.
19. Posteriormente se guardaron los tubos a -20°C hasta el momento de su uso.

## PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

A continuación se presentan las condiciones específicas que han sido previamente estandarizadas en el laboratorio de Microbiología Molecular y que se utilizaron para la amplificación de los genes de virulencia de *H. pylori*.

Para una reacción con un volumen final de 25  $\mu$ l, se agregó 1  $\mu$ l de ADN bacteriano (equivalente a  $2,5 \times 10^7$  cel/ml) en 24  $\mu$ l de mezcla de reacción que contenía: 2,5  $\mu$ l de buffer PCR 10X; 0,75  $\mu$ l de  $MgCl_2$  50mM; 0,2  $\mu$ l de dNTPs 100mM; 35 pmol/ $\mu$ l de cada uno de los iniciadores (delantero y reverso), 0,2  $\mu$ l de Taq polimerasa (5 U/  $\mu$ l) y 19,35  $\mu$ l de agua.

Igualmente para un volumen final de 25  $\mu$ l, pero para ADN obtenido a partir de biopsias gástricas se prepararon 20  $\mu$ l de mezcla de reacción, como la señalada anteriormente y se agregaron 5  $\mu$ l del material genético ( $2 \times 10^7$   $\mu$ g/ml).

Los genes de virulencia que se amplificaron fueron: *ureC* (294 pb), *vacA m1/m2* (567/642 pb), *vacA s1/s2* (259/286 pb), *cagA3'* (Tipo A: 642-651 pb. TipoB: 756pb. TipoC: 810-813pb. TipoD: 756pb) y *babA* (832 pb) (Tabla 1).

**Tabla 1:** Cebadores usados para la amplificación de los genes de virulencia de *H. pylori*.

Gen/Alelo	Cebador	Secuencia	Tamaño (Kb)
<i>ureC glmM</i>	GLMMF	5'-GGATAAGCTTTTAGGGGTGTTAGGG-3'	294
	GLMMR	5'-GCTTACTTTCTAACACTAACGCGC-3'	
<i>vacA m1/m2</i>	VAGF	5'-GGTCAAATGCGTCAYGG-3'	567 ( <i>m1</i> )
	VAGR	5'-CCATTGGTACCTGTAGAAA-3'	642 ( <i>m2</i> )
<i>vacA s1/s2</i>	VA1 – F	5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3'	259 ( <i>s1</i> )
	VA1 – R	5'-CTGCTTGAATGCGCCAAC-3'	286 ( <i>s2</i> )
<i>cagA 3'</i>	CAGTF	5'-TCTAAAAGATTACGCTCATAGGCG-3'	Tipo A: 642 – 651
	CAGTR	5'-CTTTGGCTTGCATGTTCAAGTTGCC-3'	Tipo B: 756
			Tipo C: 810 – 813
			Tipo D: 756
<i>babA2</i>	BABA2F	5'-AATCCAAAAAGGAGAAAAAGTATGAAA-3'	832
	BABA2R	5'-TGTTAGTGATTTTCGGTGTAGGACA-3'	

Las condiciones de los programas de amplificación son mostradas en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Condiciones de Amplificación.

<b>Programa</b>	<b>Tiem po</b>	<b>cagA3'</b> (Tipo A: 642-651pb. TipoB:756pb. TipoC:810-813pb. TipoD:756pb)	<b>ureC</b> (294pb)	<b>babA2</b> (832pb)	<b>vacA</b> <b>m1/m2</b> (547pb y 642pb)	<b>vacA</b> <b>s1/s2</b> (259pb y 284pb)	
<b>HOLD</b>	<b>1.5 min</b>	<b>94 °C</b>	<b>94 °C</b>	<b>94 °C</b>	<b>94 °C</b>	<b>94 °C</b>	<b>1 ciclo</b>
<b>Desnaturalización</b>	<b>1 min</b>	<b>94 °C</b>	<b>94 °C</b>	<b>94 °C</b>	<b>94 °C</b>	<b>94 °C</b>	
<b>Hibridación</b>	<b>1 min</b>	<b>55 °C</b>	<b>60 °C</b>	<b>56 °C</b>	<b>56 °C</b>	<b>52 °C</b>	<b>35 Ciclos</b>
<b>Extensión</b>	<b>1 min</b>	<b>72 °C</b>	<b>72 °C</b>	<b>72 °C</b>	<b>72 °C</b>	<b>72 °C</b>	
<b>Extensión final</b>	<b>6 min</b>	<b>72 °C</b>	<b>72 °C</b>	<b>72 °C</b>	<b>72 °C</b>	<b>72 °C</b>	<b>1 ciclo</b>
<b>Enfriar</b>	<b>-</b>	<b>4 °C</b>	<b>4 °C</b>	<b>4 °C</b>	<b>4 °C</b>	<b>4 °C</b>	
<b>Referencias:</b>		Yamaoka y col., 1998	Kamali Sarvestamiy col., 2006	Quiroga y col., 2005	Atherton y col., 1995		

En base a los protocolos de amplificación para cada gen existentes en el laboratorio de Microbiología Molecular, se estandarizó un PCR multiplex para la

detección del gen *vacA* con sus variantes alélicas *m/s*, siendo 55°C la temperatura de alineación óptima.

Para una reacción de un volumen final de 50 µl, se agregaron 40 µl de mezcla de reacción con: 5 µl de buffer PCR 10X, 3 µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 1.25 µl de dNTPs 100mM, 35 pmol/µl de cada uno de los iniciadores *vacA m/s* (delantero y reverso), 0,4 µl de Taq polimerasa (5 U/ µl); y 10µl (2 x 10<sup>7</sup>µg/ml) de ADN total de biopsias gástricas o 5 µl (equivalente a 2,5 x 10<sup>7</sup> cel/ml) de ADN de *H. pylori* obtenido de cultivo, completando el volumen final con agua.

### **Electroforesis en gel de agarosa para la visualización del ADN.**

Para la electroforesis en geles de agarosa se siguió el siguiente protocolo, estandarizado previamente en el laboratorio de Microbiología Molecular:

1. Los productos amplificados mediante PCR simple y PCR multiplex fueron visualizados a través de una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1% y 2%, respectivamente, teñido con bromuro de etidio.
2. Esta mezcla se vertió en la bandeja, se colocaron los peines y se esperó a que solidificara.
3. Se colocaron 10 µl de muestra con 3 µl de buffer de carga en cada bolsillo y el marcador de peso molecular de 1,2 Kb.
4. Se corrieron los geles a 100 v durante aproximadamente 1 hora y fueron visualizados en un transiluminador UV.

## **ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas).**

- **Protocolo para la determinación de IgA secretora específica anti-*Helicobacter pylori* en saliva a través de la técnica de ELISA, desarrollado en el laboratorio de Microbiología Molecular, Instituto de Biomedicina.**

1.- **Sensibilización:** Se acopló el antígeno comercial de *Helicobacter pylori* (BacTrace Positive Control Antigen *Helicobacter pylori*, Laboratorios Kirkegaard y Perry), según instrucciones del fabricante, diluido 1/100 en buffer carbonato pH 9,6 durante 2 horas a 37°C en Placas Nunc MaxiSorp (100µl/pozo).

2.- Se aspiró la placa, colocándola boca abajo y eliminando el exceso.

3.- **Bloqueo:** Se agregaron 100 µl por pozo de PBST-BSA 0,5% (buffer fosfato salino Tween 20, con albúmina sérica bovina) y se incubó durante 2 horas a 37°C.

4.- Se aspiró la placa.

5.- **Muestra:** Se incubaron las muestras de saliva (100 µl/pozo) diluidas 1/10 con PBST-BSA 0,5%, durante una hora a 37°C.

6.- Posteriormente se aspiró y se lavó la placa 5 veces con PBS tween al 0,05%.

7.- **Conjugado:** Se agregaron 100µl/pozo de Anti IgA marcada con peroxidasa (diluido 1/1000) en PBST-BSA 0,5%. Se incubó en estufa a 37°C por una hora.

8.- Nuevamente se aspiró y lavó la placa, 5 veces con PBS tween al 0,05%.

9.- **Revelado:** Se reveló con una solución colorante de 10 mg de ortoparafenildiamina (OPD) en 20 ml de buffer citrato pH 5,4, más 30µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Se dejó incubar 15 minutos en oscuridad y se detuvo la reacción agregando 30  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (peróxido de Hidrógeno) 2,5N.

10.- Posteriormente fue leída la absorbancia a 490 nm en un lector de placas de ELISA.

Se consideraron como positivos, los valores mayores de 0,400 UDO; punto de corte previamente establecido por Ortiz y col., 2002.

- **Protocolo para la determinación de IgG en suero, a través de la técnica de ELISA.**

A partir de protocolos ya existentes en el Laboratorio de Microbiología Molecular, se estandarizó una ELISA para la determinación de anticuerpos IgG séricos específicos anti- *H. pylori*.

Se probaron diferentes concentraciones de antígeno, muestra y conjugado, obteniendo los mejores resultados con el siguiente protocolo:

1.- **Sensibilización:** Se acopló el antígeno comercial de *Helicobacter pylori* (BacTrace Positive Control Antigen *Helicobacter pylori*, Laboratorios Kirkegaard y Perry), según instrucciones del fabricante, diluido 1/100 en buffer carbonato pH 9,6, durante 2 horas a 37°C en Placas Nunc MaxiSorp (100  $\mu$ l/pozo).

2.- Se aspiró la placa.

- 3.- **Bloqueo:** Se agregaron 100  $\mu$ l por pozo de PBST-BSA (buffer fosfato salino Tween 20, con albúmina sérica bovina) 0,5%, y se incubó por 2 horas a 37°C.
- 4.- Se aspiró la placa.
- 5.- **Muestra:** Se incubaron las muestras de suero (100  $\mu$ l/pozo) diluidas 1/100 con PBST-BSA 0,5% durante una hora a 37°C.
- 6.- Posteriormente se aspiró y lavó la placa 5 veces con PBS tween al 0,05%.
- 7.- **Conjugado:** Se agregó 100  $\mu$ l/pozo de Anti-Human IgG marcada con peroxidasa diluido 1/6000 en PBST-BSA 0,5%. Se incubó en estufa a 37°C por una hora.
- 8.- Nuevamente se aspiró y lavó la placa 5 veces con PBS tween al 0,05%.
- 9.- **Revelado:** Se reveló con una solución colorante de 10mg de ortoparafenildiamina (OPD) en 20 ml de buffer citrato pH 5,4, más 30 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se dejó incubar 15 minutos en oscuridad y se detuvo la reacción agregando 30 $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (peróxido de hidrógeno) 2,5N.
- 10.- Posteriormente fue leída la absorbancia a 490 nm en un lector de placas de ELISA.

### **Análisis estadístico**

Para realizar el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico InStat3, ANOVA para la comparación de medias y DS, y la prueba exacta de Fisher para la comparación de proporciones.

## **Estudio histopatológico**

Fue realizado por el médico patólogo correspondiente en el Instituto Anatomopatológico de la Universidad Central de Venezuela.

Cabe destacar que se obtuvieron sólo 43 resultados de los 57 pacientes evaluados.

Para agrupar de manera adecuada la diversidad de patologías encontradas en la población de estudio se siguieron los criterios de la clasificación histológica de Viena y Padova (Schlemper y col., 2000; Rugge y col., 2000), que consiste en 3 grandes grupos: 1.- engloba la gastritis crónica y la metaplasia intestinal y es denominado: negativo para malignidad/displasia, 2.- encierra lesiones como la hiperplasia foveolar y la metaplasia intestinal hiperproliferativa, y es denominado indefinido para neoplasia/displasia y 3.- abarca la displasia de bajo grado y es denominado como neoplasia de bajo grado (no invasiva).

## Resultados

En este trabajo de investigación se evaluaron un total de 57 pacientes, que asistieron a consulta de gastroenterología del Hospital Universitario de Caracas, de los cuales el 75% (43/57) fue de sexo femenino y el 25% (14/57) de sexo masculino; con edades comprendidas entre 16 y 78 años (edad promedio  $51,33 \pm 14,21$  años).

A la población estudiada se le determinó el Graffar utilizando la clasificación Graffar modificada para Venezuela por Hernán Méndez Castellano, obteniéndose que un 56% (32/57) de la población pertenecía a Graffar IV, el 25% (14/57) al III, el 16% (9/57) al V, y un 4% (2/57) al II. Cabe destacar que ninguno de los pacientes perteneció a la escala I de Graffar (Tabla 3).

**Tabla 3:** Clasificación de Graffar modificada para Venezuela por Hernán Méndez Castellano, para la población estudiada.

<b>Graffar (N total = 57)</b>	<b>Nro. Pacientes (%)</b>
<b>I (Alta)</b>	0 (0%)
<b>II (Media alta)</b>	2 (4%)
<b>III (Media baja)</b>	14 (25%)
<b>IV (Obrera)</b>	32 (56%)
<b>V (Marginal)</b>	9 (16%)

### Cultivo de Biopsias gástricas

Una biopsia de cada paciente fue destinada para realizar el cultivo de *H. pylori*, en placas con agar al 7% de sangre humana con suplemento de antibióticos (Vancomicina, Trimetoprima, Cefsulodina, Amfotericina B); obteniéndose un 16% (9/56) de cultivos positivos, 52% (29/56) de cultivos negativos y un 32% (18/56) de cultivos contaminados.

De las 56 biopsias gástricas sembradas, 53 fueron incluidas en medios de urea para la determinación de ureasa (prueba rápida de ureasa), resultando positivas un 25% (13/53) y negativas un 75% (40/53) (Tabla 4).

Todos los cultivos positivos, fueron confirmados con la prueba rápida de la ureasa.

**Tabla 4:** Resultados de cultivos de *H. pylori* y prueba rápida de ureasa.

	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>	<b>Contaminado</b>
<b>Cultivo (n=56)</b>	9 (16%)	29 (52%)	18 (32%)
<b>P.Ureasa Rápida (n=53)</b>	13 (25%)	40 (75%)	N.A

N.A: No Aplica

Los cultivos obtenidos, fueron repicados y almacenados para posteriormente extraer ADN bacteriano que fue utilizado para PCR.

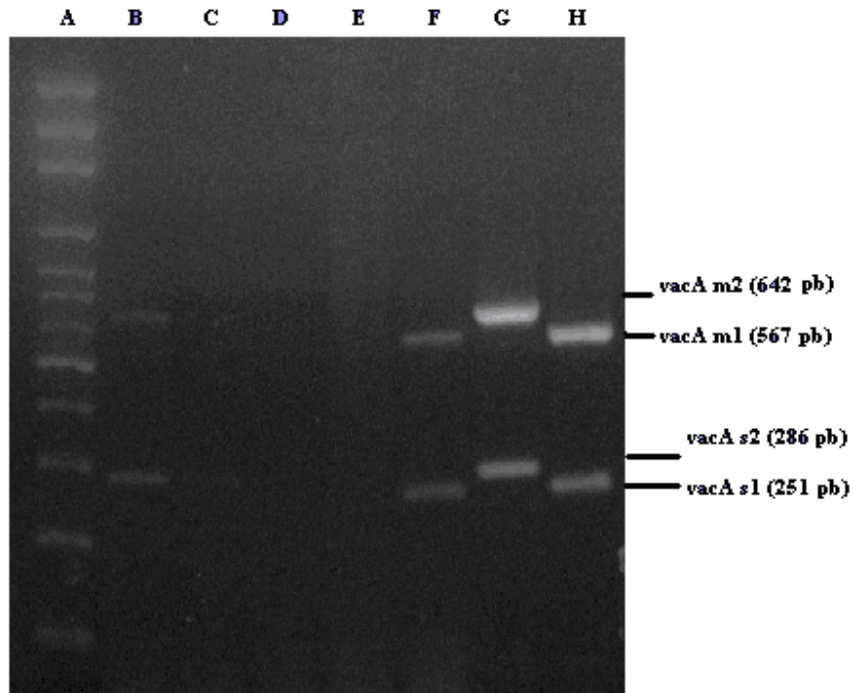
### **Diagnóstico molecular de *H. pylori*.**

Para la identificación molecular de la bacteria, se aisló ADN con proteinasa K, a partir de 57 biopsias gástricas y 9 cultivos de *H. pylori*.

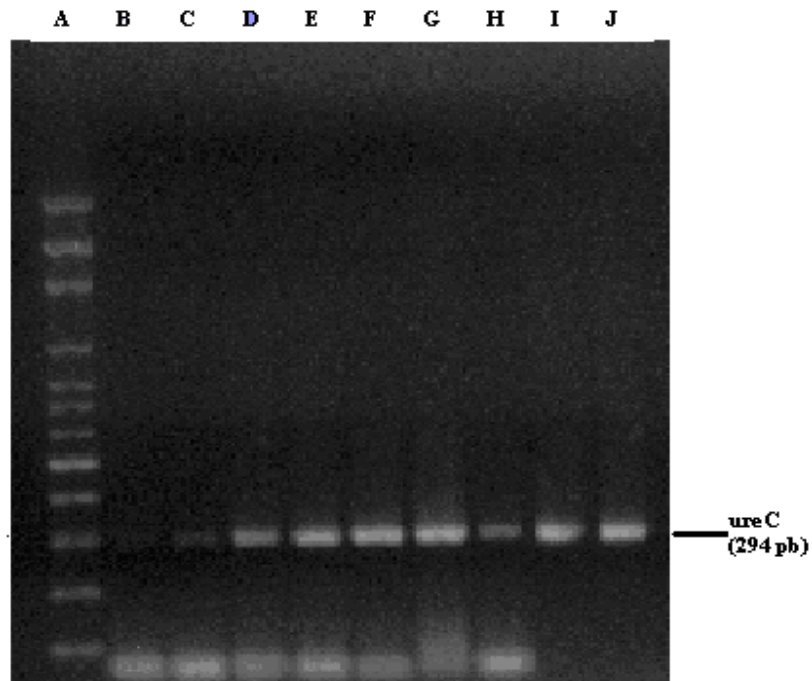
Al realizar la PCR, de los 66 aislamientos de ADN total (57 obtenidos a partir de biopsias gástricas y 9 a partir de cultivos), se detectó ADN de *H. pylori* en el 70% (40/57) de las muestras.

Para la determinación del gen *vacA* y sus variantes alélicas *m/s*, se estandarizó un PCR multiplex, a partir de protocolos establecidos en el laboratorio. Esta PCR permite el análisis simultáneo de los diferentes subtipos del gen. Para esto, se seleccionaron cebadores cuya temperatura de hibridación estuviera en un rango entre los 54°C y 56°C, y que sus pesos moleculares fuesen distintos para que al observarlos en el gel de agarosa se logaran identificar. Este procedimiento se intentó probar con *vacA m/s* y *cagA3'*, pero debido al tamaño de los fragmentos detectados por el cebador *cagA3'*, se hizo difícil la interpretación de los resultados en el gel de electroforesis. Posteriormente se hicieron pruebas con *vacA m/s* y *ureC* pero al igual que con *cagA3'*, fue difícil diferenciar las variantes alélicas *s1/s2* de *ureC* al visualizar las bandas en el gel de electroforesis. Es por ello que se estandarizó el PCR multiplex con *vacA* y sus variantes alélicas *m/s*, ensayándose en una amplia cantidad de muestras conocidas y corroborándose luego por PCR simples, obteniendo resultados óptimos. En la figura 4 se observan los productos de 259 pb para *vacAs1*, 286 pb para *vacAs2*, 567 pb para *vacAm1* y 642 pb para *vacAm2*; estos productos fueron visualizados en una corrida electroforética en gel de agarosa al 2%.

Los genes *ureC* con 294 pb (Figura 5), *cagA3'* con sus diferentes tipos: A (642-651 pb), B (756 pb), C (810-813 pb), D (756 pb) (Figura 6) y *babA* con 832 pb (Figura 7), fueron visualizados en geles de agarosa al 1%.

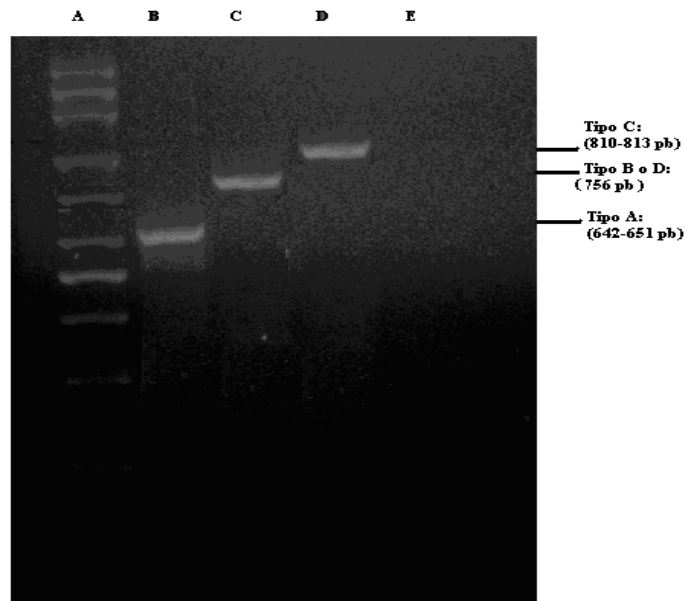


**Figura 4:** Registro fotográfico de la corrida electroforética de los productos de PCR Multiplex de *vacA m1/m2* y *vacA s1/s2*, de pacientes del Hospital Universitario de Caracas, utilizando los cebadores VAGF/VAGR y VA1-F/VA1-R. Carril A: Marcador de peso molecular 1200pb, Carril B – F: muestras, Carril G: Control positivo para *vacAm2/s2*, Carril H: Control positivo *vacAm1/s1*.

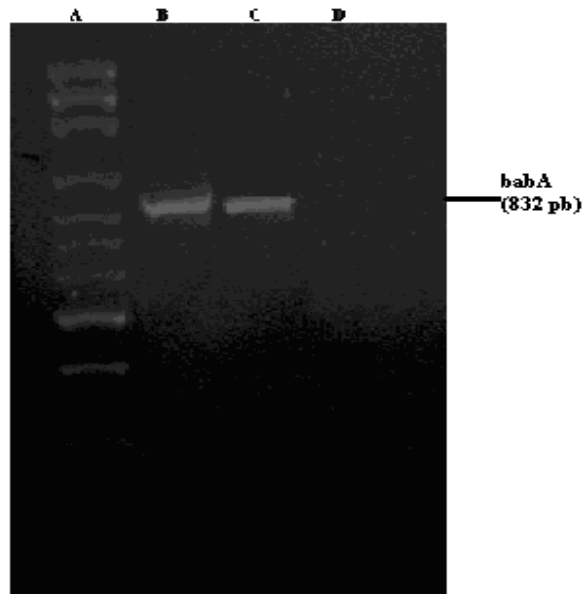


**Figura 5:** Registro fotográfico de la corrida electroforética de los amplificadores de *ureC*, de pacientes del Hospital Universitario de Caracas, usando los cebadores *ureC glmMR* y *ureC glmMF*. Carril A: Marcador de peso molecular 1200pb, Carril B-I: muestras, Carril J: Control positivo.



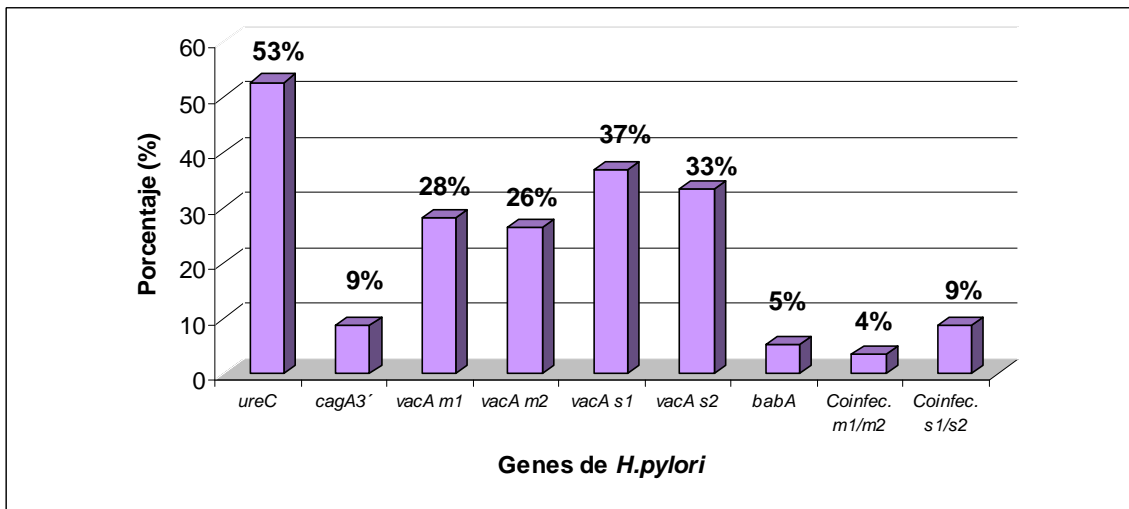


**Figura 6:** Registro fotográfico de la corrida electroforética de los amplificadores de *cagA3'*, de pacientes del Hospital Universitario de Caracas, usando los cebadores CAGTF/CAGTR. Carril A: Marcador de peso molecular 1200pb, Carril B-D: muestras, Carril E: Control negativo.



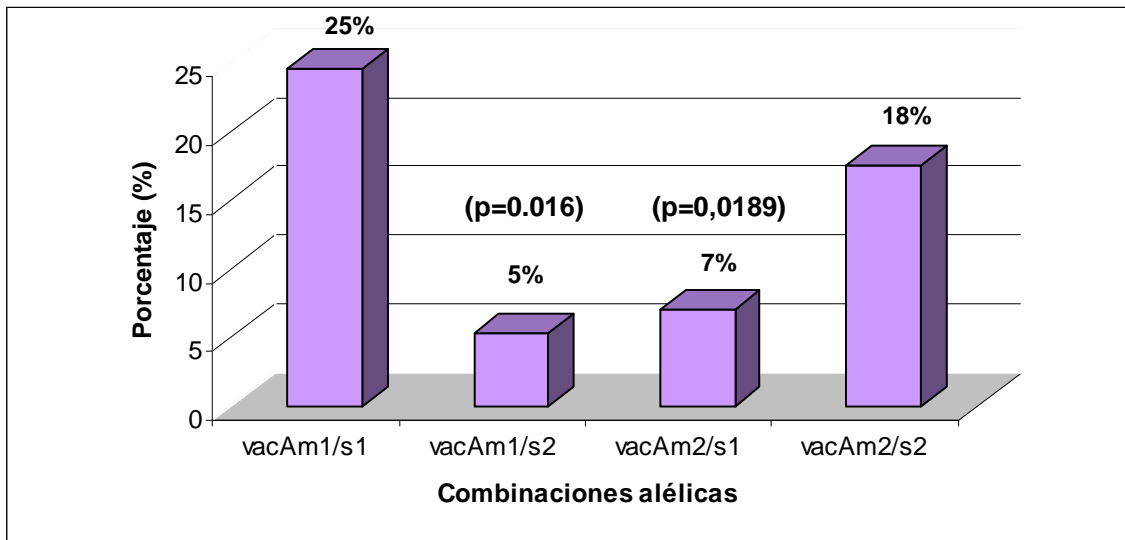
**Figura 7:** Registro fotográfico de la corrida electroforética de los amplificadores de *babA*, de pacientes del Hospital Universitario de Caracas, usando los cebadores BABA2F/ BABA2R. Carril A: Marcador de peso molecular 1200pb, Carril B-C: muestras, Carril D: Control negativo.

La frecuencia de los diferentes tipos alélicos de *vacA* y los genes de virulencia de *H. pylori* se muestran en la figura 8. Se encontró un 53% (30/57) de positividad para el gen *ureC*, un 37% (21/57) para la forma alélica del gen *vacAs1*, un 33% (19/57) para *vacAs2*, 28% (16/57) para *vacAm1* y 26% (15/57) para *vacAm2*. No se encontraron diferencias significativas al comparar las variantes alélicas de *vacA*. Se observó un 9% (5/57) de frecuencia en el gen *cagA3'* y 5% (3/57) para el gen *babA*. Se encontró un porcentaje de coinfección de cepas *vacAm1/m2* del 4% (2/57) y para *vacAs1/s2* del 9% (5/57).



**Figura 8:** Frecuencia de genes de *H. pylori*, en población estudiada.

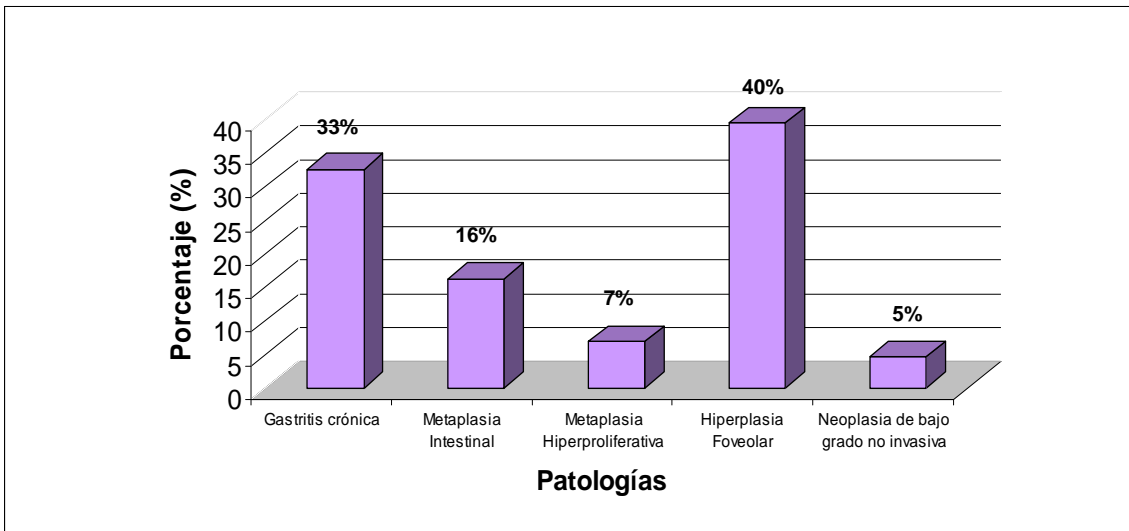
En referencia a la frecuencia de combinación de los distintos tipos alélicos del gen *vacA*, encontrados en los aislados de las muestras de ADN evaluadas, se pudo observar que la combinación más frecuente fue *vacA m1/s1* con un 25% (14/57), seguido de *vacA m2/s2* con 18% (10/57) y *vacA m2/s1* y *vacA m1/s2* con 7% (4/57) y 5% (3/57), respectivamente. Encontrándose diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,0189$ ) al comparar *vacA m1/s1* y *m2/s1* y también al comparar *vacA m1/s1* y *vacA m1/s2* ( $p=0.016$ ) (Figura 9).



**Figura 9:** Frecuencia de las combinaciones alélicas del gen *vacA* (*m/s*) de *H. pylori* en la población estudiada.

**Patologías encontradas por estudio histopatológico.**

Los resultados histopatológicos se muestran en la Figura 13, donde se observa que el 40% (17/43) de los pacientes presentó hiperplasia foveolar, el 33% (14/43) gastritis crónica, el 17% (7/43) metaplasia intestinal, el 7% (3/43) metaplasia intestinal hiperproliferativa y el 5% (2/43) displasia de bajo grado.



**Figura 10:** Resultados histopatológicos de biopsias gástricas de los pacientes evaluados. N = 43.

La presencia de *H. pylori* determinada por PCR en cada lesión se muestra en la Tabla 8, donde se observa que el 57% (8/14) de los pacientes con gastritis crónica, el 71% (5/7) de los pacientes con metaplasia intestinal, la totalidad de los pacientes (3/3) con metaplasia intestinal hiperproliferativa y el 82% (14/17) de los pacientes con hiperplasia foveolar evidencian la presencia de *H. pylori*. En cambio, para el 2% de los pacientes que presentaron displasia de bajo grado, en ninguno de los casos se detectó la presencia de *H. pylori*.

**Tabla 5:** Presencia de *Helicobacter pylori* detectado por PCR en las distintas patologías gástricas.

N = 43	<b>Hp</b>	
	<b>positivo</b>	<b>negativo</b>
<b>Gastritis Crónica</b>	8/14 (57%)	6/14 (43%)
<b>Metaplasia Intestinal</b>	5/7 (71%)	2/7 (29%)
<b>Metaplasia Intestinal Hiperproliferativa</b>	3/3 (100%)	0/3 (0%)
<b>Hiperplasia Foveolar</b>	14/17 (82%)	3/17 (18%)
<b>Displasia de Bajo Grado</b>	0/2 (0%)	2/2 (5%)

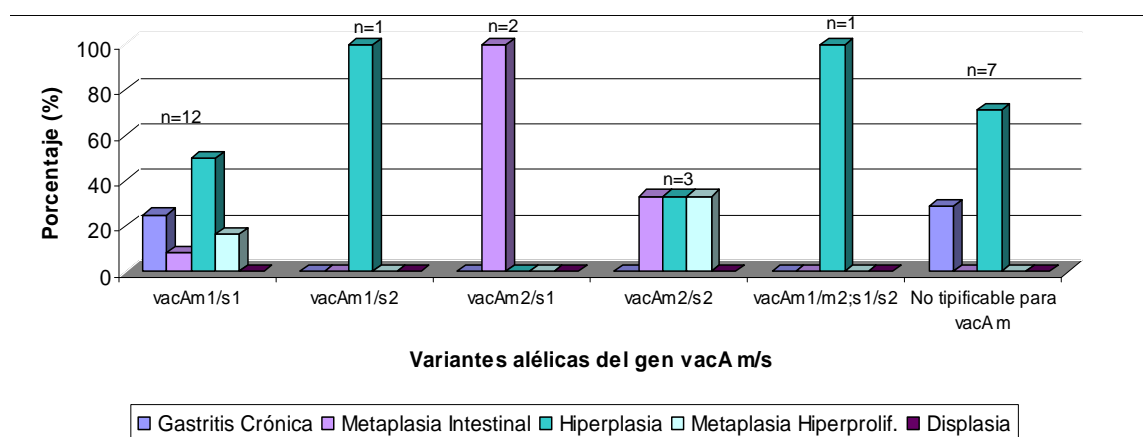
Al relacionar la malignidad de la lesión con las variantes alélicas del gen *vacA m/s* (Figura 14), se observó que un 50% (6/12) de pacientes con cepas *vacA m1/s1*, presentaron hiperplasia foveolar; el 25% (3/12) presentó gastritis crónica, el 17% (2/12) metaplasia intestinal hiperproliferativa y el 8% (1/12) metaplasia intestinal.

En cuanto a las cepas con las variantes alélicas *vacA m2/s2*, se encontró presente en un 33,33% (1/3) de pacientes con Hiperplasia foveolar, 33,33% (1/3) metaplasia intestinal y 33,33% (1/3) metaplasia intestinal hiperproliferativa.

En el caso del paciente (100% (1/1)) que presentó cepas *vacAm1/s2* se encontró que éste padecía de hiperplasia foveolar, mientras que los dos pacientes

(100% (2/2)) infectados con cepas *vacAm2/s1* presentaban lesiones de metaplasia intestinal.

Cabe destacar que en un pequeño grupo de pacientes (7/7) no se logró tipificar *vacA m1/m2*. De este grupo, el 71% (5/7) presentó hiperplasia foveolar y 29% (2/7) gastritis crónica.



**Figura 11:** Distribución de las patologías gástricas y las variantes alélicas de *vacA m/s* encontradas en la población evaluada

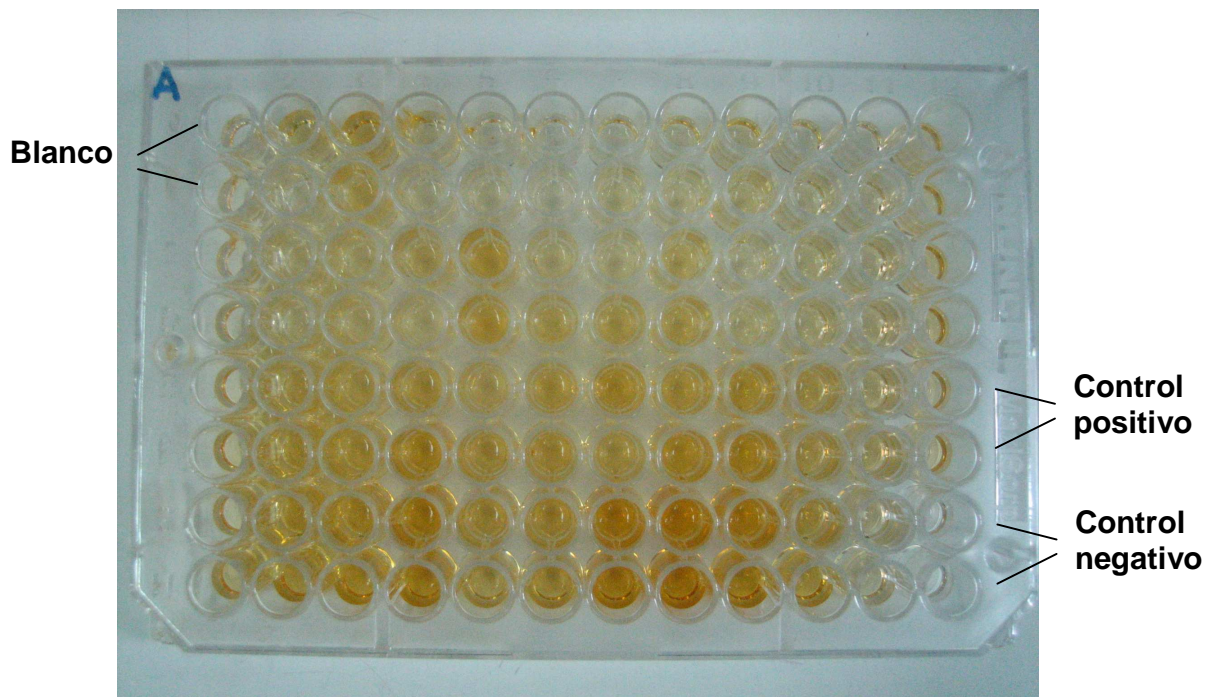
### Respuesta inmune.

Se determinaron anticuerpos IgG específicos en suero e IgA secretora en saliva anti-*H. pylori*, mediante Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA).

Las 57 muestras de saliva obtenidas, fueron analizadas por duplicado en placas de ELISA (figura 10) y posteriormente leídas en un lector de placas de ELISA a 490 nm para la determinación de unidades de densidad óptica,

obteniendo así que, 70% (40/57) de los pacientes fueron positivos, con valores por encima del punto de corte establecido en estudios previos (Ortiz y col., 2001), 5% (3/57) de los pacientes fue indeterminado y 25% (14/57) de los pacientes resultaron IgA negativos (Tabla 5).

En la figura 11 se observan los niveles de IgA secretora de acuerdo a las lesiones gástricas encontradas en los pacientes evaluados.

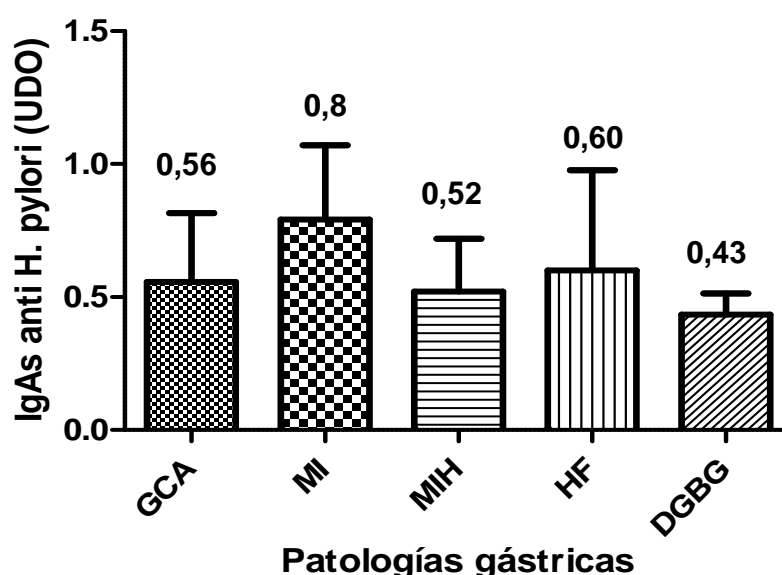


**Figura 12:** Placa de 96 pozos de ELISA, para determinación de IgA secretora específica anti-*H. pylori*. Pozos 1-2: Blanco, 3-92: Muestras, 93-94: Control positivo, 95-96: Control negativo.



**Tabla 6:** Niveles de anticuerpos IgA anti- *H. pylori* en la población estudiada.

(n total=57)	<b>Positivos</b>	<b>Negativos</b>	<b>Indeterminado</b>
<b>Nro Pacientes</b>	40	14	3
<b>Porcentaje (%)</b>	(70)	(25)	(5)

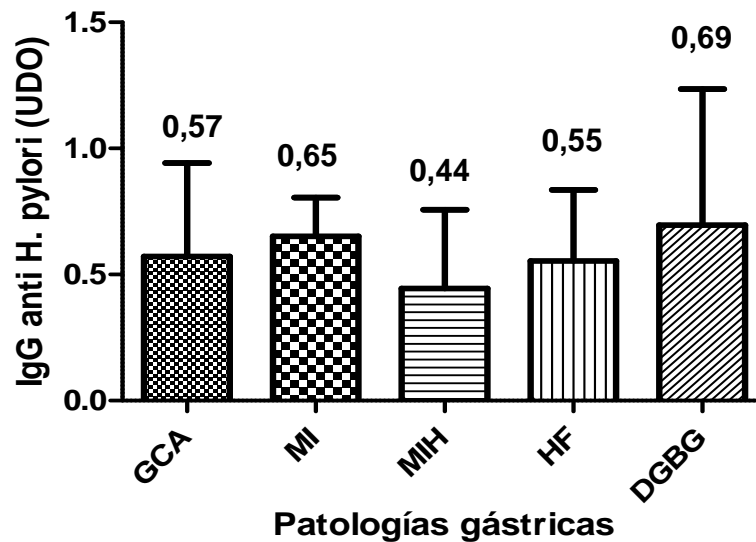


**GCA:** Gastritis Crónica Activa, **MI:** Metaplasia Intestinal, **MIH:** Metaplasia Intestinal Hiperproliferativa, **DGBG:** Displasia Gástrica de Bajo Grado

**Figura 13:** Niveles de IgAs anti *H. pylori* de acuerdo a las patologías gástricas encontradas en los pacientes evaluados.

Para la determinación de anticuerpos séricos IgG específicos anti-*H. pylori*, se estandarizó una ELISA casera con muestras conocidas y diferentes concentraciones de antígeno, muestra y conjugado. Con la prueba ya

estandarizada, las 57 muestras de suero de los pacientes se trabajaron por duplicado en placas de ELISA para determinar unidades de densidad óptica de IgG anti-*H.pylori* y posteriormente fueron leídas en un lector de ELISA a 490 nm. Para poder establecer valores positivos y negativos en esta prueba es necesario un número mayor de muestras para poder establecer un punto de corte. Los niveles de IgG sérica específica de acuerdo a las patologías gástricas observadas se muestran en la figura 12.



**GCA:** Gastritis Crónica Activa, **MI:** Metaplasia Intestinal, **MIH:** Metaplasia Intestinal Hiperproliferativa, **DGBG:** Displasia Gástrica de Bajo Grado

**Figura 14:** Niveles de IgG sérica anti- *H. pylori* de acuerdo a las patologías gástricas encontradas en los pacientes evaluados.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación a los valores de densidad óptica de anticuerpos IgA secretores e IgG séricos con respecto a la presencia de *H. pylori* y la positividad del cultivo. (Tabla 6 y 7).

**Tabla 7:** Valores promedio y desviación estándar de anticuerpos IgA secretores de acuerdo a la positividad por cultivo y PCR.

	N=57		N=56	
	<i>Hp</i> + (n=35)	<i>Hp</i> - (n=19)	Cultivo + (n=9)	Cultivo - (n=28)
<b>Promedio</b>	0,620± 0,325	0,594±0,357	0,589±0,468	0,685±0,332

Valores en D.O

*Hp* + y *Hp* - determinado por PCR

**Tabla 8:** Valores promedio y desviación estándar de anticuerpos IgG séricos de acuerdo a la positividad por cultivo y PCR.

	N=57		N=56	
	<i>Hp</i> + (n=35)	<i>Hp</i> - (n=19)	Cultivo + (n=9)	Cultivo - (n=28)
<b>Promedio</b>	0,703±0,388	0,571±0,368	0,921±0,522	0,575±0,267

Valores en D.O

*Hp* + y *Hp* - determinado por PCR

## Discusión

La infección por *H. pylori* afecta más del 50% de la población mundial. La prevalencia oscila desde un 20% en países desarrollados hasta un 90% en países en vías de desarrollo (IARC, 1994). *H. pylori* es ahora reconocida como el principal agente causal de una variedad de enfermedades gástricas como gastritis crónica, úlceras pépticas y cáncer gástrico (Forman y col., 1991; Gatti y col., 2005; Montecucco y col., 2001; Peek y col., 2002).

Durante las últimas dos décadas, un gran número de técnicas de diagnóstico tanto invasivas como no invasivas han sido reportadas para la detección e identificación de la infección por *H. pylori*. Todas estas pruebas o técnicas difieren en cuanto a sensibilidad y especificidad por lo que los estudios clínicos se ven limitados (Cardinali y col., 2003; Gatti y col., 2006; Lim y col., 2003; Park y col., 2003; Rudi y col., 1999).

En Venezuela existe una alta prevalencia de infección por *H. pylori*, pues se ha evidenciado un 66% de seroprevalencia en poblaciones infantiles de bajo nivel socioeconómico (Piñero y col., 1989; Ortiz y col., 2002) y variaciones de 40% a 90% en adultos de diferentes estados del país. Las condiciones socioeconómicas e higiénicas así como las características ambientales y genéticas de la población son factores determinantes en la adquisición de la infección (Ortiz y col., 2002).

En este estudio, la mayoría de la población evaluada pertenece a los niveles socioeconómicos más bajos, encontrándose un 72% de positividad de infección por *H. pylori*, concordando con lo reportado en estudios anteriores,

donde se determinó que la infección está inversamente relacionada con el estatus socioeconómico, es decir, un nivel socioeconómico bajo está asociado con un incremento en la prevalencia de infección por *H. pylori* y es un factor importante en la exposición y reinfección del individuo (Thomas y col., 1997).

Cabe destacar que en los resultados obtenidos no se observaron diferencias estadísticamente significativas en relación a la edad de los pacientes, presentando un promedio de  $51,33 \pm 14,21$  años.

El cultivo bacteriológico ha sido descrito como prueba “de oro” para la identificación de *H. pylori* (Jawetz y col., 2002; De Ardilla y col., 2001; Esplugues y col., 1996). En esta investigación el porcentaje de positividad de cultivos fue bajo (16%), debido a que el método depende de factores importantes como el transporte de la biopsia desde el centro hospitalario donde se tomó la muestra hasta el laboratorio donde se realiza el cultivo, el tiempo de exposición de la biopsia en medio de solución salina, la asepsia de utensilios en la toma de la muestra y en la siembra y, las condiciones adecuadas de temperatura y microaerofilia. Además, es posible que la biopsia utilizada para cultivo se haya tomado de una porción de antro no colonizada por *H. pylori* (Martel y col., 2010). Lo ideal sería aislar ADN a partir del cultivo para su diagnóstico molecular, sin embargo debido a los diferentes factores que pueden influir en el mismo, es necesario aislar ADN de biopsias gástricas para la obtención de los resultados.

El diagnóstico molecular de *H. pylori* mediante la PCR es de gran sensibilidad y especificidad para la detección molecular de la bacteria (Berroteran y col., 2002b). La literatura reporta que la PCR es capaz de detectar la presencia

de *H. pylori* a partir de ADN de biopsias de pacientes que han resultado negativos para cultivo (Hammar y col, 1992).

En 1997, se realizó el primer reporte de la existencia de diferentes familias de secuencias señales de *vacA*, (*s1* y *s2*) y de dos diferentes familias de los alelos de la región media (*m1* y *m2*). Los autores refieren que los genotipos *vacA* son mosaicos de las secuencias señal y regiones media, y todas las combinaciones posibles de estas regiones han sido identificadas (Atherton y col., 1997). A partir de ese momento, muchas investigaciones han sido realizadas sobre los genotipos de *vacA* de *H. pylori*, demostrándose que *s1* y *m1* están estrechamente asociados con el nivel de actividad de *VacA in vitro* así como de sus consecuencias clínicas (Atherton y col., 1996; Yamaoka y col., 2002; Wada y col., 2004; Xiang y col., 1995).

En este estudio se estandarizó un PCR multiplex; una técnica simple y rápida de detección de ADN de *H. pylori*, que identifica la presencia del gen *vacA* y sus secuencias señal (*s1* y *s2*), así como también los alelos de región media (*m1* y *m2*), en una sola reacción.

Aunque *vacA* está virtualmente presente en todas las cepas de *H. pylori*, solo cerca del 50% produce la citotoxina, que al ser purificada, es capaz de inducir necrosis epitelial gástrica y ulceración, cuando se administra por vía oral a ratones. Estudios *in vitro* han demostrado que *VacA* causa vacuolización masiva y muerte de un número de líneas celulares humanas (Leunk y col., 1988; Lupetti y col., 1996).

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que en los pacientes evaluados se identificaron todas las combinaciones alélicas de *vacA*, siendo la más frecuente *vacA m1/s1* con un 25% (14/57).

La variante *s1* está frecuentemente asociada con el alelo *m1*, encontrándose presente en un gran número de pacientes con lesiones precancerosas. La relación entre el estado de *vacA m1/s1* y el desarrollo de cáncer gástrico fue demostrada en estudios realizados en países Europeos (Basso y col., 1998; Van Doorn y col., 1998).

Se ha reportado la presencia de 2 grupos fenotípicamente distintos: Las bacterias de tipo 1, que expresan la citotoxina asociada al gen *cagA* y la citotoxina vacuolizante asociada al gen *vacA*; y el tipo 2, donde *cagA* está ausente y la actividad de la citotoxina vacuolizante es poco manifestada a pesar de estar presente el gen *vacA* (Xiang y col., 1995).

Según la literatura, algunas investigaciones han demostrado que la mayoría de los pacientes con cáncer gástrico, presentan cepas de *H. pylori* con fenotipos *vacA m1/s1* y *cagA* positivos; concluyendo así que *cagA* juega un papel crítico y por lo tanto es un factor de virulencia clave en cepas de *H. pylori* responsables del desarrollo de cáncer gástrico (Mahboob y col., 2005; Chattopadhyay y col., 2004; Plummer y col., 2007).

Sin embargo, algunas investigaciones han señalado que no existe correlación entre la prevalencia de cepas *cagA* positivas y el riesgo de desarrollar cáncer gástrico (Louw y col., 2001). Koehler y col., compararon otros genes de *H. pylori* asociados a virulencia demostrando que *cagA* no representa un factor de

riesgo específico para el desarrollo de cáncer gástrico (Koehler y col., 2003). Otras investigaciones, estudiaron la diversidad genotípica de la Isla de Patogenicidad *cagA*, obteniendo datos que indican que la supresión del gen *cagA* está frecuentemente relacionada con patologías severas que con gastritis superficiales (Matteo y col., 2007).

Los resultados obtenidos en este estudio, mostraron que el 9% (5/57) de la población estudiada presentó cepas *cagA* positivas, sin observarse un patrón en relación con las lesiones precancerosas desarrolladas. Es posible que *H. pylori* sufra cambios genéticos en la isla de patogenicidad *cag* posiblemente relacionados con las modificaciones del microambiente gástrico, razón por la cual no se haya detectado el gen *cagA* en un mayor número de pacientes (Matteo y col., 2007). Es importante realizar este estudio en un mayor número de pacientes para obtener resultados más contundentes.

La coexistencia de cepas con diferentes genotipos de *vacA* puede ser explicada de diferentes formas. Una de ellas radicaría en que los genotipos diferentes de *vacA*, podrían ofrecer ventajas no competitivas a las cepas. La segunda de ellas sería que diferentes genotipos podrían conferir diferentes ventajas que permitirían que las cepas sobrevivieran en nichos ecológicos diferentes dentro de la mucosa gástrica y la posibilidad de recidivas de la infección, después del tratamiento (Morales-Espinosa y col., 1999; Perrone y col., 2009).

El porcentaje de coinfección en esta investigación osciló entre el 4% y el 9% en cepas *vacAm1/m2* y *vacAs1/s2*, respectivamente.

El riesgo de coinfección o superinfección con múltiples cepas es más alto



en países donde la prevalencia de infección por *H. pylori* es alta, lo que justificaría lo encontrado en este estudio, debido a que en nuestro país existe una alta prevalencia de infección, demostrada en estudios previos (Morales-Espinosa y col., 1999; Berroterán y col., 2002b; De Sousa y col., 2006; Perrone y col., 2009).

Se ha descrito que la adherencia de *H. pylori* al epitelio gástrico, gracias a la adhesina BabA juega un papel importante en la liberación eficiente de los factores de virulencia (Ilver y col., 1998). Otras investigaciones han reportado que la presencia del gen *babA* podría ser un buen indicador de la habilidad de las bacterias para expresar la adhesina de unión a antígenos LewisB (BabA); además, encontraron una asociación significativa entre la detección de *babA* en aislados provenientes de la población alemana y la presencia de úlcera duodenal y adenocarcinoma gástrico (Gerhard y col., 1999). En un estudio posterior, se reportó una importante relación entre el genotipo *vacAs1/cagA* positivo y *babaA*, ya que el 81% de cepas *cagA* positivas *vacAs1* portaban también *babA*.

A diferencia de esto, los resultados obtenidos en esta investigación sugieren una baja frecuencia de *babA* (5%) sin asociarse a la presencia de los genes *cagA* o *vacAs1* o, a alguna patología. En estudios preliminares aún no publicados de nuestro grupo de investigación, donde se han evaluado diferentes poblaciones de Caracas la frecuencia del gen *babA* es baja. Estos resultados son similares a los reportados por Kim y col., quienes evaluaron el genotipo *babA* en cepas coreanas y no encontraron correlación con mayor riesgo de enfermedad (Kim y col., 2001).

En este trabajo de investigación sólo se tuvo acceso a los resultados

histopatológicos de 43 de los 57 pacientes estudiados. La frecuencia de lesiones negativas para malignidad fue de 48,5%, de lesiones indefinidas para displasia 46,5% y de displasia de bajo grado no invasiva en un 5%.

De estas lesiones, la presencia de *H. pylori* fue detectada en 62% de las lesiones negativas para malignidad, 85% de las lesiones indefinidas para displasia y en ningún caso de displasia de bajo grado se observó la presencia de la bacteria.

Estos resultados corresponden a lo esperado, ya que se ha descrito que no sólo la infección por *H. pylori* es capaz de inducir el cáncer gástrico, sino que existen otros factores como la susceptibilidad genética e inmune del huésped y los propios de la bacteria, que contribuyen con la inducción de esta patología. (Taylor y Parsonett, 1995; Fox y Wang, 2007). Así mismo, se ha reportado que en lesiones crónicas pero no malignas como gastritis crónica y metaplasia intestinal, la incidencia de la infección por *H. pylori* es elevada alcanzando su punto más alto en lesiones indefinidas para malignidad, como la hiperplasia foveolar y metaplasia intestinal hiperproliferativa. Posteriormente cuando la lesión pasa a ser maligna como displasia de bajo grado, la bacteria migra a otros sitios del estómago, donde la mucosa gástrica no ha sufrido daños y tiene las condiciones adecuadas para su colonización (Martel y col., 2010).

En cuanto a la respuesta inmune observada en este estudio, se obtuvo un 70% (40/57) de positividad al determinar anticuerpos IgA secretores en muestras de saliva. Con respecto a la inmunidad de la mucosa, es evidente que los anticuerpos IgA desempeñan un papel primordial en la defensa contra cuerpos extraños (Goto y col., 1999). Por lo tanto, las deficiencias en la producción de este

anticuerpo podrían ser indicador de daño de los tejidos de la mucosa (Ortiz y col., 2003). Esto explica los casos en los que el paciente presenta patologías como hiperplasia foveolar o displasia de bajo grado, encontrándose valores de densidad óptica de anticuerpos IgA secretores bajos. Por otra parte, las condiciones ambientales, higiénicas y socioeconómicas de estos pacientes pueden tener relación con alteraciones inmunológicas del tracto gastrointestinal (Ortiz y col., 2003).

El 70% de los valores obtenidos están por encima del punto de corte establecido en estudios anteriores (Ortiz y col., 2000), lo que sugiere el desarrollo de una respuesta inmune local (Borodoy y col., 1992).

Por lo tanto los resultados obtenidos están acorde con lo reportado anteriormente por Ortiz y col.(2002) en donde sugieren que anticuerpos IgA secretores en saliva pueden jugar un papel importante en la inmunidad gástrica frente a la infección por *H. pylori*, asociado a la cronicidad y fase activa de la enfermedad gástrica, por lo que la determinación de IgA secretora pudiera ser un parámetro importante en el seguimiento y control de la enfermedad, lo cual además tendría valor en estudios de niños por ser una prueba no invasiva (Ortiz y col., 2002). Estudios han demostrado que el descenso significativo en el título de anticuerpos IgA, generalmente se produce después de seis meses de haber estado en contacto con la infección (Ortiz y col., 2002).

La serología ha encontrado su principal aplicación en los estudios epidemiológicos y se ha utilizado para conocer los porcentajes de prevalencia de *H. pylori* en distintas poblaciones. Otra indicación importante de las

investigaciones serológicas es su aplicación en el seguimiento del tratamiento de erradicación a largo plazo, además de su viabilidad por ser pruebas de diagnóstico no invasivas. Sin embargo, los anticuerpos IgG permanecen durante largo período como consecuencia de una respuesta de memoria por lo cual no se pueden diferenciar los casos de infección activa de aquellos que sean positivos de una larga data, por tanto no todos los individuos que son seropositivos tienen infección gástrica por *H. pylori* clínicamente activa (Kreuning y col., 1994).

En esta investigación, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de IgAs e IgG para cada patología, estas valoraciones deben realizarse en un mayor número de pacientes y con números comparables de individuos en cada grupo de patología para poder tener una idea clara del comportamiento de estos anticuerpos frente a la infección y las patologías gástricas asociadas. Además, el estudio en un número mayor de muestras permitirá establecer un punto de corte y así poder discriminar los valores positivos de los negativos.

A pesar de que el número de muestras es pequeño, los resultados de esta investigación contribuirán a la identificación de cepas de *H. pylori* más frecuentes en Caracas y su asociación con enfermedades gástricas severas, tomando en cuenta la alta prevalencia de la infección por *H. pylori* que existe en Venezuela.

## Conclusiones

- Se observó una alta prevalencia de cepas de *Helicobacter pylori vacA m1/s1* en la población con patologías gástricas severas estudiada.
- Se observó un bajo porcentaje de coinfección de cepas *vacA m1/m2* y *vacA s1/s2*.
- Se encontró baja prevalencia de cepas con el gen *babA*.
- El cultivo bacteriológico es la prueba de oro para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*. Además, la cantidad y calidad del ADN que se obtiene a partir del mismo es el ideal para la realización del estudio molecular. Sin embargo, es necesario unificar criterios para optimizar la técnica evitando los posibles focos de contaminación o inhibición del crecimiento. Además debe tomarse en cuenta que existen casos en los que las muestras son tomadas de lugares del estómago donde *H. pylori* no ha colonizado, dando como resultado falsos negativos.
- Los anticuerpos IgA secretores en saliva están asociados a la cronicidad y fase activa de la enfermedad gástrica, por lo que la determinación de estos es un factor importante en el seguimiento y control de la enfermedad.

- Los niveles de anticuerpos IgA secretores, determinan actividad de la infección en los casos en que el individuo no presenta daños celulares y las células promuevan una respuesta inmune.
- No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos de IgA secretora e IgG sérica y las patologías encontradas.
- En este estudio se encontró una baja prevalencia de infección por cepas *cagA* positivas. Es importante realizar estudios en un mayor número de pacientes con lesiones gástricas precancerosas para poder determinar la prevalencia y asociación de este gen con las patologías gástricas.

## Recomendaciones

- Para la determinación de IgG sérica, se plantea realizar un estudio en una población mayor para establecer un punto de corte y así discriminar entre valores positivos y negativos.
- Se propone realizar un estudio donde se tomen biopsias gástricas de distintas zonas del estómago, para determinar si en efecto *H. pylori* migra a determinadas zonas del estómago donde el daño celular sea menor y por ende el microambiente sea el óptimo para la bacteria.
- Se plantea realizar el estudio con números comparables de individuos en cada grupo de patología.
- Se propone realizar un estudio más exhaustivo donde se tome en cuenta un grupo de pacientes con gastritis superficial y otro grupo con lesiones precancerosas. para poder establecer valores epidemiológicos y de prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* en Venezuela.
- Es necesario tener muy en cuenta las condiciones de asepsia que son necesarias para la optimización de la toma de muestras destinadas al cultivo bacteriológico, tomando en cuenta la importancia de la esterilización adecuada de la pinza para evitar posible contaminación.

## Bibliografía

- Atherton, J. C., Cio, P., Peek, R. M. Jr., Tummuru, M. K., Blaser, M. J., Cover, T. L. 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J. Biol. Chem.* **270**: 17771-17777.
- Atherton, J. C., Karita, M., González-Valencia, G. 1996. Diversity in *vacA* mid-region sequence but not signal sequence type among *Helicobacter pylori* strains from Japan, China, Thailand and Peru. *Gut.* 39: A73.
- Atherton, J. C., Cio, P., Peek, R. M., Tham, K. T., Blaser, M. J. 1997. Clinical and pathological importance on heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol.* **112**:92-99.
- Atherton, J. C. 1998. *Helicobacter pylori* virulence factors. *Br. Med. Bull.* **54**: 105-120.
- Azevedo, N.F., Guimaraes, N., Figueiredo, C., Keevil, C. W., Vieira, M. J. 2007. A new modelo f the transmisión of *Helicobacter pylori*: role of environmental reservoirs as gene pools to increase strain Diversity. *Crit. Rev. Microbiol.* **33**: 157-169.



- Bajarano, R., Rodriguez-Ocon, L., García J. 1999. Enfermedad gastroduodenal por *Helicobacter pylori* en niños. *Bol. Med. Infant. Mex.* **56**: 269-279.
- Baron, J. H. 1996. Why do medical students choose St Mary's Hospital Medical School? *Brit. Med. J.* **313(7072)**:1646-1647.
- Basso, D., Navaglia, F., Brigato, L., Piva MG, Toma A, Greco E, Di Mario F, Galeotti F, Roveroni G, Corsini A, Plebani M. 1998. Analysis of *Helicobacter Pylori* *vacA* and *cagA* genotypes and serum antibody profile in benign and malignant gastroduodenal diseases. *Gut* **43**: 182 – 186.
- Beji, A., Megraud, F., Vincent, P., Gavini, F., Izard, D., Leclerc, H. 1988. GC content of DNA of *Campylobacter pylori* and other species belonging to the genus *Campylobacter*. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* **138**: 527-34.
- Bellack, N. R., Koehoorn, M. W., MacNab, Y. C., Morshed, M. G. 2006. A conceptual model of water's role as a reservoir in *Helicobacter pylori* transmission: a review of the evidence. *Epidemiol. Infect.* **134**: 439-449.
- Berroterán, A., Perrone M., Correnti, M., Cavazza, M., Tombazzi, C., Lecuna, V., Goncalvez, R. 2002a. Prevalencia de *Helicobacter pylori* en muestras de placa dental de un grupo de pacientes venezolanos, mediante

técnica de reacción en cadena de la polimerasa. *Acta. Odontol. Venez.* **40**:45-51.

- Berroterán, A., Perrone M., Correnti, M., Cavazza, M., Tombazzi, C., Goncalvez, R., Lecuna, V. 2002b. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the oral cavity and gastroduodenal system of a Venezuelan population. *J. Med. Microbiol.* **51**: 764-770.
- Blaser, M. J. y Berg, D. 2001. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J. Clin. Invest.* **107(7)**: 767-773.
- Blaser, M. J. 2005. An Endangered species in the stomach. *Sci. Am.* **292**: 38-45.
- Borodoy, T., Andrews, P., Mancunso, M., Jankiewicz, E., Brandi, S. 1992. *Helicobacter pylori* reinfection 4 years posteradication. *Lancet.* **339**: 1295.
- Borroto, E. J. 1998. Survival of *Vibrio cholerae* O1 in freshwater surface and endemic cholera: a geological hipótesis. *Rev. Panam. Salud. Pública.* **4**: 371-374.
- Bravo, L. E., Cortés, A., Carrascal, E., Jaramillo, R., García, L. S., Bravo, P. E., Badel, A. y colaboradores. 2003. *Helicobacter pylori*: patología y

prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. *Coloma. Medica*. **34**: 124-131.

- Bukanov, N. O., and Berg, D. E. 1994. Ordered cosmid library and highresolution physical-genetic map of *Helicobacter pylori* strain NCTC11638. *Mol. Microbiol.* **11**:509–523.
- Carbone, M., Maugeri, T. L., Gugliandolo, C., La Camera, E., Biondo, C., Fera, M. T. 2005. Ocurrance of *Helicobacter pylori* DNA in the coastal environment of soythern Italy (Straits of Messina). *J. Appl. Microbiol.* **98**: 768-7774.
- Cardinali, L., Rocha, G. A. Rocha, A. M. C., de Moura, S. B., de Soares, T. F., Esteves, A. M. B., Nogueira, A. M. M. F. y colaboradores. 2003. Evaluation of <sup>13</sup>C urea breath test and *Helicobacter pylori* stool antigen test for diagnosis of *H. pylori* infection in children from a developing country. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 3334-3335.
- Cavazza, M.E., Urrestarazu, M.I., Correnti, M., Vivas, J., Avila, M., Ortiz, M, y col. 2003. *Helicobacter pylori* en Venezuela; un problema infeccioso multifactorial. IX Jornadas Nororientales y V Jornadas Nacionales de Infectología. Sociedad Venezolana de Infectología. *Boletín Venezolano de Infectología* **14**:56.

- Cellini, L., Del Vecchio, A., di Candia, M., Di Campli, E., Favaro, M., Donelli, G. 2004. Detection of free and plankton-associated *Helicobacter pylori* in seawater. *J. Appl. Microbiol.* **97**: 285-292.
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J. E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R., Covacci, A. 1996. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 14648-14653.
- Chattopadhyay, S., Patra, R., Ramamurthy, T., Chowdhury, A., Santra, A., Dhali, G.K., Bhattacharya, S.K. y colaboradores. 2004. Multiplex PCR assay for rapid detection and genotyping of *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens. *J. Clin. Microbiol.* **42**:2821-2824.
- Correa, P., Cuello, C., Duque, E., Burbano, L.C., Garcia, F.T., Bolanos, O., Brown, C. y colaboradores. 1976. Gastric cancer in Colombia. III. Natural history of precursor lesions. *J. Natl. Cancer. Inst.* **57**: 1027–1035.
- Correa, P. 1992. Human gastric carcinogenesis: A multistep and multifactorial process. First American Cancer Society award lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer. Res.* **52**: 6735-6740.

- Correa, P. 2003. Bacterial infections as a cause of cancer. *J. Natl. Cancer. Inst.* **95(7)**: E3.
- De Ardilla, A., Alvarado J., Gutiérrez, O. 2001. Gastroenterología. Bogotá: Editorial McGraw – Hill Interamericana. 2ª Edición. 90-93.
- De Sousa, L., Vasquez, L., Velasco, J., Parlapiano, D. 2006. Isolation of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa, dental plaque and saliva in a population from the Venezuelan Andes. *Invest. Clin.* **47**: 109-116.
- Díaz, M. I., Valvidia, J. L., Palacios, P., Harris, P., Novales, J., Garrido, E., Valderrama y colaboradores. 2005. The *H. pylori vacA s1a* and *s1b* alleles from clinical isolates from different regions of Chile show a distinct distribution along the country. *W. J. Gastroenterol.* **11**: 6366-6372.
- Dore, M. P., Sepúlveda, A. R., El-Zimaity, H., Yamaoka, Y., Osato, M. S., Mototsugu, K., Nieddu, A. y colaboradores. 2001. Isolation of *Helicobacter pylori* from sheep-implications for transmission to humans. *Am. J. Gastroenterol.* **96**: 1396-401.
- Drumm, B., Pérez-Pérez, G., Blaser, M. J., Sherman, P. M. 1990. Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. *N. Engl. J. Med.* **322**: 359-363.

- El-Omar, E. M. 2001. The importance of Interleukin 1B in *Helicobacter pylori* associated disease. *Gut*. **48**: 743-747.
- Engstrand, L. 2001. *Helicobacter* in water and waterborne routes of transmission. *J. Appl. Microbiol.* **90**: 80S-84S.
- Esplugues J, Piqué J, Once J. 1996. Terapéutica farmacológica de las enfermedades del aparato digestivo. Editorial Universidad de Navarra. (Pamplona).
- Filipe, M.I. 1989. The histochemistry of intestinal mucins. Churchill Livingstone. 65-89.
- Forman, D., Newell, D. G., Fullerton, F., Yarnell, J. W. G., Stacey, A. R., Wald, N., Sitas, F. 1991. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *Br. Med. J.* **302**: 1302-1305.
- Fox, J., Wang, T. 2007. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J. Clin. Invest.* 117: 60-69.
- Frenck, W., Clemens, J. 2003. *Helicobacter* in the developing world. *Microbes. Infect.* **5**: 705-713.

- Gasbarrini, G., Pretolani, S., Bonvicini, F., Gatto, M.R., Tonelli, E., Megraud, F., Mayo, K. y colaboradores. 1995. A population based study of *Helicobacter pylori* infection in a European country: the San Marino Study. Relations with gastrointestinal diseases. *Gut*. **36**: 838–844.
- Gatti, L. L., Sauza, E. K. F., Leite, K. R., Bastos, E. L. S., Vicentini, L. R, Silva, L.C., Smith, M. A. C. y colaboradores. 2005. *cagA*, *vacA* and *babA2* genotypes of *Helicobacter pylori* associated with gastric disease in Brazilian adult patients. *Siagn. Microbiol. Infect. Dis.* **51**: 231-235.
- Gatti, L. L., Labio, R. W., Silva, L. C., Smith, M. A. C., Payo, S. L. M. 2006. *cagA* positive *Helicobacter pylori* in Brazilian children related to chronic gastritis. *Braz. J. Infect. Dis.* **10**: 254-258.
- Gerhard, M., Lehn, N., Neumayer, N., Boren, T., Rad, R., Schepp, W., Miehke S, Classen M, Prinz C. 1999. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 12778-12783.
- Gerrits, M.M., Van Vliet, A., Kuipers, E. J., Kusters, J. G. 2006. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. *Lancet. Infect. Dis.* **6**: 1-10.

- Gold, B. D., Khanna, B., Huang, L. M., Lee, C. Y., Banatvala, N. 1997. *Helicobacter pylori* acquisition infancy alter decline of maternal passive immunity. *Pediatric. Res.* **41(5)**: 641-646.
- Goodwim, C. S., Armstrong, J. A. 1990. Microbiological Aspects of *Helicobacter pylori*. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **9**: 1-13.
- Goto, T., Haruma, K., Kitadai, Y., Ito, M., Yoshihara, M., Sumii, K., Hayakawa, N., Kajiyama, G. 1999. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in gastric mucosa of gastric cancer patients. *Clinl. Cancer. Res.* **5**: 1411-1415.
- Graham, D., Adam, E., Reddy, G. T., Agarwal, J., Agarwal, R., Evans, D. 1991. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in India. *Digest. Dis. Sci.* **36**:1984-1088.
- Graham, D. Y. y Go, M. 1993. *Helicobacter pylori*: current status. *Gatroenterology.* **105**: 279-282.
- Gruber, P., Hoffman, J., Chong, F., Burstein, N., Mepani, C., Cave, D. 1997. Vector potential of Houseflies (*Musca domestica*) for *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1300-1303.



- Halperin, D.C., Mohar, A., 1988. Stomach cancer cluster in Mexico. *Lancet*. **1**: 1055.
- Hammar, M., Tvszkiewicz, T., Wadstrom, T., O'Toole, P. W. 1992. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 54-58.
- Hatakeyama, M. 2006. The role of *Helicobacter pylori* CagA in gastric carcinogenesis. *Int. J. Hematol.* **84(4)**:301-8.
- Hazell, S. L., Lee, A., Brady, L., Hennessy, W. 1986. *Campylobacter pyloridis* and gastritis. Association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J. Infect. Dis.* **1853**: 658-663.
- Heikkinen, M., Mayo, K., Megraud, F., Vornanen, M., Marin, S., Pikkarainen, P., Julkunen, R. 1998. Association of Cag-A positive and Cag-A negative *Helicobacter pylori* strains with patients symptoms and gastritis in primary care patients with functional upper abdominal complaints. *Scand. J. Gastroenterol.* **33**: 31-38.
- Hernández, T. 2001. *Helicobacter pylori*. La bacteria que más infecta al ser humano. *Rev. Cubana. Aliment. Nutr.* **15**: 42-54.

- Holcombe, C., Omotata, B.A., Eldridge, J., Jones, D. M. 1992. *Helicobacter pylori*, the most common chronic bacterial infection in Africa: a random serological study. *Am. J. Gastroenterol.* **87**: 28-30.
- Hu, P.J., Li, Y.Y., Zhou, M.H., Chen, M.H., Du, G.G., Huang, B.J., Mitchell, H.M. y colaboradores. 1995. *Helicobacter pylori* associated with a high prevalence of duodenal ulcer disease and a low prevalence of gastric cancer in a developing nation. *Gut.* **36**: 198–202.
- Hunt, C. P. 1998. The emergence of enterococci as a cause of nosocomial infection. *Br. J. Biomed. Sci.* **55(2)**:149-56.
- Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., Frick, I. M. Kersulyte, D., Incecik, E. T., Berg, D. E., Covacci, A., Engstrand, L., Borén, T. 1998. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science.* **279**:373-7.
- International Agency for Cancer Research. 1994. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to human. **272**:177-240.
- Jawetz, M, Adelberg. 2002. Microbiología Médica. Editorial Manual Moderno. 17ª edición. (México).

- Jiang, L., Shi, M., Hao, Y., 1998. Two phase dynamic CT findings of gastric carcinoma and its value for tumor detection and gross classification. *Zhonghua Zhongliu Zazhi*. **20**: 374-376.
- Kamali-Sarvestani, E., Bazargani, A., Masoudian, M., Lankarani, K., Taghavi, A. R., Saberifiroozi, M. 2006. Association of *H. pylori* cagA and vacA genotypes and IL-8 gene polymorphisms with clinical outcome of infection in Iranian patients with gastrointestinal diseases. *World. J. Gastroenterol*. **28**:5205-10.
- Kim, S. Y., Woo, C. W., Lee, Y. M., Son, B. R., Kim, J. W., Chae, H. B., Youn, S. J., Park, S. M. 2001. Genotyping cagA, vacA subtype, iceA1, and babA of *Helicobacter pylori* isolates from Korean patients, and their association with gastroudenal diseases. *J. Korean. Med. Sci*. **16**: 579-584.
- Kivi, M., Tindberg, Y. 2006. *Helicobacter pylori* ocurrente and transmisión: a family affair? *Scand. J. Infect. Dis*. **38**: 407-417.
- Koehler, C. I., Mues, M. B., Dienes, H. P., Kriegsmann, J., Schirmacher, P., Odenthal, M. 2003. *Helicobacter pylori* genotyping in gastric adenocarcinoma and MALT lymphoma by multiplex PCR analices of paraffin wax embedded tissues. *J. Clin. Pathol*. **56**: 36-42.

- Kreuning, J., Lindeman, J., Biemond, I., Lamers, C.B. 1994. Relation between IgG and IgA antibody titres against *Helicobacter pylori* in serum and severity of gastritis in asymptomatic subjects. *J. Clin. Pathol.* **47**: 227-231.
- Lam, S.K. 1993. Epidemiology and genetics of peptic ulcer. *Gastroenterol. Jpn.* **28**: 145–157.
- Lauren, P. 1965. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. an attempt at a histo-clinical classification. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* **64**:31-49.
- Leclerc, H., Schwartzbrod, L., Dei-Cas, E. 2002. Microbial agents associated with waterborne diseases. *Crit. Rev. Microbiol.* **28**: 371-409.
- Lee, C.K., Weltzin, R., Thomas, W.D., Kleanthous, H., Ermak T.H., Soman, G., Hill, J.E. 1995. Oral immunization with recombinant *Helicobacter pylori* urease induces secretory IgA antibodies and protects mice from challenge with *Helicobacter felis*. *J. Infect. Dis.* **172**:161-172.
- Leunk, R.D., Johnson, B.T., David, B.C., Kraft, W.G., Morgan, D.R. 1988. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol.* **26**:93-99.

- Lim, C. Y., Lee, K. H., Cho, M. J., Chang, M. W., Kim, S.Y., Myong, N. H., Lee, W. K. y colaboradores. 2003. Detection of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of patients with gastroduodenal diseases by PCR restriction analysis using the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J. Clin. Microbiol.* **41**: 3387-3391.
- López-Brea, M. 2005. La infección por *Helicobacter pylori*: Premio Nobel de Medicina. *Rev. Esp. Quim.* **18**: 271-272.
- Louw, J. A., Kidd, M. S. G., Kummer, A. F., Taylor, K., Kotze, U., Hanslo, D. 2001. The relationship between *Helicobacter pylori* infection, the virulence genotypes of the infecting strain and gastric cancer in the African setting. *Gastroenterol.* **6**: 268-273.
- Lupetti, P., Heuser, J, Maniti, R. 1996. Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J. Cell. Biol.* **133**:801-807.
- Luzzza, F., Imeneo, M., Maletta, M., et al. 1995. Isotypic analysis of specific antibody response in serum, saliva, gastric and rectal homogenates of *Helicobacter pylori*-infected individuals. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **10**:285-288.
- Madinier, I. M., Fosse, T. M., Monteil, R. A. 1997. Oral carriage of *Helicobacter pylori* a review. *J. Periodontol.* **68**: 2-6.

- Maeda, S., Kanai, F., Ogura, K., Yoshida, H., Ikenoue, T., Takahashi, M., Kawabe y colaboradores. 1997. High seropositivity of anti-*cagA* antibody in *Helicobacter pylori*—infected patients irrelevant to peptic ulcers and normal mucosa in Japan. *Dig. Dis. Sci.* **42**: 1841–1847.
- Mahboob, A., Khan, A. A., Tiwari, S. K., Ahmed, N., Rao, L. V., Habibullah, C. M. 2005. Association between *cag*-pathogenicity island in *Helicobacter pylori* isolates from peptic ulcer, gastric carcinoma, and non-ulcer dyspepsia subjects with histological changes. *World. J. Gastroenterol.* **43**: 6815-6822.
- Mai, U. E. H., Perez-Perez, G. I., Allen, J. B., Wahl, S. M., Blaser, M. J. 1992. Surface proteins from *Helicobacter pylori* exhibit chemotactic activity for human leukocytes and are present in gastric mucosa. *J. Exp. Med.* **175**: 517-25.
- Malaty, H., El Kasabang, A., Grahan, DY., Millar, C. 2002. Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: a follow-up study from infancy to adult hood. *Lancet.* **359**: 931-935.
- Marshall, B. J., Goodwin, C. S. 1987. Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**:68.

- Marshall, B. J. 1988. The *Campylobacter pylori* story. *Scand. J. Gastroenterol.* **23**: 58-66.
- Martel, C., Plummer, M., Van Doorn, L., Vivas, J., López, G., Carillo, E., Peraza, S. 2010. Comparison of polymerase chain reaction and histopathology for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsias. *Int. J. Cancer.* **126**: 1992-1996.
- Matteo, M. J., Granados, G., Pérez, C., Olmos, M., Sanchez, C., Catalan, M. 2007. *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island genotype diversity within the gastric niche of a single host. *Journal of Medical Microbiology.* **56**: 664–669.
- Mégraud, F. 1995. Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. *Aliment. Pharm. Ther.* **9**: 85-91.
- Meiselman, M. S., Miller-Catchpole, R., Christ, M., Randall, E. 1988. *Campylobacter pylori* gastritis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Gastroenterology.* **95**: 209-212.
- Mendall, M.A., Molineaux, N., Levi, J., Strachan, D., Northfield, T.C. 1994. Association of *H. pylori* with diminished adult height (abstract). *Gastroenterology.* **106**:A137.

- Méndez-Castellano, H. Méndez, M. C. 1986. Estratificación social y biología humana: método Graffar modificado. *Arch. venez. pueric. pediatr.* **49(3/4)**:93-104.
- Mervis, J. 1995. China's unique environment favours large interventions trials. *Science.* **270**: 1149–1150.
- Montecucco, C., Rappuoli, R. 2001. Living Dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**:457-466.
- Morales-Espinoza, R., Castillo-Rojas, G., Gonzalez-Valencia, G., Ponce, S., Cravioto, A., Atherton, J., López-Vidal, Y. 1999. Colonization of Mexican Patients by Multiple *Helicobacter pylori* Strains with Different *vacA* y *cagA* Genotypes. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 3001-3004.
- Muñoz, N., Kato, I., Peraza, S., Lopez, G., Carrillo, E., Ramirez, H., Vivas, J., Castro, D., Sanchez, V., Andrade, O., Buiatti, E., Oliver, W. 1996. Prevalence of precancerous lesions of the stomach in Venezuela. *Cancer. Epidemiol. Biomark. Prev.* **5**:41-46.
- Narváez, P., Pedroza, R., Alonso, G., Rodríguez, V. 2005. Caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* **25**



- Negrini, R., Savio, A., Appelmelk, B.J. 1997 Autoantibodies to gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. **2**(1): S13-S16.
- O'Rourke, J., Lee, A., Fox, J.G. 1992. An ultrastructural study of *Helicobacter mustelae* and evidence of a specific association with gastric mucosa. *J. Med. Microbiol.* **6**:420-7.
- Olivares, D., Gisbert, J. P. 2006. Factors involved in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* **98**(5): 374-386.
- Oliver, J. D., 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.* **43**: 93-100.
- Ortiz, D., Cavazza, M. E., López, T., Avila, M., Lecuna, V., Correnti, M., Perrone, M. 2001. Determinación de los niveles de IgA secretora anti-*Helicobacter pylori* en venezolanos aparentemente sanos y asintomáticos. *Enferm. Infec. Micr. Cl.* **21**: (Supl).
- Ortiz, D., Daoud, G., Daoud, N., Cavazza, M. E., Urresterazu, M. I., Serrano, N., Correnti, M., y colaboradores. 2002. Evaluación de los niveles de IgA Secretora en niños con gastritis crónica infectados con *Helicobacter pylori*. *Arch. Venez. Pueric. Pediatr.* **65**: 44-49.

- Ortiz, D., Cavazza, M., Rodríguez O., Hagel, I., Correnti, M., Convit, J. 2003. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Warao Lineage Communities of delta amacuro State. Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* **98(6)**: 7221-725.
- Pajares, J. M., Gisbert, K. P. 2006. *Helicobacter pylori*: su descubrimiento e importancia en la medicina. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* **98**: 770-785.
- Park, C. Y., Kwak, M., Gutierrez, O., Graham, Y., Yamaoka, Y. 2003. Comparison of genotyping *Helicobacter pylori* directly from biopsy specimens and genotyping from bacterial cultures. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 3336-3338.
- Parsonnet, J., Friedman, G., Vandersteen, D., Chang, J., Vogelman, N., Orentreich, N., Sibley, R. 1991. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **325**:1127-1131.
- Parsonnet, J. 1995. The incidence of *Helicobacter pylori* infection. *Alim. Pharmacol. Ther.* **9**: 45-51.
- Parsonnet, J., Shmueli, H., Haggerty, T. 1999. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *J.A.M.A.* **282**:2240-2245.

- Peek, R. M., Blaser, Jr. M. K. 2002. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat. Rev. Cancer.* **2**: 28-37.
- Perrone, M., González-Valencia, G., Camorlinga, M., Correnti, M., Cavazza, M., Torres, J. 2009. Genotipos *vacA* de *Helicobacter pylori* en una población venezolana. *Rev. Soc. Venez. Microbiol.* **29**: 39-43.
- Piñero, R., Urrestarazu, M., Serrano, N., González, R., Olavarría, R., Moncada, J., Khassale, M., Poleo, J.R. 1989. Frecuencia de *Campylobacter pylori* en venezolanos aparentemente sanos y asintomáticos. *G.E.N.* **43**:777-780.
- Piñero R, Plasencio A, Avila M, Urrestarazu M, Serrano M, Correnti M, Cavaza. 2000. *Helicobacter pylori* en niños de "El Clavo", una población rural venezolana. *G.E.N.* **54 (1)**:14-17.
- Piqué, J. M. 2004. Relación entre *Helicobacter pylori*, gastritis crónica y cáncer gástrico. *Medicine.* **9(2)**:93-99.
- Pisani, P., Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. 1999. Estimates of the Worldwide mortality from twenty-five major cancers in 1990. *Int. J. Cancer.* **83**: 18-29.

- Pounder, R. E., NG, D. 1995. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **9(2)**: 33-39.
- Plummer, M., Vivas, J., Fauchere, J., Del Giudice, G., Peña, S., Ponzetto, A., López, G., Miki, K., Oliver, W., Muñoz, N. 2000. *Helicobacter pylori* and stomach cancer: A case-control study in Venezuela. *Cancer. Epidem. Biomar.* **9**: 961-965.
- Plummer, M., Van Doorn, L., Franceschi, S., Kleter, B., Canzian, F., Vivas, J., Lopez, G., Colin, D., Muñoz, N., Kato, I. 2007. *Helicobacter pylori* Citotoxin-Associated Genotype and Gastric Precancerous Lesions. *J. N. C. I.* **99**:1328-1334.
- Quiroga, A. J., Cittelly, D. M., Bravo, M. M. 2005. BabA2, oipA and cagE *Helicobacter pylori* genotypes in Colombian patients with gastroduodenal diseases. *Rev. Biomed.* **25(3)**: 325-334.
- Rivas-Traverso, F., Hernández, F. 2000. *Helicobacter pylori*: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Rev. Biomed.* **11**: 187-205.
- Rivera M., Contreras, F., Terán A., Fouilloux, O. 2004. *Helicobacter pylori*: Enteropatógeno frecuente del ser humano. *A.V.F.T.* **23**: 109-117.

- Rokkas, T., Filipe, M.I., Salden, G.E. 1991. Detection of an increased incidence of early cancer in patients with intestinal metaplasia type III who are closely followed up. *Gut* **32**:1110-3.
- Rollán Rodríguez A. 2002. *Helicobacter pylori* y Úlcera péptica. Boletín. Esc. de Med. Pub. Universidad Católica de Chile. **23**:130-5.
- Rudi, J. Rudy, A., Maiwald, M. Kuck, D., Sieg, A., Stremmel, W. 1999. Direct determination of *Helicobacter pylori vacA* genotypes and *cagA* gene in gastric biopsies and relationship to gastrointestinal diseases. *Am. J. Gastroenterol.* **94**: 1525-1531.
- Rugge, M., Farinati, F., Baffa, R., Sonogo, F., Di Mario, F., Leandro, G., Valiante, F. 1994. Gastric epithelial dysplasia in the natural history of gastric cancer: a multicenter prospective follow-up study. Interdisciplinary Group on Gastric Epithelial Dysplasia. *Gastroenterology.* **107(5)**:1288-96.
- Rugge M., Correa P., Dixon M., Hattori T., Leandro G., Lewin K., Ridell, R. 2000. Gastric dysplasia. The Padova International Classification. *Am. J. Surg. Pathol.* **24(2)**: 167-176.
- Sharm, S. A, Tumuru, M. K., Blaser, M. J., Kerr, L.D. 1998. Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription

factor nuclear factor- kappa B in gastric epithelial cells. *J. Immunol.* **160**: 2401-2407.

- Schlemper, R., Riddell, R., Kato, Y., Borchard, F., Cooper, H., Dawsey, S., Dixon, M. F. 2000. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut.* **47**: 251-255.
- Schmidt, H., Hensel, M. 2004. Pathogenicity island in bacterial patogénesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**: 14-56.
- Suerbaum, S., Michetti, P. 2002. *Helicobacter pylori* infections. *New. Engl. J. Med.* **347**: 1175-1186.
- Thomas, J. E., Gibson, G. R., Darboe, M. K., Dale, A., Weaver, L. T. 1992. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet.* **340**: 1194-1195.
- Thomas, M. D., Jiang, C., Chi, D. S., Li, C. H., Ferguson, D. A. 1997. The role of the oral cavity in *Helicobacter pylori* infection. *Am. J. Gastroenterol.* **92**: 2148-2154.
- Taylor, D. y Parsonnet, J. 1995. Infections of the gastrointestinal tract. In Infections of the gastrointestinal tract. *Raven Press.* 551–563.

- Tummuru, M. K. R., Cover, T. L., Blaser, M. J. 1993. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect. Immun.* **61**: 1799-809.
- Van Dorm, L. J., Figueredo, C., Rossau, R. 1998. Typing of *Helicobacter pylori vacA* gene and detection of *cagA* gene by PCR and reverse hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 1271-1276.
- Vaz Coelho, L.G., León-Barúa, R., Quigley, E.M. 2000. Latin-American Consensus Conference on *Helicobacter pylori* infection. *Am. J. Gastroenterol.* **95**: 2688-91.
- Wada, A., Yamasaki, E., Mizokami, M., 2004. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA, is responsible for gastric ulceration. *J. Biochem.* **136**: 741-746.
- Walker, M. M. 2003. Is intestinal metaplasia of the stomach reversible?. *Gut.* **52**: 1-4.
- Wyatt, J.I., Rathbone, B.J. 1988. Immune response of the gastric mucosa to *Campylobacter pylori*. *Scand. J. Gastroenterol.* **142**:44-49.

- Xiang, Z., Censini, S., Bayeli, P., Telford, J., Nigura, N., Rappuoli, R., Covacci, A. 1995. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect. Immun.* **63**: 94-98.
- Yamaoka, Y., Kodama, T., Kashima, K., Graham, D. Y., Sepulveda, A. 1998. Variants of the 3' Region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H.pylori*-Associated diseases. *J. Clin. Microbiol.* **36(8)**:2258-2263.
- Yamaoka, Y., Orito, E., Hirayama, T., 2002. *Helicobacter pylori* in North and South America before Columbus. *FEBS Lett.* **517**:180-184.
- Yamaoka, Y., Kato, M., 2008. Asaka, M. Geographic differences in gastric cancer incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains. *Inter. Med.* **47**: 1077-1083.
- Zullo, A., Sanchez-Mete, L., Hassan, C., Diana, F., Festuccia, F., Attili, A. F., Morini, S. 2004. *Helicobacter pylori* density and CagA status in cirrhotic patients: A case-control study. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **19**: 1174-1178.



**Consultas en línea:**

- [http://bligoo.com/media/users/0/31628/images/H%20pylori%20mecanismo.j](http://bligoo.com/media/users/0/31628/images/H%20pylori%20mecanismo.jpg)  
pg. [Consulta: 09 de Marzo de 2010].

# Anexos

# Anexo 1

INSTITUTO DE BIOMEDICINA  
Ministerio de Salud y Desarrollo Social - UCV  
Caracas, Venezuela

---

Planilla No. \_\_\_\_\_

*Consentimiento Informado para participar en el proyecto de investigación titulado:*  
**“Perfil inmunológico, genotipo bacteriano y patologías gastroduodenales asociadas a la infección por *Helicobacter pylori* en individuos venezolanos”**

Por medio de la presente hago constar que he sido informado (a) de la posible relación existente entre la enfermedad gástrica que actualmente presento y la infección por la bacteria *Helicobacter pylori*, la cual se encuentra bajo investigación en este proyecto que tiene como objetivo general: Evaluar el perfil inmunológico asociado a la genética bacteriana y enfermedades gástricas relacionadas con la infección por *Helicobacter pylori* en individuos venezolanos. De la misma manera he sido informado (a) que para dicha evaluación me será tomada una muestra de 8ml de sangre, una de 3ml de saliva y me serán tomadas 2 biopsias de estómago adicionales a las estipuladas por el gastroenterólogo que me realizará el estudio endoscópico, además; se me realizará una encuesta que contiene preguntas sobre antecedentes familiares y datos socioeconómicos. El control médico, así como los exámenes de laboratorio contemplados dentro del protocolo, serán completamente gratuitos y no recibiré ninguna remuneración por participar en este estudio. Por otro lado, se me ha indicado que seré informado (a) de los resultados de los exámenes que me realizarán, los cuales ayudarán al diagnóstico de mi enfermedad, y que los mismos serán guardados con estricta confidencialidad, pudiendo ser los datos publicados en revistas científicas completamente anónimos, además podré retirarme del estudio en el momento que lo crea conveniente sin ninguna consecuencia.

En este sentido, Yo, \_\_\_\_\_, portador de la cédula de identidad N° \_\_\_\_\_, declaro que accedo voluntariamente a participar en este proyecto y que se me realicen los estudios de diagnóstico y seguimiento pertinentes.

En caso de ser el(la) paciente voluntario (a) menor de edad el (la) representante legal se hará responsable de lo anteriormente expuesto

En Caracas, a los \_\_\_\_\_ días del mes de \_\_\_\_\_ de 200\_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Firma del Paciente Voluntario

---

*En caso de ser el paciente menor de edad firma el representante legal:*

\_\_\_\_\_  
Firma  
Apellido y Nombre en letra de imprenta: \_\_\_\_\_ CI \_\_\_\_\_

---

Dr. Responsable:

Testigo: \_\_\_\_\_

## Anexo 2

Graffar

Nombre: \_\_\_\_\_ N° \_\_\_\_\_

1.- Instrucción del jefe de familia: 1.- Universitario  
2.- Técnico  
3.- Empleado o pequeño comerciante  
4.- Obrero especializado  
5.- Obrero no especializado

2.- Instrucción de la madre: 1.- Universitario o equivalente  
2.- Secundaria completa o técnico superior  
3.- Secundaria incompleta o técnico inferior  
4.- Educación primaria o analfabeta  
5.- Analfabeta

3.- Fuente de ingreso: 1.- Rentas  
2.- Ganancias-beneficios-honorarios  
3.- Sueldo (mensual)  
4.- Salario (semanal-diario-por tareas)  
5.- Donaciones-trabajos ocasionales

4.- Alojamiento: 1.- Optimo con lujo  
2.- Optimo sin lujo  
3.- Buenas condiciones sanitarias (espacios reducidos)  
4.- Algunas deficiencias sanitarias (espacios reducidos)  
5.- Condiciones inadecuadas (rancho)

Puntaje: \_\_\_\_\_ Clasificación: 1.- Clase alta (0-6)  
2.- Media alta (7-9)  
3.- Media baja (10-12)  
4.- Obrera (13-15)  
5.- Marginal (16-20)



Alguno de sus parientes cercanos (padres, hermanos, hijos) ha tenido alguna de las siguientes enfermedades? 1. Si 2. No

Enfermedad	Mamá	Papá	hermanos	Esposo(a)	Hijos
Tíos					
1. Úlcera duodenal	___	___	___	___	___
2. Úlcera de estómago	___	___	___	___	___
3. Gastritis	___	___	___	___	___
4. Cáncer de estómago	___	___	___	___	___
5. Cáncer de esófago	___	___	___	___	___
6. Cáncer de colon	___	___	___	___	___
7. Otro cáncer (especificar)	___	___	___	___	___

- Ha consumido usted en el último año antibióticos?

1. Si 2. No

Especifique fecha de la última vez: \_\_\_\_\_

- Se ha examinado alguna vez usted en esta institución? /\_\_\_/

1. Si 2. No

- Cuántos exámenes de estómago se ha realizado usted? /\_\_\_/

Especifique año:

1° examen /\_\_\_/\_\_\_/

4° examen /\_\_\_/\_\_\_/

2° examen /\_\_\_/\_\_\_/

5° examen /\_\_\_/\_\_\_/

3° examen /\_\_\_/\_\_\_/

\* - Ha tenido alguno de los siguientes síntomas

Pérdida de apetito	/___/	/___/
Pérdida de fuerza	/___/	/___/
Pérdida de peso	/___/	/___/
Ardor de estómago	/___/	/___/
Agriuras	/___/	/___/
Vómitos de alimentos	/___/	/___/
Vómitos de sangre	/___/	/___/
Diarrea	/___/	/___/
Estreñimiento	/___/	/___/
Evacuaciones negras	/___/	/___/
Mareos	/___/	/___/
Desagrado a comidas	/___/	/___/
Salivación abundante	/___/	/___/
Dolor abdominal	/___/	/___/
Llenura después de comer	/___/	/___/
Dificultad para tragar	/___/	/___/
Intolerancia a alimentos	/___/	/___/

-Desde cuando se siente enfermo? \_\_\_\_\_

\* - Ha tenido usted enfermedades del estómago? 1. Si 2. No

Especifique: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

\* - Ha recibido tratamiento para enfermedades del estómago?

1. Si 2. No

Especifique \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_