

INSTITUTO DE SERVICIOS DE SALUD PÚBLICA DEL ESTADO DE
BAJA CALIFORNIA (ISESALUD)



TRABAJO TERMINAL:

**“Detección mediante RCP punto final de los factores de virulencia
cagA y *vacA* de *Helicobacter pylori* en pacientes con dispepsia
en una población del Hospital General de Mexicali”**

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALIDAD EN
MEDICINA INTERNA

PRESENTA:

DRA. MARÍA DEL CARMEN ROSALES GUTIÉRREZ

TUTOR:

DR. JOSÉ MANUEL AVENDAÑO REYES

REGISTRO INTERINSTITUCIONAL DEL PROYECTO

02-01-HGMXL/MI-2015-10-19/114

MEXICALI, B.C. 7 DE DICIEMBRE DE 2015

INSTITUTO DE SERVICIOS DE SALUD PÚBLICA DEL ESTADO DE
BAJA CALIFORNIA (ISESALUD)

TRABAJO TERMINAL:

**“Detección mediante RCP punto final de los factores de virulencia
cagA y *vacA* de *Helicobacter pylori* en pacientes con dispepsia
en una población del Hospital General de Mexicali”**

AUTOR DEL TRABAJO:

DRA. MARÍA DEL CARMEN ROSALES GUTIÉRREZ

TUTOR:

DR. JOSÉ MANUEL AVENDAÑO REYES

MÉDICO INTERNISTA

HOSPITAL GENERAL DE MEXICALI

MEXICALI, B.C.

ASESOR:

Q.F.B. HECTOR MANUEL ACOSTA VALLE

PROFESOR E INVESTIGADOR

FACULTAD DE MEDICINA, UABC

MEXICALI, B.C.

ASESOR:

DRA. MARIA ELENA MARIN FREGOSO

MÉDICO PATÓLOGO

MEXICALI, B.C.

REGISTRO INTERINSTITUCIONAL DEL PROYECTO

02-01-HGMXL/MI-2015-10-19/114

MEXICALI, B.C. 7 DE DICIEMBRE DE 2015

UNIVERSAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI
COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



TRABAJO TERMINAL:

**“Detección mediante RCP punto final de los factores de virulencia
cagA y *vacA* de *Helicobacter pylori* en pacientes con dispepsia
en una población del Hospital General de Mexicali”**

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALIDAD EN

MEDICINA INTERNA

Presenta:

Dra. María del Carmen Rosales Gutiérrez

Tutor:

Dr. José Manuel Avendaño Reyes

REGISTRO INTERINSTITUCIONAL DEL PROYECTO

02-01-HGMXL/MI-2015-10-19/114

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA

7 DE DICIEMBRE DE 2015

FIRMAS

Dr. Caleb Cienfuegos Rascón
Director del Hospital General de Mexicali

MDU María Luisa González García.
Jefe del Departamento de Enseñanza e Investigación

Dr. José Alberto González Sarmiento
Jefe del Servicio de Medicina Interna

Dr. José Manuel Avendaño Reyes
Titular del Curso de Medicina Interna y
Asesor principal de la investigación

Dr. María del Carmen Rosales Gutiérrez
Sustentante del Examen para obtener el Diploma
de Especialidad en Medicina Interna

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, esposo e hijo.

A los pacientes, que permitieron su atención.

A mis maestros, que brindaron enseñanzas y consejo.

ÍNDICE

RESUMEN	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
3. ANTECEDENTES	16
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
5. JUSTIFICACIÓN	20
6. OBJETIVOS	21
7. HIPÓTESIS	21
8. METODOLOGÍA	22
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
10. ASPECTOS ÉTICOS, NORMATIVOS Y DE SEGURIDAD	29
11. RESULTADOS	30
12. DISCUSIÓN	38
13. CONCLUSIONES	42
14. REFERENCIAS	43
15. ANEXOS	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencias nucleotídicas utilizadas para la detección de <i>H. pylori</i> por medio de RCP punto final.	27
Tabla 2. Datos demográficos.	30
Tabla 3. Hallazgos endoscópicos de pacientes con dispepsia.	35
Tabla 4. Expresión de los factores de virulencia <i>cagA</i> y <i>vacA</i> en pacientes con dispepsia orgánica.	36
Tabla 5. Expresión de los factores de virulencia <i>cagA</i> y <i>vacA</i> en pacientes con dispepsia funcional.	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Helicobacter pylori</i> .	2
Figura 2. Detección del gen <i>ureA</i> en biopsia gástrica de pacientes con dispepsia.	31
Figura 3. Detección del gen <i>ureA</i> en biopsia gástrica de pacientes con dispepsia funcional.	31
Figura 4. Detección del gen <i>ureA</i> en biopsia gástrica de pacientes con dispepsia orgánica.	32
Figura 5. Detección del gen <i>cagA</i> en biopsia gástrica de pacientes con dispepsia infectados por <i>H. pylori</i> .	33
Figura 6. Detección del gen <i>vacA</i> en biopsia gástrica de pacientes con dispepsia infectados por <i>H. pylori</i> .	34
Figura 7. Clasificación de los pacientes con dispepsia orgánica infectados por <i>H. pylori</i> .	36

Figura 8. Detección del gen <i>cagA</i> en biopsia gástrica de pacientes con dispepsia orgánica.	37
Figura 9. Detección del gen <i>vacA</i> en biopsia gástrica de pacientes con dispepsia orgánica.	37
Figura 10. Detección de los genes <i>cagA</i> y <i>vacA</i> en biopsia gástrica de pacientes con dispepsia orgánica.	38
Figura 11. Detección del gen <i>cagA</i> en biopsia gástrica de pacientes con dispepsia funcional.	39
Figura 12. Detección del gen <i>vacA</i> en biopsia gástrica de pacientes con dispepsia funcional.	39
Figura 13. Detección de los genes <i>cagA</i> y <i>vacA</i> en biopsia gástrica de pacientes con dispepsia funcional.	40
Figura 14. Factores de virulencia según dispepsia	40

RESUMEN

Introducción: El *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es una bacteria gramnegativa de la que se tiene gran interés en la investigación por su causalidad en enfermedades digestivas. Se calcula que su prevalencia es de 70 a 90% en países en desarrollo y de 25 a 50% en países desarrollados. La bacteria es capaz de desencadenar las señales necesarias que culminan con la aparición de enfermedades por medio de sus factores de virulencia, de estos los más importantes hasta hoy estudiados son el gen asociado a la citotoxina (*cagA*) y el gen de la citotoxina vacuolizante (*vacA*).

Objetivo: Detectar mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) punto final, los factores de virulencia *cagA* y *vacA*, en pacientes con dispepsia no estudiada infectados por *H. pylori* en una población del Hospital General de Mexicali.

Materiales y métodos: Se incluyó un grupo de pacientes con dispepsia no estudiada diagnosticados durante el periodo de 11 de mayo del 2011 al 18 de mayo del 2012. Se les realizó endoscopia de tubo digestivo alto, y se obtuvo una muestra de tejido gástrico. Se utilizó la RCP punto final para determinar la presencia de la bacteria mediante la expresión del gen *ureA*, así como se determinó la expresión de los factores de virulencia *cagA* y *vacA*.

Resultados: La prevalencia de infección con *H. pylori* en pacientes con dispepsia fue del 89.83% (53/59) por medio de la RCP punto final para la detección del gen *ureA*. De estos pacientes el 64.15% (34/53) expresó el factor de virulencia *cagA* y el 66.04% (35/53) expresó el factor de virulencia *vacA*. Ambos factores se encontraron en el 47.17% (25/53) de los pacientes. En los hallazgos endoscópicos predominó la presencia de algún tipo de gastritis (28.8%) y de úlcera péptica (32.07%).

Conclusiones: El presente estudio aportó datos sobre la prevalencia de *H. pylori* detectada por medio de RCP punto final y la expresión de los factores de virulencia *cagA* y *vacA*. Nuestros resultados demuestran que más del 50% de los pacientes con infección por *H. pylori* expresan alguno de estos factores y que casi un 50% expresaron ambos factores. Esta expresión es menor a la de otros países en vías de desarrollo. Los datos resultantes de este trabajo, además de ser los primeros comunicados para nuestra región, adquieren relevancia adicional por aportar datos de interés en la epidemiología de la infección por *H. pylori*.

1. INTRODUCCIÓN

El *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es una bacteria gramnegativa, microaerofílica, en forma de espiral descubierta a principios de la década de los 80's en la mucosa gástrica de humanos.

Desde entonces ha existido gran interés en la investigación de su participación en la patogénesis de distintas enfermedades digestivas.

Tiene una alta prevalencia a nivel mundial; se calcula que más del 50 % de la población cursa con una infección a causa de este microorganismo.

Actualmente es indiscutible que *H. pylori* representa un factor etiopatogénico en la dispepsia, gastritis, enfermedad ulcerosa péptica, procesos linfoproliferativos e incluso adenocarcinoma gástrico.

Existen numerosas técnicas para su identificación, entre las menos invasivas tenemos a la: serología, prueba de aliento de la ureasa y antígeno en materia fecal; no obstante, la biopsia de mucosa gástrica obtenida por esofagogastroduodenoscopia (EGD) es requerida en muchas ocasiones para comprobar el diagnóstico.

Con el advenimiento de la biología molecular, se diseñaron técnicas moleculares para detectar a la bacteria. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) surgió como una opción novedosa y confiable para identificar el *H. pylori* en la mucosa gástrica.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Características del *Helicobacter pylori*

El *H. pylori* es una bacteria gram negativa, curva, espiriforme, muy móvil, no fermentadora, no oxidante que mide de 2.5 a 4 micras de longitud por 0.5 a 1 micra de ancho. Tiene un grupo de 4 a 8 flagelos envainados en uno de sus extremos que le dan gran movilidad. Su forma es de espiral (figura 1) y se encuentra en la capa mucosa o adherida al epitelio de la mucosa gástrica^{1,2}.

Comparte características estructurales con las bacterias gramnegativas, como son la presencia de una membrana plasmática y una membrana externa; su composición interna se caracteriza por un complejo constituido por elementos fibrilares nucleares y ribosomas, que se entremezclan entre sí, la vaina de sus flagelos tiene una estructura lipídica igual a la de la membrana externa, que se encarga de proteger a los flagelos de la degradación del ácido³.

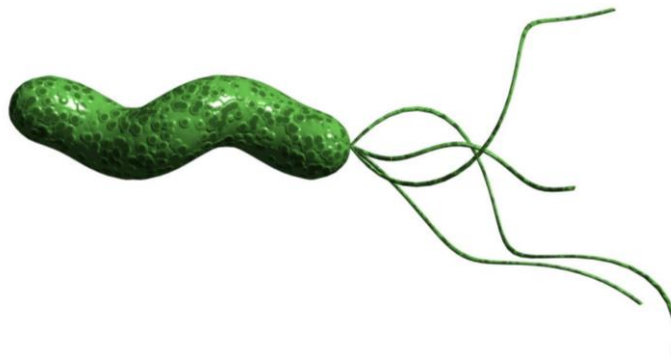


Figura 1. *Helicobacter pylori*.

2.2 Epidemiología

La infección por *H. pylori* genera un importante problema de salud pública; difiere en países desarrollados, los cuales tienen prevalencias del 5 al 10 %, en comparación con países en vías de desarrollo con cifras que alcanzan hasta el 90 %, (países de África y de Latinoamérica, incluido México). Los factores que influyen en esta diferencia son el nivel socioeconómico y el estado ambiental^{3,4}.

Es considerada la infección bacteriana crónica más común en el mundo, -no es microbiota habitual-, su presencia siempre produce una respuesta inflamatoria.

De hecho la presencia de *H. pylori* en personas sanas es un aspecto intrigante: la prevalencia ha sido descrita hasta en 40% de personas asintomáticas, no obstante menos de un 5% tienen una histología normal.

En los países desarrollados la incidencia de la infección por *H. pylori* aumenta con la edad, - raramente se presenta antes de los veinte años-, mientras que en los países en vías de desarrollo la incidencia en niños de diez años es más del 50%.

El único huésped del *H. pylori*, es el hombre y si bien se ha encontrado en otros mamíferos, únicamente en los monos Rhesus se ha asociado la gastritis.

El *H. pylori* causa más de 90% de las úlceras duodenales y hasta el 50% de las úlceras gástricas^{3,4}.

Décadas pasadas, los alimentos, la acidez gástrica y el estilo de vida se consideraban las causas principales de la enfermedad ulcerosa péptica. Los pacientes requerían a largo plazo dosis altas de medicamentos para reducir la sintomatología dispéptica y daño a la mucosa gástrica como consecuencia de la acidez, estos fármacos como los bloqueadores H₂ no generaban una oportunidad para la cura permanente. Ahora se sabe que la gran mayoría de estas lesiones son causadas por *H. pylori*; los regímenes antibióticos apropiados pueden erradicar la infección con éxito en la mayoría de los pacientes, con resolución completa de la inflamación de la mucosa y una oportunidad mínima para la recurrencia de las úlceras.

2.3 Factores de virulencia de *H. pylori*

El desenlace de la enfermedad depende de factores ambientales, del huésped y de la bacteria. Dentro de las características atribuidas al microorganismo se han descrito varios factores de virulencia los cuales le permiten colonizar la mucosa gástrica, sobrevivir en el ambiente ácido del estómago y evadir la respuesta inmune.

La bacteria por si misma origina una fuerte respuesta inmune, humoral y celular en la mucosa gástrica; aunque con esto no se consigue eliminar la infección y por el contrario se producen daños en el epitelio gástrico. Tras la colonización, *H. pylori* libera sustancias tóxicas que estimulan la respuesta inmunológica local en la que fundamentalmente participan los neutrófilos⁵.

Después se produce una amplificación de la respuesta inflamatoria por la interacción de linfocitos, neutrófilos, macrófagos, células mastoides y células no inmunes que liberan gran cantidad de mediadores químicos.

La úlcera péptica, el adenocarcinoma y el linfoma gástrico son complicaciones de esta inflamación crónica^{6, 7, 8}.

Los factores de virulencia de *H. pylori* bien pueden ser divididos en tres grupos:

1. Factores de virulencia que contribuyen a la colonización de la mucosa gástrica.
2. Factores de virulencia que contribuyen al daño de la mucosa gástrica.
3. Otros factores.

2.3.1 Factores de virulencia que contribuyen a la colonización de la mucosa gástrica

H. pylori posee factores de virulencia que le permiten la colonización del epitelio superficial, la profundidad de las criptas y el espacio entre las células epiteliales.

El principal de estos factores es la ureasa. La ureasa es una metaloenzima que cataliza la hidrólisis de la urea presente en el estómago en amonio y dióxido de carbono. El amonio (NH_4^+) producido aumenta el pH elevándolo hasta 6-7 en su entorno. Con este mecanismo se acumula una gran cantidad de ureasa en el citoplasma, en el espacio periplásmico y en la superficie de la bacteria. De este modo la bacteria puede alcanzar la superficie de las células de la mucosa, donde el pH es prácticamente neutro.

La ureasa se regula ya que un aumento excesivo de la alcalinidad debida al NH_4^+ producido mataría a la bacteria. La regulación se produce mediante un transportador dependiente de pH. El transportador UreI permite la entrada de urea pero una vez que el pH alcanza el valor de 6-7, se inactiva.

El NH_4^+ liberado va a producir una serie de daños que afectan a la microcirculación y a las células epiteliales superficiales.

Origina necrosis del tejido profundo; colabora en el desarrollo de gastritis atrófica crónica humana y facilita el incremento de infecciones virales y la carcinogénesis.

Otros factores que contribuyen a la colonización de la mucosa gástrica son: los sistemas antioxidantes, sus flagelos y las adhesinas.

2.3.2 Factores de virulencia que contribuyen al daño de la mucosa gástrica.

- Gen asociado a la citotoxina (*cagA*)

La presencia del gen *cagA* se asocia con gastritis severa, la atrofia de la mucosa, enfermedad ulcerosa y cáncer gástrico.

El gen *cagA* codifica para una proteína de un peso molecular entre 120 a 140 kilodaltons (kDa) que se considera altamente inmunogénica⁹. Forma parte de la isla de patogenicidad Cag (*cagPAI*). Las islas de patogenicidad son segmentos de ADN que contienen más de un gen de virulencia con la peculiaridad de que una simple delección lleva a la pérdida de al menos dos genes de virulencia con segmentos de ADN de más de 30 Kb. Tienen un papel fundamental en la contribución a la virulencia de las bacterias patógenas que los contienen y en el desarrollo de la enfermedad.

En el caso de la isla de patogenicidad de *H. pylori* (*cagPAI*), tiene un tamaño de 37 a 40 kb y está flanqueada por secuencias repetidas directas de 31 pb. Su contenido G + C es del 35% en contraste con el 39% del cuerpo del genoma^{9,10}. Como muchos genes de virulencia los genes de la *cagPAI* no se expresan constitutivamente, sino que responden a señales ambientales. Están reguladas por complejos mecanismos que pueden activarse o no dependiendo de condiciones microambientales como el nivel de oxígeno, la osmolaridad, la fase de crecimiento bacteriano, el pH, presencia o no de ácidos grasos volátiles de cadena corta.

La detección del estado *cagA* se puede realizar de forma directa mediante la realización de RCP al ADN de la cepa a estudiar o de forma indirecta, mediante serología. Mediante la RCP se puede detectar el gen *cagA*, que es un marcador de la isla de patogenicidad.

La mayoría de estudios moleculares han determinado el estatus *cagA* mediante la presencia o ausencia con cebadores específicos o sondas para este gen.

Uno de los factores de virulencia más estudiados y codificados dentro del islote de patogenicidad es el gen *cagA* y su proteína CagA. Las cepas de *H. pylori* capaces de codificar para esta proteína se han denominado cepas CagA positivas; el gen se ha encontrado presente en aproximadamente el 70% de pacientes infectados con el microorganismo⁹.

- *Gen asociado a la citotoxina vacuolizante (vacA)*

La proteína VacA es una toxina codificada por el gen *vacA*, que induce vacuolización en las células epiteliales, la muerte celular y la destrucción de la integridad epitelial. Posee una estructura hexamérica y se ensambla en la bicapa lipídica celular del hospedador formando un canal selectivo de aniones. Produce un gradiente de pH que atrae sustancias alcalinas al interior haciendo que se capte agua por ósmosis, lo que origina una vacuolización alrededor del núcleo y más tarde el estallido y muerte celular^{9, 10}. En el citosol, interfiere con el tráfico vesicular de los lisosomas. Es producida por aproximadamente el 90% de las cepas de *H. pylori*. La infección por cepas que producen la toxina es más frecuente en pacientes con úlcera péptica y cáncer gástrico que en pacientes que sólo padecen gastritis¹¹.

VacA puede llevar a la muerte programada, de forma independiente a la vacuolización. La presencia de *vacA* puede inducir la expresión de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y provocar el desarrollo de procesos cancerígenos.

2.3.3 Otros factores de virulencia.

Entre otros factores patogénicos de la bacteria se encuentran los lipopolisacáridos y las proteínas Tip- α . Estas últimas tienen una potente actividad carcinogénica a través de la inducción de TNF- α y la activación de NF- κ B.

2.4 Dispepsia

El término dispepsia deriva del griego δυσπεψία ("δυσ" dis = dificultad y "πέψη" pepsia = digestión) que significa "difícil digestión". Es una entidad que se caracteriza por una heterogénea relación de signos y síntomas atribuibles al tracto gastrointestinal superior, que habitualmente incluye alguno de los siguientes: dolor o malestar centrado en el abdomen superior, quemazón epigástrica, plenitud postprandial y saciedad precoz.

Supone un problema de salud pública muy importante, con considerables repercusiones personales, laborales, sanitarias, económicas y sociales. Afecta a un gran número de personas de la población general, es una causa frecuente de ausentismo laboral y provoca gastos directos e indirectos enormes.

En los últimos 25 años ha presentado más de 20 definiciones: desde una definición clínica, hasta definiciones fisiopatológicas y endoscópicas. Con el objetivo de unificar conceptos, en la última década se ha mantenido la definición de dispepsia en base a criterios clínicos de acuerdo al consenso de Roma III (2006).

2.4.1 Criterios de Roma III para diagnóstico de dispepsia funcional

Criterios diagnósticos*. Debe incluir¹¹:

1. Uno o más de los siguientes:
 - a. Llenura postprandial que incomoda
 - b. Saciedad temprana
 - c. Dolor epigástrico
 - d. Quemazón epigástrica y,
2. Excluir cualquier evidencia de enfermedad estructural

* Criterios que se cumplan en los últimos 3 meses con inicio de las molestias al menos 6 meses antes del diagnóstico.

A su vez, se divide en subgrupos:

I. Síndrome de distrés postprandial¹¹:

Criterios diagnósticos*. Debe incluir uno o ambos de los siguientes:

1. Llenura postprandial que incomoda, que ocurre después de una comida de tamaño regular, que ocurre al menos varias veces a la semana.
2. Saciación temprana que evita finalizar una comida regular, al menos varias veces por semana.

* Criterios que se cumplan en los últimos 3 meses con inicio de las molestias al menos 6 meses antes del diagnóstico.

Criterios de soporte:

1. Balonamiento abdominal alto o náusea postprandial o eructos excesivos pueden estar presentes.
2. El síndrome de dolor epigástrico puede coexistir.

II. Síndrome de dolor epigástrico¹¹:

Criterios diagnósticos*. Debe incluir todo lo siguiente:

1. Dolor o quemazón localizado en el epigastrio de al menos una severidad moderada, al menos una vez a la semana.
2. El dolor es intermitente.
3. No es generalizado o localizado en otra región abdominal o torácica.
4. No calma con la defecación o eliminación de flatos.
5. No llena los criterios para desordenes de la vesícula biliar o el esfínter de Oddi.

* Criterios que se cumplan en los últimos 3 meses con inicio de las molestias al menos 6 meses antes del diagnóstico.

Criterios de soporte:

1. El dolor puede ser tipo quemazón, pero sin componente retroesternal.
2. El dolor comúnmente es inducido o aliviado por la ingesta de una comida, pero puede ocurrir en ayunas.
3. El síndrome de distrés postprandial puede coexistir.

2.5 Enfermedades digestivas asociadas a *H. pylori*

Cuando *H. pylori* coloniza la mucosa gástrica humana produce una gastritis superficial que puede permanecer así durante el resto de la vida o bien, al cabo de años desarrollar una úlcera péptica o una gastritis atrófica que podría ser el primer paso para la evolución a cáncer gástrico. Todavía no se conoce claramente por qué en unos pacientes la enfermedad es casi asintomática mientras que en otros se producen enfermedades digestivas de diferente gravedad. Parece que algunos factores genéticos, ambientales o los factores de patogenicidad de la propia bacteria pueden tener su efecto en el desarrollo de la enfermedad.

- **Gastritis:** la gastritis que se origina después de la infección por *H. pylori* puede desarrollarse sin manifestaciones o bien originar la expresión clínica propia de gastritis aguda (dolor epigástrico, náuseas y vómitos). La gastritis crónica se caracteriza por infiltración inflamatoria crónica, constituida por linfocitos y células plasmáticas, con presencia de folículos linfoides y un grado variable de actividad. La gastritis crónica por *H.pylori* es un proceso dinámico que evoluciona hacia la atrofia que afecta al antro y se extiende en dirección al cuerpo.

La colonización permanente de la mucosa gastroduodenal por *H. pylori* va a causar una inflamación con un infiltrado mixto en el que predominan los leucocitos polimorfonucleares, pero también con linfocitos y células plasmáticas, dando lugar a lo que se denomina gastritis crónica activa, como ya hemos dicho. Una de las características de este infiltrado en la edad pediátrica es la mayor presencia de linfocitos y células plasmáticas y una afectación más leve que la que tiene lugar en el adulto, por lo que se denomina gastritis crónica superficial activa.

La bacteria puede ser identificada en biopsias gástricas mediante tinción de Giemsa y en presencia de mucha cantidad de bacterias incluso con hematoxilina-eosina.

Después de la erradicación del microorganismo, la gastritis histológica mejora lentamente pero no desaparece totalmente hasta seis meses o un año después de la finalización del tratamiento.

- **Úlcera péptica:** la asociación de *H. pylori* con la úlcera duodenal es clara, ya que un 90-95% de los pacientes presentan el microorganismo y se curan en su gran mayoría al erradicar la bacteria. Con respecto a la úlcera gástrica, también existe una clara relación, aunque sólo un 70% de este tipo de úlceras está asociada a la presencia de *H. pylori*, el resto se asocian al consumo de antiinflamatorios no esteroideos. La úlcera gástrica o duodenal relacionada con la infección por *H. pylori* es muy poco frecuente en la edad pediátrica respecto a lo que ocurre en el adulto¹².

- **Cáncer gástrico:** la infección por *H. pylori* origina una gastritis superficial y si se continua puede aparecer atrofia, que es una condición precancerosa. En 1994, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer de la Organización Mundial de la Salud incluyó a *H. pylori* como agente biológico carcinogénico para el hombre (categoría 1) basándose en evidencias epidemiológicas que le asocian con cáncergástrico¹³.

- **Linfoma gástrico tipo MALT:** el 90% de los pacientes con linfoma MALT son positivos para *H. pylori*. Este tipo de linfoma se localiza preferentemente en el antro del estómago, dado que es la zona donde existe más tejido linfoide. Además, varios estudios apoyan la asociación de *H. pylori* con esta enfermedad puesto que tras la erradicación de la bacteria se ha observado la regresión del linfoma de bajo grado.

2.6 Métodos diagnósticos para la detección de la infección por *H. pylori*.

La infección por *H. pylori* puede diagnosticarse mediante métodos invasivos o no invasivos. En los primeros se requiere realización de endoscopia con toma de biopsia gástrica mientras que los segundos la omiten.

Un método diagnóstico ideal sería uno no invasivo, económico, seguro, disponible en todos los centros y que fuera capaz de diferenciar infección activa de una adquirida anteriormente. Ninguno de los métodos que existen en la actualidad cumple con todas estas características. Los métodos existentes presentan ventajas y ciertos inconvenientes.

Sin embargo, con el advenimiento de técnicas de biología molecular, como es la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa se ha abierto una nueva etapa de diagnóstico, denominado diagnóstico molecular. Dada la gran especificidad y sensibilidad de la técnica de RCP, es una herramienta esperanzadora de gran utilidad en los microorganismos de difícil cultivo como es el caso del *H. pylori*.

Métodos invasivos

La endoscopia con toma de biopsia para el estudio histológico permitirá diagnosticar la infección mediante el cultivo de dicha biopsia, así como dará a conocer la sensibilidad a los antimicrobianos.

El cultivo es considerado por algunos como el método de referencia para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*; sin embargo, la demostración de la infección para *H. pylori* en cultivo, muestra un amplio rango de sensibilidad. El espectro de los datos publicados es muy variable. Algunos informan sensibilidad baja, otros sensibilidad mayor de 90%, lo cual depende de los diversos factores que influyen la obtención de cultivos positivos para *H. pylori*. Es probable que a estos factores se deba la presencia de falsos positivos en este método diagnóstico.

Cabe destacar además que es un método lento de diagnóstico que puede demorarse varios días y que la sensibilidad de la técnica depende de la experiencia en su cultivo y de que la toma y el transporte se realicen en las condiciones adecuadas. La identificación se realiza mediante visión en fresco con un microscopio de contraste de fases para ver a morfología o bien mediante tinción de Gram. Las pruebas positivas de catalasa, ureasa y oxidasa confirman la identificación. La muestra más habitual para el cultivo es una biopsia a partir de mucosa gástrica.

- **Examen histopatológico.** El estudio histológico de la biopsia permite conocer las lesiones de la mucosa además de detectar la infección por *H. pylori*.

La confirmación histológica de la inflamación de la mucosa es fundamental para el diagnóstico de la gastritis y su clasificación. Además, permite detectar zonas de metaplasia intestinal. La técnica de tinción es fácil, rápida, de bajo coste y de alta utilidad¹⁴.

Se han utilizado diferentes tinciones como la de Gram, Giemsa, Carbolfuchina, Genta o tinciones inmunohistoquímicas. La visión microscópica tiene una sensibilidad y especificidad menor que la del cultivo.

- **Prueba de la ureasa.** Esta prueba permite detectar la presencia de la descomposición de la urea en anhídrido carbónico y amoníaco. La prueba de la ureasa rápida se puede realizar directamente con la muestra de biopsia gástrica. Existen diferentes reactivos comerciales que contienen urea a diferentes concentraciones y un indicador de pH. Los resultados de sensibilidad y especificidad son en general superiores al 80% y 90%.

- **Reacción en cadena de la polimerasa en el diagnóstico de *H. pylori*.**

La reacción en cadena de la polimerasa (RCP) es una técnica biotecnológica que tiene como fin el amplificar o reproducir *in vitro* un número de copias de una región específica de ADN, con la finalidad de reproducir cantidad suficiente de un fragmento para su evaluación.

Su aplicación es un campo muy extenso, que incluye no solo a la biología molecular, sino también a la biotecnología, la genética, la epidemiología, las ciencias forestales, las ciencias forenses, la microbiología, el diagnóstico de enfermedades infecciosas¹⁵.

Tiene una alta especificidad y sensibilidad por lo que su expansión para el diagnóstico de virus, parásitos y bacterias de difícil cultivo es muy llamativa. De esta manera ofrece un diagnóstico confiable, con mayor rapidez, y menor trabajo en comparación a realizar cultivos.

Entre otras ventajas se puede mencionar que la secuencia específica de interés no necesita estar aislada del genoma, sino que al realizar su reproducción, se puede separar del resto del ADN por medio de electroforesis en geles de agarosa, además la cantidad de material que se requiere para el inicio de la reacción es muy pequeña¹⁵.

La RCP requiere para su realización lo siguiente: 2 oligonucleótidos sintéticos o cebadores (*primers*), complementarios a la región de interés; una enzima termoestable, Taq polimerasa, proveniente de la bacteria *Thermusaquaticus* y 4 desoxiribonucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)¹⁵.

De esta manera se obtiene una duplicación exponencial de la secuencia de interés por medio de 3 pasos fundamentales en un proceso cíclico; es decir, cada ciclo consta de un proceso de desnaturalización (95°C) que permite la apertura de las dobles cadenas; luego viene seguido por un proceso de anillamiento (40-65°C), que consiste en la unión o el apareamiento de los oligonucleótidos o cebadores que se encuentran en la mezcla de reacción con los extremos 3' de la secuencia específica del ADN, formando una unión ayudada por enlaces iónicos; en donde la enzima Taq-polimerasa se pueda unir y comenzar en presencia de los 4 nucleótidos trifosfatos con la tercera etapa que es la fase de síntesis (72°C), la cual se refiere al copiado del templado que se van uniéndose por enlaces iónicos dando como resultado una nueva molécula del fragmento de ADN de interés.

Dada la gran especificidad y sensibilidad de la técnica de RCP se ha abierto una nueva etapa de diagnóstico, denominado diagnóstico molecular; de gran utilidad en los microorganismos de difícil cultivo como es el caso del *H. pylori*.

El diagnóstico por RCP de *H. pylori* tiene una sensibilidad y especificidad de 95 %, de hecho algunos estudios la encuentran igual de sensible que el cultivo a partir de biopsia gástrica. Actualmente se está utilizando la RCP a tiempo real que además permite la detección de cepas resistentes a antibióticos¹⁵.

La especificidad de esta técnica viene dada por el uso de oligonucleótidos sintéticos, específicos para determinado gen y que facilitan la amplificación de una secuencia nucleotídica, que a su vez es específica para el *H. pylori*; es por esta razón que en los últimos años se ha diseñado una variedad de pruebas diagnósticas para esta bacteria por medio de RCP basándose en oligonucleótidos provenientes del gen de la ureasa A (*ureA*), oligonucleótidos provenientes de los genes que codifican el ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) oligonucleótidos provenientes del gen de la fosfoglucosa mutasa (*glmM*).

En los últimos años, la determinación del ADN de *H. pylori* a través de RCP también se ha estudiado en otras muestras como heces, saliva o agua. La mayoría de las técnicas se basan en la RCP, tanto punto final como en tiempo real.

Métodos no invasivos.

Entre los métodos no invasivos tenemos a los siguientes:

- **Serología:** los métodos serológicos se basan en la detección de anticuerpos específicos frente a *H. pylori* en suero. La serología es útil en los estudios de poblaciones seleccionadas, sin embargo, su principal problema radica en que no puede diferenciar la infección activa de la exposición previa al microorganismo.

H. pylori provoca una respuesta inmunitaria, tanto local como sistémica. El sistema inmune responde con un aumento transitorio de IgM, seguido de un aumento de anticuerpos de los tipos IgG e IgA que persisten durante la infección.

Puesto que los anticuerpos IgM se detectan sólo transitoriamente, tienen poco valor para el diagnóstico. La principal respuesta sistémica es de tipo IgG por lo que la detección de estos anticuerpos es la más utilizada para el diagnóstico.

La detección de anticuerpos específicos contra algunas proteínas del microorganismo, como CagA y VacA tiene especial interés en estudios sobre virulencia.

- **Detección de anticuerpos en saliva:** aunque debido a la comodidad de la obtención de la muestra se ha esperado mucho de esta técnica, los datos de sensibilidad obtenidos, no permiten ser optimistas respecto a su implementación.

- **Prueba del aliento,** es el método indirecto para detectar la ureasa de *H. pylori*. Si *H. pylori* se encuentra en el estómago va a hidrolizar la urea ingerida previamente y se va a liberar CO₂ marcado que se absorbe, difunde a sangre, es transportado a los pulmones y es liberado con el aliento.

Se considera uno de los métodos no invasivos más seguros para detectar *H. pylori*. La prueba del aliento indica una infección actual por la bacteria, ya que en una infección pasada el resultado sería negativo. Por esto es útil como seguimiento del tratamiento realizado 4 a 6 semanas después de finalizado.

- **Antígeno en heces:** es un método directo no invasivo que permite la detección de antígeno de *H. pylori* en muestras de heces.

Existen varios sistemas comerciales que permiten detectar la presencia de antígeno en heces con anticuerpos policlonales o monoclonales. Se ha descrito como válida para establecer el diagnóstico inicial, verificar la eficacia del tratamiento en las cuatro o seis semanas posteriores a su realización y comprobar la reaparición de una infección.

3. ANTECEDENTES

Diversos trabajos fueron conducidos anteriormente para determinar la infección de *H. pylori* y sus factores de virulencia por medio de biología molecular.

Se realizó un estudio en Argentina donde se midió la expresión de los genes *hsp60* y *cagA*. En este estudio se definió que el paciente tenía infección por *H. pylori* al estar presente el gen *hsp60*. Sobre el total de muestras procesadas, se obtuvieron resultados positivos en un 81 % (39/48). Se obtuvo una gran concordancia al evaluar la detección de *H. pylori* por RCP y por el estudio histológico: todas las muestras positivas por RCP también lo fueron por coloraciones histológicas¹⁶. Los porcentajes de positividad mencionados fueron similares a los encontrados por otros autores al analizar muestras de pacientes sintomáticos, tanto en América Latina como en el exterior. Los autores concluyeron que la amplificación de secuencias de *hsp60* podría ser una alternativa diagnóstica eficiente para detectar *H. pylori*, tanto en muestras de biopsia gástrica como en estudios no invasivos, utilizando saliva o heces. En una segunda etapa, a partir del ADN obtenido de 22 de las muestras que fueron positivas para *H. pylori* del gen *hsp60*, se investigó la presencia del gen *cagA*. Se encontró que 15/22 de estas presentaron el genotipo *cagA*¹⁶.

Moncayo y colaboradores, estudiaron a 73 pacientes, 19 (26%) fueron hombres y 54 (74%) mujeres, con edades entre 13 y 84 años; casi todos los pacientes (30.1%) se ubicaron en un rango de edad entre 31 y 40 años. El estudio endoscópico reveló que 70 pacientes presentaban algún tipo de gastritis (95.9%), de los cuales sólo 40 tenían gastritis y los otros 30 presentaban gastritis asociada con otra enfermedad gastroduodenal. De los 70 pacientes con gastritis 68 fueron *H. pylori* positivos. La combinación de los resultados de las dos biopsias mostró que 94.5% de los pacientes tenían *H. pylori*. Los resultados en la RCP-*ureC* de biopsia antral estableció que 86.3% de los pacientes tenían la bacteria¹⁷.

En el 2012, en pacientes de Venezuela se evaluó la infección por *H. pylori* en diferentes muestras del tracto digestivo superior de pacientes dispépticos, mediante la detección por RCP de genes esenciales (*glmM* y *ureA*) y de virulencia (*cagA*)¹⁸.

De los 104 pacientes estudiados, *H. pylori* fue encontrado en 53.8, 69.2 y 58.7% de las muestras de jugo gástrico, biopsias gástricas y esofágicas, respectivamente, con una predominancia de cepas *cagA*+ en jugo y biopsias gástricas. La detección de *H. pylori* en jugo gástrico y biopsias esofágicas mostró una alta sensibilidad y especificidad en relación a la detección en biopsias gástricas, lo cual sugiere que ambos tipos de muestras pueden ser utilizados eficazmente para un diagnóstico seguro de la infección por *H. pylori*¹⁸.

Bosques Padilla y colaboradores, estudiaron a 231 pacientes sintomáticos en el noreste de México, a los cuales se les realizó endoscopia gastrointestinal. La prevalencia de *H. pylori* fue de 67.8% determinado por histología, prueba de la ureasa, cultivo o serología. De 177 pacientes infectados por *H. pylori*, 90 (50.8%) fueron positivos al antígeno CagA. *H. pylori* CagA + fue encontrado en 77.8% de personas con úlcera péptica y en 43.2% de enfermos con dispepsia funcional. Sin embargo, no se encontró asociación de estos pacientes con cáncer gástrico¹⁹.

En el 2004, el mismo autor junto con Garza González, determinó genotipos *vacA* y *cagA* por medio de RCP y correlacionó estos genotipos con diferentes resultados clínicos. No se encontró asociación entre *vacA* y *cagA* con las patologías estudiadas, entre las que se mencionan, enfermedad ulcerosa péptica y dispepsia funcional²⁰.

En el 2011, Avendaño y colaboradores, realizaron en la población de Mexicali, B.C, un estudio para evaluar la prevalencia de anticuerpos IgG anti-CagA y anti-VacA en suero mediante ELISA en pacientes con dispepsia e infección por *H. pylori* y determinaron, además, su asociación con úlcera gástrica, úlcera duodenal y neoplasia gástrica. Se incluyeron un total de 41 pacientes con dispepsia y Clo-test positivo. El 68.3% correspondió a pacientes del sexo femenino; con edades entre 21 y 81 años. Un total de 8 pacientes (19.5%) resultaron con procedimiento endoscópico normal; 3 pacientes resultaron con úlcera duodenal (7.3%) y 4 más con úlcera gástrica; 21 (51% de los pacientes) resultaron con algún tipo de gastritis; los 5 pacientes restantes manifestaron hallazgos endoscópicos compatibles con hernia hiatal, várices esofágicas y hemorragias subepiteliales²¹.

En total, se obtuvieron tres pacientes VacA positivo sin hallazgos endoscópicos de úlcera o neoplasia. Un paciente CagA positivo sin hallazgos endoscópicos de úlcera o neoplasia. En cuanto a la correlación entre niveles de anticuerpos Anti CagA y Anti VacA y hallazgos histopatológicos, de los tres pacientes con resultado positivo de títulos Anti VacA y endoscopia sin úlcera o neoplasia, se reportaron como hallazgos histopatológicos gastritis crónica y en un paciente CagA positivo sin evidencia endoscópica de úlcera o neoplasia, el hallazgo fue gastritis crónica²¹.

Este estudio sugirió que la probabilidad de tener úlcera gástrica, duodenal o neoplasia con títulos positivos de anticuerpos contra las proteínas VacA y CagA del *H. pylori* en la población atendida en el Hospital General de Mexicali por dispepsia no estudiada es prácticamente nula²¹.

En Etiopía, un país en vías de desarrollo, se realizó un estudio donde se incluyeron 273 pacientes con infección con *H. pylori* determinado por biopsia gástrica, se detectó el gen *cagA* en el 79 % de los pacientes, y el gen *vacA* en el 90 %, dando con la anterior una de las más altas prevalencias de estos factores de virulencia a nivel mundial. La correlación histopatológica de los genotipos *cagA* y *vacA* mostró que estas cepas fueron detectadas en un mayor grado con gastritis crónica y con otras patologías²².

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La infección por *H. pylori* genera un importante problema de salud pública, sobre todo en países en vías de desarrollo. A nivel mundial se calcula que más del 50 % de la población cursa con una infección a causa de este microorganismo.

En México su prevalencia se estima es mayor al 70 %.

Su participación causal de *H. pylori* en la dispepsia, gastritis, enfermedad ulcerosa y cáncer gástrico, es actualmente indiscutible.

Los dos factores de virulencia más importantes producidos por la bacteria son los productos codificados por los genes *cagA* y *vacA*.

El determinar que pacientes con dispepsia expresan estos genes sería crucial para poder orientar el pronóstico de cada caso.

Por lo anterior consideramos que es importante estudiar a pacientes que cursan con dispepsia y determinar si además de cursar con la infección por *H. pylori* se encuentran expresando los genes *cagA* y *vacA*.

4.1. Pregunta de Investigación

¿Cuál es la prevalencia de los factores de virulencia *cagA* y *vacA* en pacientes con dispepsia orgánica y funcional que acuden al Hospital General de Mexicali?

5. JUSTIFICACIÓN

La literatura menciona que la expresión de los genes *cagA* y *vacA*, está asociada con enfermedad más severa, por ejemplo úlcera duodenal, úlcera gástrica o neoplasia. Sin embargo, esta asociación varía entre las regiones geográficas y grupos étnicos. En nuestro país, la prevalencia de infección por *H. pylori* en la población general es muy importante (más del 80 % en mayores de 40 años).

Si se demuestra que los pacientes con dispepsia no estudiada que acuden al Hospital General de Mexicali, expresan los factores de virulencia *cagA* y *vacA*, podríamos tener una idea más precisa del pronóstico esperado para estos pacientes.

Por otra parte, es importante investigar si los resultados previos son correctos o reales ya que se encontró una baja prevalencia de factores de virulencia medidos por serología, encontrándose solo 3 pacientes *VacA* positivo sin hallazgos endoscópicos de úlcera o neoplasia y un paciente *CagA* positivo sin hallazgos endoscópicos de úlcera o neoplasia. Al comparar el promedio entre grupos no se encontró diferencia estadísticamente significativa.

Por lo tanto, se justifica realizar este estudio con otra técnica (RCP) para medir los factores de virulencia.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Detectar mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) punto final los factores de virulencia *cagA* y *vacA* en pacientes con dispepsia orgánica y funcional infectados por *H. pylori* en una población del Hospital General de Mexicali.

6.2. Objetivos específicos

- Determinación de la infección de *H. pylori* en pacientes con dispepsia orgánica y funcional.
- Determinar la presencia del gen *cagA* en pacientes con dispepsia orgánica y funcional infectados por *H. pylori*.
- Determinar la presencia del gen *vacA* en pacientes con dispepsia orgánica y funcional infectados por *H. pylori*.
- Determinar si existe diferencia de la expresión de los genes *cagA* y *vacA* en pacientes con dispepsia orgánica y dispepsia funcional.
- Determinar las características demográficas de los pacientes con dispepsia orgánica y funcional.

7. HIPÓTESIS

7.1. Hipótesis Descriptiva

La presencia de los factores de virulencia *cagA* y *vacA* determinados por RCP punto final en pacientes con dispepsia orgánica y funcional en el Hospital General de Mexicali es menor a la prevalencia en otros países en vías de desarrollo (79-90%).

8. METODOLOGÍA

8.1 Diseño del estudio

El presente trabajo es un estudio descriptivo, prospectivo, de corte transversal.

8.2 Universo de estudio

Se incluyeron pacientes con diagnóstico de dispepsia no estudiada a los que se les realizó endoscopia de tubo digestivo alto en el Hospital General de Mexicali (HGM).

8.3 Selección de las pacientes

8.3.1 Criterios de inclusión

1. Pacientes con dispepsia funcional de acuerdo a los criterios de Roma III:

Criterios diagnósticos*. Debe incluir:

Uno o más de los siguientes:

- a. Llenura postprandial que incomoda
- b. Saciedad temprana
- c. Dolor epigástrico
- d. Quemazón epigástrica y,

Excluir cualquier evidencia de enfermedad estructural

* Criterios que se cumplan en los últimos 3 meses con inicio de las molestias al menos 6 meses antes del diagnóstico.

2. Pacientes con dispepsia orgánica (aquellos pacientes que posterior al resultado de endoscopia se determine evidencia de enfermedad ulcerosa péptica ya sea úlcera duodenal, úlcera gástrica).

3. Referidos de la consulta externa y hospitalización del HGM para endoscopia, con o sin síntomas de alarma.

4. Firma de consentimiento informado.

8.3.2 Criterios de exclusión

1. Historia de gastrectomía parcial.
2. Embarazo.
3. Pacientes que hayan recibido inhibidor de bomba de protones en los 2 meses previos al estudio.
4. Pacientes que se encuentren bajo tratamiento con antibióticos.
5. Pacientes que hayan recibido tratamiento para erradicación de *H. pylori*.
6. Pacientes que no den consentimiento informado.

8.3.3 Criterios de eliminación

1. Tejido gástrico insuficiente.

8.3.4. Población y muestra

Se incluyeron a los pacientes que acudieron durante el periodo de 11 de mayo de 2011 al 18 de mayo de 2012 al Hospital General de Mexicali, y a los cuales se les hizo el diagnóstico de dispepsia no estudiada. Los pacientes recibieron una hoja informativa que leyeron, y firmaron una carta de consentimiento informado. De cada paciente se obtuvo una biopsia de tejido gástrico. Se les realizó diagnóstico histológico por un médico patólogo.

8.4. Descripción de las Variables

8.4.1. Variables Dependientes

Dispepsia.

Definición: entidad caracterizada por una heterogénea relación de signos y síntomas atribuibles al tracto gastrointestinal superior, que habitualmente incluye alguno de los siguientes: dolor o malestar centrado en el abdomen superior, quemazón epigástrica, plenitud postprandial y saciedad precoz.

Dispepsia funcional: diagnóstico basado en los criterios de ROMA III. * Criterios que se cumplan en los últimos 3 meses con inicio de las molestias al menos 6 meses antes del diagnóstico.

1. Uno o más de los siguientes:
 - a. Llenura postprandial que incomoda
 - b. Saciedad temprana
 - c. Dolor epigástrico
 - d. Quemazón epigástrica y,
2. Excluir cualquier evidencia de enfermedad estructural

Dispepsia orgánica: evidencia de enfermedad ulcerosa péptica (úlcera duodenal, úlcera gástrica).

Tipo de variable: nominal dicotómica

Nivel de medición: presente – ausente.

8.4.2 Variables Independientes

Expresión del gen *ureA*

Definición: gen que codifica para la proteína ureasa, la cual es una metaloenzima que cataboliza la hidrólisis de la urea presente en el estómago en amonio y dióxido de carbono.

Tipo de variable: nominal dicotómica

Nivel de medición: presente – ausente.

Expresión del gen *cagA*

Definición: gen que codifica para la proteína CagA, la cual es una proteína de un peso molecular entre 120 a 140 kDa altamente inmunogénica.

Tipo de variable: nominal dicotómica

Nivel de medición: presente – ausente.

Expresión del gen *vacA*

Definición: gen que codifica para la proteína VacA, la cual es una toxina codificada por el gen *vacA*, que induce vacuolización en las células epiteliales, la muerte celular y la destrucción de la integridad epitelial.

Tipo de variable: nominal dicotómica

Nivel de medición: presente – ausente.

8.5. Procedimientos

Endoscopia. Se requirió ayuno de por lo menos 12 hrs previo al procedimiento. Como premedicación se empleó midazolam a dosis respuesta y xilocaína local en spray. Para los estudios endoscópicos se empleó un videoendoscopio Fujinon de visión frontal, de 10 mm de diámetro, modelo EG-590ZW.

Todos los pacientes recibieron oxígeno suplementario a 3 L por minuto y se monitorizaron con oximetría de pulso y frecuencia cardíaca.

Se obtuvieron 2 biopsias de antro y 2 de fundus, mediante una pinza para biopsia marca Fujinon modelo BF2418SF.

Biopsia gástrica y aislamiento de cepa.

Se utilizaron dos sets de muestras de biopsias gástricas. Una muestra de biopsia se almacenó a -20°C hasta extracción de ADN. Las muestras descongeladas fueron homogenizadas en tubos de Griffith conteniendo 400 mL de solución salina (0.85 % [wt/vol]) transferidos a tubos de Eppendorf de 1.5 mL de (0.85% [wt/vol]), y centrifugados (10,000 por dos minutos) y el supernadante fue desechado.

Los gránulos fueron resuspendidos en un amortiguador de extracción (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.5 % [vol/vol] Tween 20) y en proteinasa K (0.5 ng/mL), centrifugados por 2 a 5 segundos e incubados a 56°C por una hora y posteriormente a 100°C por 10 minutos. El ADN extraído fue almacenado a -22°C hasta ser requerido.

La determinación por RCP convencional de los genes *vacA* y *cagA* de *H. pylori* se llevó a cabo en el laboratorio de bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Baja California. Para tal efecto se obtuvo una muestra del material gástrico de las biopsias y se colocó en un vial de plástico de Eppendorf. Se trasladaron inmediatamente al laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina en un termo con hielo.

Ensayo convencional de RCP. El ensayo de RCP tuvo como objetivo la subunidad 16 del gen de ARNr de *H. pylori* y se realizó con el primer par de Hp1 y Hp2.

La mezcla de 50 mL de RCP se constituyó en 5 mL de ADN extraído, 200 mM deoxinucleosidotrifosfato (dNTP) (Gibco BRL, Paisley, Escocia), 0.4 mM base (MWG Biotech, Milton Keynes, Inglaterra), 1.5 mM MgCl₂ y 1 U de Taq polimerasa (Gibco BRL) en amortiguador de RCP (20 mM Tris-HCl [pH 8.4], 50 mM KCl, 0.2 % [vol/vol] glicerol), fue sujeto por 5 minutos a desnaturalización a temperatura de 95°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos cada uno a desnaturalización con temperatura de 95°C, posteriormente con temperatura de 60°C y finalmente a 72° C por 5 minutos.

Método de extracción de DNA:

Centrifugar 1 mL de por dos minutos a 13,000-16,000xg (máxima velocidad en una microcentrifuga). Desechar el supernadante.

Lisis de células

1. Agregar 600 uL de solución de lisis de núcleo. Mezclar gentilmente con una pipeta
2. Incubar por 5 minutos a 80°C, posteriormente enfriar a temperatura ambiente.
3. Mezclar, incubar a 37°C por 15 a 60 minutos, posteriormente enfriar a temperatura ambiente.

Precipitación de proteínas

1. Agregar 200 uL de solución de precipitación de proteínas.
2. Incubar en hielo por cinco minutos.
3. Centrifugar a 13,000-16,000xg (máxima velocidad en una microcentrifuga) por tres minutos.
4. Transferir el supernadante para limpiar el tubo conteniendo 600 uL de isopropanolol a temperatura ambiente. Mezclar.
5. Centrifugar y decantar el supernadante.
6. Agregar 600 uL de etanol al 70 % a temperatura ambiente.
7. Centrifugar por 2 minutos a 13,000-16,000xg (máxima velocidad en una centrifuga).
8. Aspirar el etanol y secar por 10-15 minutos.

9. Rehidratar en 100 uL de solución de rehidratación por una hora a 65° C.

Tabla 1. Secuencias nucleotídicas utilizadas para la detección de *H. pylori* por medio de RCP punto final.

Secuencia amplificada	Tamaño del producto de RCP	Secuencia del oligonucleótido sintético (5'-3')
Gen <i>ureA</i> <i>ureA</i> + <i>ureA</i> *	411 pb	GCC AAT GGT AAA TTA GTT CTC CTT AAT TGT TTT TAC
Gen <i>cagA</i> <i>cagA</i> + <i>cagA</i> *	348 pb	GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA
Gen <i>vacA</i> <i>vacA</i> + <i>vacA</i> *	348 pb	GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA

+ *secuencia del cebador hacia adelante*

* *secuencia del cebador hacia atrás*

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un estudio descriptivo, de corte transversal. Las variables de interés se estudiaron mediante estadística descriptiva. Se calculó la proporción de los pacientes con dispepsia portadores o no de los genes *ureA*, *cagA* y *vacA* y se reportó en cantidad y porcentajes.

Se calcularon las medias y desviaciones estándares de los datos epidemiológicos.

Se trató de comparar la diferencia entre los valores de positividad de *cagA* y *vacA* entre los grupos de dispepsia funcional y orgánica mediante la prueba de bondad de ajuste para comparación de proporciones. Lo cual no fue factible por el tamaño de la muestra.

10. ASPECTOS ÉTICOS, NORMATIVOS Y DE SEGURIDAD

El presente estudio se desarrolló en apego a las disposiciones legales de la Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos, la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos; a la legislación aplicable en materia de protección al ambiente como la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos- Clasificación y especificaciones de manejo; y de conformidad con los principios éticos emanados de la décimo octava Asamblea Médica Mundial de Helsinki, Finlandia en 1964 y sus respectivas modificaciones hechas por dicha asamblea.

Se explicó a cada paciente la naturaleza del estudio, su objetivo, procedimientos involucrados, duración esperada, riesgos potenciales y beneficios derivados, así como cualquier molestia que se pudiera ocasionar. A cada participante se le informó que la participación en el estudio era de carácter voluntario,

Con base en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación, se obtuvo el consentimiento bajo información por escrito de cada participante en el estudio.

11. RESULTADOS

Se incluyeron un total de 59 pacientes con dispepsia no estudiada en el periodo del 11 de mayo de 2011 al 18 de mayo de 2012. Los datos demográficos se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Datos demográficos.

	Total	<i>ureA</i> +	<i>cagA</i> +	<i>vacA</i> +	<i>cagA</i> +, <i>vacA</i> +
Pacientes	59(100)	53 (89.8)	34 (64.15)	35 (66.30)	25 (47.16)
Sexo, hombre/mujer	29/30	25/28	20/14	17/18	13/12
Edad, media, años (DE)	50.6 (14.5)	51 (14.9)	51.5 (13.25)	50 (14.43)	53.4 (13.83)
Duración de la dispepsia, > 1 año	12(20.3)	12(20.3)	8 (66.6)	7 (58.3)	5 (41.6)

Los datos en la tabla se muestran como: n (%)

DE: desviación estándar

11.1 Determinación de la infección de *H. pylori* en pacientes con dispepsia.

De los 59 pacientes con dispepsia no estudiada, a 53 se les realizó el diagnóstico de infección por *H. pylori* (figura 2) por medio de la técnica RCP punto final - expresión del gen *ureA* en tejido gástrico-. Esta cantidad de pacientes representa un 89.83%

Figura 2. Detección del gen *ureA* en biopsia gástrica de pacientes con dispepsia.

■ ureA + ■ ureA -

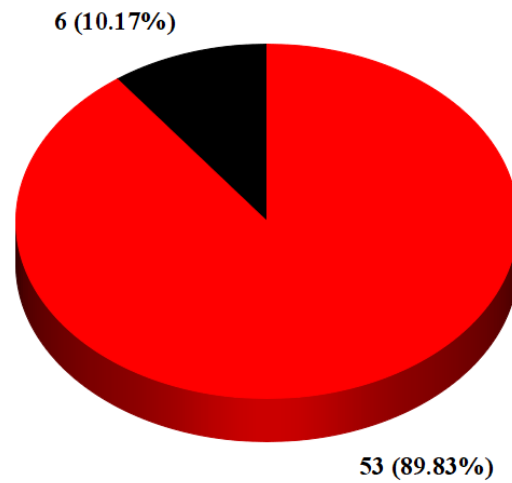


Figura 3. Detección del gen *ureA* en biopsia gástrica de pacientes con dispepsia funcional.

■ urea A + ■ urea A -

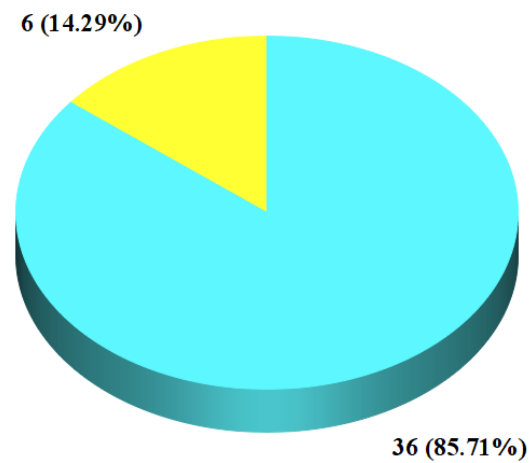
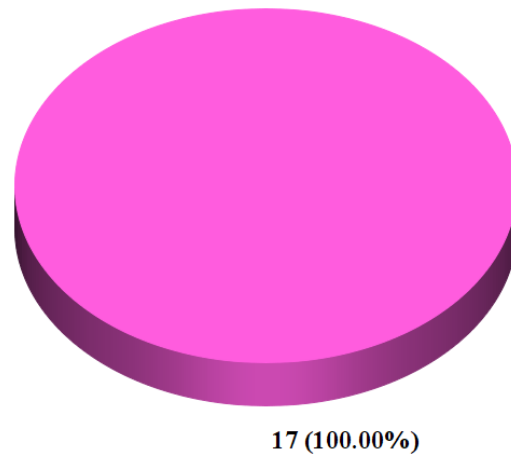


Figura 4. Detección del gen *ureA* en biopsia gástrica de pacientes con dispepsia orgánica.

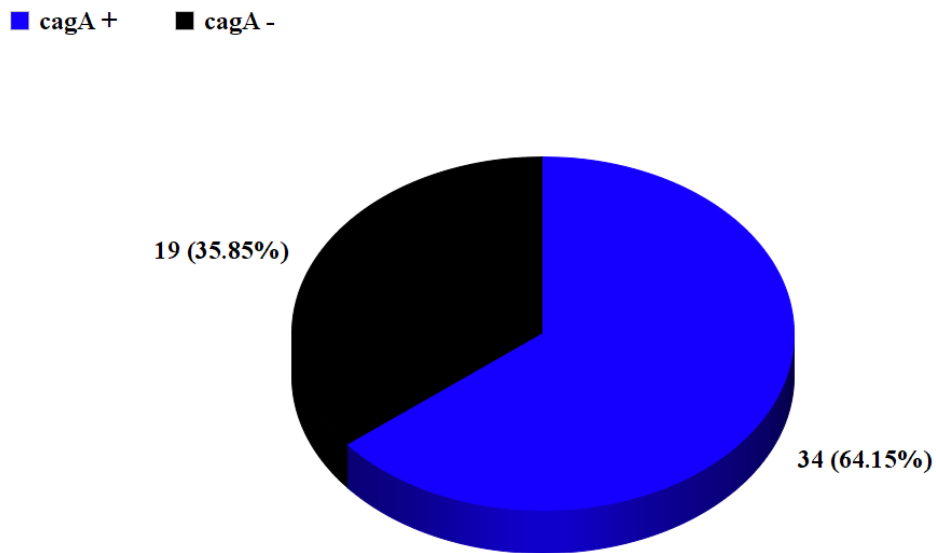
■ urea A +



11.2 Expresión del gen *cagA*

La expresión del gen *cagA* en pacientes con dispepsia infectados por *H. pylori* se detectó en 34 de los 53 pacientes, lo que representa un 64.15% (figura 5).

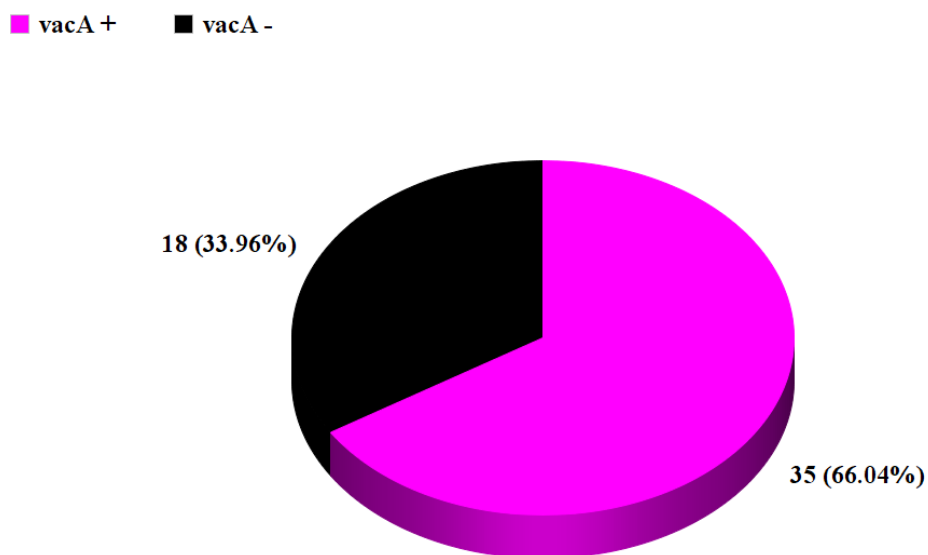
Figura 5. Detección del gen *cagA* en biopsia gástrica de pacientes con dispepsia infectados por *H. pylori*.



11.3 Expresión del gen *vacA*

La expresión del gen *vacA* en pacientes con dispepsia infectados por *H. pylori* se detectó en 35 de los 53 pacientes, lo que representa un 66.04% (figura 6).

Figura 6. Detección del gen *vacA* en biopsia gástrica de pacientes con dispepsia infectados por *H. pylori*.



11.4 Hallazgos endoscópicos

Finalmente, los hallazgos endoscópicos se muestran en la tabla 3. Solo 9 pacientes presentaron características estructurales normales. El hallazgo predominante fue gastritis (17 pacientes, 28.8%) entre las que se incluyeron: gastritis erosiva, no erosiva, crónica. Úlcera péptica, se diagnosticó en 17 pacientes (28.8%). Tres pacientes presentaron várices esofágicas al momento del estudio y sólo en un paciente se documentó metaplasia intestinal.

Tabla 3. Hallazgos endoscópicos de pacientes con dispepsia.

	Total	<i>ureA</i> +	<i>cagA</i> +	<i>vacA</i> +	<i>cagA</i> + <i>vacA</i> +	<i>ureA</i> -	<i>cagA</i> - <i>vacA</i> -
Normal	9 (15.25)	9	5	6	5	0	3
Gastritis	17 (28.8)	14	10	10	8	3	2
Úlcera duodenal	11 (18.6)	11	6	8	4	0	1
Úlcera gástrica	6 (10.1)	6	4	4	3	0	1
Várices esofágicas	3 (5.08)	2	1	2	1	1	0
ERGE	4 (6.77)	3	3	1	1	1	0
Hernia hiatal	3 (5.08)	3	2	2	2	0	1
Metaplasia intestinal	1 (1.69)	1	0	0	0	0	1
Otros	5 (8.47)						
Esofagitis	1	0	0	0	0	0	0
GD	1	1	0	1	0	0	0
GPH	1	1	1	0	0	0	0
GDE	1	1	1	1	1	0	0
Úlcera esofágica	1	1	1	0	0	0	0

Los datos en la tabla se muestran como: n (%)
 ERGE: enfermedad por reflujo gastroesofágico.
 GD: gastroparesia diabética
 GPH: gastropatía portal hipertensiva
 GDE: gastroduodenitis erosiva

Figura 7. Clasificación de los pacientes con dispepsia orgánica infectados por *H. pylori*.

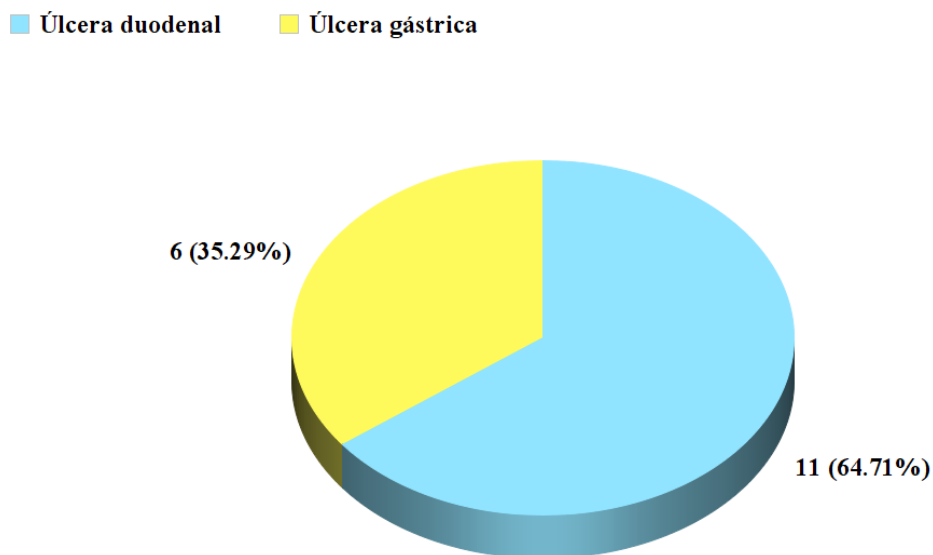


Tabla 4. Expresión de los factores de virulencia *cagA* y *vacA* en pacientes con dispepsia orgánica.

	Total	<i>ureA</i> +	<i>cagA</i> +	<i>vacA</i> +	<i>cagA</i> + <i>vacA</i> +	<i>ureA</i> -	<i>cagA</i> - <i>vacA</i> -
Úlcera duodenal	11 (18.6)	11	6	8	4	0	1
Úlcera gástrica	6 (10.1)	6	4	4	3	0	1
Úlcera péptica	17	17	10	12	7	0	2

Figura 8. Detección del gen *cagA* en biopsia gástrica de pacientes con dispepsia orgánica.

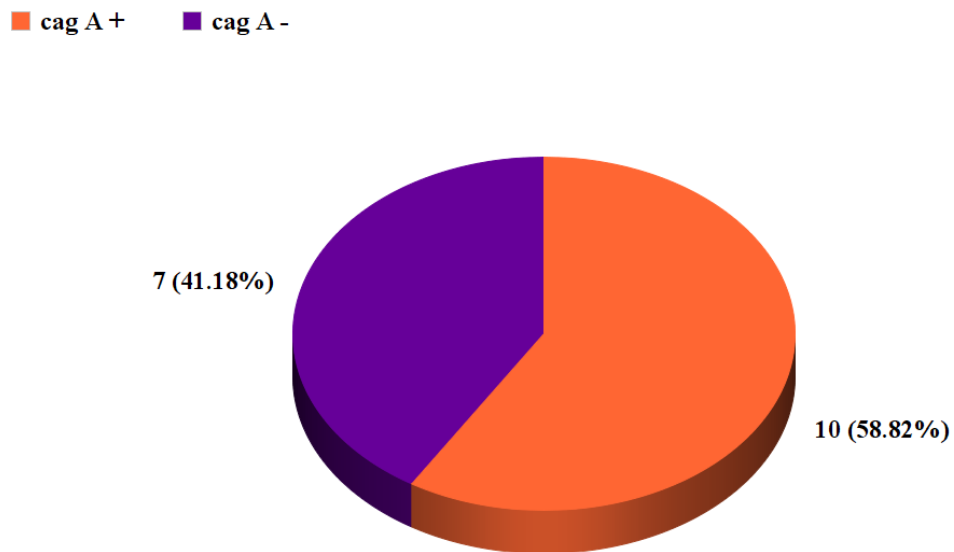


Figura 9. Detección del gen *vacA* en biopsia gástrica de pacientes con dispepsia orgánica.

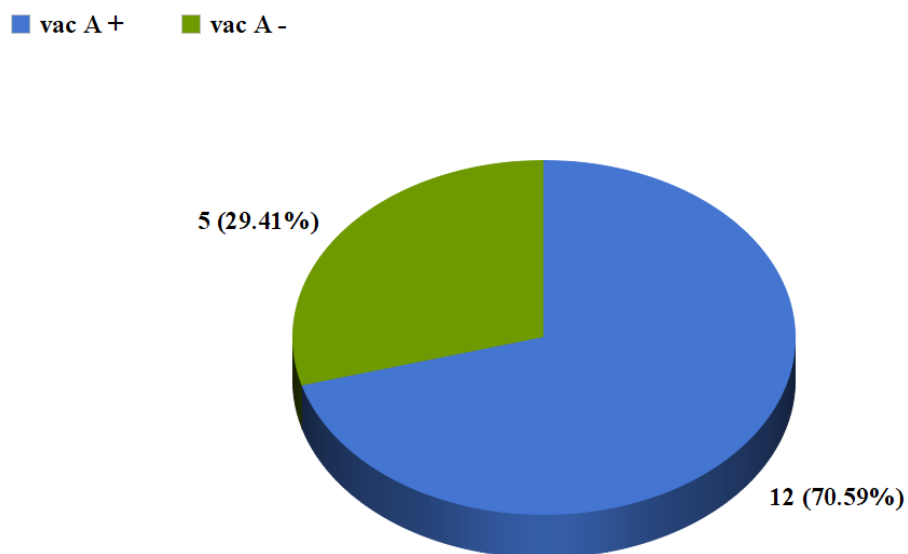


Figura 10. Detección de los genes *cagA* y *vacA* en biopsia gástrica de pacientes con dispepsia orgánica.

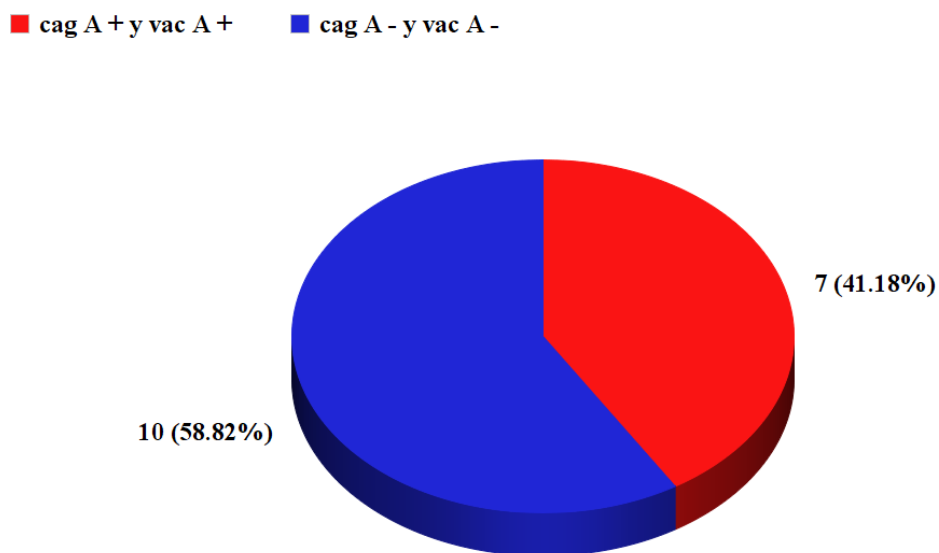


Tabla 5. Expresión de los factores de virulencia *cagA* y *vacA* en pacientes con dispepsia funcional.

	Total	<i>ureA</i> +	<i>cagA</i> +	<i>vacA</i> +	<i>cagA</i> + <i>vacA</i> +	<i>ureA</i> -	<i>cagA</i> - <i>vacA</i> -
Dispepsia funcional	42	36	24	23	18	0	7

Figura 11. Detección del gen *cagA* en biopsia gástrica de pacientes con dispepsia funcional.

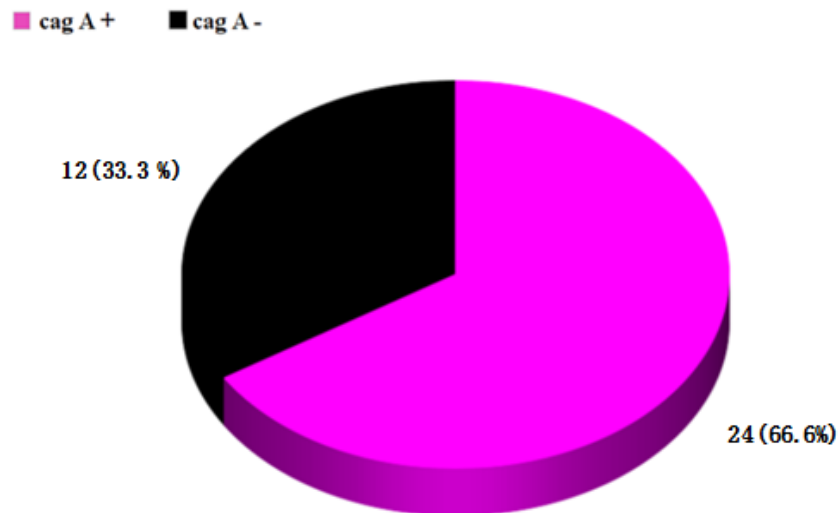


Figura 12. Detección del gen *vacA* en biopsia gástrica de pacientes con dispepsia funcional.

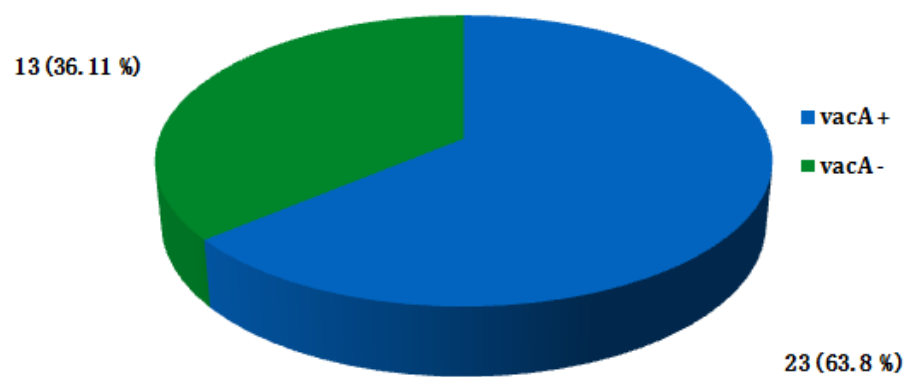


Figura 13. Detección de los genes *cagA* y *vacA* en biopsia gástrica de pacientes con dispepsia funcional.

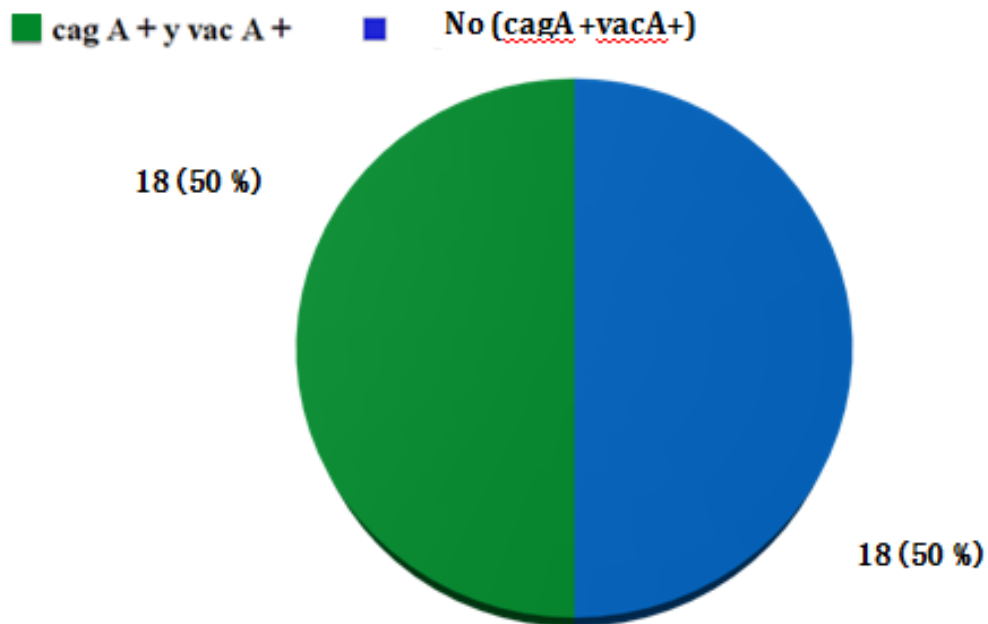
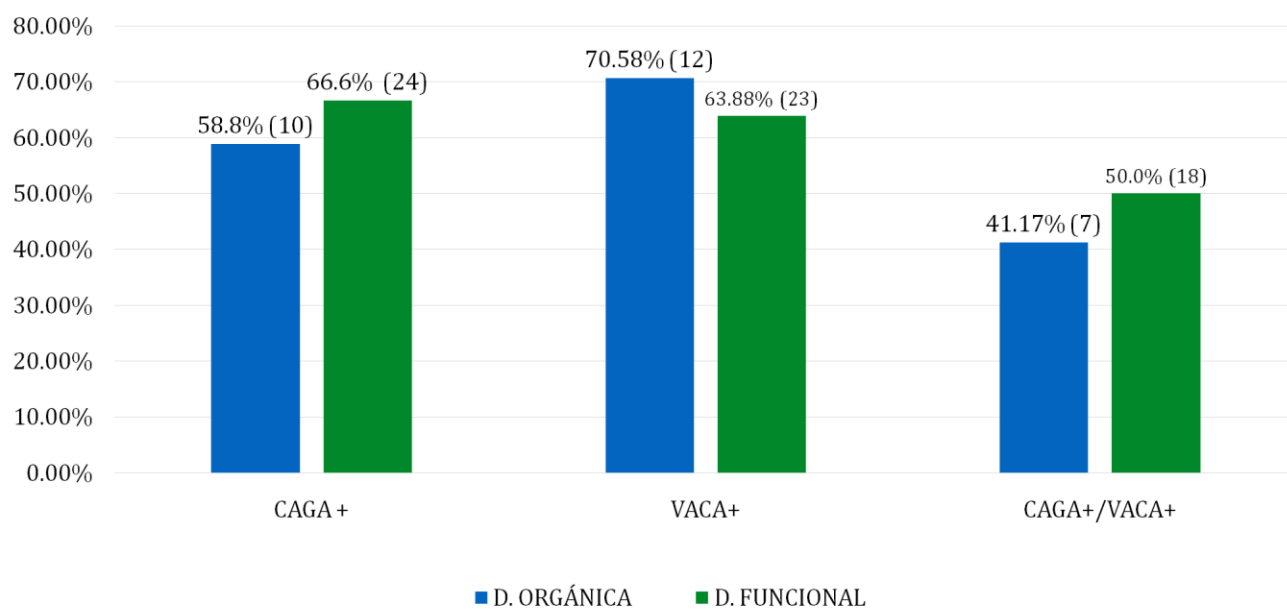


Figura 14. Factores de virulencia según dispepsia



12. DISCUSIÓN

Estos resultados comparados con un estudio previo²¹ en el que se determinaron los antígenos mediante serología, muestran una mayor expresión de estos factores de virulencia en pacientes con dispepsia funcional y orgánica. Lo anterior probablemente debido a que la técnica RCP es más sensible que la detección de anticuerpos.

A pesar de que la prevalencia de factores de virulencia fue alta, sigue representando un menor porcentaje del encontrado en otros estudios realizados en países en vías de desarrollo (79-90%)²².

Este hallazgo puede ser debido a diversos factores ambientales y socioeconómicos que marcan diferencias en las condiciones de la población que acude al Hospital General de Mexicali en comparación a las de las poblaciones descritas en los trabajos realizados por otros grupos de investigadores.

Cabe mencionar que la prevalencia de polimorfismos ya descritos de los genes *cagA* y *vacA* pueden ser otro de los factores que modifiquen la expresión en una población estudiada.

Por otra parte, la ciudad de Mexicali, al ser frontera con Estados Unidos de América, genera diferencias importantes en estilos de vida en la población mexicana que pudieran ser motivo de la presencia o ausencia de estos factores patogénicos.

La relación de los factores de virulencia en pacientes con dispepsia y úlcera y/o cáncer gástrico ha sido anteriormente planteada. No fue este el objetivo de nuestro estudio, pero en ninguno de los 59 pacientes se demostró evidencia de cáncer gástrico.

En conjunto, nuestros hallazgos abren la posibilidad de nuevos estudios que nos permiten elucidar los factores que regulan la sobreexpresión o inhibición de estos genes en poblaciones de diferentes regiones del mundo y su participación en el desarrollo de patologías gástricas; además, de sus implicaciones pronósticas.

13. CONCLUSIONES

La prevalencia de *H. pylori* en los pacientes con dispepsia en este estudio fue mayor a la reportada en otros estudios similares de países en vías de desarrollo.

La expresión de los factores de virulencia *cagA* y *vacA* en este grupo de pacientes infectados por *H. pylori* atendidos en el Hospital General de Mexicali es menor en relación a pacientes estudiados en otros países en vías de desarrollo.

En la totalidad de los pacientes con dispepsia orgánica se demostró *H. pylori* mediante RCP (en comparación con 85.7 % de dispepsia funcional).

La proporción de positividad para *cagA* ya sea aislado o en conjunto con *vacA* fue discretamente superior en el grupo de dispepsia funcional. Caso contrario con *vacA* aislado cuya proporción fue mayor en pacientes con dispepsia orgánica.

Las diferencias en cuanto a la expresión de los factores de virulencia (*cagA* y *vacA*) entre los grupos de dispepsia funcional y orgánica no pudieron ser evaluadas mediante técnicas estadísticas, muy probablemente, debido al tamaño de las muestras (prueba de bondad de ajuste para comparación de proporciones).

14. REFERENCIAS

1. Marshall BJ. Unidentified curved bacillion gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet.1983;1:1273 –75
2. Marshall BJ, Warren JP. Unidentified curved bacilli in the stomach patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet.1984; 1: 1311–15
3. Reyes HS. *Helicobacter pylori*: La bacteria que nadie soñó. 2005. <http://hosting.udlap.mx/profesores7miguela.mendez/alephozero/archivo/historico/az/41/medicina2005.html>.
4. Orvostort Kozl. History of the discovery of *Helicobacter pylori*. Buzas GM 2004; 49 (3-5): 45 – 56.
5. M. F. GO. Review article: natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Aliment Pharmacol Ther. 2002; 16 (Suppl 1): 3-15.
6. *Helicobacter pylori* in developing countries. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines. 2010.
7. Chey, Wong. Guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. American College of Gastroenterology. 2007; 102: 1808-1825.
8. Sobrino-Cossío y cols. Tercer Consenso Mexicano sobre *Helicobacter pylori*. Rev Gastroenterol Mex, Vol. 72, Núm 3, 2007.
9. Maeda, Ogura, Yoshida, et al. Major virulence factors, VacA and CagA, are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. Gut. 1998; 42: 338-343.
10. Basso et al. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* cagA and vacA gene polymorphisms. Gastroenterology.Vol. 135, No.1
11. Rome Foundation. Rome III Diagnostic Criteria for Functional Gastrointestinal Disorders. 2006.
12. Management of *Helicobacter pylori* infection- the Maastricht IV/Florence Consensus Report. Gut. 2012; 61: 646-664
13. Jones et al. A tale of two toxins: *Helicobacter pylori* CagA and VacA modulate host pathways that impact disease. Frontiers in microbiology. 2010. Volume 1. Article 115.
14. Cáceres P, Montijo E, Bacarreza D, Zárate F, Díaz S, Mora I, Cervantes R, Ramírez J. Utilidad de los métodos diagnósticos para la detección de *Helicobacter pylori* en pediatría. Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría. 2009; Vol. XXIII Núm. 90.
15. Premoli, Gloria. Diagnóstico de *Helicobacter pylori* mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Rev Cubana MedTrop. 2004; 56 (2): 85-90

16. Jiménez F, Barbaglia Y, Bucci P, et al. Detección molecular y genotipificación de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas de pacientes adultos sintomáticos de la ciudad de Santa Fe, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. 2013; 45.
17. Moncayo J, Santacruz J, Álvarez A, y colaboradores. Comparación de métodos diagnósticos en la infección por *Helicobacter pylori* en Quindío, Colombia. *Colombia Médica*. 2006; 37(3).
18. Abrante L, Reyes N, García-Amado M, et al. Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* por PCR en jugo gástrico y biopsias gastroesofágicas de pacientes dispépticos. *InvestClin*. 2012; 53(2):168 –177.
19. Bosques Padilla y colaboradores. Comparison of *Helicobacter pylori* prevalence in symptomatic patients in northeastern Mexico with the rest of the country: its association with gastrointestinal disease. *Arch Med Res*. 2003. Jan-Feb; 34 (1): 60-3.
20. Garza González, Bosques Padilla y colaboradores. Characterisation of *Helicobacter pylori* isolates from the north-eastern region of Mexico. *Clinical Microbiol Infect* 2004; 10: 41-45.
21. Avendaño y colaboradores. Prevalencia de anticuerpos anti CagA y anti VacA en pacientes con dispepsia e infección por *Helicobacter pylori* y su asociación con úlcera péptica y neoplasia. *Med Int Mex* 2011; 27(4):327-332.
22. Asrat et al. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes in Ethiopian dyspeptic patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004, p. 2682-2684.

15. ANEXOS

Anexo1. Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARNr 16S	ácido ribonucleico ribosomal 16S
<i>cagA</i>	gen A asociado a la citotoxina
CagA	Proteína asociada a la citotoxina
EGD	esofagogastroduodenoscopia
glmM	gen de la fosfoglucosa mutasa
HGM	Hospital General de Mexicali
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
kDa	Kilodaltons
MALT	tejido linfoide asociado a las mucosas
NH ₄ ⁺	Amonio
Pb	pares de bases
RCP	reacción en cadena de la polimerasa
urea	gen ureasa A
<i>vacA</i>	gen de la citotoxina vacuolizante
VacA	Proteína citotoxina vacuolizante
VEGF	factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)

Anexo 2. Hoja informativa

Título del proyecto:

**“Detección mediante RCP punto final de los factores de virulencia
cagA y *vacA* de *Helicobacter pylori* en pacientes con dispepsia
en una población del Hospital General de Mexicali”**

Los pacientes con dispepsia (malestar epigástrico), pueden estar infectados por una bacteria llamada *Helicobacter pylori* y a su vez asociarse a otras enfermedades más severas. Este estudio utilizará una técnica de biología molecular para identificar que pacientes con dispepsia están infectados por *H. pylori*. Para tal efecto, se realizará una endoscopia la cual tiene una duración de 15 a 20 minutos. Serán canalizados para sedación, los riesgos y molestias de la investigación son la incomodidad del estudio endoscópico. El procedimiento endoscópico es el medio por el cual se obtendrán la biopsia gástrica al que usted es enviado por sus molestias. Los estudios para esta investigación serán gratuitos.

La decisión de aceptar es voluntaria y libre, y podrá retirarse en cualquier momento, sin que esto afecte la relación con su médico.

La información de la investigación será guardada por el investigador y podrá ser requerida también por las autoridades de salud pública de nuestro país. Los resultados podrán ser presentados en reuniones médicas y/o publicaciones, pero su identidad no será revelada en dichas presentaciones.

Les agradecemos el leer esta hoja informativa, cualquier otra duda estamos a sus órdenes.

Dra. María del Carmen Rosales Gutiérrez

Anexo 3. Consentimiento informado

Título del proyecto:

**“Detección mediante RCP punto final de los factores de virulencia
cagA y *vacA* de *Helicobacter pylori* en pacientes con dispepsia
en una población del Hospital General de Mexicali”**

He sido informado acerca de mi participación en el proyecto aquí citado. Se me han explicado todas las dudas acerca de la participación en el estudio, los riesgos y los beneficios. Se me ha asegurado que es libre de costo y que se me informarán de los resultados derivados de los estudios realizados si así lo deseo.

De manera voluntaria acepto participar, y se me garantiza la confidencialidad de la investigación.

Nombre y firma del paciente o representante legal:

Nombre y firma del investigador:

Nombre y firma, testigo I:

Nombre y firma, testigo II:

Fecha: _____