



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD
GENÉTICA DE LA REGIÓN SECUENCIA
SEÑAL DEL GEN *vacA* DE *Helicobacter
pylori* por RFLP-PCR**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A

BEATRIZ SALDIVAR HERRERA

**ASESORA
DR. MA. DEL ROSARIO MORALES ESPINOSA**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Por darme la vida y permitirme terminar este sueño.

A mis padres:

Por el gran apoyo que me brindaron por los sacrificios que hicieron, porque sé que son capaces de darlo todo por mí sin pedir nada a cambio.

A las profesoras:

Andrea, Guadalupe, Ana Laura y Patricia por el apoyo y el tiempo dedicado para la revisión de este trabajo, muchas gracias.

A mis hermanos: Ana, Iris, Daniel y Abraham

Por su paciencia y comprensión sobre todo por apoyarme cuando estudiaba.

A la Dra. Rosario Morales:

Por haberme permitido realizar y concluir este proyecto, sus consejos y la sabiduría que me transmitió.

A Biólogo José Luis Méndez:

Por el apoyo técnico, la asesoría en el manejo de equipos y técnicas sobre todo por la gran paciencia que tuvo conmigo, sobre todo por la ayuda que me brindo cuando algo no salía bien.

A Gabriela Delgado:

Por el apoyo técnico, la asesoría en la aplicación de técnicas y manejo de equipos. Recuerda que siempre hay que tener paciencia para enseñar a los demás lo que sabes.

A ti latoso:

Que eres la luz que iluminó mi vida y por ocupar un lugar muy grande en mi corazón, por tu paciencia, por todas las cosas que me enseñaste, sobre todo por los momentos maravillosos que pasamos.

A mis amigos:

Ana, Vero y Poncho por los momentos agradables y desagradables que pasamos quedarán en mi recuerdo.

Héctor Arroyo:

Por la amistad y el cariño que me diste, personas como tú nunca se olvidan y como tú lo dijiste un adiós no es para siempre.

Gil:

Por el cariño y el tiempo dedicado sobre todo por los momentos que pasamos en la facultad, recuerda que las cosas siempre pasan por algo.

A mis amigos y compañeros de la generación 27:

Angel, Caro, Xoch, Chuy, Humberto, Lucy, Misael, Luis Donis, Aranny, Edmundo, Mario y Germán

INDICE

	Pagina
Lista de Tablas	IV
Lista de figuras	V
Lista de abreviaturas	VI
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Historia	3
2.2 Epidemiología	6
2.3 Cuadro Clínico	8
2.4 Transmisión	10
2.5 Patogenia	10
3. CARACTERISTICAS MORFOLÓGICAS	11
3.1 Morfología	11
3.2 Cultivo	12
4. FACTORES DE VIRULENCIA	14
4.1 <i>Ureasa</i>	14
4.2 Lipopolisacárido	15
4.3 Motilidad	17
4.4 Adhesinas	17
4.5 Isla de patogenicidad <i>cag</i>	18

4.6 Proteína Cag A	18
4.7 Citotoxina vacuolizante	19
4.7.1 gen <i>vacA</i>	23
5. HIPOTESIS	29
6. OBJETIVOS	29
6.1 OBJETIVO GENERAL	29
6.2 OBJETIVOS PARTICULARES	29
7. MATERIAL Y MÉTODOS	31
7.1 Población de estudio, cepas, cultivo e identificación	31
7.2 Extracción de DNA	32
7.2.1 Breve descripción de la técnica	32
7.3 Caracterización del genotipo s1 ó s2 de la secuencia señal del gen <i>vacA</i> de las cepas de <i>H. pylori</i>	33
7.4 Preparación de la mezcla para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	34
7.5 Caracterización de la secuencia señal del gen <i>vacA</i> por el método RFLP	34
7.6 Determinación del tipo de subfamilia de la secuencia señal del gen <i>vacA</i> de cepas de <i>H. pylori</i> no caracterizadas como s1a, s1b ó s2, (utilizando un nuevo iniciador).	36
8. RESULTADOS	38
8.1 Caracterización del genotipo s1 ó s2 de la secuencia señal del gen <i>vacA</i> de las cepas de <i>H. pylori</i>	38

8.2 Determinación del tipo de subfamilia de la secuencia señal del gen <i>vacA</i> de cepas de <i>H. pylori</i> no caracterizadas como s1a, s1b ó s2, (utilizando un nuevo iniciador)	38
8.3 Caracterización de la secuencia señal del gen <i>vacA</i> por el método RFLP-PCR	40
8.4 Relación entre el alelo s1 y s2 con el perfil de restricción de la secuencia señal de <i>vacA</i>	45
9. DISCUSIÓN	48
10. CONCLUSIONES	56
11. APÉNDICE	57
11.1 APÉNDICE 1	57
11.1.1 Material empleado para el desarrollo de la tesis	57
11.1.2 Equipo empleado para el desarrollo de la tesis	58
11.2 APÉNDICE 2	59
11.2.1 Preparación reactivos	59
11.3 APÉNDICE 3	67
11.3.1 Técnicas de Biología Molecular	67
11.3.2 Reacción de cadena de la polimerasa (PCR)	67
11.3.3 Enzimas de restricción	68
11.3.4 Geles de poliacrilamida	71
12. BIBLIOGRAFIA	72

LISTA DE TABLAS

Tabla1. Especies de <i>Helicobacter</i> y su localización en determinados Hospedadores	6
Tabla 2. Iniciadores empleados en la caracterización de los alelos del gen <i>vacA</i>	26
Tabla 3. Genotipos de <i>vacA</i> y sus RFL-PCR de cepas de niños con dolor abdominal crónico	44
Tabla 4. Concentración de antibióticos para Agar Sangre	59
Tabla 5. Tiempo de lavado para geles de poliacrilamida de acuerdo al tamaño de gel.	65
Tabla 6. Tiempo de revelado de geles de poliacrilamida de acuerdo al tamaño de éstos	66
Tabla 7. Ejemplos de algunas enzimas de restricción, bacteria de donde se obtienen y secuencia de DNA que reconocen.	70

II. LISTA DE FIGURAS	Página
Figura 1. Robin Warren y Barry Marshall	5
Figura 2. Distribución de <i>H. pylori</i> en el mundo	7
Figura 3. Imagen 3D de <i>H. pylori</i>	12
Figura 4. Morfología del microorganismo teñido con tinción de Gram	14
Figura 5. Mecanismo de acción de VacA	22
Figura 6. Esquema de la proteína VacA y del gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i>	24
Figura 7. Amplificación de la secuencia señal s1d del gen <i>vacA</i> con los Iniciadores SS5F y VA1-R	40
Figura 8. Gel de acrilamida que representa los perfiles de restricción I, II, III y IV.	43
Figura 9. Gel de acrilamida que representa la caracterización de perfiles I, II, IV	46
Figura 10. Gel de acrilamida que representa perfiles II, III y IV.	47
Figura 11. Posición de iniciadores de secuencia señal s1a, s1b y s2	53
Figura 12. Comparación de secuencia señal s1a, s1b y s1d	54
Figura 13. Comparación de secuencia señal s1b y s1d	55

III. LISTA DE ABREVIATURAS

col.	colaboradores
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GES	Tiocianato de Guanidina y Sarcosyl
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
kDa	Kilodaltones
LPS	Lipopolisacárido
m1	Alelo de la región media del gen <i>vacA</i>
m2	Alelo de la región media del gen <i>vacA</i>
MLEE	Electroforesis de enzimas multilocus
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PFGE	Electroforesis en campos pulsados
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMN	Polimorfonucleares
RAPD	Amplificación al azar de fragmentos de ADN
RFLP	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción
s1	Alelo de la secuencia señal del gen <i>vacA</i>
s2	Alelo de la secuencia señal del gen <i>vacA</i>
s1a	Familia de alelo de la secuencia señal s1 del gen <i>vacA</i>
s1b	Familia de alelo de la secuencia señal s1 del gen <i>vacA</i>
s1d	Familia de alelo de la secuencia señal s1 del gen <i>vacA</i>

TE	Buffer tris-EDTA
VacA	Citotoxina vacuolizante
<i>vacA</i>	Gen que codifica para la citotoxina vacuolizante VacA

1. RESUMEN

H. pylori es un bacilo pleomórfico gram-negativo, microaerofílico, que para su crecimiento en el laboratorio necesita requerimientos especiales, presenta características bioquímicas importantes como la producción de ureasa, que le confiere crear un microambiente neutro alrededor de ella, permitiéndole sobrevivir en el ambiente gástrico, también produce una catalasa y oxidasa. *H. pylori*, se encuentra infectando a más del 50% de la población mundial. Su importancia clínica es su asociación a gastritis atrófica tipo B, úlcera gástrica y cáncer gástrico.

Un importante factor de virulencia de *H. pylori* es la citotoxina vacuolizante codificada por el gen *vacA*, éste gen presenta en su estructura dos regiones variables: la región media, que puede ser caracterizada con base a su secuencia de nucleótidos en dos familias m1 y m2, y la secuencia señal, que puede ser caracterizada en tres familias de alelos: s1a, s1b y s2. Existen numerosos trabajos que documentan que *H. pylori* es una de las bacterias que presenta mayor variabilidad genética mostrada por: la diferencia en el contenido de genes; en el rearrreglo cromosomal observado entre cepas; en la distribución, el contenido y el número de zonas de plasticidad en el cromosoma; y la diversidad genética que presentan genes individuales, como *vacA*.

El objetivo del presente trabajo fue demostrar que la región secuencia señal del gen *vacA* de *H. pylori* presenta mayor diversidad genética a la actualmente descrita por el método de caracterización por PCR con iniciadores específicos de alelo. Para esto, se estudio una

población de cepas, las cuales no pudieron ser caracterizadas en la secuencia señal del gen *vacA*, en un estudio previo, utilizando el método original descrito por Atherton. Los resultados muestran que la secuencia señal tipo s1 del gen *vacA* de las cepas estudiadas, presentan mayor diversidad a la descrita en otros países. Sin embargo la secuencia señal tipo s2 es más conservada y puede ser perfectamente caracterizada por la metodología antes descrita así como por la empleada en este trabajo. La secuenciación de la secuencia señal de las cepas mostró sustitución de bases en el sitio de alineación del iniciador forward. El diseño y uso de un iniciador específico nos permitió caracterizar completamente la secuencia señal de estas cepas, sugiriendo la existencia de una nueva familia a la cual se le asignó el alelo s1d.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Historia. Desde principios del siglo XX, se tenían reportes por estudios anatomopatológicos de biopsia de estómago sobre el hallazgo de un microorganismo en forma de espiral en individuos con úlceras gástricas (Buck, 1990). Para 1938, Doenges reporta una bacteria presente en el interior de las células parietales gástricas (López-Brea, 2000, Kidd y Modlin, 1998). Sin embargo, no fue hasta principios de junio de 1979 que Robin Warren (patólogo), observó por primera vez la presencia de bacterias curvas en una biopsia gástrica proveniente de un paciente con gastritis crónica activa. Sus observaciones en estudios histopatológicos continuaron por un par de años, asociando la presencia de un microorganismo con esta patología gástrica, pero la mayoría de los investigadores asumían la presencia de este microorganismo como un saprofito en mucosa gástrica. Aunado a que, durante mucho tiempo hubo intentos de aislar a la bacteria sin ningún éxito (Kidd y Modlin, 1998).

En 1981, Barry Marshall un médico gastroenterólogo, se une a la investigación de Warren y confirman lo reportado desde un principio por este último (Kidd y Modlin, 1998). Aislándose y cultivándose por primera vez a el microorganismo en abril de 1982, en el Hospital Royal Perth de Australia, como dato anecdótico “cuando se presentaron unos días festivos y se dejaron en incubación las placas de cultivo por seis días” (dando tiempo suficiente para el crecimiento de las colonias del microorganismo) (Stevenson y cols. 2000, Kidd y Modlin, 1998).

La bacteria originalmente se describió como un microorganismo semejante a *Campylobacter* spp., ya que las condiciones de cultivo y crecimiento eran las mismas que para el género *Campylobacter*, las características del crecimiento utilizando el mismo medio de cultivo, la incubación bajo condiciones de microaerofilia, además de que la tinción de Gram mostraba una morfología de bacterias curvas Gram negativas (Buck, 1990), razón por la que se le llamó *Campylobacter pyloridis*, sin embargo este nombre no cumplía en su totalidad con las reglas de la nomenclatura (Murray y cols. 2003), por lo que se optó por nombrarla *Campylobacter pylori*.

Los estudios moleculares comparativos de la nueva especie con las preexistentes, mostraron diferencias importantes en el patrón de ácidos grasos, en la secuencia de nucleótidos de los genes de RNA ribosomales y en la actividad enzimática del microorganismo además, que la hibridación con sondas de DNA específicas y las diferencias morfológicas, condujeron a proponer el nuevo género de *Helicobacter* (Achtman y Suerbaum, 2001). Las observaciones con microscopía electrónica permitieron diferenciar morfológicamente a los dos géneros: *Campylobacter* presenta en su cuerpo bacilar extremos puntiagudos, con la presencia de flagelos desnudos en cada uno de sus polos derivándose en una concavidad y *H. pylori* tiene extremos romos con 3 a 8 flagelos envainados en uno de sus polos (Traverso y Hernández, 2000).

En 1984, se publicó por primera vez en la revista Lancet, la asociación de *H. pylori* con la gastritis crónica y se sugirió que la úlcera péptica pudiera ser de etiología infecciosa (Marshall y cols. 1984, Kidd y Modlin, 1998).

Finalmente en 1985, Marshall y Warren confirmaron la asociación de *H. pylori* con el desarrollo de gastritis, cuando Marshall ingiere un inóculo de la bacteria provocándose un cuadro de gastritis, demostrando el papel patógeno del microorganismo por los postulados de Koch (Marshall y cols. 1985, González y cols, 2004).

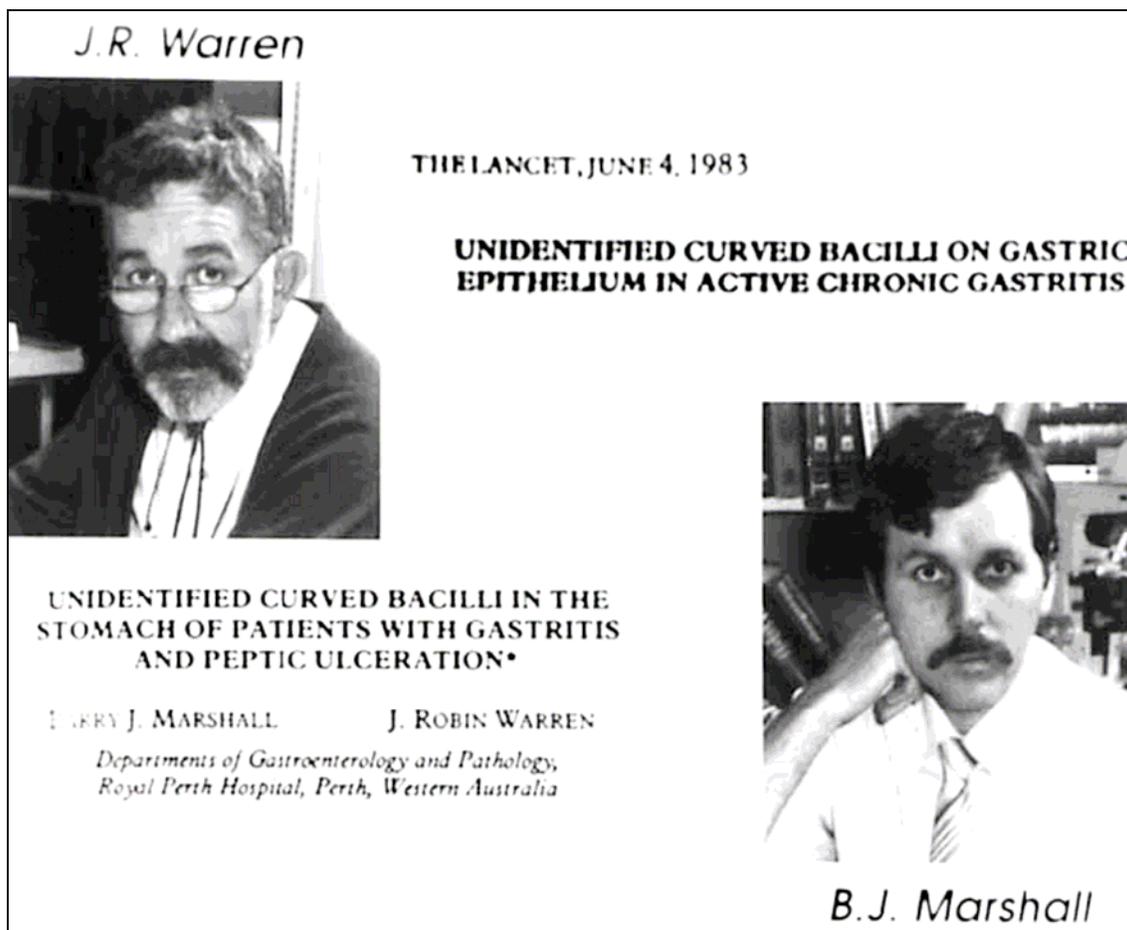


Figura 1. Robin Warren y Barry Marshall.

Finalmente en 1994 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer de la OMS declara a *H. pylori* como un cancerígeno del grupo I en humanos (Stoicov y cols. 2004).

El género *Helicobacter* alberga a más de 15 especies, la mayoría aisladas de mucosas del tracto gastro-intestinal de diferentes hospederos (Tabla.1). Sin embargo, las especies descritas recientemente se han aislado de vías hepáticas e intestinales de diversos animales; *H. pylori* es la única especie que coloniza el epitelio gástrico humano (López-Brea, 2000, Murray y cols. 2000, Achtman y Suerbaum, 2001).

Tabla 1. Especies de *Helicobacter* y su localización en determinados hospederos.

Especie	Hospederos	Localización
<i>H. pylori</i>	Hombre	Estómago
<i>H. felis</i>	Gato y perro	Estómago
<i>H. mustelae</i>	Hurón	Estómago
<i>H. acinonyx</i>	Leopardo	Estómago
<i>H. nemestrinae</i>	Mono	Estómago
<i>H. cinaedi</i>	Hombre y roedores	Intestino
<i>H. muridarum</i>	Ratas y ratones	Intestino
<i>H. rappini</i>	Hombre, oveja y perros	Intestino, estómago e hígado
<i>H. bilizozeroni</i>	Perro	Estómago
<i>H. canis</i>	Perro	Intestino
<i>H. pullorum</i>	Pollos	Intestino
<i>H. pametensis</i>	Cerdos y gaviotas	Intestino
<i>H. bilis</i>	Ratones	Intestino
<i>H. cholecytus</i>	Hámster	Intestino
<i>H. rodentium</i>	Ratones	Intestino
<i>H. hepaticus</i>	Ratones	Intestino
	Humanos	Vías biliares
<i>H. fennelliae</i>	Humanos	Intestino
<i>H. canadensis</i>	Humanos	Intestino
<i>H. heilmannii</i>	Humanos	Intestino

2.2 Epidemiología. La infección por *H. pylori* es la infección crónica mas común en todo el mundo, ya que ésta, afecta a mas del 50 % de la población mundial, con una prevalencia mayor en los países en vías de desarrollo que en los ya desarrollados (González y cols. 2004). En Estados Unidos se observa una incidencia anual de la infección de 0.5-1.0 % en

niños menores de 10 años, aumentando hasta un 50 a 60% en los adultos con una edad promedio de 60 años (Stoicov y cols. 2004, González y cols. 2004). Sin embargo, en países en desarrollo como el nuestro; la frecuencia de la infección por *H. pylori* es de hasta el 90% en adultos jóvenes, encontrando que aproximadamente el 30% de la población infantil menor de 10 años ya presentan anticuerpos contra la bacteria, diversos estudios epidemiológicos muestran que la infección en países en vías de desarrollo se adquiere en la niñez y que probablemente la adquisición de la infección a edad temprana es un factor predisponente para el desarrollo de la enfermedad (Torres y cols. 2000, González-Valencia y cols. 2000).

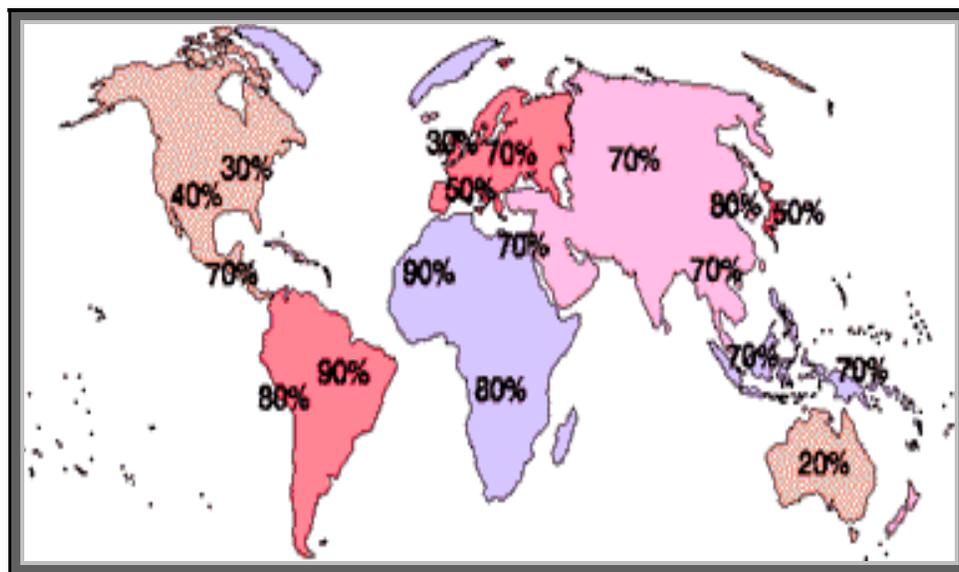


Figura 2. Distribución de *H. pylori* en el mundo.

En un estudio seroepidemiológico hecho en México (Torres y cols. 1998), se realizó el escrutinio de la presencia de anticuerpos IgG específicos contra antígenos totales de *H. pylori* por el método de ELISA. La detección de anticuerpos se hizo con un total de 11 600 sueros, pertenecientes a un banco de sueros de la Secretaria de Salud, las muestras provenían de personas de todos los estados de la República, cuya edad fluctuaba entre los 6 meses a los 90 años. El análisis mostró que el 20% los sueros provenientes de niños menores de un año de edad, presentaron anticuerpos contra *H. pylori*, la seropositividad aumentó hasta un 50 % en los sueros de niños menores de 10 años de edad, alcanzando un 80 % en los sueros provenientes de jóvenes de 25 años (Torres y cols. 1998).

Actualmente ya se han establecido algunos de los factores de riesgo para adquirir la infección por el microorganismo, como son: la edad, el nivel socioeconómico bajo, el hacinamiento, la promiscuidad, la vivienda insalubre, el deficiente suministro de agua potable y la baja escolaridad (Torres y cols. 2000, Torres y cols. 1998, González-Valencia y cols. 2000).

2.3 Cuadro Clínico. Desde su descubrimiento hasta la fecha hay evidencia suficiente de que *H. pylori* es el agente etiológico del 90 % de las úlceras duodenales y del 80 % de las úlceras gástricas (Otero, 2000).

La mayoría de los individuos afectados, incluyendo aquellos en edad pediátrica, son asintomáticos, sin embargo algunos individuos pueden desarrollar gastritis atrófica de tipo

B, úlcera péptica, adenocarcinoma ó linfoma gástrico. Al parecer, el desarrollo de cualquier patología gástrica esta asociada a la suma de varios factores provenientes del huésped, del ambiente y de las características genéticas de la bacteria.

La gastritis atrófica tipo B presenta dos fases: 1) la *fase aguda*, donde existe una intensa proliferación bacteriana y una respuesta inflamatoria gástrica, manifestándose en algunas personas, con un período transitorio de síntomas gastrointestinales inespecíficos, durante este período se desarrolla hipoclorhidria, la cual evoluciona por algunas semanas para presentarse la: 2) *fase crónica*, donde la respuesta inflamatoria es reducida a niveles bajos, pasando a un estadio estable, denominado gastritis crónica superficial difusa, la mucosa antral inflamada esta infiltrada con leucocitos mononucleares y polimorfonucleares (PMN) y termina produciéndose una atrofia y dilatación quística de las glándulas. En los casos graves el proceso se extiende en sentido proximal abarcando la mucosa del cuerpo y fondo gástricos (Ernst y cols. 2000, Buck, 1990). En algunos casos se presenta un proceso inflamatorio severo hasta el desarrollo de una gastritis que evoluciona a una úlcera, con lesiones atróficas que pueden terminar en metaplasia (reemplazo de células columnares por epitelio de tipo gástrico rico en mucina), displasia y finalmente a un adenocarcinoma (Ernst y cols. 2000, Marshall, 2002).

En niños se presenta dolor abdominal crónico, generalmente de localización epigástrica y con menos frecuencia periumbilical, acompañado de vómitos recurrentes, pérdida de peso y pirosis, el dolor se presenta en determinado tiempo al día (por ejemplo en las mañanas).

Histológicamente estos niños tienen con frecuencia una gastritis antral y sólo en un pequeño número de casos se detecta úlcera duodenal y excepcionalmente úlcera gástrica. Afecta al 10% de los niños (en un grupo de edades de 5-14 años) (Torres y cols. 2000, González y cols. 2004).

2.4 Transmisión. La vía de transmisión de *H. pylori* aún no se conoce claramente, pero lo común de la infección y su alta incidencia en los países en desarrollo, donde el nivel socioeconómico y las medidas de sanidad no son adecuados, se intuye que la ruta puede ser oral-fecal o oral-oral. La pre-masticación del alimento por mamás en Bangladesh y Etiopia esta asociada con un incremento en la prevalencia de la bacteria en los bebés de éstas, lo cual sugiere esta posible ruta de transmisión (oral-oral) (Frenck y Clemens, 2003). Otra probable ruta de infección es la iatrogénica que involucra el mal uso de tubos endoscópicos o artefactos que no son lavados y desinfectados adecuadamente en los hospitales y con ellos se realiza endoscopias sucesivas a otros pacientes (Frenck y Clemens, 2003, Aguilar y cols. 2001, Torres y cols. 2000).

2.5 Patogenia. *H. pylori* se asocia al desarrollo de gastritis atrófica tipo B y úlcera péptica (gástrica o duodenal) y es un factor de riesgo, tanto para el desarrollo de adenocarcinoma y linfoma gástrico (Ernst y cols. 2000, Marshall, 2002). El desarrollo clínico de la enfermedad parece depender de un número de factores, por ejemplo, el genotipo de la cepa que se encuentra infectando a la mucosa gástrica, la susceptibilidad del hospedero, la predisposición genética a desarrollar algunas patologías gástricas, la consanguinidad, el

consumo de tabaco y de alcohol, el alto contenido de sal y nitratos en la dieta, así como un bajo nivel socioeconómico, el residir en comunidades cerradas como orfanatos y estancia prolongada en hospitales, entre otros (Torres y cols. 2000).

H. pylori ingresa al estómago, la presencia de flagelos en uno de sus polos le confieren gran movilidad, atraviesa la capa de moco gruesa, permitiéndole llegar a las células epiteliales gástricas donde va a colonizar. Para poder sobrevivir en el ambiente gástrico el microorganismo produce una potente ureasa, esta enzima desdobla la urea de su alrededor produciendo bióxido de carbono y amonio, el amonio generado crea un microambiente neutro alrededor de la bacteria. Al llegar *H. pylori* a la célula gástrica se adhiere por medio de adhesinas que son proteínas que se expresan en su membrana externa. El hecho de que *H. pylori* colonice la mucosa gástrica va a desencadenar una respuesta inflamatoria de diferente grado, ésta puede ser de leve a severa, produciendo una gastritis superficial que en algunos casos puede evolucionar a gastritis atrófica a úlcera, a metaplasia y por último a un cáncer.

3. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

3.1 Morfología: *H. pylori* es un bacilo Gram negativo que mide 2.5 µm de largo y 0.5-1.0 µm de ancho, es de superficie lisa, microaerofílico (requiriendo para su crecimiento una atmósfera que contenga 10 % de CO₂, 5 % de O₂, 85 % de N₂), sus características bioquímicas sobresalientes son producir ureasa, catalasa y oxidasa. La forma microscópica

que presenta en cultivos frescos son bacilos pequeños, curvos, en espiral o bien pleomórficos, presenta 3 a 8 flagelos unipolares que le permiten tener una alta movilidad (en forma de sacacorchos) (Marshall, 2002, Murray y cols. 2003, Mobley y Hazell, 2001). Sin embargo, después de cultivos prolongados en medio sólido adquiere una forma cocoide, sugiriendo para algunos autores que es una forma de resistencia, y para otros que es un paso a la muerte (Mobley y Hazell, 2001).

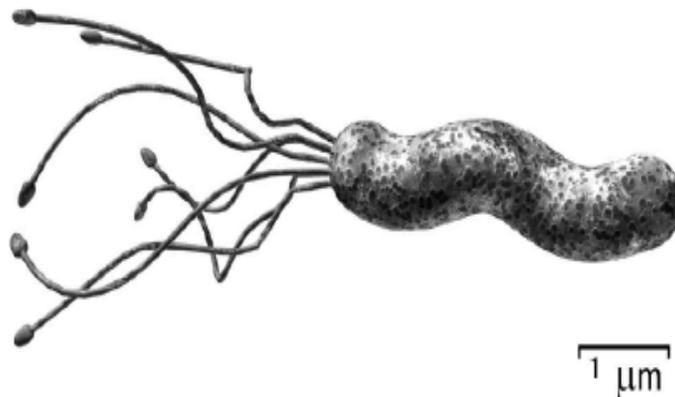


Figura 3. Imagen en 3D de *H. pylori*.

3.2 Cultivo: Debido a que es un microorganismo de crecimiento fastidioso requiere de medios artificiales (líquido o sólido) ricos en nutrientes como: peptona, triptona, extracto de levadura, glucosa y sales de cloruro de sodio o de bisulfito de sodio. Algunos medios recomendados para su crecimiento son: agar BHI, caldo Brucella, agar Columbia, agar de Skirrow, caldo Mueller-Hinton y Agar Base. Todos estos medios están suplementados con diferentes componentes como: suero fetal bovino, sangre de carnero desfibrinada, sarcosyl,

glicerol, almidón de maíz, emulsión de yema de huevo, entre otros. Cuando el aislamiento es a partir de biopsia gástrica se recomienda que el medio además lleve una mezcla de antibióticos (10.7 mg/L de ácido nalidíxico, 5 mg/L de anfotericina B, 10 mg/mL de trimetoprim, 10 mg/L de vancomicina, 3.3 mg/L de polimixina y 20 mg/L de bacitracina). Los cultivos se incuban en condiciones de microaerofilia que puede generarse con sobres formadores de CO₂ y N₂ como Campy Pak Plus (BBL) o en incubadoras con una concentración de 9.5 % CO₂ (Stevenson, 2000, Ho, 1993). *H. pylori* crece a una temperatura de 35-37 °C (Buck, 1990, Stevenson y cols. 2000, Ho y Vijayakumar, 1993).

La mayoría de las cepas tardan de 3 a 5 días en crecer, aunque algunos aislamientos requieren de 7 a 10 días de incubación, sobre todo cuando se trata del primer aislamiento (crecimiento a partir de homogenizado de biopsia gástrica). La identificación morfológica del crecimiento de *H. pylori* se basa en sus colonias pequeñas, circulares, convexas, lisas, translúcidas de 1-2 mm de diámetro, el realizar un frotis con tinción de Gram, para identificar su morfología y mediante las pruebas bioquímicas anteriormente descritas (Buck, 1990, Achtman y Suerbaum, 2001, López-Brea, 2000).

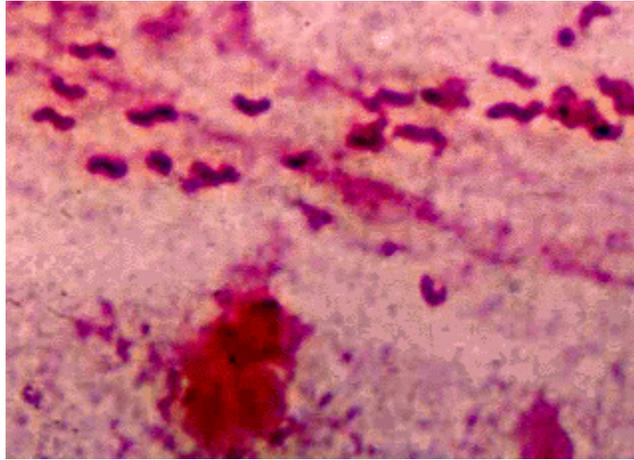


Figura 4. Morfología del microorganismo teñido con Tinción de Gram.

4. FACTORES DE VIRULENCIA

4.1 Ureasa. El jugo gástrico posee un pH de 2 a 3.5, dándole características de bactericida, por lo que es una defensa del cuerpo para eliminar a muchas bacterias que llegan al estómago. La clave para la sobrevivencia de *H. pylori* en este ambiente extremadamente ácido del lumen del estómago, es la producción de la enzima ureasa expresada en grandes cantidades por el microorganismo. La ureasa es una proteína que cataliza la hidrólisis de la urea produciendo amonio y dióxido de carbono, permitiendo a la bacteria neutralizar el pH ácido del estómago. La biosíntesis de la urea esta controlada por un grupo de 7 genes continuos: *ureABIEFGH*. Los genes *ureA* y *ureB* codifican para las subunidades estructurales de 26.5 kDa y 60.3 kDa respectivamente que forman la apoenzima multimérica de 550 kDa, esta apoenzima es formada por 5 subunidades de UreA y 6 de UreB organizadas en doble anillo de 3nm de diámetro. Los 4 genes accesorios: *ureE*, *ureF*, *ureG* y *ureH* codifican para proteínas UreE, UreF, UreG y UreH respectivamente, que son

responsables de la inserción y de la recepción del ion níquel (Ni^{2+}) en el sitio activo de la apoenzima (Ge y Taylor, 1999, Sachs y cols. 2003). La enzima es formada en el citoplasma, pasando al periplasma y a la superficie celular, donde es excretada a la luz del estómago (Ge y Taylor, 1999).

El gen *ureI* en *H. pylori* codifica para una proteína de membrana externa llamada UreI, esta proteína es específica para la urea. La proteína forma un canal a través de la membrana externa del microorganismo favoreciendo la entrada de la urea del exterior al citoplasma de la bacteria. La ureasa plasmática bacteriana hidroliza la urea, produciendo amonio en cantidades abundantes. El amonio generado en el citoplasma de la bacteria difunde a través de la membrana externa del microorganismo, provocando elevación del pH en el microambiente que rodea a *H. pylori*, lo que favorece la permanencia del microorganismo en el estómago del hospedero (Ge y Taylor, 1999, Mobley y Hazell, 2001).

La producción de amonio como resultado de la hidrólisis de la urea, actúa como factor quimiotáctico, activando a los PMN que liberan citocinas para activar a los monocitos, proceso que produce una respuesta inflamatoria localizada, lo que favorece el daño al epitelio y provoca licuefacción del moco gástrico, exponiendo indirectamente a la mucosa gástrica a la acción del pH ácido del estómago (Mobley y Hazell, 2001).

4.2 Lipopolisacárido (LPS). Se ha reportado que cepas de *H. pylori* presentan cadenas laterales de carbohidratos en el antígeno O que componen el LPS del microorganismo,

semejantes a los antígenos de Lewis “x” (Le^x) ó Lewis “y” (Le^y) u ambos, presentes en los grupos sanguíneos. Estudios recientes han reportado que el antígeno “O” del LPS de la cepa NCTC11637 de *H. pylori* es similar al antígeno de Lewis tipo “x” presente en el grupo sanguíneo tipo “O” y en la superficie de las células epiteliales gástricas, la cepa NO19 presenta antígeno de Lewis tipo “y”, mientras la cepa P466 expresa en su LPS ambos antígenos (Ge y Taylor, 1999).

Los antígenos de Lewis son glucoconjugados con diferentes residuos de fucosa que pueden ser de 4 tipos: Le^a, Le^b, Le^x, Le^y (Appelmeck y cols. 1998). Estos antígenos de Lewis presentan variación de fase, la cual está estimulada por el pH ácido del medio y por el tipo de antígeno que expresa la superficie de las células sanguíneas. Los genes involucrados en la variación de fase del antígeno de Lewis son dos: un gen glucosiltransferasa (*fucT*) y uno fucosiltransferasa (*fucT2*).

La respuesta inmune desencadenada por los antígenos de Lewis de la bacteria es dual, por un lado es de tipo autoinmune por estar dirigida contra los antígenos de Lewis expresados tanto por *H. pylori* como por los compartidos en las células eucarióticas. Por ejemplo, el antígeno tipo “y” es expresado en la superficie de los eritrocitos del grupo sanguíneo “O” y en la cadena β de las ATPasas H y K de la bomba de protones; el antígeno Lewis tipo “x” se expresa en el receptor CD15 presente en la superficie de neutrófilos, el reconocimiento de los anticuerpos contra Lewis en la superficie de los PMN favorece la llegada de las células inflamatorias al tejido epitelial (Appelmeck y cols. 1996).

Por otro lado, estos mismos antígenos de Lewis pueden crear un mimetismo molecular inmune entre los antígenos expresados por *H. pylori* y los de las células eucariotas, no desencadenando una respuesta inmune efectiva que ayude a eliminar a la bacteria, lo que favorece una evasión de la respuesta inmune en el momento de la colonización, favoreciendo su permanencia por largo tiempo (Appelmelck y cols. 1996).

4.3 Motilidad. La motilidad conferida por los flagelos es un factor esencial en la colonización de *H. pylori*. Le permiten deslizarse a través del moco gástrico para llegar a las células epiteliales gástricas dándole la capacidad de resistir las contracciones musculares del estómago. *H. pylori* normalmente posee de 3 a 8 flagelos unipolares los cuales están codificados por dos genes: *flaA* y *flaB* que codifican para dos unidades diferentes de flagelina: una de peso molecular de 53 kDa (FlaA) y una mayor de 54 kDa (FlaB). Además presenta genes accesorios que codifican para proteínas de ensamble (*flgE*, *fliK*, *fliD*), así como genes responsables de movimientos de rotación de los flagelos (*fliG*, *fliN*, *fliM* y *fliY*) (Marais y cols. 1999).

4.4 Adhesinas: La adherencia a la mucosa gástrica es un requisito para que *H. pylori* colonice y establezca una infección crónica. Esta adherencia ocurre mediante la interacción entre las adhesinas bacterianas, que son proteínas de membrana externa (OMP's) con los receptores presentes en las células epiteliales. Dentro de estas adhesinas está la HpaA que se une al receptor N-acetilneuraminlactosa, las adhesinas AlpA y AlpB para las cuales se desconoce su receptor; la adhesina BabA, que facilita la unión de *H. pylori* a el fucosilato de antígeno Lewis "b" que se encuentra en la superficie de las células epiteliales gástricas;

y SabA se une a los glucoconjugados fucosil y al ácido siálico los cuales son dímeros del antígeno de Lewis “x” presente en las células gástricas (Marais y cols. 1999, Mobley y Hazell, 2001).

4.5 Isla de patogenicidad *cag*. Es un segmento de DNA cromosomal de un tamaño aproximado de 40 kb, esta isla de patogenicidad esta formada por alrededor de 37 a 40 genes que codifica para proteínas del sistema de secreción tipo IV, las cepas que presentan la isla de patogenicidad se han asociado con el desarrollo de enfermedad gástrica. Sin embargo, solo aproximadamente el 60 % de las cepas poseen la isla de patogenicidad *cag* (PAI-*cag*). Las cepas de *H. pylori* presentan diferente organización estructural de esta isla, algunas cepas pueden presentar la isla insertada en el cromosoma bacteriano de manera continua, flanqueada en ambos extremos por secuencias repetidas directas; o bien en otras cepas, PAI-*cag* se puede encontrar dividida por una secuencia de inserción (IS606) en dos regiones *cagI* y *cagII*, ó bien dividida por un segmento de DNA cromosomal; otras cepas pueden presentar delección de alguna de las dos regiones de PAI-*cag*, presentándose la isla en forma parcial. Por ultimo otras cepas presentan la delección completa de la isla (Mobley y Hazell, 2001, Marais y cols. 1999). Estas variaciones en su estructura explican la existencia de cepas PAI-*cag*⁺ (positivas) y cepas PAI-*cag*⁻ (negativas) (Mobley y Hazell, 2001).

4.6 Proteína CagA. Otro factor de virulencia es la proteína asociada a la citotoxina (CagA), la cual esta codificada por el gen *cagA* que se encuentra localizado al final del extremo 3' de la PAI-*cag* (Marais y cols. 1999). La proteína tiene un peso molecular que varía entre 120-140 kDa, esta proteína es altamente inmunogénica y desencadena la

producción de anticuerpos identificables por serología (Marshall 2002). La expresión de CagA esta asociada con úlcera péptica (Achtman y Suerbaum, 2001). Aproximadamente el 60% de las cepas expresan la proteína. Dentro de la célula del hospedero, CagA sufre una fosforilación en un residuo de tirosina, localizado en la región carboxilo terminal de la proteína en una secuencia de repetición denominada EPIYA, la fosforilación de la proteína es llevada a cabo por una cinasa de la célula del hospedero. CagA provoca cambios en el citoesqueleto de la célula epitelial, por la interacción con Arp 2/3 y N-WASP (complejos para la polimerización de la actina) mediados por una GTPasa (Mobley y Hazell, 2001). Otro efecto de la proteína CagA es la inducción de interleucina-8 (IL-8), una citocina proinflamatoria que causa infiltración de neutrófilos en el sitio de la infección. El resultado de este proceso es una respuesta inflamatoria severa relacionada con cepas CagA⁺. Las cepas que expresan la proteína CagA se asocian con el desarrollo de gastritis crónica atrófica, úlcera péptica y con adenocarcinoma gástrico en los pacientes infectados con *H. pylori*, mientras las cepas que no expresan la proteína no producen cambio dramático en la mucosa gástrica (Mobley y Hazell, 2001). El análisis del extremo 3' del gen *cagA* permitió identificar 4 alelos de este gen, designados tipo A, B, C y D. Estos 4 tipos de alelos presentan una diferencia en la organización estructural, ya que varían en el número de regiones repetidas denominadas R1, R2 y R3. Las cepas tipo C desencadenan altos niveles de anticuerpos anti-CagA, en pacientes con cáncer gástrico y úlcera gástrica (Yamaoka y cols. 1998).

4.7 Citotoxina vacuolizante. La citotoxina vacuolizante (VacA) juega un papel muy importante en la patogénesis de *H. pylori*, estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que la

citotoxina produce vacuolización citoplásmica en líneas celulares de mamíferos y en las células epiteliales de mucosa gástrica de humanos (Atherton y cols. 1997), además, cuando es administrada a ratones por vía oral provoca ulceración en la mucosa gástrica (Atherton y cols. 1994). La citotoxina interactúa con células del sistema inmune como linfocitos T, linfocitos B y macrófagos, además con la presentación de antígeno en células B (Fischer y cols. 2004), inhibe la fusión fago-lisosoma en macrófagos, bloquea la maduración de endosomas para el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II (Fischer y cols. 2004).

VacA está codificada por el gen *vacA* localizado en el cromosoma de *H. pylori*, presente en una sola copia, tiene aproximadamente 3864 pb. Este gen, presenta 5 marcos abiertos de lectura, pero solo uno es funcional para la codificación de la citotoxina vacuolizante. Aunque el gen *vacA* esta presente en todas las cepas, sólo del 50 al 60 % de ellas expresan una citotoxina funcional (Marshall, 2002). La citotoxina vacuolizante está codificada como una protoxina de 140 kDa, la cual presenta 3 dominios funcionales (Cover y cols. 1994): 1) uno de ellos es el péptido señal de 33 aminoácidos (de 3 kDa), 2) un monómero funcional de 87 kDa y 3) un dominio carboxilo terminal de 50 kDa, que se inserta en la membrana externa del microorganismo actuando como un autotransportador (Nguyen y cols. 2001, Cover y cols. 1994). La protoxina sufre ruptura en las porciones amino y carboxilo terminal al pasar a través de la membrana interna y externa del microorganismo respectivamente, permaneciendo el monómero funcional de aproximadamente 90 kDa, la toxina madura esta constituida por 6 ó 7 de estos monómeros, que al unirse forman una estructura que asemeja una flor de 6 pétalos con un centro de 30 nm. de diámetro (Marais y cols. 1999,

Ilver y cols. 2004). Cada monómero presenta un asa expuesta flexible, propensa a una ruptura proteolítica que la divide en dos subunidades, una de 37 kDa (p37) y otra de 58 kDa (p58) (Ilver y cols. 2004, Papini y cols. 2001). Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual cada uno de los monómeros se rompe y si esto es de utilidad para la toxina vacuolizante, varios estudios han demostrado que estas subunidades deben de permanecer unidas para la actividad de la citotoxina (Ilver y cols. 2001). (Figura 6a)

El mecanismo propuesto para VacA, es el que presentan las toxinas tipo AB de las bacterias Gram negativas, donde las subunidades B (p58) son responsables del reconocimiento de un receptor en la superficie de las células epiteliales (Tombola y cols. 1999, Szabo y cols. 1999). Uno de los receptores propuesto, es el receptor del factor de desarrollo epidermal (EGF), además, de una proteína de 140 kDa aun no caracterizada (Papini y cols. 2001, Cover y Blank, 2005). La subunidad A completa (p37) junto con una pequeña región amino terminal de la subunidad p58 (150 aminoácidos) presentan la actividad citotóxica (Ilver y cols. 2004). Algunos estudios muestran que cuando VacA es expuesta a pH ácido (1.5) o bases débiles como cloruro de amonio sufre cambios conformacionales e incrementa en su superficie la exposición de amino ácidos hidrofóbicos capaces de interaccionar con la cadena de fosfolípidos de la membrana de las células gástricas y de esta forma la proteína puede ser endocitada por las células parietales (Bernard y cols. 2004, Montecucco y Bernard, 2003).

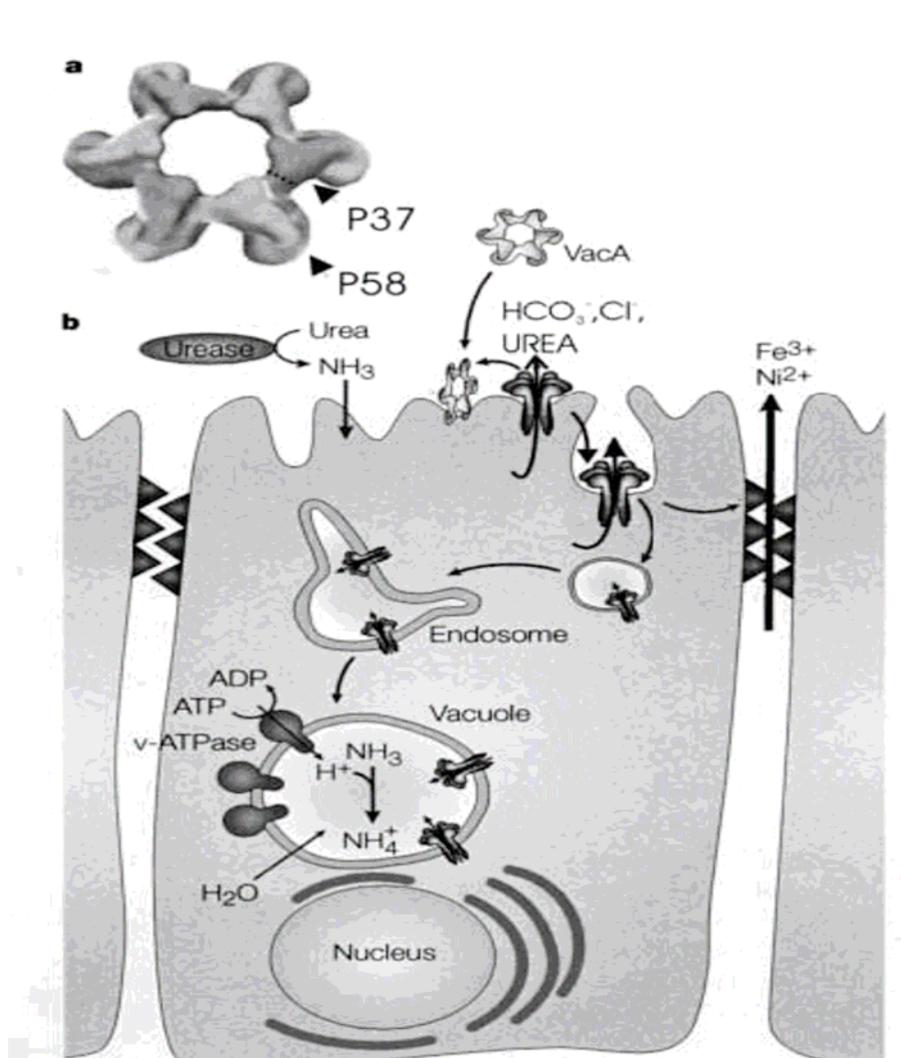


Figura 5. Mecanismo de acción de VacA (Bernard y cols. 2004).

Las vacuolas inducidas por VacA son acidicas y contienen marcadores de proteínas de membrana de los endosomas tardíos y de los lisosomas, la acidificación de las vacuolas es esencial para su formación, engrandecimiento y su preservación, la acidificación es debido a la actividad de una bomba de protones una ATPasa vacuolar (V-ATPasa) sobre la membrana de la vacuola (Papini y cols. 2001, Cover y Blanke, 2005), la biogénesis de la vacuola requiere Rab7 activa, una GTPasa pequeña de los endosomas tardíos (Cover y

Blanke, 2005, Szabo y cols. 1999). VacA induce rearrreglos considerables en la organización de los endosomas tardíos y lisosomas, con fusión de las membranas y el hinchamiento, produciendo alteraciones graves en la fisiología de la célula (Figura 5) como: i) una marcada disminución de la actividad proteolítica dentro de la vía endocítica, incluyendo la proteólisis de antígenos en los compartimientos procesadores de antígeno de las células presentadoras de antígeno, estos compartimientos procesadores se encuentran básicamente en los endosomas tardíos y los lisosomas que se fusionan con la membrana plasmática; ii) alteración marcada del tráfico de proteínas de la red Trans-Golgi a los endosomas tardíos. La degradación de proteínas es una función celular esencial que permite la remoción de proteínas no funcionales de la membrana celular y de ligandos extracelulares con la reutilización de amino ácidos (Papini y cols. 2001, Cover y Blanke, 2005, Bernard y cols. 2004). La inhibición del procesamiento y presentación de antígeno inducidos por VacA pudiera ser parte de la estrategia de la sobrevivencia de *H. pylori*.

4.7.1 gen *vacA*. . Como se mencionó anteriormente la citotoxina vacuolizante (VacA) esta codificada por el gen *vacA*.

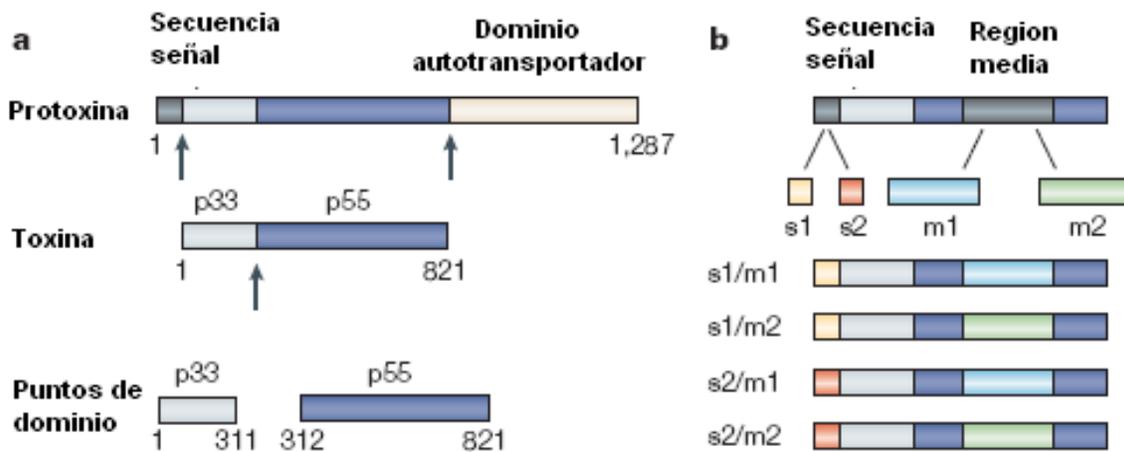


Figura 6. a) Esquema de la proteína VacA y b) Gen *vacA* de *H. pylori*

En 1994 Cover y cols. reportaron la secuencia completa del gen *vacA* de la cepa 60190 con actividad citotóxica (tox+) y de la cepa 87-203 sin actividad citotóxica (tox-), demostrando que ambas cepas difieren en su secuencia de nucleótidos y en los niveles de expresión de la citotoxina. Además identificaron una región adyacente localizada corriente arriba del extremo 5' del gen *vacA* de aproximadamente 567 pb que corresponde al gen de *RNAI* de la cisteína-sintetasa, homólogo al de *E. coli*. En este estudio el análisis de un fragmento de 1541 pb del gen *vacA* de la cepa 60190 y de 87203, mostró una identidad del 64.8 % en las secuencias de nucleótidos entre ambas cepas (Cover y cols. 1994).

En 1995 Atherton y col., analizaron una región de 0.73 Kb que correspondió a la región media del gen *vacA*, de 10 cepas de *H. pylori* con diferente actividad citotóxica. Esta región fue marcadamente diferente entre las cepas tox- y tox+ (70.4 % de identidad en nucleótidos y 58.7 % de homología en aminoácidos), con el análisis de las secuencias, se diseñaron iniciadores específicos para la amplificación por PCR (VA3-F, VA3-R, VA4-F y

VA4-R) de la region media permitiendo clasificar a las cepas en dos familias de alelos: m1 (para cepas con actividad citotóxica) y m2 (para cepas sin actividad citotóxica). Las cepas m1 dan un producto de amplificación de 290pb y las cepas m2 producen un producto de PCR de 352 pb (Atherton y cols. 1995). (Figura 6b)

También en este estudio analizaron un fragmento de 0.5 kb, que correspondía a la secuencia señal. El análisis de aminoácidos entre cepas tox + y tox - determinó que hay una homología en los 25 primeros residuos de aminoácidos entre cepas vacuolizantes y no vacuolizantes. El análisis de la secuencia de nucleótidos de esta region entre las diferentes cepas, permitió el diseño de iniciadores específicos para amplificar por PCR la secuencia señal del gen *vacA* de *H pylori* (VA1F y VA1R) con lo que se pudo diferenciar la secuencia señal de la cepa en tipo s1 y s2, con respecto a su tamaño de amplificación, obteniéndose productos de 259 y 286 pb respectivamente. (Figura 6b) Para lograr una mejor caracterización entre los alelos de la secuencia señal, Atherton y cols. diseñaron nuevos iniciadores (SS1F, SS2F y SS3-F) derivados de la región variable de la secuencia señal, permitiendo hacer una subclasificación por PCR en tres familias de alelos entre las cepas: alelo tipo s1a, s1b y s2, con productos de amplificación de 190 pb, 187 pb y 199 pb respectivamente (Atherton y cols. 1995).

Region amplificada	Nombre del iniciador	Secuencia del primer	Tamaño del producto de PCR, localización en pb
m1	VA3-F	5'GGTCAAAATGCGGTCATGG 3'	290 pb (2741-3030)
	VA3-R	5'CCATTGGTACCTGTAGAAAC 3'	
m2	VA4-F	5'GGAGCCCCAGGAAACATTG 3'	352 pb (976-1327)
	VA4-R	5'CATAACTAGCGCCTTGAC 3'	
s1	VA1-F	5'ATGGAATACAACAAACACAC 3'	259 pb (797-1055)
	VA1-R	5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC 3'	
s2	VA1-F	5'ATGGAATGCAACAAACACAC 3'	286 pb (284-596)
	VA1-R	5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC 3'	
s1a	SS1-F	5'GTCAGCATGACACCGCAAC 3'	190pb (866-1055)
s1b	SS3-F	5'AGCGCCATGCCGCAAGAG3'	187 pb
s2	SS2-F	5'GCTAACACGCCAAATGATCC 3'	199pb (371-569)

Tabla 2. Iniciadores empleados en la caracterización de los alelos del gen *vacA*. (Atherton y cols. 1995)

La existencia de diferentes alelos s y m del gen *vacA*, permitió genotipificar a las cepas en cepas tipo s1a/m1, s1b/m1, s1a/m2, s1b/m2, s2/m1 y s2/m2 del gen *vacA*. Atherton y col., en este mismo trabajo relacionaron el genotipo de *vacA* y la actividad vacuolizante *in vitro*, que presentaron las cepas, utilizando monocapas de células HeLa. Los autores reportaron las cepas con genotipo s1a/m1 presentaron mayor actividad citotóxica, mientras las cepas s1b/m1, s1a/m2 y s1b/m2 presentaron actividad citotóxica media y las cepas s2/m2 no presentaron alguna actividad. Sin embargo, en este trabajo Atherton y cols. no reportaron la presencia del genotipo s2/m1 entre sus cepas. Así mismo reportaron cepas con genotipo s1a/m1 aisladas con mayor frecuencia de pacientes con úlcera péptica, mientras que las cepas s1b/m1 se aislaron de pacientes con gastritis y las cepas con genotipo s2/m2 de pacientes asintomáticos.

Además señalaron que el tipo s1 de secuencia señal del gen *vacA* es responsable del grado de inflamación (infiltración de neutrófilos y linfocitos) en la mucosa gástrica, mientras que la región media m1 es responsable del daño al tejido epitelial (degeneración epitelial, depleción de moco y erosiones microscópicas de tejido) (Atherton y cols. 1997).

Morales-Espinosa y cols., en 1999, estudiaron una población de 26 pacientes mexicanos con infección de *H. pylori* y diferentes patologías gástricas (úlcera péptica gástrica o duodenal, gastritis y asintomático). El estudio consistió en caracterizar un promedio de 10 colonias individuales de *H. pylori* aisladas de antro y de cuerpo gástrico de cada uno de los pacientes, los autores reportaron por primera vez, que los pacientes mexicanos presentaron infección múltiple con cepas de *H. pylori* con diferentes genotipos de *vacA*, independientemente de la patología gástrica y del lugar de aislamiento (antro o cuerpo), más del 70 % de las cepas fueron del genotipo s1b/m1, seguido en frecuencia del genotipo s2/m2 con un porcentaje del 25 %, y el genotipo s1a/m1 de *vacA* solo fue detectado en el 10% de las cepas. Sin embargo hubo un 5 % de cepas aisladas de 7 pacientes que no pudieron ser caracterizadas utilizando los iniciadores específicos propuestos por Atherton. Además, se reportó por primera vez aislamientos de *H. pylori* con el genotipo s2/m1 (Morales-Espinosa y cols. 1999).

Actualmente, otros estudios realizados en otros países han reportado la falta de caracterización de la secuencia señal o de la región media del gen *vacA* con el método propuesto por Atherton, en algunas cepas aisladas de sus poblaciones de estudio. La

secuenciación de ambas regiones en estas cepas, ha llevado al diseño de nuevos iniciadores para caracterizar las cepas no tipificables por el esquema de Atherton, encontrando nuevas familias para la región media: como la m3 reportadas en cepas de población de Alemania y Bélgica (Strobel y cols. 1998, Shan-Rui y cols. 1998); los alelos de la región media m1a, m1b, m2a y m2b en poblaciones de Asia (Van Doorn y cols. 1998, Pan y cols. 1998); predominando ciertos genotipos en determinadas áreas geográficas como son los genotipos m1a y m2a en el Sur y los genotipos m1b y m2b en el Este de Asia (Van Doorn y cols. 1998). De igual manera, se ha reportado un nuevo genotipo de alelo de la secuencia señal s1c, el cual es más frecuente en el Este de Asia (Van Doorn y cols. 1998, Pan y cols. 1998).

Todos estos estudios muestran que existe mayor variabilidad genética en ambas regiones de este gen, como a lo largo del cromosoma de *H. pylori*, hecho que se ha documentado con la secuenciación de los genomas de dos cepas de *H. pylori* (cepas 26690 y J99). En estudios previos usando diferentes técnicas de biología molecular como RAPD (random amplification of polymorphic DNA), huellas de DNA (fingerprint), electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), electroforesis en campos pulsados (PFGE), y secuenciación de genes individuales, entre otros, han demostrado que el contenido de genes es variable, el rearrreglo cromosomal observado entre cepas es diferente y que hay cepas con presencia ó ausencia de la isla o de zonas de plasticidad.

5. HIPOTESIS

La diversidad genética en la región secuencia señal del gen *vacA* es mayor a la mostrada por el esquema de tipificación por PCR iniciador-específico-de alelo, propuesto por Atherton, que caracteriza a esta región en tres familias s1a, s1b y s2.

6. OBJETIVOS

6.2 OBJETIVO GENERAL

Demostrar que la region secuencia señal del gen *vacA* de *H. pylori* presenta mayor diversidad genética a la actualmente descrita por el método de caracterización por PCR con iniciador específico de alelo.

6.3 OBJETIVOS PARTICULARES

6.3.1 Demostrar por RFLP, que existe una mayor variabilidad genética en la región secuencia señal del gen *vacA* de *H. pylori*.

6.3.2 Determinar si existe una asociación entre el tipo de secuencia señal caracterizada por el método PCR-iniciador específico de alelo, con algún (os) patrón (es) de restricción, utilizando el método de RFLP-PCR, en la región secuencia señal del gen *vacA* de cepas de *H. pylori*.

6.3.3 Completar la caracterización de la secuencia señal (ss) del gen *vacA* de las cepas de *H. pylori*, que no fueron caracterizadas con el uso de los iniciadores específicos de alelos, propuestos por el esquema de Atherton, utilizando un nuevo iniciador derivado del análisis de la secuenciación de esta región.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo de tesis fue desarrollado en el Laboratorio de Epidemiología Molecular y Genómica bacteriana del Edificio de Investigación de la Facultad de Medicina. Ciudad Universitaria. UNAM.

7.1 Población de estudio, cepas, cultivo e identificación. Se trabajó con un total de 50 cepas de *H. pylori* que pertenecientes al banco de cepas del laboratorio de Epidemiología Molecular y Genómica Bacteriana. Treinta y un cepas fueron previamente aisladas de biopsia gástrica de 12 niños que presentaron dolor abdominal crónico, y de las cuales, en su mayoría, no pudieron ser caracterizadas con respecto a su secuencia señal utilizando el esquema propuesto por Atherton y cols.1995. Trece cepas fueron aisladas de pacientes adultos con diferentes patologías gástricas y completamente caracterizadas como genotipo s1b, en el estudio previo. Seis cepas fueron utilizadas como control para cada uno de los alelos, las cepas tipo 8823 y 26695 presentan el genotipo s1a-m1 del gen *vacA*, las cepas 8822 y 86613 con el genotipo s2-m2 de *vacA* y las cepas 84183 y J99 del genotipo s1b-m1. Las cepas previamente congeladas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en medio de conservación (Apéndice 2), fueron descongeladas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, para tomarse una alícuota de $50\text{ }\mu\text{L}$ de cada una de las cepas y depositarse en placas de Agar Sangre, (agar soya trpticasa suplementado con 5% sangre de carnero desfibrinada y una mezcla de antibióticos: 10.7 mg/L de ácido nalidíxico, 5.0 mg/L de anfotericina B, 5 mg/L de trimetoprim, 10 mg/L de vancomicina, 3.3 mg/L de polimixina y 20 mg/L de bacitracina) para su crecimiento. Las placas se incubaron en una incubadora de CO_2 , (9.5% de CO_2), a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 a 7 días.

Se confirmó la pureza del cultivo con la inspección macroscópica de las colonias: las cuales fueron pequeñas translúcidas convexas y de bordes regulares. Se realizó a cada cultivo frotis y tinción de Gram, observando la presencia de bacilos pequeños curvos gram-negativos, además se les realizaron las pruebas bioquímicas de ureasa, oxidasa y catalasa que resultaron positivas.

7.2 Extracción de DNA. Se cosecho una placa completa de cada cepa con un desarrollo de 48-72 horas, en 500 μ L de solución salina isotónica contenida en un tubo Eppendorf, posteriormente el cultivo se centrifugó para compactar el paquete bacteriano. La extracción del DNA se hizo por el método de tiocianato de guanidina y sarcosyl (GES) (Apéndice 2).

7.2.1 Breve descripción de la técnica

- 1.- La pastilla bacteriana contenida en el tubo Eppendorf se resuspendió en 100 μ L de buffer TE (Buffer tris-EDTA pH 8.0)
- 2.- Las bacterias fueron lisadas, adicionando 500 μ l de GES (Apéndice 2), el tubo se agitó suavemente con la finalidad de homogenizar su contenido, dejándolo a temperatura ambiente durante 5 minutos e inmediatamente después se depositó en hielo.
- 3.- Posteriormente, se le adicionó 250 μ L de acetato de amonio a una concentración de 7.5 M e incubándose el tubo en hielo por 5 minutos, con la finalidad de precipitar los

componentes orgánicos de la bacteria. Durante el transcurso de la incubación se tuvo la precaución de estar invirtiendo el tubo constante y suavemente.

4.- Al terminar el periodo de incubación en hielo, se agrego a la mezcla 850 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico, permaneciendo el tubo a temperatura ambiente durante 15 minutos (durante este periodo el contenido del tubo se mezclo constantemente por inversión), después el tubo fue centrifugado a 13 000 rpm (máxima velocidad) por 3 minutos. Al final de la centrifugación se observó la formación de tres fases, el DNA permaneció en la fase acuosa (parte superior).

5.- Inmediatamente se procedió a remover la fase acuosa (aproximadamente 600 μ L), la cual fue transferida a otro tubo Eppendorf limpio.

6.- El DNA fue precipitado con un volumen de 0.54 X de isopropanol (324 μ L), a temperatura ambiente durante 5 minutos.

7.- Posteriormente se centrifugo el tubo a 13 000 rpm (máxima velocidad) durante 3 minutos observando un botón de DNA en el fondo.

8.- Finalmente, el isopropanol fue desechado invirtiendo el tubo cuidadosamente, efectuando dos lavados consecutivos con etanol al 70 % (500 μ L en cada lavado), y dejando secar el DNA a temperatura ambiente.

9.- El botón de DNA se resuspendió en 100 μ L de agua para PCR.

10.- Por último el DNA se almaceno a -20° C, para usarlo en ensayos posteriores.

7.3 Caracterización del genotipo s1 ó s2 de la secuencia señal del gen *vacA* de las cepas de *H. pylori*. Se caracterizó la secuencia señal del gen *vacA* de un total de 50 cepas

H. pylori. La caracterización se realizó usando los iniciadores conservados descritos por Atherton y cols. (1995) VA1-F 5' ATGGAAATACAACAAACACAC 3' (forward) y VA1-R 5' CTGCTTGAATGCGCCAAAC 3' (reverse) (Tabla 2).

7.4 Preparación de la mezcla maestra para llevar a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se preparó una mezcla maestra para la realización de la PCR, agregándose cada componente en el orden que se describe en el protocolo y que consistió en lo siguiente: 17.95 µL de agua para PCR, 2.5 µL de buffer 10X sin MgCl₂ (Invitrogen), 0.75 µL de MgCl₂ a 50mM (Invitrogen), 0.5 µL de dNTP's preparados a una concentración de 10 mM (Invitrogen), 1 µL de cada iniciador preparados a una concentración de 20 pmol, 0.3 µL de Taq DNA polimerasa (Invitrogen) y 1µL de DNA de la muestra.

Las condiciones de temperatura del protocolo de PCR fueron: 94 °C por 1 minuto, 52 °C por un minuto y 72 °C por un minuto repitiendo el programa por 35 ciclos. Se utilizó un termociclador MJ-Research PTC 200

Los productos de PCR fueron corridos por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1 %, y teñido con bromuro de etidio (Apéndice 2). Los productos de PCR fueron visualizados en un transiluminador con luz UV.

7.5 Caracterización de la secuencia señal del gen *vacA* por el método RFLP. Se bajaron las secuencias de nucleótidos de la secuencia señal del gen *vacA* de las cepas de *H. pylori*, reportadas en la base de datos del GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). Se realizó

un análisis *in silico* de los perfiles de restricción de los diferentes tipos de secuencia señal de gen *vacA*, con la finalidad de determinar cual fue la enzima que nos diera un mejor perfil discriminatorio entre las diferentes secuencias señal.

Cada uno de los amplificados obtenidos por PCR con los iniciadores conservados fue cortado con la enzima *Hinf I*, esta enzima reconoce la secuencia de bases G*ANTC, el asterisco indica el sitio de corte de la enzima, utilizando el siguiente protocolo:

Agua PCR (GIBCO)	11.5 μ L
Buffer de la enzima (Invitrogen)	2.5 μ L
<i>Hinf I</i> (Invitrogen)	1.0 μ L
Producto de PCR	10 μ L

La mezcla fue realizada en hielo y posteriormente se colocó en baño María a 37 °C dejándose incubar toda la noche.

Después del tiempo de incubación, la digestión de los productos de PCR fueron corridos en cámara de electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 12 % (Apéndice 2), teniendo el cuidado de colocar las muestras en pares (en el primer pozo 5 μ L del producto sin digerir como control y en el siguiente pozo 5 μ L de su producto digerido), además en cada uno de los pozos de los extremos (enmarcando las muestras) se colocó 5 μ L del marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogene). Los geles se corrieron a 100 Volts durante 6 horas y posteriormente se fijaron durante toda la noche con solución fijadora (50% de etanol + 5% de ácido acético). Terminado el tiempo de fijación, los geles fueron lavados cuatro veces (cada tiempo de lavado de aproximadamente 45 minutos) con agua desionizada para eliminar residuos de etanol y ácido acético. (Apéndice 2). Los geles se tiñeron con el kit gel code silver satín siguiendo las indicaciones del proveedor. Este método esta basado en

la reducción del ión plata, a plata metálica, a continuación se describe brevemente la técnica.

- El gel fue depositado en solución de plata durante 30 minutos
- Posteriormente, fue lavado con agua desionizada.
- Se le agregó la solución reductora (preparando por partes iguales la solución aldehído y la base reductora) dejándola por 5 minutos.
- Se procedió a lavar con agua desionizada.
- Y se le adicionó la solución estabilizadora permaneciendo con ella durante 40 minutos.

Los tiempos de cada paso varían de acuerdo al tamaño del gel (ver Apéndice 2)

Finalmente los geles se analizaron por densitometría en el programa Bio Image Whole Band Analyzer Tutorial, este programa analiza las imágenes en una dimensión, obteniéndose los pesos moleculares de cada una de las bandas de la restricción, con base en los pesos moleculares del marcador de peso molecular empleado de 100pb (Invitrogene).

7.6 Determinación del tipo de subfamilia de la secuencia señal del gen *vacA* en las cepas de *H. pylori*, no caracterizadas como s1a, s1b ó s2, (utilizando un nuevo iniciador). Las cepas caracterizadas como genotipo s1 y s2 de *vacA*, se subtipificaron nuevamente con los iniciadores específicos para los alelo s1a, s1b y s2 utilizando los iniciadores previamente descritos por Atherton y cols. 1995 (Tabla 2). Con la finalidad de completar las subtipificación de las cepas se utilizo un nuevo iniciador [asignado **SS5-F** 5' AGCGCCATGCCGCAACAA 3' (forward)] diseñado por la Dra. Morales con base a el

análisis de la secuencia de nucleótidos de cuatro cepas secuenciadas y aisladas de niños con dolor abdominal crónico, las cuales no pudieron ser caracterizadas previamente con el uso de los iniciadores específicos de alelos. Con el nuevo iniciador **SS5-F** se utilizó el iniciador **VA1-R** [5' CTGCTTGAATGCGCCAAAC 3' (reverse)], previamente reportado por Atherton y cols. La mezcla de reacción y el protocolo de la PCR fueron hechas de igual manera como se describe en la sección de caracterización del genotipo s1 y s2 con los iniciadores conservados. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1% bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

8. RESULTADOS

8.1 Caracterización del genotipo s1 ó s2 de la secuencia señal del gen *vacA* de las cepas de *H. pylori*. Todas las cepas fueron caracterizadas como genotipo s1 ó s2 utilizando los iniciadores conservados **VA1F/VA1R** diseñados por Atherton y col. (1994). Estos iniciadores permitieron diferenciar entre los alelos s1 y s2 de la secuencia señal de acuerdo al tamaño molecular de cada uno de los productos (s1 con un tamaño de 259 pb y s2 de 286 pb). De las 31 cepas aisladas de niños, solo 6 cepas (19%) fueron caracterizadas como alelo s2 y las 25 cepas (81%) restantes fueron caracterizadas como s1. Las 13 cepas aisladas de pacientes adultos con diferentes patologías gástricas y previamente caracterizadas como genotipo s1b, fueron caracterizadas con estos iniciadores conservados como s1. Con respecto a la caracterización de las seis cepas de referencia y control: las cepas 8823, 26695, 84183 y J99 confirmaron ser del genotipo s1 de la secuencia señal de *vacA* y las cepas 8822 y 86613 del genotipo s2.

8.2 Determinación del tipo de subfamilia de la secuencia señal del gen *vacA* de cepas de *H. pylori* no caracterizadas como s1a, s1b ó s2, (utilizando un nuevo iniciador). La caracterización de la subfamilia de la secuencia señal del gen *vacA* de las 50 cepas de *H. pylori*, con los iniciadores específicos de alelo descritos previamente por Atherton (Tabla 2) mostró: que de las 31 cepas aisladas de niños, 6 (19.35%) cepas fueron caracterizadas como s2 con los iniciadores conservados y fueron nuevamente caracterizadas como alelos s2 con los iniciadores específicos de alelo. Once cepas (35.48%) de niños caracterizadas como s1 con los iniciadores conservados, fueron tipificadas como s1b con los iniciadores específicos de alelo y otras 14 cepas (45.16%) caracterizadas como s1 con los iniciadores conservados,

no pudieron ser nuevamente caracterizadas utilizando los iniciadores específicos de alelo s1a, s1b y s2 propuestos por Atherton y cols. Por lo que, para determinar el alelo de la secuencia señal de éstas cepas se empleo el nuevo iniciador **SS5-F** [5´ AGCGCCATGCCGCAACAA 3´ (forward)] diseñado en el laboratorio a partir de las cuatro cepas de niños secuenciadas. Estas 14 cepas aisladas de niños lograron ser caracterizadas completamente con este juego de iniciadores, las cuales produjeron un producto de amplificación de 190 pb, lo que sugiere la presencia de una nueva familia de secuencia señal del gen *vacA*, a la cual denominamos s1d (Figura 7).

La caracterización de las 6 cepas de referencia, como control de cada uno de los alelos de la secuencia señal del gen *vacA* confirmo la correcta tipificación de las cepas y el correcto funcionamiento de cada uno de los iniciadores: 8823 y 26695 (s1a), 8822 y 86313 (s2) y 84183 y J-99 (s1b). Además con el uso de los iniciadores específicos de alelo se confirmo la caracterización previa de las 13 cepas aisladas de pacientes con diferentes patologías gástricas como del tipo de alelo s1b.

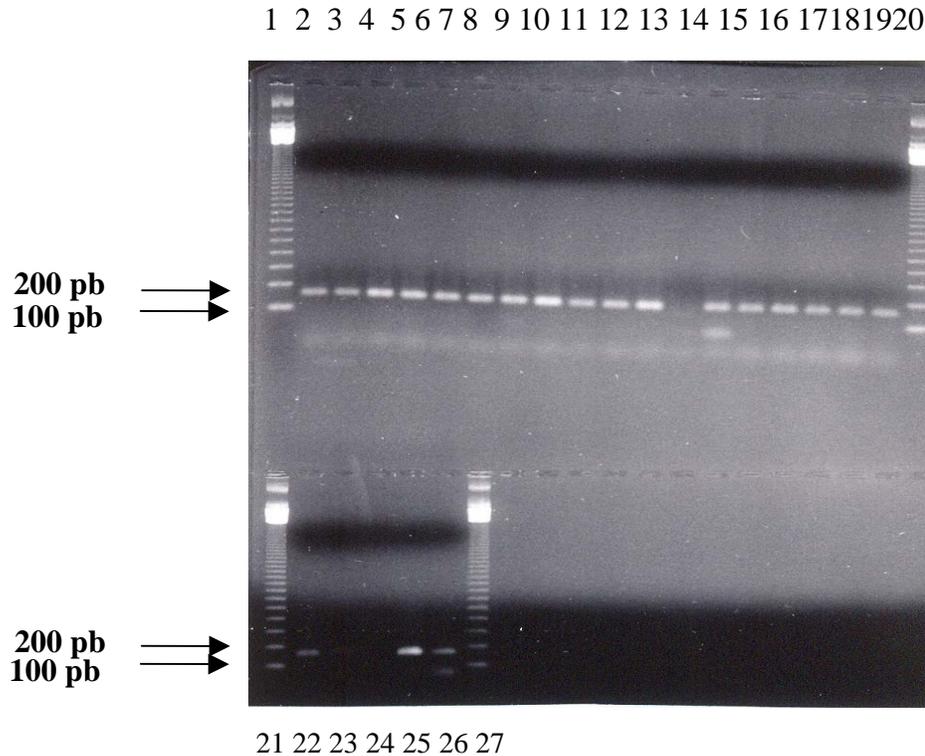


Figura 7. Amplificación de la secuencia señal s1d del gen *vacA* con los iniciadores específicos SS5F y VA1-R. Los carriles 1, 20, 21 y 27 corresponden al marcador de peso molecular de 100 pb. Carriles 2 a 11, 14 a 19 y 22, 25 y 26 corresponden al producto de 190 pb de la secuencia señal s1d. Carriles 13, 23 y 24 no tienen muestra.

8.3 Caracterización de la secuencia señal del gen *vacA* por el método RFLP-PCR

Con la identificación de una nueva familia en la secuencia señal del gen *vacA* de las cepas de *H. pylori* aisladas de niños con dolor abdominal crónico, se muestra existe mayor diversidad genética en esta región del gen. Para documentar esta diversidad, decidimos caracterizar la región secuencia señal por el método molecular RFLP-PCR. Se utilizaron los amplificadores obtenidos con los iniciadores conservados de la secuencia señal del gen *vacA* de las 31 cepas aisladas de niños con dolor abdominal crónico, cada uno de los productos de PCR fueron digeridos con la enzima de restricción *Hinf I*, tomando como controles los

productos de PCR obtenidos de cada una de las cepas de referencia: 8823 y 26695 (s1a); 8822 y 86313 (s2); y 84183 y J-99 (s1b). El análisis *in silico* previamente realizado de las cepas J-99 y 84183, mostró que la enzima *Hinf I* realizó tres cortes a nivel de los nucleótidos 90 y 191 en cada una de las cepas, produciendo tres fragmentos de DNA de un tamaño de 100, 91 y 68 pb (figura 8), sin embargo, en el marco experimental estos cortes no se produjeron (Figura 8, Tabla 4). El análisis *in silico* de las cepas 8823 y 26695 no mostró cortes, como se pudo corroborar experimentalmente (Figura 8). Las cepas 8822 y 86313 presentaron un corte a nivel del nucleótido 120, produciendo dos fragmentos de DNA de un tamaño de 120 y 166 pb (Figura 8) los cuales fueron obtenidos experimentalmente. Con respecto a la secuencia señal de las 31 cepas de *H. pylori* aisladas de niños, solamente las cepas: 72-3, 72-10 y 262 no presentaron ningún sitio de corte, las 28 cepas restantes si presentaron sitio de corte pudiéndose diferenciar entre ellas, cuatro perfiles de restricción. (Tabla 3).

Perfil I. Seis cepas (19.35 %) de niños presentaron en la secuencia señal del gen *vacA* un patrón de restricción de dos fragmentos de DNA con tamaños moleculares de 183 y 128 pb, a este patrón se le asignó arbitrariamente el número I. Este patrón también lo presentaron las cepas de referencia 8822 y 86313 que son del genotipo s2 de *vacA* (Tabla 3 y Figura 8).

Perfil II. Doce cepas (39 %) presentaron en la secuencia señal del gen *vacA* un patrón de restricción de dos fragmentos de DNA con tamaños moleculares de 170 y 29 pb, a este patrón se le asignó arbitrariamente el número II (Tabla 3 y Figura 8).

Perfil III. Dos cepas (6 %) presentaron en la secuencia señal del gen *vacA* un patrón de restricción de tres fragmentos de DNA con tamaños moleculares de 111, 40 y 27 pb, a este patrón se le asignó arbitrariamente el número III (Tabla 3 y Figura 8).

Perfil IV. Ocho cepas (26 %) presentaron en la secuencia señal del gen *vacA* un patrón de restricción de dos fragmentos de DNA con tamaños moleculares de 160 y 44 pb, a este patrón se le asignó arbitrariamente el número IV (Tabla 3 y Figura 8).

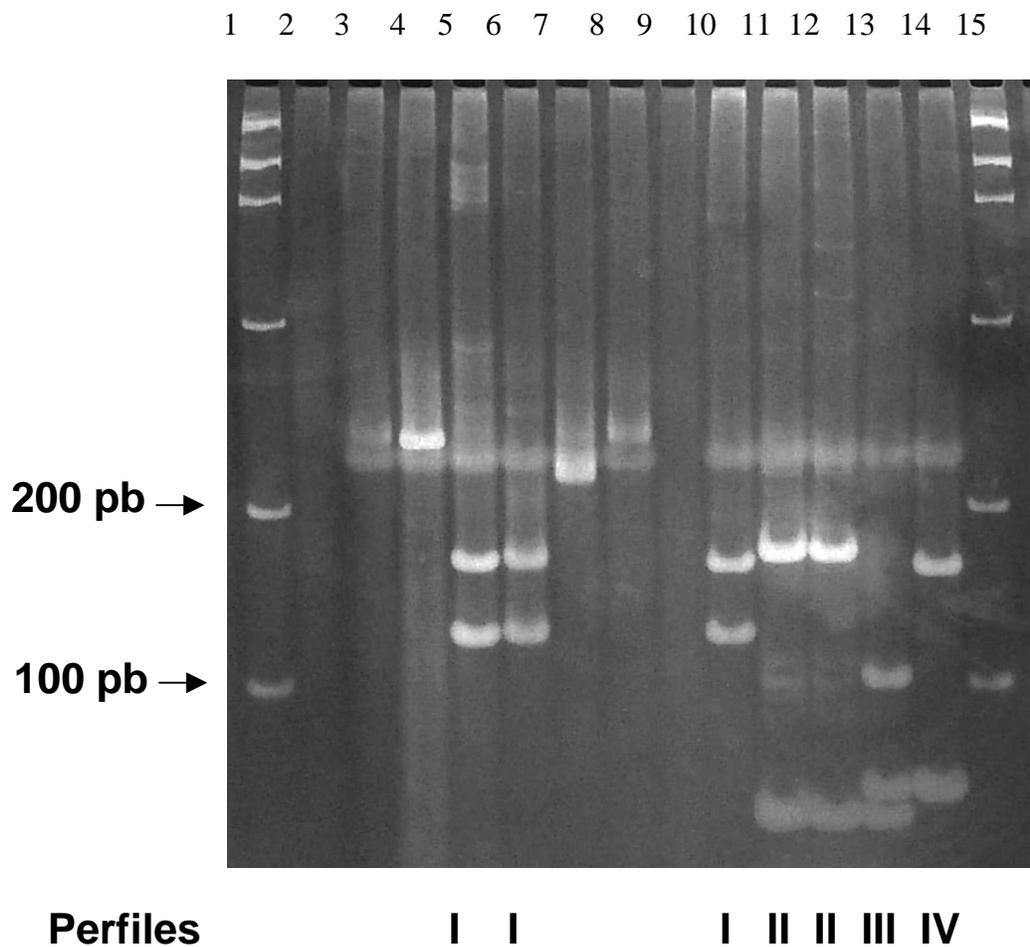


Figura 8. En este gel se muestra que los productos de la secuencia señal del gen *vacA* de las cepas de referencia 8823, 26695 (carril 3 y 4) y las cepas 84183 y J99 (carriles 7 y 8) no presentaron cortes con la enzima *Hinf I*. El perfil de restricción de las cepas 8822 y 86313 corresponde al perfil I (carriles 5 y 6) También se muestran en forma comparativa los perfiles de restricción I (carril 10), perfil II (carriles 11 y 12), perfil III (carril 13) y perfil IV (carril 14). Los carriles 1 y 15 corresponden al marcador de peso molecular Low DNA Mass. En los carriles 2 y 9 no hay muestra. Todos los productos fueron corridos en un gel de poliacrilamida al 12%.

Tabla 3. Genotipos de *vacA* y sus RFLP-PCR de cepas aisladas de niños con dolor abdominal crónico

Cepa	s1/ s2	s1b /s1b-1	Perfiles de restricción			
			I	II	III	IV
236 A-4	s1	s1b				X
236 A-5	s1	s1b				X
236 A-8	s1	s1b				X
236 A- 10	s1	s1b				X
536A pool	s1	s1b		X		
536 C pool	s1	s1d		X		
536 CC-2	s1	s1b		X		
536 C-3	s1	s1d		X		
536 AC-8	s1	s1d		X		
536 C-10	s2	-	X			
536 CC-6	s1	s1b		X		
536A – 11	s1	s1d		X		
544 C pool	s2	-	X			
544 CC-1	s2	-	X			
544 CC-3	s2	-	X			
544 CC -4	s2	-	X			
572 C pool	s1	s1d		X		
572 C2Ñ	s1	s1b		X		
572 C-7	s1	s1b		X		
51 a Ñ	s1	s1d			X	
69 PÑ	s1	s1d				X
92 Ñ	s1	s1d		X		
92 – 10	s1	s1d		X		
128 A – 1	s2	-	X			
64 CÑ	s1	s1d				X
64 C- 1	s1	s1d				X
64 C-3	s1	s1d				X
23 a Ñ	s1	s1b			X	
72 – 3	s1	s1d				
72 – 10	s1	s1d				
262	s1	s1d				
8823		s1a				
26695		s1a				
8822		s2	X			
86313		s2	X			
84183		s1b				
J-99		s1b				

8.4 Relación entre el alelo s1 y s2 con el perfil de restricción de la secuencia señal de *vacA*. Una vez terminada la caracterización de las cepas de *H. pylori* en relación a el alelo s1 ó s2 de la secuencia señal de *vacA* con los iniciadores conservados y determinados los perfiles de restricción por RFLP-PCR con la enzima *Hinf I*. Se hizo el análisis de cada una de las cepas, primero agrupándolas por alelo específico (s1 ó s2) y comparando los perfiles de restricción obtenidos por cada una de ellas. Segundo, se agruparon las cepas por perfil de restricción obtenido y se relaciono con el alelo caracterizado. Todas las cepas genotipificadas como alelo s2 de la secuencia señal de *vacA* (incluyendo las cepas control) presentaron un solo perfil de restricción al cual se le asigno arbitrariamente el numero I (Tabla 3). Las cepas genotipificadas como alelo s1 de la secuencia señal de *vacA* presentaron diferentes perfiles de restricción (II, III, IV). Tercero por ultimo se hizo el análisis de las cepas agrupándolas por subfamilias s1b, s1d y s2 caracterizadas con los iniciadores específicos de alelos y relacionando el perfil de restricción que presentaban. Se encontró que las cepas previamente caracterizadas como s2 presentaban el mismo perfil de restricción (perfil I), confirmando lo anteriormente señalado con la caracterización usando iniciadores conservados, mientras que las cepas caracterizadas como s1b y s1d no presentaron un perfil característico (Tabla 3, Figura 9 y 10), compartiendo ambos genotipos tres patrones de restricción y el genotipo s1a representado por la cepa 8823 y 26695 no presentó ningún corte con la enzima empleada (Figura 10).

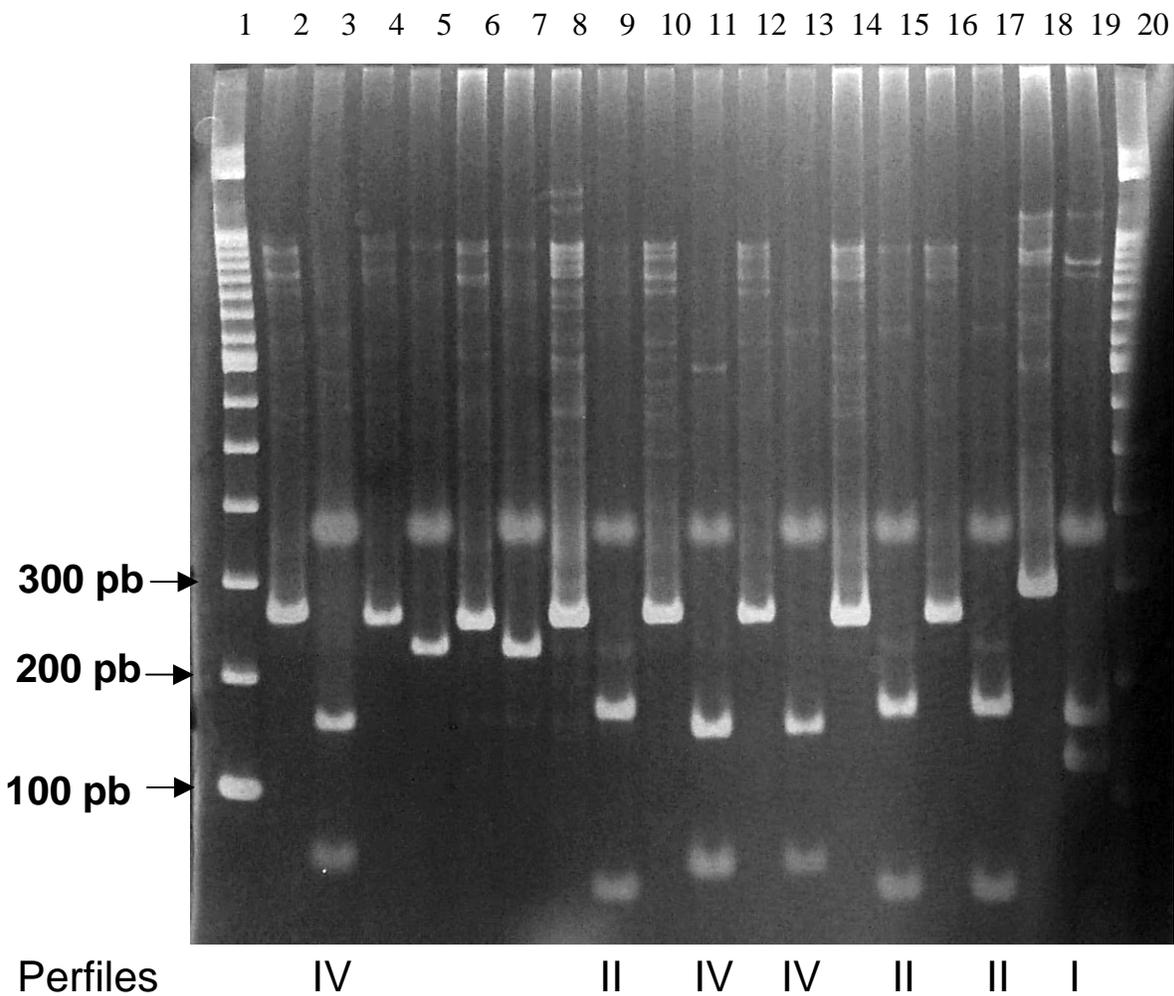


Figura 9. Gel de acrilamida al 12%. Se observan sólo tres de los cuatro perfiles de restricción generados con la enzima *Hinf I*. Perfil I, generado por una cepa de alelo s2 (carril 19). Perfil II, generado por cepas de alelo s1b y s1d (carriles 9, 15 y 17 respectivamente). Perfil IV, generado por cepas de alelo s1d y s1b (carriles 3, 11 y 13 respectivamente). Dos cepas no presentaron corte (cepas 72-3 y 72-10), carriles 4 y 6. Los productos sin digerir de cada cepa (controles) están presentes en los carriles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18. Los carriles 1 y 20 muestran el marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogene).

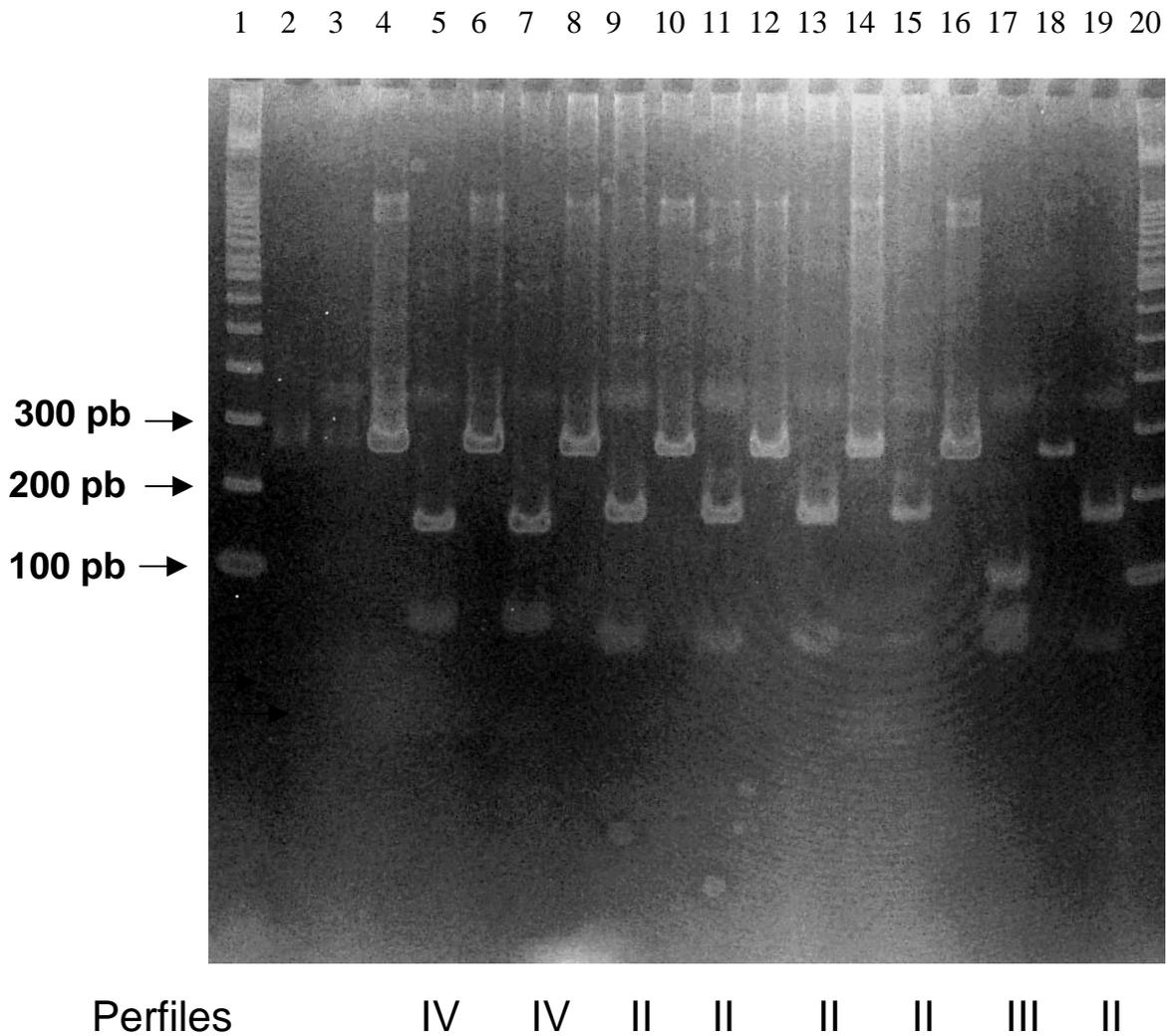


Figura 10. Gel de acrilamida al 12%. Muestra tres perfiles de restricción (II, III y IV) que presentaron las cepas de *H. pylori* con genotipo s1b (carriles 5, 7, 9, 11 y 15) ó genotipo s1d (carriles 13, 17 y 19). El carril 3 muestra la cepa control 8823 con genotipo s1a, la cual no presento corte. Los carriles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 18 muestran productos sin digerir (controles). Los carriles 1 y 20 muestran el marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogene).

9. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudiaron 50 cepas de *H. pylori*, todas las cepas fueron caracterizadas en la región secuencia señal del gen *vacA*, por medio de PCR-RFLP utilizando la enzima *Hinf I*. Con este método se determinó que las cepas presentaron diferentes patrones de restricción en la secuencia señal del gen, lo que mostró mayor diversidad a la documentada por Atherton y col., con su esquema de tipificación iniciador-específico-alelo-PCR, quienes desde 1995, determinan y proponen el esquema de caracterización del gen *vacA* con la tipificación de tres alelos diferentes para la región secuencia señal (s1a, s1b y s2) y dos para la región media (m1 y m2).

Existen otros trabajos con cepas de diferentes poblaciones que reportan la falta de caracterización del gen *vacA*, tanto en la región secuencia señal como en la región media.

Van Doorn y col (1998) reportan el hallazgo de un nuevo alelo de la secuencia señal del gen *vacA* en las cepas estudiadas, a la cual denominaron genotipo s1c, indicando que este tipo de alelo es predominante en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes del Este de Asia, al realizar el análisis de aminoácidos de estas cepas de *H. pylori* determinaron que este tipo de secuencia señal es fenotípicamente diferente a las cepas con genotipo s1a y s1b. El cual difiere con respecto a la familia s1a en dos posiciones de aminoácidos (Ala 21Leu, y Gln30 Lis) y con la familia s1b en 7 posiciones de aminoácidos (Ala18Val, Val20Ala, Ala22Leu, Ile24Val, Ala/Ser26Ile, Ile27Tre y Glu/Gln30Lis). Además, los autores

reportan, variabilidad genética en la región media del gen en estas mismas cepas, denominando dos subfamilias derivadas de la región tipo m2, como m2a y m2b.

La falta de caracterización del gen *vacA* en su secuencia señal y en su región media, en algunas cepas de *H. pylori*, es en parte atribuida a la variación en la secuencia de nucleótidos correspondiente al sitio de alineación de los iniciadores específicos para la caracterización de cada alelo del gen *vacA*. Strobel y col. (1998), estudiaron 158 cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes Alemanes, de las cuales 28 cepas no llegaron a ser caracterizadas en su región media de acuerdo al método tradicional descrito por Atherton 1995, al determinar el análisis de las secuencias de nucleótidos de estas cepas no tipificadas, observaron que las secuencias de nucleótidos varió en múltiples cambios de pares de bases con respecto a la región m1, algunos cambios afectaron el sitio de alineación del iniciador, por lo que designaron a esta región como una nueva subfamilia m1a. En este mismo año Han y col. reportaron otra variante en la región media del gen *vacA* en dos cepas, asignando a esta variante el subtipo (subfamilia) m3, la cual presentó una inserción de seis nucleótidos en la región de alineación del iniciador empleado para la caracterización de la familia m1. En 1999, Atherton y col. diseñaron una nueva estrategia para completar la caracterización de la región media de 22 cepas procedentes de diferentes poblaciones, que no caracterizaron al emplear los iniciadores de su esquema tradicional, al realizar la secuenciación de la región media de estas cepas, observan que en algunas hay una inserción de 75 pb y una cepa japonesa además presentó en su región media un evento de recombinación entre las secuencias de nucleótidos de los dos tipos de familias m1 y m2. En este mismo estudio se encontró la falta de caracterización del subtipo (s1a, s1b, s2) de la

secuencia señal de dos cepas peruanas y por secuenciación se determina que estas cepas presentan recombinación entre los alelos s1a y s1b.

Los antecedentes anteriormente señalados documentan la gran variabilidad que presenta el gen *vacA*. En un estudio previo, realizado con cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes mexicanos, Morales y col. reportaron que el genotipo de la secuencia señal s1b es el más prevalente en nuestra población. Sin embargo, los autores encontraron la falta de caracterización en la secuencia señal del gen *vacA* del 10% de las cepas estudiadas con el esquema propuesto por Atherton. El análisis de la región secuencia señal de cuatro cepas, mostró una sustitución de dos nucleótidos en el extremo 5' correspondiente a la zona de alineación del iniciador SS3-F (cambio de guanina por citocina y de adenina por guanina), además, dando como resultado un cambio de amino ácido en el marco de lectura, razón que explicó la falta de amplificación por PCR de la secuencia señal en estas cepas cuando se utilizó el iniciador que caracteriza a la familia s1b. El diseño de un nuevo iniciador SS5-F, con secuencias homólogas a este cambio permitió la caracterización completa por PCR de las cepas no caracterizadas previamente (Figura 13), asignándose el subtipo s1d a este nuevo genotipo de secuencia señal.

Al realizar la alineación de las secuencias de nucleótidos de la secuencia señal de las cepas mexicanas con la región correspondiente de cepas de diferente genotipo (s1a, s1b y s2) depositadas en la base de datos (GeneBank) utilizando Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast-blast.cgi), se encontró que la secuencia señal del gen *vacA* de las cepas mexicanas presentaron una mayor similitud (90 %) con las cepas del tipo s1b. El análisis de las cepas mexicanas 64c, 21, y 262cs variaron con el genotipo s1a, en la región que corresponde al

sitio de alineación del iniciador específico (SS1-F) para esta familia y con respecto al genotipo s2 las cepas mexicanas carecen de la inserción de nucleótidos presentes en esta familia (Figura 12).

Las secuencias de nucleótidos de las cepas mexicanas que corresponden al sitio de alineación del iniciador reverse VA1-R reportado previamente (Atherton y col. 1994), no presentó ningún cambio en su secuencia, lo que permitió el uso de este iniciador junto con el nuevo iniciador SS5-F para completar la caracterización de las cepas con una nueva familia s1d.

Con esta nueva caracterización utilizando un primer-alelo-especifico-PCR de la secuencia señal del gen *vacA* en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes mexicanos, se documenta que el gen que codifica para la citotoxina vacuolizante presenta mayor variabilidad en esta región, a la reportada en otras regiones del mundo. Confirmándose esta variabilidad al utilizarse el método PCR-RFLP, además no se encontró asociación entre el tipo de familia s1a y s1b de la secuencia señal del gen *vacA* obtenido por el método tradicional de Atherton y el patrón de restricción obtenido en esta región por el método PCR-RFLP de las cepas estudiadas. Sin embargo si se logro asociar el genotipo s2 con un determinado perfil de restricción (Perfil I). Lo que sugiere que la secuencia señal tipo s2 es mas conservada entre las cepas de *H. pylori*.

H. pylori exhibe una pronunciada diversidad genética entre sus genes y el gen *vacA* es un gen que tiende a presentar esta variabilidad por evento de recombinación entre sus partes homologas con el mismo gen de diferentes cepas, la comparación entre los nucleótidos de

la secuencia señal de diferentes genotipos con el nuevo genotipo aquí descrito muestra que el genotipo s1d tiene un origen común con el genotipo s1b. No sería raro suponer que en una infección múltiple con diferentes genotipos de *vacA* entre las cepas de *H. pylori*, evento común en nuestros pacientes, las cepas de *H. pylori* presenten mayor rearrreglo en la estructura de mosaico del gen *vacA*, influyendo directamente en el cambio de toxicidad de la proteína resultante. Las diferencias entre la combinación de alelos de la secuencia señal y la región media del gen *vacA*, radica principalmente en la actividad citotóxica de las cepas. Esta bien documentado que cepas de *H. pylori* con genotipo s1a/m1 son mas citotóxicas en ensayos de células HeLa y están mas asociados a enfermedad gástricas mas severas, en los pacientes de países anglosajones y que las cepas de genotipo s2/m2 no son citotóxicas en ensayos *in vitro* y estas cepas son mas frecuentemente aisladas de pacientes con dispepsia no ulcerosa o población asintomática.

Estudios posteriores deben de realizarse para determinar la importancia o no de esta diversidad genética en la secuencia señal del gen *vacA* de cepas mexicanas de *H. pylori* con base a su efecto vacuolizante y la asociación a cuadro clínico.

Cepa	5`	3`
8823	ATTG	GTCAGCATCACACCGCAACAAAGTCATGCCGCCTTTTTTAC
26695	GTTA	GTCAGCATCACACCGCAACAAAGTCATGCCGCCTTTTTTCAC
J-99	GTTGATT	AGCGCCATACCGCAAGAGAGTCATGCCGCCTTTTTTCAC
CEPA 46	GTTGATT	AGCGCCATACCGCAAGAGAGTCATGCCGCCTTTTTTCAC
8822	AATGGGCACCGAACTGGGGG	GCTAACACGCCAAATGATCCCA
Cepa128	ATTAATGGGCACCGAACTAGGGG	GCTAACACGCCAAATGATCCCA

Figura 11. Posición de iniciadores de secuencia señal s1a, s1b y s2. En rojo se muestra la alineación y la secuencia de nucleótidos de cada uno de los iniciadores que se utilizan para caracterizar la secuencia señal tipo s1a (8823 y 26695), s1b (J-99 y Cepa 46) y s2 (8822 y Cepa 128).

Cepa	5`	3`
8823	ATTG	GTCAGCATCACACCGCAACAAAGTCATGCCGCCTTTTTTAC
26695	GTTA	GTCAGCATCACACCGCAACAAAGTCATGCCGCCTTTTTTCAC
Cepa64c	GTTGATTAGCGCCATA	ACCGCAACAAAGTCATGCCGCCTTTTTTCAC
C-21-262	GTTGATTAGCGCCATA	ACCGCAACAAAGTCATGCCGCCTTTTTTCAC
8822	GTTAATGGGCACCGAACTGGGG	GCTAACACGCCAAATGATCCCA
Cepa128	ATTAATGGGCACCGAACTAGGG	GCTAACACGCCAAATGATCCCA

Figura 12. Comparación de secuencia señal s1a, s1b y s1d. En rojo se muestran la alineación y la secuencia de nucleótidos de los iniciadores utilizados para caracterizar la secuencia señal s1a (8823 y 26695) y s2 (8822 y 128), en azul se muestra la secuencia de nucleótidos para caracterizar la secuencia señal s1d.

Cepa	5`	3`
J-99	GTTGATT	AGCGCCATACCGCAAGAGAGTCATGCCGCCTTTTTCAC
Cepa46	GTTGATT	AGCGCCATACCGCAAGAGAGTCATGCCGCCTTTTTCAC
Cepa64c	GTTGATT	AGCGCCATACCGCAACAAGTCATGCCGCCTTTTTCAC
C-21-262	GTTGATT	AGCGCCATACCGCAACAAGTCATGCCGCCTTTTTCAC

Figura 13. Comparación de secuencia señal s1b y s1d En rojo se muestran la secuencia de nucleótidos para caracterizar la secuencia señal s1b (J-99 y Cepa 46) y s1d (Cepa 64c y C-21-262). En azul se muestran los cambios de bases que presentan las s1b y s1d.

10. CONCLUSIONES

- Se demostró por la caracterización de la región secuencia señal del gen *vacA*, utilizando el método RFLP-PCR, que en esta región hay una mayor diversidad a la documentada por Atherton, presentando la secuencia señal tipo s1 mayor variación en sus secuencias de nucleótidos con respecto a la tipo s2.
- No se encontró una asociación entre las subfamilias s1a y s1b con algún patrón de restricción específico, sin embargo, si se encuentra asociación entre la subfamilia s2 con un patrón de restricción específico (perfil I).
- Se encontró que existe una nueva subfamilia para la región secuencia señal denominada s1d. Esta subfamilia presenta alta homología con la subfamilia s1b. Los iniciadores diseñados para la caracterización de esta nueva subfamilia son altamente específicos.

11. APENDICE

11.1 APÉNDICE 1

11.1.1 Material empleado para el desarrollo de la tesis

Cajas Petri esteriles, desechables

Matraces Erlenmeyer de 2 litros, KIMAX

Probetas de 1 litro, KIMAX

Asas para cultivo, estériles, desechables.

Micropipetas de 1000 μ L, 100 μ L, 20 μ L, 10 μ L, 2 μ L y 1 μ L

Puntas para micropipetas de 1000 μ L, 100 μ L, 10 μ L y 1 μ L

Tubos Eppendorf de 1000 μ L, 500 μ L y 200 μ L

Sangre de carnero desfibrinada

Antibióticos para el agar sangre: 10.7 mg/L de ácido nalidixico, 5.0 mg/L de anfotericina B,

5.0 mg/L de trimetoprim, 10 mg/L de vancomicina, 3.3 mg/L de polimixina y 20 mg/L de

bacitracina

Caldo Brucella BBL-Becton

Agar soya tripticasa GIBCO BRL

Agarosa GIBCO-BRL *ultra* PURE

Tris-boratos GIBCO BRL *Ultra* PURE

Acilamida GIBCO BRL *Ultra* PURE

Persulfato de amonio GIBCO BRL *Ultra* PURE

TEMED , marca GIBCO BRL *Ultra* PURE

11.1.2 Equipo empleado para el desarrollo de la tesis

Termociclador M-J Research PTC-200

Incubadora de CO₂ REVCO

Microcentrifuga

Transiluminador de U.V.

Cámara de electroforesis horizontal para geles de agarosa CLP Modelo 75.710

Cámara de electroforesis vertical para geles de acrilamida HOEFER SE 600

Fuente de poder para cámara de electroforesis Modelo BRL 4000

Balanza analítica

11.2 APÉNDICE 2

11.2.1 Preparación de reactivos

a) Preparación de medio de conservación.

Preparación. Para preparar 200 ml de medio de conservación, pesar 5.6 gr. de Caldo Brucella (BBL-Becton) en 150 ml de agua desionizada agregar 30 ml de glicerol (15%), esterilizar durante 15 lb (121°C) durante 15 min. Posteriormente dejar enfriar el medio aproximadamente a 40°C y adicionar 20 ml de Suero Fetal Bovino (10 %) en condiciones de esterilidad. Repartir en criotubos aproximadamente 500 µl del medio estéril

b) Antibióticos para un litro de Base Agar Sangre

Se pesa cada antibiótico de acuerdo a la siguiente tabla para preparar 25 ml de solución stock de cada uno:

Antibióticos	Para 25 mL (mg)	Concentración final mg/litro ♣
Ac. Nalidixico*	267.5	10.7
Trimetoprim**	125	5
Vancomicina	250	10
Anfotericina***	125	5
Polimixina	82.5	3.3
Bacitracina	500	20

Tabla 4. Concentración de antibióticos para Agar Sangre

* Acido nalidixico, disolver en NaOH 0.1 M (1 mL por cada 10 gr)

** Trimetoprim, disolver en HCl 0.05 M (1 mL por cada 10 gr).

*** Anfotericina, disolver con dimetilformamida.

Los demás antibióticos se disuelven con agua desionizada. Alicuotar 1mL de cada antibiótico en tubos eppendorf y mantener a -20°C .

♣De cada antibiótico se preparan viales con 1.0 mL a una concentración final indicada en la tabla, se usa un vial de 1 mL de cada antibiótico para un litro de Agar Sangre.

c) Agar Sangre

Pesar 40 gr. de Agar Soya Trypticasa GIBCO BRL, para un litro de agua, disolver por ebullición posteriormente esterilizar durante 15 minutos, a 121°C y 15 libras. Enfriar a una temperatura aproximada de 50°C , y adicionar 10% de sangre de carnero desfibrinada y un vial de los siguientes antibióticos: Polimixina, Vancomicina, Anfotericina, Ácido nalidíxico, Trimetoprim y Bacitracina. El medio se vacía en cajas Petri estériles.

d) Tiocianato de guanidina – sarcosyl (GES)

Pesar 60 gr de tiocianato, disolver en 50 mL de agua desionizada, adicionar 20 mL de EDTA a 0.5 M, calentar a 65°C y mezclar posteriormente adicionar 5mL de sarcosyl al 10%. Aforar a 100 ml con agua desionizada

e) Tris-boratos EDTA 5X (TBE)

Pesar 54 gr. de Tris-base y 27,5 gr de ácido bórico en 500 mL de agua desionizada, mantener en agitación hasta disolver, posteriormente adicionar 20 mL de EDTA estéril (pH 8.0) y aforar a un litro con agua desionizada.

Para preparar TBE 0.5 X. Para preparar TBE 0.5 X, a un litro de TBE 5 X se adicionan 10 L de agua.

f) Cloroformo: alcohol isoamílico 24:1

Para preparar 100 mL de solución se toman 96 mL de cloroformo y se adicionan 4 mL de alcohol isoamílico. Se mantiene en un frasco cerrado en refrigeración hasta su uso a 4° C.

g) Acetato de amonio 7.5 M.

Para preparar 100 mL de acetato de amonio se pesan 57.81 gr. de éste y se aforan a 100 mL con agua destilada.

h) Etanol al 70%.

Etanol absoluto 70 mL en 30 mL de agua desionizada

i) Electroforesis en gel de agarosa al 1%

Se pesan 0.5 gr. de agarosa y se adicionan 50 mL de TBE a 0.5X, la agarosa se disuelve en un horno de microondas posteriormente se adicionan 2 µL de Bromuro de etidio (1.5 mg/mL). La agarosa disuelta se deja enfriar a una temperatura de aproximadamente 50 °C para posteriormente verterse en el molde de la cámara de electroforesis Modelo BRL 4000, colocando previamente un peine de 10 pozos. La agarosa se deja gelificar a temperatura ambiente. Se prepara una mezcla con 5 µL de cada uno de los productos de

PCR y 5 μL de buffer de corrimiento III. Cada una de las mezclas se coloca en cada una de los pozos del gel, poniéndose además en el primer y último pozo 5 μL de marcador de peso molecular. La electroforesis se deja correr durante una hora a 100 volts. Posteriormente se observan las bandas amplificadas por medio de un transiluminador de UV.

j) Buffer de corrimiento III.

0.25% de azul de bromofenol

0.25% de xilen cianol FF

30% de glicerol en agua

k) Soluciones de trabajo de los iniciadores para PCR a una concentración de 20 pmol. Los cálculos se realizan a partir de los nmoles que reporta el Laboratorio de síntesis (INVITROGEN).

* Iniciador VA1R (REVERSE)

$$\text{Solución stock } \frac{40.5 \text{ nmol}}{200 \mu\text{L}} = 0.2025 \text{ nmol} / \mu\text{L} = 202.5 \text{ pmol} / \mu\text{L}$$

$$\frac{1 \mu\text{L}}{202.5 \text{ pmol}} \times \frac{20 \text{ pmol}}{1} = 0.09876 \mu\text{L} \times 100 \mu\text{L} = 9.8 \mu\text{L}$$

Solución de trabajo se preparan 100 μL . Tomar 9.8 μL de la solución stock del iniciador y agregar 90,2 μL de agua para PCR.

* Iniciador SS5-F para amplificar a la secuencia señal s1d

$$\text{Solución stock } \frac{105.9 \text{ nmol}}{200 \text{ } \mu\text{L}} = 0.5295 \text{ nmol/ } \mu\text{L} = 529.5 \text{ pmol / } \mu\text{L}$$

$$\frac{1 \text{ } \mu\text{L}}{529.5 \text{ pmol}} \times \underline{20 \text{ pmol}} = 0.0378 \text{ } \mu\text{L} \times 100 \text{ } \mu\text{L} = 3.7 \text{ } \mu\text{L}$$

Solución de trabajo se preparan 100 μL . Solución de trabajo tomar 3.7 μL de la solución stock del iniciador y agregar 96.3 μL de agua para PCR.

* Iniciador SS3-F para amplificar a la secuencia señal s1b

$$\text{Solución stock } \frac{44.5 \text{ nmol}}{200 \text{ } \mu\text{L}} = 0.2225 \text{ nmol/ } \mu\text{L} = 222.5 \text{ pmol / } \mu\text{L}$$

$$\frac{1 \text{ } \mu\text{L}}{222.5 \text{ pmol}} \times \underline{20 \text{ pmol}} = 0.0898 \mu\text{L} \times 100 \text{ } \mu\text{L} = 8.9 \text{ } \mu\text{L}$$

Solución de trabajo se preparan 100 μL . Solución de trabajo tomar 8.9 μL de la solución stock del iniciador y agregar 91.1 μL de agua para PCR.

l) Preparación de geles de Poliacrilamida a diferentes concentraciones

	8%	12%
Acrilamida al 20%	10.0 mL	16.8 mL
Persulfato de amonio 10%	85.7 μ L	143.98 μ L
TEMED (NNN'N'tetrametilendiamino)	14.2 μ L	23.86 μ L
TBE 0.5 X	cbp 25.0 mL	28.0 mL

Nota: adicionar el TEMED al final.

m) Persulfato de Amonio al 10 %

Pesar 10 gr. de persulfato de amonio marca GIBCO BRL *Ultra PURE* y disolver en 100 mL de agua desionizada estéril, alicuotar en tubos Eppendorf y mantener a -20° C.

n) TEMED, marca GIBCO BRL *Ultra PURE*

o) Solución fijadora para gel de Acrilamida

Etanol absoluto	50 mL
Ácido acético	5 mL
Agua desionizada	cbp 100 mL

Tabla 5. Tiempo de lavado para geles de poliacrilamida de acuerdo al tamaño de gel.

Ancho de gel (mm)	Lavados(minutos)				Tiempo total (minutos)
	1	2	3	4	
.125	5	5	5	5	20
.500	15	15	15	15	60
.750	30	30	30	30	120
1.000	40	40	40	40	160
1.500	45	45	45	45	180

p) Soluciones para revelar los geles de poliacrilamida

* Solución de trabajo de plata adicionar 20mL de la solución de plata concentrada a 280 mL de agua desionizada.

* Solución de trabajo aldehído reductora: adicionar 20mL de la solución aldehído reductora concentrada a 130 mL de agua desionizada.

* Solución de trabajo base reductora: adicionar 20mL del base reductora concentrada a 130 mL de agua.

* Solución de trabajo base estabilizadora: adicionar 220 mL de solución estabilizadora concentrada a 880mL de agua desionizada.

Tabla 6. Tiempo de revelado de geles de poliacrilamida de acuerdo al tamaño de éstos.

Ancho de gel (mm)	Solución de plata (min.)	Lavado (seg.)	Solución reductora(min.)	Lavado (seg.)	Solución estabilizadora (min.)	Tiempo total (min.)
0.125	5	No	¼-1/2	No	15	11
0.500	15	3-5	1-2	No	30	47
0.750	30	5-10	3-5	No	30	65
1.000	30	20	5	5	40	80
1.500	20	20-30	9-10	15	60	90

11.3. APÉNDICE 3

11.3.1 Técnicas de Biología Molecular

11.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En abril de 1983, Kary Mullis da a conocer la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa. Es una técnica *rápida, sencilla, sensible y específica*, derivada de los avances en la biología molecular y es ya un proceso automatizado, donde se pueden procesar hasta 96 muestras a la vez. Es un método *in vitro* que permite amplificar un fragmento específico de ADN por medio de ciclos sucesivos de multiplicación exponencial hasta llegar a obtener una cantidad adecuada del producto, el cual puede ser visualizado por electroforesis. Requiere de una sola molécula de ADN, aunque habitualmente se toman cantidades de alrededor de un microgramo, para generarse un millón de copias de sí misma.

Un ciclo de amplificación está constituido por tres reacciones que se hacen a temperaturas distintas: *a) desnaturalización del ADN*; las dos cadenas de ADN se separan por ruptura de los puentes de hidrógeno a una temperatura de 95 °C; *b) alineación de los iniciadores o cebadores*, consiste en el apareamiento de los iniciadores a las regiones homólogas complementarias en las cadenas de ADN, la temperatura de alineación está en relación al contenido de G y C que contiene la secuencia de los iniciadores. Un cálculo sencillo de esta T_m es mediante la fórmula: $T_m = 4^\circ\text{C} (\text{G-C}) + 2^\circ\text{C} (\text{A-T}) \pm 5^\circ\text{C}$. Generalmente la temperatura de alineación ocurre entre los 50 y 80°C y *c) extensión*; se efectúa a 72°C, temperatura a la que la Taq polimerasa va a actuar. Esta polimerasa es estable al calor, proviene de *Thermus aquaticus*, una bacteria termófila que vive en fuentes termales, va

actuar uniendo los diferentes nucleótidos complementarios en el orden que va copiando a la cadena molde (en sentido 5' a 3'). Estas tres fases se repiten "n" ciclos para obtener 2ⁿ copias de ADN.

Para que se lleve a cabo la reacción es necesario aportar: el ADN a copiar (1µg), los iniciadores; son oligonucleótidos, generalmente de 15-30 bases de largo que hibridan la cadena opuesta y la región de interés la concentración ideal de éstos es de 0.1µM-1µM, desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP's) - dATP, dCTP, dGTP y dTTP- la concentración ideal es de 20-200 µM, Taq polimerasa , esta enzima es extraída de la bacteria *Thermus aquaticus*, tiene un índice de error de 1-4/10⁴ bases y con una capacidad de síntesis de 3000 pb, se emplea en una concentración de 1-2.5 U/µL, cloruro de magnesio, su concentración es determinante para la alta especificidad de la enzima, se requiere de una concentración de 0.5-2.5 mM (Sardelli)

11.3.3 Enzimas de restricción. Las enzimas o endonucleasas de restricción son producidas por las bacterias como mecanismo de defensa frente a los fagos. Se llaman enzimas de restricción porque parece que funcionan primariamente para restringir la entrada de ADN extraño en las células bacterianas. Se caracterizan por cortar el ADN se manera selectiva en los sitios donde se reconocen secuencias diana específicas de nucleótidos (sitios de restricción) los cuales suelen tener una longitud de 4 a 8 bases.

El DNA de una célula que sintetiza una enzima de restricción está protegido de la acción de esta enzima porque tales células también sintetizan una *enzima de modificación*, que altera

la estructura de los sitios del ADN reconocidos por la enzima de restricción (Jeremy y cols. 2003, Nelson y Cox 2001)

Se conocen tres tipos de enzimas de restricción:

- Las endonucleasas de restricción del tipo I y III: son grandes complejos formados por múltiples subunidades que contienen, simultáneamente, la actividad de endonucleasa y metilasa. Las endonucleasas de restricción tipo I cortan el ADN al azar, en lugares que pueden estar a 1000 pares de bases o más de la secuencia de reconocimiento. Las endonucleasas de restricción de tipo III cortan el ADN a unos 25 pares de bases de la secuencia de reconocimiento.
- Las endonucleasas de restricción tipo II: reconocen un sitio y producen una ruptura específicamente en el sitio de reconocimiento.

Los sitios de reconocimiento de los enzimas de restricción son secuencias *palindrómicas* (secuencias que tienen un eje central de simetría y se leen de forma idéntica en ambas direcciones a partir de este eje).

Los cortes de filamento doble pueden ser escalonados o alineados a lo largo del eje de simetría. Algunas enzimas realizan los cortes escalonados creando extremos adhesivos, que pueden anillarse entre sí y cerrarse con enlaces covalentes por la DNA ligasa. La protección de la segmentación la confieren enzimas de modificación que metilan ciertas bases en los sitios de reconocimiento. La metilación por las enzimas de modificación ocurre después de la incorporación de los nucleótidos en el filamento de DNA.

Las endonucleasas que forman extremos adhesivos pueden producir una ruptura en dos o más sitios que hayan escapado a la modificación y dan una oportunidad para que los extremos adhesivos experimenten una reordenación o una recombinación. Las moléculas recombinadas pueden, posteriormente, ser ligadas y modificadas por la ligasa y las enzimas de modificación.

Tabla 7. Ejemplos de algunas enzimas de restricción, bacteria de donde se obtienen y secuencias de ADN que reconocen.

ENZIMA	BACTERIA	ROMPIMIENTO	
		5'	3'
AluI	<i>Arhrobacter luteus</i>	A	G * C T
MspI	Especies de <i>Moraxella</i>	G	C * C C
Hinfi	<i>Haemophilus influenzae</i> Rf	G	* A N T C
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H.	G	* G A T C C
EcoRI	<i>Escherichia coli</i> RY13	G	* A A T T C
PstI	<i>Providencia stuartii</i>	C	T G C A * G

Se pueden detectar pequeñas diferencias entre moléculas similares de ADN porque sus fragmentos de restricción pueden visualizarse por electroforesis en gel. Se utilizan geles de poliacrilamida para separar fragmentos de hasta unos mil pares de bases y geles más porosos, de agarosa, para resolver mezclas de fragmentos mayores (de hasta 20 kb). Las mutaciones en los centros de restricción producen cambios en el tamaño de los fragmentos de restricción y, por tanto, en la posición de bandas en el análisis de geles. La existencia de diversidad genética en una población se denomina polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), permite diferenciar

11.3.4 Geles de poliacrilamida. Es un método analítico de alto poder resolutivo que combina la migración en un campo eléctrico y el tamizado molecular a través de un gel de corrida. Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida monomérica ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) y su entrecruzamiento por intermedio de la N,N'-metilenbisacrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$), corrientemente designada bisacrilamida. El poro del gel formado dependerá de las concentraciones de ambos reactivos durante la polimerización. La polimerización de la acrilamida necesita de un iniciador del proceso. Los más comunes son el persulfato y la riboflavina. Se requiere además de un acelerador N,N,N,N'-tetrametilnediamina (TEMED). La porosidad del gel la determina las proporciones relativas de poliacrilamida y bis-acrilamida, siendo menor el poro cuanto más bisacrilamida vs. acrilamida se use. El porcentaje total de acrilamida/bisacrilamida determina el rango de separación del gel. Habitualmente los geles se denominan en función del % de acrilamida/bisacrilamida que contienen .

12. BIBLIOGRAFIA

1. Achtman Mark, Suerbaum Sebastian, 2001. *Helicobacter pylori*; Molecular and Cellular Biology, Horizon Scientific Press, 330 pp.
2. Aguilar R, Ayala GM, Ferros GZ, 2001. *Helicobacter pylori* recent advances in the study of its pathogenicity and prevention. *Salud Pùblica de México*. **43 (3)**: 237-246.
3. Appelmelk BJ, Shiberu B, Trinks C, Zheng PY. 1998. Phase variation in the *Helicobacter pylori* Lipopolisaccharide. *Infection and Immunity*. **66 (1)**: 70-76.
4. Appelmelk BJ, Simoons Negrini R, Moran AP, Aspinall OG. 1996. Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolisaccharide and host lew is blood group antigens in autoimmunity. *Infection and Immunity*. **64 (6)**: 2031-2040.
5. Atherton JC, Cao P, Peek RM, Tumuru KR, Blaser MJ, Cover TL. 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *The Journal of Biological Chemistry*. **270 (30)**: 17771-17777.
6. Atherton JC, Peek R, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. 1997. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. **112**: 92-99.
7. Atherton JC, Cover T.L, Morales MR, Hawkey CJ, Blaser MJ. 1999. Simple and accurate PCR-Based system for typing vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology*. **37 (9)**: 2979-2982.
8. Bagasra O, Hansen J. 1997. *In situ* PCR techniques. Wiley. New York. 121 pp.

9. Berg MJ, Tymoczko JL, Stryer L. 2003. Bioquímica. Editorial Reverte S.A. Barcelona, España. 973 pp.
10. Bernard M, Cappon A, Guidice G, Rappouli R, Montecucco C, 2004. The multiple cellular activities of the VacA cytotoxin of *Helicobacter pylori*. International Journal Medical Microbiology. **293**: 589-597.
11. Buck E. George, 1990. *Campylobacter pylori* and Gastroduodenal disease. Clinical Microbiology Reviews. **3 (1)**: 1-12.
12. Cover TL, Tumuru M., Cau P, Thompson S, Blaser MJ, 1994. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. The Journal of Biological Chemistry. **269 (14)**: 10566-10573.
13. Cover TL, Blanke SR. 2005. *Helicobacter pylori* VacA a paradigm for toxin multifunctionality. Nature Reviews Microbiology. **30**: 320-332.
14. Ernst B, Peter Gold D. Benjamin. 2000. The disease Spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. Annu. Rev. Microbiology. **54** :615-640.
15. Fischer W, Gebert B, Haas R, 2004. Novel activities of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: from epithelial cells forwards the immune system. International Journal Medical Microbiology. **293**: 539-547.
16. Frenck RW, Clemens John. 2003. Helicobacter in the developing world. Microbes and infection. **5**: 705-713.
17. Ge Z, Taylor DE. 1999. Contributions of genome sequencing to understanding the biology of *Helicobacter pylori*. Annual Review Microbiolgy. **53**: 353-387.

18. González M J, Leal Villarreal L, Guzmán LS, Guzmán TG. 2004. *Helicobacter pylori* y enfermedad. Revista Alergia México. Artículo de revisión. **51 (6)**: 218-225.
19. González-Valencia, Atherton JC, Muñoz O, Torres J. 2000. *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes in Mexican adults and children. The Journal of Infectious Diseases. **182**: 1450-1454.
20. Ho B, Vijayakumar S. 1993. Microbios, A simple and efficient continuous culture system for *Helicobacter pylori*. **70**: 59-66.
21. Ilver Dag, Barone Silvia, Mercati David, Lupetti Pietro, Telford JL. 2004 *Helicobacter pylori*, toxin VacA is transferred to host cells via novel contact-dependent mechanism. Cellular Microbiology. **6: (2)**. 167-174.
22. Kidd M, Modlin J M, 1998. A Century of *Helicobacter pylori*. Paradigms Lost. Paradigms Regained. Digestion. **59**: 1-15.
23. Lòpez-Brea Manuel. 2000. *Helicobacter pylori* retos para el siglo XXI, Microbiología Clínica y tratamiento.
24. Marais A, Mendez GL, Hazell SL, McGraund F. 1999. Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. Microbiology and Molecular Biology Review. 642-674.
25. Marshall BJ, Warren, JR. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration, Lancet. 1311-1315.
26. Marshall BJ, Armstrong JA, Mc Genchie DB. 1985. Attempt to fulfil Koch`s postulates for pyloric Campylobacter, Med. J. Aust, **142**: 436-439.

27. Marshall B. 2002 *Helicobacter pylori*: 20 years old. *Clinical Medicine*. **2 (2)**: 147-152.
28. Mobley LT, Hazell SL, 2001. *Helicobacter pylori*: Physiology and genetics. ASM, Press, Wasingtong, D.C.
29. Montecucco C, Bernard M. 2003. Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil activating protein (HP NAP) virulence factors of *Helicobacter pylori*. **5**:715-721
30. Morales-Espinosa R, Castillo-Rojas G, Gonzales-Valencia G, Ponce de Leon S, Atherton JC. 1999. Colonization of Mexican patients by múltiple *Helicobacter pylori* strains with different *vacA*, and *cagA*, genotypes. *Journal of Clinical Microbiology*. **37 (9)**: 3001-3004.
31. Murray PR, Rosenthal KS, Kabayasi, GS. 2003. *Microbiología Mèdica*, Ed. Mobley Elsevier.
32. Nelson LD, Cox MM. 2001. *Lehninger Principios de Bioquímica*. Ediciones Omega. 3ª. Ed. 1149 pp.
33. Nguyen QV, Caprioli MR, Cover TL. 2001. Carboxy terminal proteolytic processing of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Infection and Immunity*.. **69 (1)**: 543-546.
34. Otero W. 2000. Càncer gàstrico y *Helicobacter pylori* ¿Sì ò no?. *Acta Mèdica Colombiana*.

35. Pan Zhi-Jun, Berg DE, Van der Helst RW, Xiao Shu-Dong, Tytgat NT, Van der Ende A. 1998. Prevalence of vacuolating cytotoxin production and distribution of distinct *vacA* alleles in *Helicobacter pylori* from China. *The Journal of Infectious Diseases*. **178** : 220-226.
36. Papini Emanuele, Zoratti Mario, Cover TL. 2001. In search of the *Helicobacter pylori* VacA mechanism of action. *TOXICON*. **39**: 1757-1767.
37. Sachs G, Weeks DL, Melchers K, Schott D. 2003. The gastric Biology of *Helicobacter pylori*. *Annual Review Physiology*. **65**: 349-369.
38. Shan-Rui H, Hans-Joachim S, Sucharit B, Loos M, Maturer M. 1998. *vacA* genotypes and genetic diversity in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. **5 (2)**: 139-145.
39. Stevenson TH, Castillo A, Lucia LM, Acuff GR. 2000. Growth of *Helicobacter pylori* in various liquid and plating media. *Letter in Applied Microbiology*. **30**: 192-196.
40. Stoicov C, Safari R, Cai. 2004. Molecular Biology of gastric cancer, *Helicobacter* infection and gastric adenocarcinoma bacterial and host factor responsible for altered growth signalling, *GENE*. **341**: 1-17.
41. Strobel S, Bereswill S, Balig P, Sonntag H, Kits M. 1998. Identification and analysis of a new *vacA* genotype variant of *Helicobacter pylori* in different patient groups in Germany. *Journal of Clinical Microbiology*. **36 (5)**: 1285-1289.

42. Szabo L, Brutsche S, Tómbola F, Maschioni M, Telford JL, Rappouli R, Montecucco C, Papini E, Zoratti M. 1999. Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. The European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal. **18 (20)**: 5517-5527.
43. Tombola F, Carlesso C, Szabo I, Bernard M, Reyrat JM, Telfor JL, Rappouli R, Montecucco C, Papini E, Zoratti M. 1999. *Helicobacter pylori* vacuolating toxin forms anion-selective channels in planar lipid bilayer: possible implications for the mechanism of cellular vacuolation. Biophysical Journal. **76**: 1401-1409.
44. Torres J, Pèrez-Pèrez G, Goodman KJ, Atherton JC. 2000. Comprehensive review of the Natural History of *Helicobacter pylori* infection in children. Archives of Medical Research. **31**: 431-469.
45. Torres J, Herrera YL, Pérez-Pèrez G, Camorlinga-Ponce M, Cedillo- Rivera R, 1998. A Comunity Based Seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in México. The Journal of Infectios Disease. **178**: 1089-1094.
46. Traverso FR, Hernández F. 2000. *Helicobacter pylori*, Factores de virulencia patología y diagnóstico. Rev Biomédicas San José, Costa Rica. **2 (3)**: 187-199.
47. Van Doorn L, Figueiredo C, Sanna R, Middo P, Atherton JC, Blazer MJ, Quint WG. 1998. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. Journal of Clinical Microbiology. **36 (9)**: 2597-2603.

48. Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, Graham BY, Sepulveda AR. 1998. Variants of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *Helicobacter pylori* associated diseases. *Journal of Clinical Microbiology*. **36 (8)**: 2258-2263.