



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**

Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas

Unidad Académica de Medicina

Genotipos s y m del gen *vacA* de *Helicobacter pylori* en pacientes con patología gastroduodenal

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A :

**ABNER SAUL CUEVAS CABALLERO**

DIRECTOR DE TESIS

M. EN C. ADOLFO ROMÁN ROMÁN



Chilpancingo, Gro., Diciembre de 2007



# Genotipos s y m del gen *vacA* de *Helicobacter pylori* en pacientes con patología gastroduodenal



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**  
**UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**APROBACIÓN DE TESIS**

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 7 días del mes de septiembre de dos mil siete, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada “Genotipos s y m del gen vac A de *Helicobacter pylori* en pacientes con patología gastroduodenal”, presentada por el alumno Abner Saúl Cuevas Caballero, para obtener el Grado de **Maestría en Ciencias Biomédicas**. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

M en C. Adolfo Román Román  
Dirección de tesis

Dra. Berenice Illades Aguiar

Dra. Gloria Fernández Tilapa

M en C. Natividad Castro Alarcón

Dra. Guadalupe Ayala Aguiar



Yo, **Dra. Berenice Illades Aguiar**  
Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas



Yo, **Dr. Alfonso Bernabé Carreño**  
Director de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas



Este trabajo se realizó en el Laboratorio Investigación Clínica de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en la Ciudad de Chilpancingo, Gro.

Bajo la dirección de

M en C. Adolfo Román Román

y la asesoría de

Dra. Berenice Illades Aguiar

Dra. Gloria Fernández Tilapa

M. en C Natividad Castro Alarcón

Dra. Guadalupe Ayala Aguilar

Con la colaboración de

Cir. Gast. End. Reyes Betancourt Linares

Unidad Especializada de Gastroenterología y Endoscopía

y

Esp. en Anat. Patol., subesp. en Patol. Oncol. Martin Orlando Morrugares Ixtepan

Esta investigación fue financiada por la Secretaría de Educación Pública a través del Programa Integral de Fortalecimiento Institucional del año 2004 (PIFI 3.1), durante el período en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, el C. Abner Saul Cuevas Caballero, recibió beca del CONACYT



---

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres por el apoyo que me han brindado porque gracias a ustedes he alcanzado todas las metas que me he propuesto.

A mis hermanos por ser mis amigos y por estar ahí cuando los he necesitado.

Al M. en C. Adolfo Román Román por hacer posible la realización de esta tesis y por su amistad.

A la Dra. Gloria Fernández Tilapa por todo el empeño puesto en este proyecto, por sus consejos y por su amistad.

A mis sinodales: M. en C Natividad Castro Alarcón, Dra. Berenice Illades Aguiar y Dra. Guadalupe Ayala Aguiar por sus sugerencias, correcciones y críticas en la redacción de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Dino, Temo, Dane, Pako, con los cuales aprendí muchas cosas y por los buenos momentos compartidos.

A mi amiga Rox porque a pesar de que el trabajo fue duro pudimos llegar hasta el final.

A Mabel por su amor en el tiempo que hemos estado juntos y por todo el apoyo brindado. TQM.



---

## DEDICATORIA

### **A mi madre:**

Por todo el apoyo que me ha brindado, por el ejemplo que me ha dado y por enseñarme que para alcanzar una meta es necesario luchar hasta el final.



---

## ÍNDICE

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	i
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	ii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	iii
<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	2
<b>INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	5
<b>RESULTADOS</b>	9
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	21
<b>REFERENCIAS</b>	28



---

## ABREVIATURAS

<b>AlpA</b>	Lipoproteína A asociada a adherencia
<b>AlpB</b>	Lipoproteína B asociada a adherencia
<b>BabA</b>	Adhesina de unión a antígenos de grupo sanguíneo.
<b>BHI</b>	Caldo de infusión cerebro-corazón
<b>CagA</b>	Gen asociado a citotoxina A
<b>dNTP's</b>	Desoxinucleótidos trifosfato
<b>HopZ</b>	Proteína Z de membrana externa de <i>Helicobacter pylori</i>
<b>iceA</b>	Gen A inducido por contacto con el epitelio
<b>m</b>	Región intermedia del gen <i>vacA</i>
<b>SabA</b>	Adhesina de unión a ácido siálico
<b>s</b>	Región señal del gen <i>vacA</i>
<b>VacA</b>	Citotoxina vacuolizante A





## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Frecuencia de infección por <i>Helicobacter pylori</i> determinada por histopatología	11
Figura 2 Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de un fragmento del gen del rRNA 16S para la identificación de <i>H. pylori</i>	15
Figura 3 Comparación entre la detección de <i>Helicobacter pylori</i> por el método de PCR y por histopatología en 101 pacientes estudiados	16
Figura 4 Electroforesis en gel de agarosa de amplificados de los alelos del gen <i>vacA</i> .	17
Figura 5 Frecuencia de genotipos <i>vacA</i> de 95 pacientes positivos a la infección por <i>H. pylori</i> .	18



## ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Oligonucleótidos utilizados en la tipificación del gen <i>vacA</i> .	7
Tabla 2	Características generales de los 120 pacientes estudiados.	9
Tabla 3	Distribución de pacientes por patología gástrica definidas por estudio endoscópico.	10
Tabla 4	Distribución de pacientes por patología gástrica definidas por estudio histopatológico.	10
Tabla 5	Relación entre la densidad de <i>Helicobacter pylori</i> presente en la mucosa gástrica de los pacientes y el diagnóstico histopatológico.	11
Tabla 6	Relación entre el infiltrado inflamatorio agudo presente en la mucosa gástrica de los pacientes y el diagnóstico histopatológico.	12
Tabla 7	Relación entre la presencia de infiltrado inflamatorio crónico en la mucosa gástrica de los pacientes y el diagnóstico histopatológico.	13
Tabla 8	Frecuencia de los factores de riesgo relacionados con la infección por <i>Helicobacter pylori</i> .	13
Tabla 9	Frecuencia de los factores de riesgo para el desarrollo de patología gástrica en los 120 pacientes estudiados.	14
Tabla 10	Relación entre los factores de riesgo para el desarrollo de patologías gástricas y las patologías gástricas definidas por endoscopia.	14
Tabla 11	Distribución de la infección por <i>H. pylori</i> según diagnóstico endoscópico.	16
Tabla 12	Distribución de la infección por <i>H. pylori</i> según diagnóstico histopatológico.	17
Tabla 13	Distribución de genotipos <i>vacA</i> por diagnóstico endoscópico.	19
Tabla 14	Distribución de genotipos <i>vacA</i> por diagnóstico histopatológico.	19



## RESUMEN

**INTRODUCCION.** *Helicobacter pylori* es la causa más común de gastritis y se asocia a una mayor incidencia de úlcera gastroduodenal. La citotoxina VacA es uno de los principales marcadores de virulencia de esta bacteria, induce vacuolización intracelular, modificación del metabolismo celular, dependiendo del genotipo del gen *vacA* de la cepa infectante. Las cepas s1m1 y s1m2 dañan considerablemente el epitelio gástrico, mientras que aquellas s2m1 y s2m2 causan un daño mínimo o nulo. **OBJETIVO.** Determinar la frecuencia de infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con patología gastroduodenal, tipificar los genotipos *vacA* s y m de la bacteria y relacionar la infección con los factores de riesgo identificados en los pacientes. **METODOLOGÍA.** Durante el periodo de marzo a septiembre de 2006 se colectaron datos y biopsias de 120 pacientes que fueron sometidos a endoscopia por diagnóstico presuntivo de gastritis, úlcera o cáncer gástrico, en la “Unidad Especializada de Gastroenterología y Endoscopia” de la ciudad de Chilpancingo, Guerrero. Se incluyeron pacientes que no habían tomado antibióticos al menos un mes antes de la endoscopia, que aportaron datos completos para el llenado de un cuestionario, firmaron consentimiento escrito para participar en el estudio y que resultaron con diagnóstico endoscópico de gastritis, úlcera o cáncer gástrico. Se obtuvieron dos biopsias por paciente, una para extracción de DNA total por el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, previa digestión con proteinasa K, y otra para estudio histopatológico. El DNA total obtenido de las biopsias fue analizado por PCR para la búsqueda de *Helicobacter pylori* mediante la amplificación de un fragmento del gen del rRNA 16S. La genotipificación del gen *vacA* fue hecha por PCR, amplificando un fragmento de la región s y la región m. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2% y observados bajo luz UV. **RESULTADOS.** El 79.2% de los pacientes presentaron infección por *H. pylori*; de acuerdo al diagnóstico endoscópico la distribución de la bacteria fue, 72% en los pacientes con gastritis, 72.7% de aquellos con úlcera y en el 100% de los casos con cáncer gástrico. Se encontró relación estadísticamente significativa entre la presencia del DNA de *H. pylori* y la gastritis ( $p= 0.05$ ). De 101 biopsias analizadas por histopatología en el 53.5% se detectaron bacilos parecidos a *Helicobacter*. El genotipo infectante de mayor frecuencia fue el s1m2 (74.7%), encontrándose en el 62.1% de los pacientes con gastritis folicular, en el 75% de los casos con úlcera gástrica y en el 100% de aquellos con cáncer gástrico. Se encontró relación estadísticamente significativa entre el genotipo s1m2 y la gastritis ( $p= 0.04$ ). El 12.6% de los pacientes presentaron infección con 2 genotipos *vacA*. Dentro de los factores de riesgo para el desarrollo de las patologías gástricas el consumo de café (59.2%), refrescos con gas (70%) y el estrés (93.3%) presentaron una mayor frecuencia. **CONCLUSIONES.** El 79.2% de los pacientes con algún padecimiento gástrico (gastritis, úlcera o cáncer gástrico) presentaron infección por *H. pylori*. El genotipo *vacA* predominante fue el s1m2 (74.7%) y el 12.6% de los casos presentó infección por dos genotipos. Ningún factor de riesgo para el desarrollo de las patologías gástricas se relacionó estadísticamente con el desarrollo de gastritis, úlcera o cáncer gástrico. No se encontró algún factor de riesgo relacionado con la adquisición de la infección. El diagnóstico de *Helicobacter pylori* por PCR a partir de DNA total obtenido de biopsias frescas es una alternativa diagnóstica que ofrece la ventaja de disminución en tiempo y costo.



## ABSTRACT

**INTRODUCTION.** *Helicobacter pylori* is the most common cause of gastritis and it is also associated to a high incidence of gastroduodenal ulcer. VacA cytotoxin is the major virulence marker associated with *H. pylori* pathogenicity. VacA induces the formation of intracellular vacuoles in the cell lines, modification of cellular metabolism, depend on the *vacA* genotype of the infecting strain. The strains s1m1 and s1m2 damage the gastric epithelium, while those s2m1 and s2m2 cause little or no damage. **AIM.** To determine the frequency of *Helicobacter pylori* infection in patients with gastroduodenal pathology, to define the *vacA* s and m genotype of the bacterium and to relate the infection to the risk factors identified in the patients. **METHODOLOGY.** During the period from March to September 2006 were collected data and biopsies from 120 patients who were undergoing endoscopy for presumptive diagnosis of gastritis, gastric ulcer or gastric cancer, in the " Unidad Especializada de Gastroenterología y Endoscopía" in the city of Chilpancingo, Guerrero . We included patients who had not taken antibiotics for at least one month before endoscopy, which provided data for the complete filling of a questionnaire, signed written consent to participate in the study and who were diagnosed with endoscopic gastritis, ulcer or gastric cancer. Two biopsies were obtained by the patient, one for a total DNA extraction by the phenol-chloroform-isoamylalcohol method previous digestion with proteinasa K, and another for histopathologic study. The total DNA obtained from biopsies was analyzed by PCR for the search of *Helicobacter pylori* by the amplification of a fragment of the gene rRNA 16S. Genotyping of the *vacA* gene was made by PCR amplifying a fragment of the region s and the region m. PCR products were separated by 2% agarose gel electrophoresis and examined under UV light. **RESULTS.** The 79.2% of patients were infected with *H. Pylori*, according to endoscopic diagnostic, to the bacterium was present in 72% of patients with gastritis, 72.7% of those with ulcers and in 100% of cases with gastric cancer. There was statistically significant relationship between the presence of DNA from *H. Pylori* and gastritis ( $p = 0.05$ ). Of 101 biopsies analyzed by histopathology at 53.5% bacilli were detected similar to *Helicobacter*. the most frequent *vacA* genotype was s1m2 (74.7%), found in 62.1% of patients with follicular gastritis, in 75% of cases with gastric ulcer and in 100% of those with gastric cancer. There was statistically significant relationship between genotype s1m2 and gastritis ( $p = 0.04$ ). The 12.6% of patients of the patients presented infection by two genotypes *vacA*. Within of risk factors for the development of gastric diseases consumption of coffee (59.2%), soft drinks gas (70%) and stress (93.3%) had a higher frequency. **CONCLUSIONS.** The 79.2% of patients with gastritis, ulcer or gastric cancer presented infection by *H. pylori*. The predominant *vacA* genotype was s1m2 (74.7%) and 12.6% of the cases were infected by two genotypes. No risk factor for the development of gastric disorders are statistically related to the development of gastritis, gastric ulcer or cancer. We did not find any risk factor associated with the acquisition of infection. The diagnosis of *Helicobacter pylori* by PCR from total DNA obtained from fresh biopsies is a alternative diagnostic method offered the advantage of reduced time and cost that result from the isolation of this bacteria..



## INTRODUCCIÓN

*Helicobacter pylori* es el agente causal de la gastritis crónica superficial, úlcera gastroduodenal y cáncer gástrico, pero no todas las personas infectadas con esta bacteria desarrollan alguna de estas patologías. Diversos estudios realizados hasta el año 2006 revelaron que *H. pylori* tiene una distribución mundial con una prevalencia de entre 30 y 90 %, donde los países en vías de desarrollo son los más afectados por esta infección. <sup>1-8</sup>

Analizando la presencia de *H. pylori* por patología gástrica se encontró que entre el 70-80% de los casos de gastritis crónica activa, el 90-95% de los pacientes con úlcera duodenal y el 60-70% de aquéllos con úlcera gástrica están colonizados por esta bacteria <sup>2, 5, 9-11</sup>. La infección con *Helicobacter pylori* representa un riesgo de entre 2.9-34.5 veces para el desarrollo de cáncer gástrico <sup>3-5</sup>. Según estudios seroepidemiológicos nacionales, la prevalencia de infección por *H. pylori* es del 80 % en pacientes jóvenes entre los 18 y 20 años de edad <sup>5</sup>.

Estudios realizados en el estado de Guerrero reportan una seroprevalencia del 75.1% en pacientes con patología gástrica, mientras que en pacientes sin sintomatología la seroprevalencia fue del 54.1% <sup>12, 13</sup>. La prevalencia de la infección por *H. pylori* en México está entre el 60% y 100%, la cual ha sido determinada por estudios moleculares en pacientes con patologías gástricas. <sup>14-17</sup>.

Dentro de los factores que pueden influir en la génesis de las enfermedades gástricas están, factores propios del huésped y factores de virulencia de la bacteria. Un factor importante de virulencia de *H. pylori* es la citotoxina vacuolizante A (VacA), que induce múltiples efectos en las células del epitelio gástrico, entre ellas la vacuolización citoplasmática. La citotoxina VacA es codificada por el gen *vacA*, como una protoxina de 1287-1296 aminoácidos, la cual sufre un procesamiento tanto en el extremo N-terminal como en el C-terminal para dar lugar a una toxina madura de aproximadamente 87 kDa. <sup>1,2, 5-7, 9, 18, 19</sup>.



Aunque el gen *vacA* está presente en todas las cepas de *Helicobacter pylori*, éste es polimórfico como consecuencia no todas las cepas presentan la misma actividad citotóxica. La región que codifica el péptido señal existe como tipos alélicos s1 ó s2, y la región m (región media) como tipos alélicos m1 ó m2. De esta forma el genotipo *vacA* s/m es un marcador de la patogenicidad individual de cada cepa, dado que el genotipo de la bacteria y el desarrollo de las patologías gástricas están relacionados. Las cepas *vacA* s1m1 y s1m2 de *H. pylori* se encuentran más involucradas en el desarrollo de la gastritis, úlcera y cáncer gástrico. <sup>1, 5, 18- 21, 23, 29-34.</sup>

Se ha reportado que en la región central de México el genotipo de mayor prevalencia es el s1m1, mientras que en la región norte es el s2m2 y en ambos casos se encontró infección por más de 2 cepas de esta bacteria. <sup>18- 21</sup> En el estado de Guerrero se desconoce la prevalencia de esta infección, así como el genotipo *vacA* que circula entre los pacientes que padecen alguna patología gastroduodenal.

Los objetivos de este estudio fueron determinar la frecuencia de infección por *H. pylori* en pacientes con patologías gastroduodenales, tipificar los genotipos s y m del gen *vacA* y relacionar la infección con los factores de riesgo para el desarrollo de patología gástrica identificados en los pacientes estudiados.



## MATERIALES Y MÉTODOS

***Población en estudio.*** Se realizó un estudio transversal descriptivo durante el periodo de marzo a septiembre de 2006, en el cual participaron un total de 120 pacientes, los cuales asistieron al servicio de endoscopia de la “Unidad Especializada de Gastroenterología y Endoscopia” de Chilpancingo, Guerrero, para valoración endoscópica por diferentes desordenes gástrico (gastritis, úlcera o cáncer gástrico).

Por consentimiento informado firmado, los pacientes aceptaron que sus antecedentes clínicos y demográficos, así como sus biopsias fueran utilizados para esta investigación. Los criterios de selección final fueron ausencia de tratamiento con antibióticos, sin uso de inhibidores de la bomba de protones al menos un mes antes de la endoscopia.

***Estudio endoscópico.*** Se realizó endoscopia gastroduodenal hasta la segunda porción del duodeno. Se tomaron dos biopsias una para estudio histopatológico y otra para extracción de DNA. La zona escogida para la toma de muestra fue determinada por la disponibilidad de tejido y por la experiencia del endoscopista. Tanto el equipo endoscópico como la pinza para la toma de biopsia fueron cuidadosamente desinfectados por inmersión en una solución de glutaraldehido al 2% durante 15 minutos, se enjuagaron y fueron secados después de cada sesión de endoscopia.

***Obtención de la muestra.*** Las biopsias, que se obtuvieron del antro gástrico de cada paciente, se colocaron en un criotubo que contenía 1 ml de caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI) más 10% de glicerol y se transportaron en hielo al Laboratorio de Investigación Clínica de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, donde se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.





**Evaluación histológica.** El diagnóstico histopatológico fue hecho por un especialista el cual llevo a cabo el siguiente proceso. Primero las biopsias se fijaron en una solución de formol al 10%, posteriormente se embebieron en parafina, se cortaron en secciones de 0.5µ y finalmente se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los parámetros histopatológicos fueron graduales de 0 a 3, utilizando el sistema de clasificación de Sydney modificada <sup>35</sup> para el análisis de la inflamación crónica, actividad de los polimorfonucleares y densidad bacteriana.

**Extracción de DNA:** La obtención de DNA total se realizó mediante protocolo de extracción de DNA de tejido fresco. En resumen, se realizó extracción de DNA total mediante la técnica de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico previa digestión con proteinasa K, el DNA obtenido fue cuantificado, posteriormente almacenado a -20 °C hasta su procesamiento.

**Detección molecular de *Helicobacter pylori*.** Los iniciadores utilizados fueron HP 16-219 5'-GCTAAGAGATCAGCCTATGTCC3' y HPGR16SR 5'CAATCAGCGTCAGTAATGTTC3' <sup>36</sup> que están dirigidos hacia el gen del *rRNA* 16S, con los cuales se obtuvo un producto de 522 pb. La mezcla de PCR contenía 100 ng de DNA total, buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 2.5mM, 0.2 mM de cada dNTP's (Invitrogen, Brasil), 0.6 µM de cada primer específico, 1U de Taq DNA polimerasa Platinum (Invitrogen, Brasil) en un volumen final de reacción de 15 µl. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, luego 30 ciclos de 30 segundos a 94°C para la desnaturalización, 30 segundos a 55°C para el alineamiento y 45 segundos a 72°C para la extensión. Finalmente se realizó una extensión a 72 °C por 7 minutos.

**Genotipificación por PCR del gen *vacA*.** Para la genotipificación del gen *vacA* se utilizaron los iniciadores reportados por Atherton y col. en 1995.<sup>9</sup> (**Tabla 1**). Para la región señal (s) del gen *vacA* se utilizaron los iniciadores VAI-F y VAI-R, para la región intermedia (m) se utilizaron los iniciadores VA3-F, VA3-R, VA4-F y VA4-R.



**Tabla 1.- Oligonucleótidos utilizados en la tipificación del gen *vacA*<sup>9</sup>**

Región amplificada	Primer	Secuencia del primer	Tamaño del producto
m1	<b>VA3-F</b>	5'GGTCAAAATGCGGTCATGG3'	290 pb
	<b>VA3-R</b>	5'CCATTGGTACCTGTAGAAAC3'	
m2	<b>VA4-F</b>	5'GGAGCCCCAGGAAACATTG3'	352 pb
	<b>VA4-R</b>	5'CATAACTAGCGCCTTGCAC3'	
s1	<b>VA1-F</b>	5'ATGGAAATACAACAAACACAC3'	259 pb
	<b>VA1-R</b>	5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC3'	
s2	<b>VA1-F</b>	5'ATGGAAATACAACAAACACAC3'	286 pb
	<b>VA1-R</b>	5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC3'	

Los productos de PCR de la región s (s1 y s2) fueron diferenciados en base al tamaño molecular.

La mezcla de PCR para la región media (m) contenía 200 ng de DNA total, buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 0.125 mM de cada dNTP's, 0.375 µM de cada primer específico, 1U de Taq DNA polimerasa Platinum (Invitrogen, Brasil) y agua de ampolleta en un volumen final de reacción de 20 µl. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, luego 30 ciclos de 30 segundos 94°C para desnaturalización, 53°C por 30 segundos para alineamiento, 72°C por 30 segundos para extensión. Finalmente, se realizó una extensión a 72 °C por 5 minutos.

La mezcla de reacción de PCR para la región señal (s) se hizo como se describe para la región "m". El programa de amplificación fue: desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, luego 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 56°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos. Finalmente, se realizó una extensión a 72 °C por 7 minutos. Todas las reacciones de PCR fueron hechas en un termociclador AG, Master Cycler. Ep gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Para la identificación de los productos amplificados se hizo un corrimiento electroforético de tipo submarino en geles de agarosa al 2%. Para verificar el tamaño de las bandas obtenidas se utilizó un marcador de peso molecular de 123 pb. Para la visualización de los productos amplificados se realizó tinción con bromuro de etidio y se observó en un transiluminador de luz ultravioleta donde se tomó registro fotográfico del gel. Como



control positivo de la reacción de PCR para la identificación de *Helicobacter pylori* y la genotipificación del gen *vacA* se utilizó DNA de la cepa de *Helicobacter pylori* ATCC 43504, que contiene los genes *vacA* s1/m1, y como control negativo se sustituyó el DNA molde por agua desionizada estéril.

**Análisis estadístico.** La captura de datos fue hecha en el programa SPSS v13.0, donde se calcularon frecuencias, porcentajes y medias. Para verificar si existía relación entre variables se utilizó el estadístico de  $\chi^2$  o la prueba exacta de *Fisher*. Para las pruebas se consideraron diferencias estadísticamente significativas con  $p \leq 0.05$ .



## RESULTADOS

**Características generales de la población.** Se estudiaron 120 pacientes, 56.7% (68/120) del sexo femenino y 43.3% (52/120) del sexo masculino. En el grupo completo, el promedio de edad fue de 44.4 años (rango: 16-90). En cuanto a la edad por sexo, se encontró que para las mujeres el promedio fue de 42.9 años con un rango de 16 a 87 años, mientras que para hombres el promedio fue de 44.1 años con un rango de 18 a 90 años. El 47.5% (57/120) de la población estudiada tuvo un grado de escolaridad de nivel superior, en cuanto a ocupación, el 24.2% (29/120) de los pacientes fueron empleados de gobierno, 20.8% (25/120) fueron docentes y el 20%(24/120) fueron amas de casa. El 59.2% (71/120) de los pacientes procedían del municipio de Chilpancingo (**tabla 2**).

**Tabla 2. Características generales de los 120 pacientes estudiados.**

<b>Característica</b>	<b>n=120</b>	<b>%</b>
<b>Edad</b>		
< 20 años	8	6.7
20-39 años	39	32.5
40- 59 años	55	45.8
>60 años	18	15.0
<b>Sexo</b>		
Femenino	68	56.7
Masculino	52	43.3
<b>Grado de escolaridad</b>		
Ninguno	7	5.8
Educación básica	20	16.7
Nivel medio	12	10.0
Nivel medio superior	17	14.2
Nivel superior	57	47.5
Posgrado	7	5.8
<b>Ocupación</b>		
Ama de casa	24	20.0
Docente	25	20.8
Estudiante	10	8.3
Jornalero	18	15.0
Área de la salud	5	4.2
Empleado de gobierno	29	24.2
Autoempleado(a)	6	5.0
Jubilado	2	1.7
Sacerdote	1	0.8
<b>Lugar de origen</b>		
Municipio de Chilpancingo	71	59.2
Otro lugar de procedencia	49	40.8



**Diagnóstico endoscópico.** Mediante estudio endoscópico se determinó que el 41.7% (50/120) de los pacientes presentaron gastritis crónica, el 27.5% (33/120) gastritis folicular, 9.2% (11/120) úlcera gástrica y el 5% (6/120) de los pacientes estudiados presentó cáncer gástrico (**tabla 3**).

**Tabla 3. Distribución de pacientes por patología gástrica definidas por estudio endoscópico.**

<b>Diagnóstico endoscópico</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Gastritis aguda	4	3.3
Gastritis crónica	50	41.7
Úlcera	11	9.2
Cáncer gástrico	6	5.0
Gastritis folicular	33	27.4
Pólipo gástrico	2	1.7
Gastritis biliar	12	10.0
Metaplasia intestinal	2	1.7
<b>Total</b>	<b>120</b>	<b>100</b>

Porcentaje calculado por columna.

**Diagnóstico histopatológico.** Se realizó el estudio histopatológico de 101 biopsias obtenidas de los pacientes, con lo cual se encontró que el 60.3% (61/101) de los pacientes presentó gastritis folicular, el 12.8% (13/101) presentó gastritis química y el 14.8% (15/101) tuvo gastritis crónica (**tabla 4**).

**Tabla 4. Distribución de pacientes por patología gástrica definidas por estudio histopatológico**

<b>Diagnóstico histopatológico</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Gastritis aguda y crónica	1	0.8
Gastritis crónica	15	14.8
Gastritis eosinofílica	4	4.7
Gastritis folicular	61	60.3
Adenocarcinoma	6	5.8
Pólipo gástrico	1	0.8
Gastritis química	13	12.8
<b>Total</b>	<b>101</b>	<b>100</b>

Porcentaje calculado por columna.



Por medio del estudio histopatológico, se encontró que de los 101 pacientes, el 53.5% (54/101) estaban infectados con *H. pylori* (figura 1).

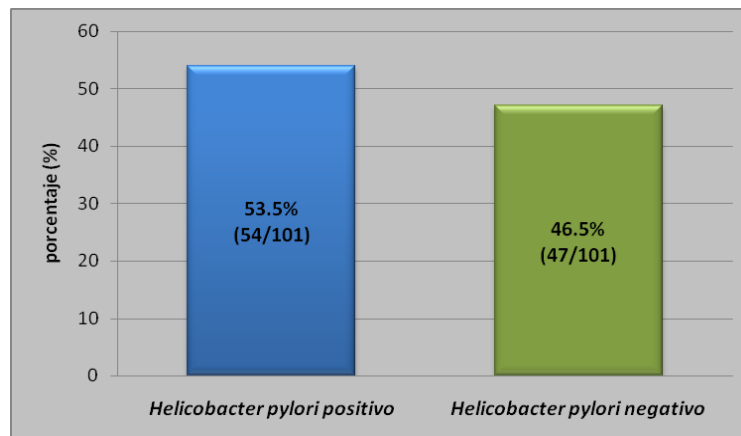


Figura 1. Frecuencia de infección por *Helicobacter pylori* determinada por histopatología en 101 pacientes.

**Densidad de *Helicobacter pylori* en la mucosa gástrica y su relación con el diagnóstico histopatológico.** El 49.4% (38/77) de los casos con gastritis de origen infeccioso presentaban bacilos de tipo *Helicobacter* con una densidad leve y en el 15.6% (12/77) de los pacientes con esta patología se encontró una densidad moderada.

Entre la presencia de *H. pylori* y la gastritis de origen infeccioso se encontró una correlación estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) (tabla 5).

Tabla 5. Relación entre la densidad de *Helicobacter pylori* presente en la mucosa gástrica y el diagnóstico histopatológico.

Diagnóstico histopatológico	n <sup>A</sup>	Densidad de <i>Helicobacter pylori</i> (%)				p <sup>B</sup>
		Ausente	leve	moderado	severo	
Gastritis de origen infeccioso <sup>C</sup> no	17	15(88.2)	2(11.8)	0	0	0.08
Gastritis de origen infeccioso <sup>D</sup>	77	25(32.5)	38(49.4)	12(15.6)	2(2.6)	<0.001
Adenocarcinoma gástrico	6	6(100)	0	0	0	0.06
Pólipo gástrico	1	1(100)	0	0	0	0.07

A. Solo se realizó estudio histopatológico de 101 pacientes.

B. Valor obtenido por el estadístico de Fisher

C Se consideraron los casos de gastritis química y gastritis eosinofílica

D. Se consideraron los casos de gastritis aguda, gastritis crónica y gastritis folicular



**Infiltrado inflamatorio agudo y su relación con las patologías gástricas determinadas por histopatología.** No se encontró relación estadísticamente significativa entre la presencia de infiltrado inflamatorio agudo y las patologías gástricas. (Tabla 6)

**Tabla 6. Relación entre la presencia de infiltrado inflamatorio agudo presente en la mucosa gástrica y el diagnóstico histopatológico.**

Diagnóstico histopatológico	n <sup>A</sup>	Infiltrado inflamatorio agudo (%)				p <sup>B</sup>
		Ausente	leve	moderado	severo	
Gastritis de origen no infeccioso <sup>C</sup>	17	12(70.6)	2(11.8)	3(17.6)	0	0.26
Gastritis de origen infeccioso <sup>D</sup>	77	38(49.4)	21(27.3)	17(22.1)	1(1.2)	0.90
Adenocarcinoma	6	0	3(50.0)	3(50.0)	0	0.08
Pólipo gástrico	1	0	1(100)	0	0	0.40

A. Solo se realizó estudio histopatológico de 101 pacientes.

B. Valor obtenido por el estadístico de Fisher

C. Se consideraron los casos de gastritis química y gastritis eosinofílica

D. Se consideraron los casos de gastritis aguda, gastritis crónica y gastritis folicular

**Infiltrado inflamatorio crónico y su relación con las patologías gástricas determinadas por histopatología.** El 10.4% (8/77) de los pacientes que padecían gastritis de origen infeccioso presentaron infiltrado inflamatorio crónico leve, mientras que el 77.9% (60/77) presentó infiltrado inflamatorio crónico moderado, para el caso de los pacientes que presentaron adenocarcinoma gástrico el 83.3% (5/6) presentó infiltrado inflamatorio moderado.

Se encontró correlación estadísticamente significativa entre la ausencia de infiltrado inflamatorio crónico y entre la gastritis de origen no infeccioso ( $p < 0.001$ ), la gastritis de origen infeccioso ( $p = 0.007$ ) y el adenocarcinoma gástrico ( $p < 0.001$ ) con el infiltrado crónico moderado (tabla 7).

**Tabla 7. Relación entre la presencia de infiltrado inflamatorio crónico en la mucosa gástrica y el diagnóstico histopatológico.**

Diagnóstico histopatológico	n <sup>A</sup>	Infiltrado inflamatorio crónico (%)				p <sup>B</sup>
		Ausente	leve	moderado	severo	
Gastritis de origen no infeccioso <sup>C</sup>	17	9(52.9)	3(17.6)	5(29.5)	0	<0.001
Gastritis de origen infeccioso <sup>D</sup>	77	7(9.1)	8(10.4)	60(77.9)	2(2.6)	0.007
adenocarcinoma	6	0	0	5(83.3)	1(16.7)	<0.001
Pólipo gástrico	1	0	0	1(100)	0	0.93

A. Solo se realizó estudio histopatológico de 101 pacientes.

B. Valor obtenido por el estadístico de Fisher

C. Se consideraron los casos de gastritis química y gastritis eosinofílica

D. Se consideraron los casos de gastritis aguda, gastritis crónica y gastritis folicular

### Factores de riesgo para la adquisición de la infección por *Helicobacter pylori*.

El 83% (100/120) de los pacientes desinfectan frutas y verduras, el 90% (108/120) no conviven con animales involucrados en la transmisión de *H. pylori* y el 95% (115/120) del total de los pacientes trabaja en áreas no relacionadas a la salud (**tabla 8**).

**Tabla 8. Frecuencia de los factores de riesgo relacionados con la infección por *Helicobacter pylori***

Factor de riesgo	n <sup>a</sup>	% <sup>b</sup>
<b>Desinfecta frutas y verduras</b>		
si	100	83.3
no	20	16.7
<b>Convive con animales involucrados en la transmisión de <i>H pylori</i><sup>c</sup></b>		
si	12	10
no	108	90
<b>Ocupación</b>		
Área de la salud	5	4.2
No relacionado al área de la salud	115	95.8

a. Para el análisis se tomaron en cuenta los 120 pacientes

b. Porcentaje calculado por columna por cada variable

c. perros, gatos.

**Factores de riesgo para el desarrollo de patologías gástricas.** Con el fin de incluir a todos los pacientes del estudio se analizan los factores de riesgo a partir del diagnóstico endoscópico en cual se determinó en los 120 individuos, con esto se encontró que el 59.2% (71/120) consume café, el 70% (84/120) consume refrescos con gas y el 93.3% (112/120) dijo padecer estrés (**tabla 9**).

**Tabla 9. Frecuencia de los factores de riesgo para el desarrollo de patología gástrica en los 120 pacientes estudiados.**

Factor de riesgo	n	% <sup>a</sup>
Ha fumado		
Si	29	24.2
No	67	55.8
Ocasionalmente	24	20.0
Bebidas alcohólicas		
Si	37	30.8
No	36	30.0
Ocasionalmente	47	39.2
Refrescos con gas		
Si	84	70.0
No	19	15.8
Ocasionalmente	17	14.2
Ingiera café		
Si	71	59.2
No	38	31.7
Ocasionalmente	11	9.2
Estrés		
Si	112	93.3
No	8	6.7

<sup>a</sup> Porcentajes calculado para cada variable por columna

Una vez que se analizaron los factores de riesgo para el desarrollo de las patologías se hizo un análisis para determinar si existía correlación entre éstos y la gastritis, úlcera o cáncer gástrico, encontrando, que para este estudio los factores de riesgo no están asociados estadísticamente con las patologías (**tabla 10**).

**Tabla 10. Relación entre los factores de riesgo y las patologías gástricas definidas por endoscopia.**

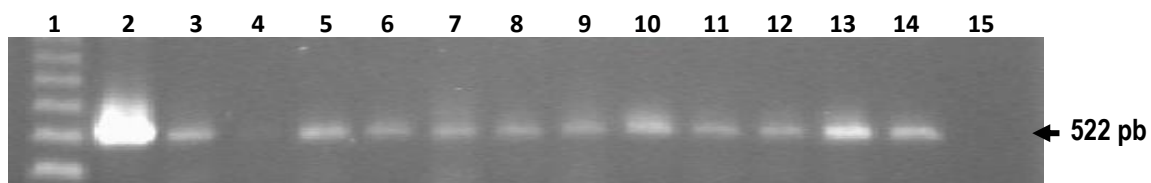
Diagnóstico Endoscópico	n=120 (%)	Fuma (%)	p	Alcohol (%)	p	café	p	Refresco (%)	p
Gastritis de origen no infeccioso	12(10.0)	6(50)	0.448	8(66.7)	0.512	7 (58.3)	0.315	11(91.7)	0.4
Gastritis de origen infeccioso	87(72.5)	36(41.4)	0.214	64(73.6)	0.124	60(69.0)	0.486	74(85.1)	0.428
Cáncer gástrico	6(5.0)	3(50)	0.543	4(66.7)	0.584	6(100)	0.435	4(66.7)	0.241
Úlcera	11(9.1)	7(63.6)	0.148	7(63.6)	0.430	6(54.5)	0.240	8(72.7)	0.241
Pólipo gástrico	2(1.2)	0	----	1(50)	0.512	1(50)	0.535	2(100)	0.707
Metaplasia intestinal	2(1.2)	1(50)	0.690	0	-----	2(100)	0.465	2(100)	0.707





Así mismo se analizaron los factores de riesgo para el desarrollo de las patologías gástricas con la presencia de *Helicobacter pylori* en la mucosa gástrica encontrando que no hay correlación estadísticamente significativa entre éstos. Se encontró que el 53% (64/120) de los pacientes estudiados tuvieron tratamiento con antibióticos contra *H. pylori* al menos 3 meses antes de la endoscopia y el 65% (78/120) tuvo tratamiento con inhibidores de la bomba de protones (H<sub>2</sub>).

**Diagnóstico molecular de *Helicobacter pylori*.** En la figura 2 se muestra un gel de agarosa con el corrimiento del amplificado de un fragmento del gen del rRNA 16S. El 79.2 % (95/120) de los pacientes fueron positivos a *Helicobacter pylori*, mientras que el 20.8% (25/120) fueron negativos.



**Figura 2.** Gel de agarosa mostrando el amplificado de un fragmento del gen del *rRNA 16S* de *Helicobacter pylori*. 1 Marcador de peso molecular de 123 pb, 2 control positivo (cepa ATCC 43504), 3-14 muestras clínicas, 15 control negativo.

**Concordancia en la detección de *Helicobacter pylori* por el método de PCR y el estudio histopatológico.** Al hacer un análisis con el estadístico de *kappa* se encontró una concordancia pobre entre estos dos métodos de detección (*kappa*= 0.05), ya que de 101 pacientes analizados, por el método de PCR se identificó a *H. pylori* en el 81.2% (82/101) y por histopatología se identificaron bacilos parecidos a *Helicobacter* en el 53.5% (54/101).

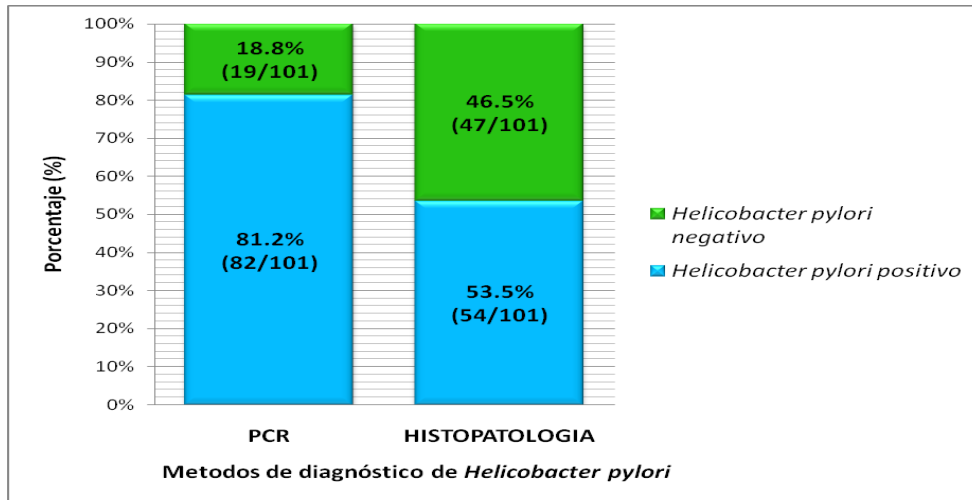


Figura 3. Comparación entre la detección de *Helicobacter pylori* por el método de PCR y por la histopatología en 101 pacientes

**Presencia de *Helicobacter pylori* determinada por PCR y su relación con las patologías gástricas definidas por endoscopia.** Se diagnosticó infección por la bacteria en el 50% (6/12) de los pacientes con gastritis de origen no infeccioso, el 82.8% (72/87) de aquellos con gastritis de origen infeccioso, el 100% (6/6) de los que presentaron cáncer gástrico y el 72.7% (8/11) de los que tenían como diagnóstico úlcera gástrica.

Se encontró correlación estadísticamente significativa entre la infección por *H. pylori* y la gastritis de origen no infeccioso ( $p=0.02$ ) y la gastritis de origen infeccioso ( $p=0.05$ ) (tabla 11).

Tabla 11. Distribución de la infección por *Helicobacter pylori*<sup>B</sup> según diagnóstico endoscópico

Diagnóstico endoscópico	n <sup>A</sup> (%)	<i>Helicobacter pylori</i> positivos <sup>B</sup>	%	p <sup>C</sup>
Gastritis de origen no infeccioso <sup>D</sup>	12(10.0)	6	50.0	0.02
Gastritis de origen infeccioso <sup>E</sup>	87(72.5)	72	82.8	0.05
Cáncer gástrico	6(5.0)	6	100	0.24
Úlcera	11(9.1)	8	72.7	0.41
Pólipo gástrico	2(1.2)	2	100	0.65
Metaplasia intestinal	2(1.2)	1	50	0.37

A. Estudio endoscópico, realizado en los 120 pacientes.

B. Detección de *Helicobacter pylori* mediante la técnica de PCR

C. Valor obtenido por el estadístico de Fisher

D. Se consideraron los casos de gastritis química y gastritis eosinofílica

E. Se consideraron los casos de gastritis aguda, gastritis crónica y gastritis folicular



**Presencia de *Helicobacter pylori* determinada por PCR y su relación con las patologías gástricas definidas por histopatología.** El estudio histopatológico se realizó solo en 101 pacientes, al analizar la presencia de *H. pylori* se encontró que la bacteria estaba infectando al 89.6% (69/77) de los pacientes que padecía gastritis de origen infeccioso y al 100% (6/6) de los presentaron adenocarcinoma gástrico. La presencia de *Helicobacter pylori* se correlacionó estadísticamente con la gastritis de origen no infeccioso ( $p < 0.001$ ) y la gastritis de origen infeccioso ( $p < 0.001$ ) (tabla 12)

**Tabla 12. Distribución de la infección por *Helicobacter pylori*<sup>B</sup> según diagnóstico histopatológico.**

Diagnóstico histopatológico	n=101 <sup>A</sup>	<i>Helicobacter pylori</i> positivo <sup>B</sup>	%	p <sup>C</sup>
Gastritis de origen no infeccioso <sup>D</sup>	17	6	35.3	<0.001
Gastritis de origen infeccioso <sup>E</sup>	77	69	89.6	<0.001
adenocarcinoma	6	6	100	0.276
Pólipo gástrico	1	1	100	0.812

A. estudio endoscópico, realizado en los 120 pacientes.

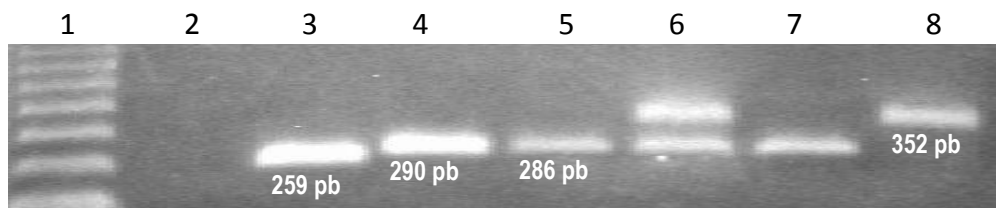
B. Detección de *Helicobacter pylori* mediante la técnica de PCR

C. Valor obtenido por el estadístico de Fisher

D. Se consideraron los casos de gastritis química y gastritis eosinofílica

E. Se consideraron los casos de gastritis aguda, gastritis crónica y gastritis folicular

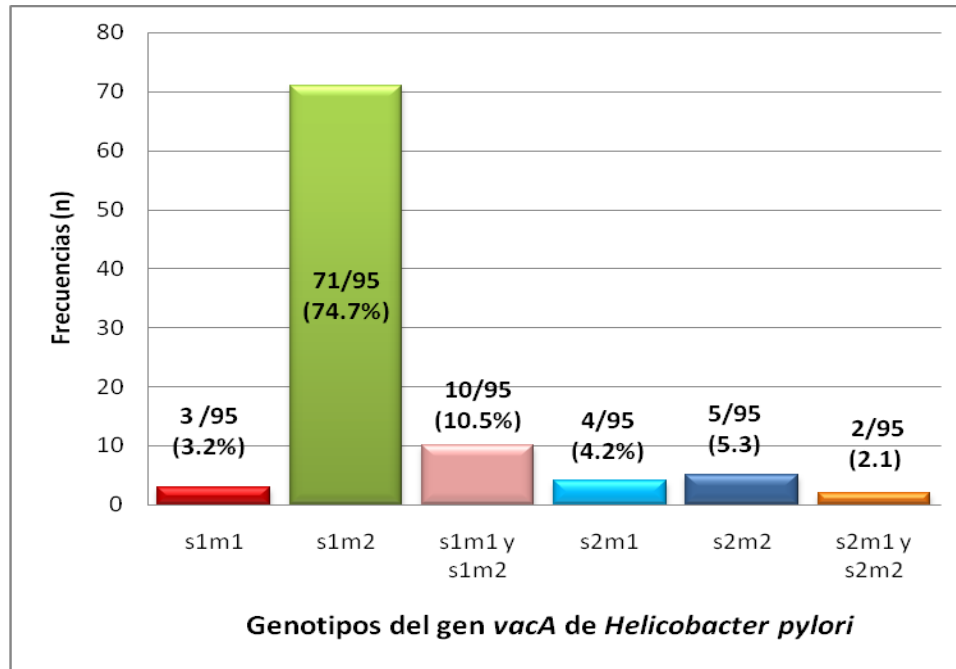
**Genotipificación del gen *vacA*.** De los 120 pacientes analizados por PCR para la búsqueda de *Helicobacter pylori* el 79.2% (95/120) resultó positivo. De los 95 casos con infección por la bacteria se determinó el genotipo infectante con el método de PCR (figura 4), para la región señal se encontró que el 88.4% presentaban el alelo s1 y el 11.6% el alelo s2. Para la región intermedia del gen *vacA* el 80% de las muestras positivas a *H. pylori* presentaba el alelo m2, el 7.4% el alelo m1 y el 12.6% presentó ambos alelos.



**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa después de la amplificación de los diferentes genotipos del gen *vacA* de *Helicobacter pylori*. 1 Marcador de peso molecular de 123 pb, 2 control negativo, 3 control positivo s1, región señal (cepa ATCC 43504), 4 control positivo m1, región intermedia (cepa ATCC 43504), 5 muestra clínica s2, 6 muestra clínica m1 y m2, 7 muestra clínica s2 y 8 muestra clínica m2.



Al analizar la combinación de los genotipos presentes en los pacientes estudiados se encontró que el 74.7% fue s1m2 y el 12.6% del total de los pacientes presentaron infección por dos genotipos (**figura 5**).



**Figura 5. Frecuencia de genotipos *vacA* de 95 pacientes positivos a la infección por *Helicobacter pylori*.**

**Genotipos *vacA* y su relación con las patologías gástricas determinadas por endoscopia.** El genotipo s1m2 fue el de mayor prevalencia, ya que éste se encontró en el 80% (32/40) de los pacientes con gastritis crónica, en el 62.1% (18/29) de aquellos con gastritis folicular y en el 100% de los casos con cáncer. Se confirmó infección por dos genotipos (s1m1 y s1m2) en el 27.6% (8/29) de los pacientes que presentaron gastritis folicular.

Se encontró correlación estadísticamente significativa entre la gastritis folicular y el genotipo s1m2 ( $p=0.044$ ), así como con la infección con dos cepas de *H. pylori* (s1m1 y s1m2) ( $p<0.001$ ) (**tabla 13**).

**Tabla 13. Distribución de genotipos *vacA* por diagnóstico endoscópico.**

Diagnóstico endoscópico	n=95	Genotipos <i>vacA</i>					
		s1 m1 (%)	s1m2 (%)	s1m1 y s1m2 (%)	s2m1 (%)	s2m2 (%)	s2m1 y s2m2 (%)
Gastritis aguda	3	1(33.3)	2(66.7)	0	0	0	0
Gastritis crónica	40	1(2.5)	32 (80)	1(2.5)	3(7.5)	3(7.5)	0
Úlcera	8	0	6(75)	0	1(12.5)	1(12.5)	0
Cáncer gástrico	6	0	6(100)	0	0	0	0
Gastritis folicular	29	1(3.4)	18(62.1)	8(27.6)	0	0	2(6.9)
Pólipo gástrico	2	0	2(100)	0	0	0	0
Gastritis biliar	6	0	4(66.6)	1(16.7)	0	1(16.7)	0
Metaplasia intestinal	1	0	1(100)	0	0	0	0

Los porcentajes fueron calculados por filas.

**Genotipos *vacA* y su relación con las patologías gástricas determinadas por histopatología.** El genotipo s1m2 continuo siendo el de mayor prevalencia, éste fue encontrado en el 76.9% (10/13) de los pacientes con gastritis crónica y en el 78.3% (43/55) de los casos de gastritis folicular. La infección por dos genotipos (s1m1 y s1m2) estuvo presente en el 7.7% (1/13) de los pacientes con gastritis crónica y en el 10.9%(6/55) de aquellos con gastritis folicular.

No se encontró correlación estadísticamente significativa entre el genotipo de la bacteria y las patologías gástricas determinadas por histopatología (**tabla 14**)

**Tabla 14. Distribución de genotipos *vacA* por diagnóstico histopatológico.**

Diagnóstico histopatológico.	n= 82	genotipo <i>vacA</i>					
		s1m1(%)	s1m2(%)	s1m1 y s1m2(%)	s2m1(%)	s2m2(%)	s2m1 y s2m2(%)
Gastritis aguda y crónica	1	0	1(100)	0	0	0	0
Gastritis crónica	13	0	10(76.9)	1(7.7)	1(7.7)	1(7.7)	0
Gastritis eosinofílica	2	0	0	1(50)	1(50)	0	0
Gastritis folicular	55	1(1.8)	43(78.3)	6(10.9)	2(3.6)	2(3.6)	1(1.8)
Adenocarcinoma	6	0	6	0	0	0	0
Pólipo gástrico	1	0	1	0	0	0	0
Gastritis química	4	0	4	0	0	0	0

Los porcentajes fueron calculados por filas.



---

No se encontró correlación estadísticamente significativa entre los genotipos *vacA* y la presencia de algún tipo de infiltrado inflamatorio.



## DISCUSIÓN

*Helicobacter pylori* coloniza el estómago humano y establece una infección por largos periodos de tiempo. Aunque más de la mitad de la población mundial está infectada solo una pequeña proporción presenta síntomas o desarrolla gastritis, úlcera o cáncer gástrico. Este hecho puede estar relacionado con la respuesta inmune del hospedero, factores ambientales o diferencias en la virulencia de las cepas de la bacteria <sup>1, 7- 9</sup>.

El diagnóstico de *H. pylori* puede hacerse mediante una gran variedad de técnicas, como la histopatología y el cultivo, sin embargo, estos requieren de procesos largos o de técnicas complicadas; en el caso del cultivo el tiempo que tarda en crecer la bacteria es de al menos una semana, para el caso de la histopatología, esta no ofrece la certeza de identificación de la bacteria ya que solo identifica bacilos parecido a *Helicobacter*.

En esta investigación se hizo la búsqueda de *H. pylori* a partir de biopsias frescas por el método de PCR. La sensibilidad y especificidad de la PCR para la detección del DNA de esta bacteria es de 95%. La especificidad de esta técnica viene dada por el uso de oligonucleótidos sintéticos, específicos para determinado gen, que facilitan la amplificación de una secuencia nucleotídica definida. <sup>36</sup>

En este estudio la detección de *H. pylori* por el método de PCR fue más eficaz que la histopatología, ya que de 101 muestras analizadas por ambas técnicas, la PCR identificó infección en el 81.2% de los pacientes, mientras que por histopatología solo se detectaron bacilos parecidos a *Helicobacter* en el 53% de las muestras, estos resultados concuerdan con los reportados por Martins LC y col., <sup>37</sup> en el 2005, que informa una mayor detección de la bacteria por PCR (91.5%) que con histopatología (70%), pero difieren de lo encontrado por Nimri LF y col., <sup>38</sup> en Jordania en el 2006, donde identificaron *Helicobacter pylori* en condiciones similares, encontrando que la histopatología tuvo un mayor porcentaje de identificación (77.5%) que la PCR (44.1%). La discrepancia en los resultados con respecto a la histopatología puede deberse al número de biopsias que se analizaron por paciente y al sitio de la toma de



muestra, ya que la bacteria tiene una distribución en parches en el estómago, mientras que en el presente estudio se analizó una muestra por paciente, en el estudio de Nimri FL, y col.,<sup>38</sup> analizaron dos muestras de sitios diferentes por cada paciente. La diferencia en los resultados con el método de PCR puede radicar en que los pacientes analizados por estos investigadores tenían tratamiento con antiácidos o inhibidores de la bomba de protones al momento de tomar la muestra, los cuales pueden contener inhibidores de la PCR.

La detección del DNA de *Helicobacter pylori* por el método de PCR en DNA total obtenido de biopsias es una alternativa diagnóstica que permite disminuir el tiempo y costo de la prueba, de tal forma que ésta podría emplearse en la práctica de rutina para la detección y seguimiento de los pacientes infectados.

En este estudio se demostró una alta prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* detectada por PCR a partir de DNA total obtenido de biopsias frescas (79.2%) de pacientes del municipio de Chilpancingo, Gro., que padecen gastritis, úlcera o cáncer gástrico. Estos resultados son similares a los reportados en otros estados del país, como es el caso de Martínez-Madrigal F y col.,<sup>14</sup> en un estudio en pacientes con gastritis crónica dividida según su intensidad en, intensa, moderada y leve, encontraron *H. pylori* en el 100%, 77% y 25% respectivamente; también se han informado frecuencias similares en estudios realizados en diversos países en los que hacen la búsqueda de *H. pylori* en DNA total, tal es el caso de Araya OJC, y col.,<sup>39</sup> en Chile quienes encuentran una prevalencia del 83.3%, Martins LC, y col.,<sup>37</sup> en Brasil reporta 91.5% y Ghose C, y col.,<sup>40</sup> en Venezuela reporta 95% de pacientes positivos a la infección; estos países al igual que México son países en vías de desarrollo, en los cuales la prevalencia de infección es alta.

Numerosos estudios han reportado que *Helicobacter pylori* está presente en el 70-80% de las gastritis, en el 60-70% de pacientes con úlcera gástrica y en el 100% de cáncer gástrico.<sup>5, 9- 11.</sup> Morales-Espinoza R, y col.,<sup>19</sup> reportan una prevalencia de *H. pylori* del 60% en úlcera gastroduodenal, Martins LC, y col.,<sup>37</sup> informa una frecuencia





de infección del 89.8% en pacientes con gastritis y de 93.3% en casos de úlcera gastroduodenal., por otra parte, Perng CHI, y col., <sup>41</sup> encuentra 67.6% en gastritis y 59.3% en úlcera. El diagnóstico clínico en cada uno de estos estudios fue hecho por histopatología y endoscopia. Los resultados de este estudio concuerdan con lo reportado a nivel mundial ya que por diagnóstico histopatológico se encontró que la bacteria estaba presente en el 89.6% (69/77) de los pacientes que padecían gastritis crónica, y en el 100% (6/6) en cáncer gástrico. De acuerdo al diagnóstico endoscópico el 72.7% (8/11) de los casos con úlcera, el 82.2%(72/87) de aquellos con gastritis y el 100% de los casos con cáncer gástrico fueron positivos a la presencia del DNA de la bacteria

El diagnóstico de infección por *Helicobacter pylori* es importante para el tratamiento de la gastritis, úlcera o cáncer gástrico, sin embargo la determinación del genotipo *vacA* infectante es un factor importante ya que la virulencia de cada cepa varía según el genotipo presente.

La citotoxina *VacA* de *Helicobacter pylori* ejerce múltiples daños sobre el epitelio gástrico, dependiendo del genotipo *vacA* presente. Las bacterias que presentan el genotipo s1m1 y s1m2 dañan considerablemente el epitelio gástrico, mientras que aquellas con genotipo s2m1 y s2m2 causan un daño mínimo o nulo. <sup>37, 42, 43.</sup>

En las 95 muestras positivas a la infección por *Helicobacter pylori* sometidos a genotipificación se encontraron todas las combinaciones posibles de la región s y m del gen *vacA* (s1m1, s1m2, s2m1, s2m2), y el genotipo s1m2 presentó una frecuencia del 74.7% (71/95). Este hallazgo difiere con los de otros estudios realizados en el país; en Monterrey Garza-González E, <sup>20</sup> y col., en el año 2004 reportó una frecuencia del 60% para el genotipo s2m2, mientras que Morales-Espinosa R y col. <sup>19</sup> reportan en el año de 1999 una prevalencia del 95% para el genotipo s1m1 y González-Valencia G, y col., <sup>18</sup> en el año 2000 en la ciudad de México reportan una prevalencia del 86% para s1 y 85% para m1, Román-Román A,



y col., en casos del Distrito Federal reportaron una frecuencia del 24.5% para el genotipo s1m1 (Datos no publicados).

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con los reportados en otros países que reportan una mayor frecuencia para el genotipo s1m2, como es el caso de Smith S, y col.,<sup>44</sup> en Nigeria que reporta 73.2% para este genotipo, por su parte Miehleke S., y col.,<sup>45</sup> en Alemania encuentran el genotipo s1m2 en un 42% y Gong YH, y col.<sup>46</sup> reportan una prevalencia del 86% para s1 y 45% para m2 en pacientes con cáncer gástrico. Las variaciones en la distribución geográfica dentro de un mismo país podrían deberse a las migraciones humanas, ya que como se sabe México es un país con una gran combinación de razas y también una nación a la que migran personas de diversas nacionalidades.

Diversos genotipos del gen *vacA* han sido encontrados en pacientes que padecen gastritis, úlcera o cáncer gástrico. Quiroga AJ, y col.,<sup>47</sup> en Colombia encontraron que el 61.5% de los casos de gastritis tenían el genotipo s1m1, en úlcera este genotipo estuvo presente en el 81.0% de los pacientes y en cáncer gástrico en el 84.0%, por otro lado Martins LC, y col.,<sup>37</sup> en Brasil encontró que en el 62.1% de los pacientes con gastritis y 89.2% en úlcera gastroduodenal tenían este genotipo.

Los resultados obtenidos en este estudio difieren de los reportados por esos autores ya que el genotipo de mayor prevalencia en nuestra población fue el s1m2, con un 79.1% en gastritis, 75% en úlcera y 100% en cáncer gástrico; pero concuerdan con los informados por Miehleke S, y col.,<sup>45</sup> quienes publicaron que en gastritis el genotipo s1m2 es el más frecuente con un 56%, Smith S, y col.,<sup>44</sup> en Nigeria reportan este mismo genotipo en pacientes con úlcera gastroduodenal con una frecuencia del 73.7%. El genotipo de mayor virulencia es el s1m1 seguido del s1m2. Para poder determinar el porqué genotipos de distinta virulencia son encontrados en las mismas patologías es necesario determinar diversos factores como, los ambientales, la virulencia de la bacteria (dependiente de otros genes como *cagA*, *babA*, etc.) y polimorfismos en genes involucrados en la respuesta inmune del hospedero, ya que



no todos los individuos responden de la misma manera a la infección, algunos desarrollaran gastritis, úlcera o cáncer gástrico a edades más tempranas de la vida.

Los resultados de este estudio confirman que la población mexicana es portadora de múltiples genotipos. El 12.6% de los pacientes estudiados presentaron infección por dos genotipos *vacA*, lo que concuerda con lo reportado por otros estudios hechos en población mexicana, Morales-Espinosa R y col.,<sup>19</sup> encontraron que el 90% de los pacientes estudiados presentaban infección por múltiples genotipos, González-Valencia G, y col.,<sup>18</sup> publicaron que pacientes con úlcera gastroduodenal presentaron infección múltiple con una frecuencia del 95%. Así mismo en otros países se ha reportado infección por múltiples genotipos como es el caso de Brasil donde Martins LC, y col.<sup>37</sup> detectaron un 3.4%, Ghose C, y col.<sup>40</sup> en Venezuela un 55%, Nogueira C, y col.<sup>42</sup> en Colombia 18.1%, Asrat D, y col.<sup>48</sup> en Etiopia 7% y Gold BD, y col.<sup>49</sup> en un estudio multicéntrico en 4 regiones de Estados Unidos 10.5%.

Entre los factores que incrementan el riesgo para el desarrollo de gastritis, úlcera y cáncer gástrico se mencionan el consumo de café, bebidas alcohólicas, consumo de refrescos con gas, el estrés, y consumo de cigarrros. En este estudio se encontró una alta prevalencia de consumidores de café (59.2%) y refrescos con gas (70%), así como de individuos que padecen estrés (93.3%). Se ha demostrado que estos factores potencializan el daño que *H. pylori* ejerce sobre la mucosa gástrica,<sup>22, 23, 26</sup> sin embargo, en este estudio no fue posible calcular riesgos debido al tamaño de muestra y al tipo de estudios en el que solamente se incluyeron casos..

Los factores relacionados con la adquisición de la infección son el hacinamiento, condiciones socioeconómicas bajas, higiene pobre y la ocupación (gastroenterólogos, endoscopistas, dentistas).<sup>1, 5, 24</sup> En la población estudiada el 83% (100/120) desinfectaban frutas y verduras, el 90% (108/120) no convivían con animales involucrados en la transmisión de *H. pylori* y el 95% (115/120) del total de los pacientes trabaja en áreas no relacionadas con el cuidado de la salud. Por lo



tanto, el hecho de que estén infectados puede deberse a que adquirieron la infección en etapas tempranas de su vida, o a través de la saliva, por contacto estrecho entre individuos, esta podría ser alguna explicación del porqué nuestros pacientes a pesar de tener buena higiene y no tener riesgo ocupacional adquirieron la bacteria.

Uno de los hallazgos de este estudio fue que los pacientes habían tenido tratamientos previos con medicamentos que inhibían la acción del ácido gástrico y otros eran específicos para eliminar la bacteria, sin embargo, aún con esto la frecuencia de infección fue alta. Esto podría significar que la bacteria está adquiriendo resistencia a los medicamentos que se utilizan para su eliminación.



## CONCLUSIONES

El 79.2 % de los pacientes que asistieron a la Unidad Especializada de Gastroenterología y Endoscopia, que fueron diagnosticados con gastritis, úlcera o cáncer gástrico fueron positivos a la infección por *Helicobacter pylori*; esto demuestra un alta prevalencia de la infección considerando que el 56% de los pacientes habían recibido tratamiento con antibióticos y el 65% con inhibidores de la bomba de protones al menos 3 meses antes de la endoscopia. Quizá también se deba a reinfección después del tratamiento.

El genotipo *vacA* predominante fue el s1m2 (74.74%), este fue encontrado en el 80.0% de los pacientes con gastritis crónica, 75% de aquellos con úlcera gastroduodenal y en el 100% de los casos con cáncer gástrico. Del total de la población el 12.6% de los pacientes presentaron infección por dos genotipos.

Una alta proporción de la población estudiada ingiere café (59.2%) y refrescos con gas (70%), y el 93.3% reconoció padecer estrés. Estos factores pueden estar contribuyendo al desarrollo de la gastritis úlcera o cáncer gástrico.

No se encontró algún factor de riesgo que pudiera estar relacionado con la adquisición de la infección por *Helicobacter pylori*.

El diagnóstico de *Helicobacter pylori* por PCR a partir de DNA total obtenido de biopsias frescas es una alternativa diagnóstica que ofrece la ventaja de disminución en tiempo y costo, que podría emplearse en la práctica de rutina para la detección y seguimiento de pacientes infectados.



## REFERENCIAS

1. Aguilar R G, Ayala G, Fierros-Zarate G. *Helicobacter pylori* recents advances in the study of its pathogenicity and prevention. *Salud Pub Mex* 2001; 43: 237-247.
2. Beswick J E, Suarez G, Reyes E V. *Helicobacter pylori* and host interactions that influence pathogenesis. *World J Gastroenterol* 2006; 12(35): 5599-5605.
3. Guarner J, Mohar A. La asociación entre *Helicobacter pylori* y neoplasias gástricas. Evidencia epidemiológica. *Rev Gastroenterol Mex* 2000; 65 (supl 2): 20-24.
4. Barreto-Zúñiga R, Kato Y, Bobadilla D J, Okuyama M, Maruyama M, Otha H, Takekishi T, et al. Importancia del *Helicobacter pylori* en la patogénesis del cáncer gástrico. Modelos en experimentales en roedores. *Rev Gastroenterol Mex* 2000; 65 (supl 2): 25-33.
5. Castillo-Rojas G, Mazari-Hiriart M, Lopez-Vidal Y. *Helicobacter pylori*: focus on CagA and VacA major virulence factors. *Salud Pub Méx* 2004; 46: 538-158.
6. Tomb JF, White O, Kerlavage A R, Clayton R A, Sutton G G, Fleischmann R D, *Et al.* The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; 388: 539-547.
7. *Suarez G, Reyes V E, Beswick EJ.* Immune response to *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2006; 12(35): 5593-5598.
8. Ito M, Tanaka S, Kamada T, Haruma K, Chayama K. Causal role of *Helicobacter pylori* infection and eradication therapy in gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2006; 12(1): 10-16.
9. Atherton J. C, Cao P, Peek R. M, Tummuru M. K. R., Blaser M. J., Cover T. L. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995; 270:17771–17777.
10. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 2002; 347(15): 1175-1186.
11. Gamboa-Figueroa J.L. Infección por *Helicobacter pylori* y enfermedad ulcerosa péptica. *Univ Diag* 2003; 3(1): 20-24.



12. Díaz-Mata D, Sánchez-Tacuba C, Román-Román A, Flores-Alfaro E, Salgado-Bernabé A, Fernández-Tilapa G. Prevalencia de anticuerpos anti-*Helicobacter pylori* en personas sin sintomatología gástrica de cuatro colonias de la ciudad de Chilpancingo, Guerrero. XI Foro de Estudios sobre Guerrero. 24 de noviembre de 2006. Acapulco, Guerrero.
13. Guzmán-Guzmán I P, Garibay-García J A, Román-Román A, Flores-Alfaro E, Betancourt-Linares R Fernández-Tilapa G. Seroprevalencia de *Helicobacter pylori* en pacientes con gastritis y úlcera gástrica de la clínica hospital ISSSTE de Chilpancingo, Guerrero. XI Foro de Estudios sobre Guerrero. 24 de noviembre de 2006. Acapulco, Guerrero.
14. Martínez-Madrigal F, Ortiz-Hidalgo C, Torres-Vega C, Álvarez L, Manzo-Montaña A, García-López L, Et al. Cambios regenerativos atípicos, displasia y carcinoma in situ en gastritis crónica asociada con *Helicobacter pylori*. Rev Gastroenterol Mex 2000; 65(1): 11-17.
15. Carmona-Sánchez R, Navarro-Cano G. La prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con esofagitis por reflujo gastroesofágico. Estudio de casos y controles. . Rev Gastroenterol Mex 2003; 65(1): 23-28.
16. Ocádiz-Delgado R, Sobrino-Cossío S, García-García L, Marroquín-Chavira A, Hernández-Mote R, Gariglio P. Relación entre la infección por *Helicobacter pylori* y el desarrollo de metaplasia en pacientes con gastritis crónica. Bioquímica 2005. 30(1): 13-22.
17. Oñate-Ocaña L F. Gastric cancer in Mexico. Gastric Cancer 2001; 4: 162–164.
18. González-Valencia G, Atherton J C, Muñoz O, Dehesa M, Madrazo-de la Garza, Torres J. *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes in Mexican adults and children. J I D 2000; 182: 1450-1454.
19. Morales-Espinosa R, Castillo-Rojas G, González-Valencia G, Et al. Colonization of Mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strains with different *VacA* and *CagA* genotypes. J Clin Microbiol 1999; 37(9): 3001-3004.
20. Garza-González E, Bosques-Padilla J, Tijerina Menchaca R, Perez-Perez G I: characterization of *Helicobacter pylori* isolates from the north-eastern region of Mexico. Clin Microbiol infect 2004; 10(1): 41-45.
21. Garza-González E, Pérez-Pérez G I, Tijerina-Menchaca R, Maldonado-Garza H J, Bosques-Padilla F J. Genotipos de *Helicobacter pylori* y su asociación con la respuesta inmune del hospedero. Rev Gastroenterol Mex 2002; 67(3): 155-160.



22. Smith M G, Hold GL, Tahara E, El-Omar E M. Cellular and molecular aspects of gastric cáncer. *World J Gastroenterol* 2006; 12(19): 2979-2990.
23. Olivares D, Gisbert J P. Factores implicados en la patogenia de la infección por *Helicobacter pylori*. *Rev Esp Enferm Dig* 2006; 98(5): 374-486.
24. Pérez-Pérez G I. ¿Es la asociación de *Helicobacter pylori* con los humanos un clásico ejemplo de parasitismo? *Rev Gastroenterol Mex* 2000; 65 (supl 2): 7-12.
25. Ahmed N, Sechi L A. *Helicobacter pylori* and gastroduodenal pathology: New threats of the old friend. *Ann Clin Microb Antimicrob* 2005; 4(1): 1-10.
26. Pinto-Santini D, Salama N R. The biology of *Helicobacter pylori* infection, a major risk factor for gastric adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(8): 1853-1858.
27. Blazer M J, Atherton J C. *Helicobacter pylori* persistence: Biology and disease. *J Clin Invest* 2004; 13(3): 321-323.
28. Montecucco C, de Bernard M. Immunosuppressive and proinflammatory activities of the *vacA* toxin of *Helicobacter pylori*. *J Exp Med* 2003; 198(12):1767–1771.
29. Cover L T, Blanke S R. *Helicobacter pylori vacA*, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol* 2005; 10: 2-14.
30. Ribeiro-de Gusmao V, Nogueira-Méndez E, De Magalhaes-Queiros D M, Aguiar-Rocha G, Camargos-Rocha A M, Ramadan-Ashour A A, *et al.* *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from children with and without duodenal ulcer in Brazil. *J Clin Microbiol* 2000; 38(8): 2853-2857.
31. Aviles-Jimenez F, Letley D P, Gonzales-Valencia G, Salama N, Torres J, Atherton J C. Evolution of the *Helicobacter* vacuolating citotoxin in a human stomach. *J Bacteriol* 2004; 186(15): 5182-5185.
32. Evans D G, Queiroz D M M, Mendes E N, Evans D J. *Helicobacter pylori* CagA status and s and m alleles of *vacA* in isolates from individuals with a variety of *Helicobacter pylori* associated gastric diseases. *J Clin Microbiol* 1998; 36(11): 3435–3437.
33. Hou P, Tu ZX, Xu GM, Gong YF, Ji XH, Li ZS. *Helicobacter pylori vacA* genotypes and *cagA* status and their relationship to associated diseases. *World J Gastroenterol* 2000; 6(4): 605-607.





34. Acuña R, Espinosa F, Sánchez R, Segura E, Waller A, Reyes G, et al. Prevalencia de *Helicobacter pylori*, su correlación con las principales patologías del tubo digestivo superior y la imagen endoscópica del antro. *Gastroenterol* 2001; 13(4): 181-189.
35. Dixon MF, Genta RM, Yardley HH, Correa P and the Participants in the International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 1.161-1.181.
36. Sheng-Ang H, Hoyle JA, Lewis FA, Secker AD, Cross D, Mapstone NP, et al. Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. *J Clin Microbiol* 1991.29(11): 2543-2549.
37. Martins LC, Oliveira –Corvelo TC, Demachki S, Araujo MTF, Assumpção MB, Araujo-Juca Vilar SC, et al. Clinical and pathological importance of *vacA* allele heterogeneity and *cagA* status in peptic ulcer disease in patients from North Brazil. *Mem Inst Oswaldo Rios* 2005, 100(8): 875-881.
38. Nimri LF, Matalka I, Bani-Hani K, Ibrahim M. *Helicobacter pylori* genotypes identified in gastric biopsy specimens from Jordanian patients. *BMC Gastroenterology* 2006; 6(27):1-6.
39. Araya OJC, Anabalon RL, Roa E I, Bravo EM, Villaseca HMA, Guzman GP, et al. Relacion de la genotipificación de *Helicobacter pylori* con la forma e intensidad de la gastritis en población adulta portadora de patología gástrica benigna. *Rev Med Chile* 2004;132: 1345-1354.
40. Ghose C, Perez-Perez GI, van Doorn LJ, Dominguez –Bello MG, Blaser MJ. High frequency of gastric colonization with multiple *Helicobacter pylori* strains in Venezuela subjects. *J Clin Microbiol* 2005; 43(6): 2635-2641.
41. Chin-lin P, Hwai-Jeng L, Wen-Ching L, Guan-Ying T, I-Chen S, Yueh-Hsing O. Genotypes of *Helicobacter pylori* in patients with peptic ulcer bleeding. *World J Gastroenterol* 2004; 10(4):602-605.
42. Nogueira C, Figueredo C, Carneiro F, Taveira-Gomes A, Barreira R, Figueira P, et al. *Helicobacter pylori* genotypes may determine gastric histopathology. *A J P* 2001; 158(2): 647-654.
43. Yamazaki S, Yamakawa A, Okuda T, Ohtani M, Suto H, Ito Y, et al. Distinct diversity of *vacA*, *cagA*, and *cagE* genes of *Helicobacter pylori* associated with peptic ulcer in Japan. *J Clin Microbiol* 2005; 43(8): 3906-3916.



44. Smith SI, Kirsch C, Oyedeji KS, Arigbabu AO, Coker AO, Bayerdoffer E, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori vaca*, *cagA* and *iceA* genotypes in Nigerian patients with duodenal ulcer disease. *J Med Microbiol* 2002; 51:851-854.
45. Miehke S, Meining A, Morgener A, Bayerdoffer E, Lehn N, Stolte M, et al. Frequency of *vaca* genotypes and cytotoxin activity in *Helicobacter pylori* associated with low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *J Clin Microbiol* 1998; 36(8): 2369-2370.
46. Gong YH, Wang Y, Yuan Y. Distribution of *Helicobacter pylori* in north China. *World J Gastroenterol* 2005; 11(23): 3523-3527.
47. Quiroga AJ, Cittelly DM, Bravo MM. Frecuencia de los genotipos *babA2*, *oipA* y *cagE* de *Helicobacter pylori* en pacientes colombianos con enfermedades gastroduodenales. *Biomedica* 2005; 25 : 325-334.
48. Asrat D, Nilsson I, Mengistu Y, Kassa E, Ashenafi S, Ayenew K, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori vaca* genotypes in Ethiopian dyspeptic patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42(6): 2682-2684.
49. Gold BD, van Doorn LJ, Guarner J, Owens M, Pierce-Smith D, Song Q, et al. Genotypic clinical, and demographic characteristic of children infected with *Helicobacter pylori*.