

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**EPIDEMIOLOGIA DE *Helicobacter pylori* DE UN GRUPO DE PACIENTES DEL
SEGURO SOCIAL DE GUATEMALA: COMPARACION DE CEPAS POR
TECNICAS MOLECULARES**

INFORME DE TESIS

PRESENTADO POR:

CLAUDIA MARIA GARCIA GONZALEZ

PARA OPTAR AL TITULO DE:

QUIMICO BIOLOGO

GUATEMALA, MAYO DE 1,999

ACTO QUE DEDICO

A Dios y a la Santísima Virgen María

A mis padres:

Berna González Estrada y Alfonso García Girón: Gracias por su amor, apoyo
y confianza.

A mis hermanos:

Carla Marina y Daniel Alfonso

A mi familia, en especial:

A mi abuelita, Marta Marina Estrada (QEPD)

A mis tíos: Gladys, Aury, Juan Roberto, Carlos y Mirta

A mis primos: en especial a Mariela Liliana

A mis amigas y compañeras de promoción, en especial a:

Karen Sofía, Karen Elizabeth, María Elisa, Marielos, Ileana, Gisela, Byanca,
Karla y Lilian.

6. Hipótesis	24
7. Materiales y Métodos	25
7.1 Universo de Trabajo	25
7.2 Recursos	25
7.2.1 Recursos Humanos	25
7.2.2 Recursos Institucionales	25
7.2.3 Recursos físicos	25
7.3 Procedimientos	30
7.3.1 Aislamiento e identificación	30
7.3.2 Preparación de stocks y recuperación	30
7.3.3 Suceptibilidad al metronidazol	31
7.3.4 Extracción de ADN	31
7.3.5 Determinación de la concentración de ADN	32
7.3.6 Reacciones de PCR	32
7.3.7 Electroforesis de ADN	33
7.3.8 Purificación de ADN	34
7.3.9 Preparación de sondas de hibridación	34
7.3.10 Procedimiento de hibridación	35
8. Resultados	38
9. Discusión de Resultados	40
10. Conclusiones	42
11. Recomendaciones	43
12. Referencias Bibliográficas	44
13. Anexos	50

mismo paciente en diferentes porciones del estómago, e incluso en diferentes oportunidades. La variabilidad de cepas entre diferentes individuos fue bastante amplia, ya que no se encontraron patrones de bandas similares o iguales genéticamente, en ninguno de los pacientes estudiados.

Con respecto a los genes de patogenicidad se detectaron altos índices de resultados positivos, demostrándose que el 100% de las cepas poseen por lo menos cuatro de las regiones de patogenicidad estudiadas, y en la mayor parte de los casos presentan los alelos de los genes más virulentos.

Esta colección de cultivos de *Helicobacter pylori* de pacientes Guatemaltecos presentó un 74 por ciento de resistencia al metronidazol, que es uno de los medicamentos empleados en la erradicación de *H. pylori*.

Se concluye entonces que las cepas guatemaltecas estudiadas, al igual que las aisladas en otras partes del mundo presentan alta variabilidad en su patrón genético. Los genes de patogenicidad de estas cepas se encuentran en un punto medio comparados con los de otras poblaciones del mundo, y presentan también alta resistencia al metronidazol. Se recomienda ampliar el número de pacientes del estudio a fin de poder concluir con más certeza acerca de las características de las cepas de nuestra población.

3. ANTECEDENTES:

3.1 HISTORIA DE *Helicobacter pylori*:

A finales del siglo pasado, varios tipos de espiroquetas y espirilos fueron observados por vez primera en el estómago de animales (7). A principios de éste siglo bacterias espirales fueron encontradas en biopsias de pacientes con cáncer gástrico y úlcera péptica, médicos gastroenterólogos sugirieron la existencia de la bacteria, pero no pudieron explicar el hallazgo de gastritis antral en pacientes con úlcera duodenal y observaron la presencia frecuente de gastritis atrófica en pacientes con úlcera gástrica y cáncer. Sin embargo, la posibilidad de que la úlcera péptica o el cáncer gástrico fueran causados por un agente infeccioso no fue aceptada. La observación hecha en 1,975 de que una bacteria Gram-negativo se encontraba presente en el ochenta por ciento de pacientes con úlcera gástrica fue ignorada durante muchos años por la comunidad científica (8).

Helicobacter pylori fue descubierto en 1,982 por Marshal y Warren, quienes lo denominaron *Campylobacter pylori* (9).

El escepticismo inicial fue abandonado en 1,983. A partir de éste año se reportó por diferentes autores la frecuente asociación entre gastritis antral y la presencia de bacterias del género *Campylobacter* (10).

El género *Helicobacter* fue establecido en 1,989 durante una reestructuración taxonómica de las especies *Campylobacter pylori* y *Campylobacter mustelae* (10).

En Junio de 1,994 la Agencia Internacional para la Investigación de Cáncer afirmó: "*H. pylori* juega un rol importante en la cadena de eventos que desencadenan cáncer", refiriéndose a adenocarcinomas y linfomas de estómago (11).

3.2 TAXONOMIA Y DESCRIPCION DE *H. pylori*:

Helicobacter pylori pertenece a un grupo bacteriano que comprende varios géneros: *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Wolinella* y *Helicobacter* (12).

Helicobacter pylori además forma parte de un grupo de bacterias que fisiológicamente son bacilos Gram negativo. Tiene la particularidad de adaptarse a la ecología dentro de la mucosa del

de persona a persona o por vía feco-oral (24,30). Estas afirmaciones se basan en los siguientes argumentos: *H. pylori* ha sido detectado en heces y en muestras provenientes de la cavidad oral; ya que la boca constituye un medio favorable para las bacterias acidófilas en general, y las bacterias espirales microaerofílicas son particularmente adaptables a la mucosa salival (10,18).

También se ha confirmado la presencia de *H. pylori* en el agua, lo que provee evidencia adicional de que la transmisión ocurre asimismo a través del agua de bebida. *H. pylori* ha sido detectado por medio de PCR en el agua de algunos países sudamericanos como Perú y Colombia, indicándose en algunos de estos estudios sensibilidad de la bacteria a los estándares de clorinación que se utilizan rutinariamente para la eliminación de *Escherichia coli*. Estos estudios revelan a la vez, que al estar contaminada el agua, la transmisión puede ocurrir también a través de la comida (14,31).

H. pylori ha podido ser cultivado del agua, en donde el marcaje con timidina tritiada evidenció que el metabolismo de la bacteria es prolongado, ya que se mantiene aproximadamente por 10 días a 4°C. El agua puede desempeñar por ejemplo, un papel de vehículo intermediario de contaminación fecal humana, constituyendo entonces el vehículo principal de contaminación (32).

En estudios recientes se ha observado una alta prevalencia de la infección en niños de familias en las que los adultos han resultado ser seropositivos, demostrándose de esta manera que existe transmisión intrafamiliar. Ambos padres están involucrados en la transmisión hacia los niños. No obstante, es probable que este tipo de transmisión sea de dos vías: de niños hacia los padres u otros adultos o personas de la familia y viceversa (26,33,34).

La contaminación por endoscopios, biopsias y pinzas también ha sido estudiada. Esta puede evitarse desinfectando meticulosamente los instrumentos, considerando que el uso de alcohol es insuficiente. Es importante considerar también que el riesgo de este tipo de contaminación es mayor para los gastroenterólogos, asistentes y todo el personal de la salud que se ve directamente involucrado con el manejo de las muestras, por lo que se requieren cuidados especiales para evitar contaminación ocupacional (35).

A partir del estómago, *H. pylori* puede llegar al intestino e implantarse en los divertículos de Meckel, es de hacer notar que incluso en el recto se ha reportado este tipo de implantación. Sin embargo esto es raro que ocurra, depende de la sensibilidad de la bacteria a las concentraciones de

sales biliares, aunque existen referencias acerca de que no puede ser cultivada en sales humanas o de animales, pero la sobrevivencia es posible en el ambiente exterior.

3.5 FACTORES DE VIRULENCIA Y PODER PATOGENICO DE *Helicobacter pylori*:

Los argumentos en favor del rol que juega *H. pylori* en el desarrollo de enfermedades gástricas inflamatorias han estado surgiendo desde 1,983, a tal punto que actualmente es posible afirmar que *H. pylori* es una bacteria patógena.

Esta bacteria es reconocida como el agente etiológico de gastritis antral. El rol de *H. pylori* en el desarrollo de úlceras está más o menos establecido, actualmente aparece como uno de los cofactores requeridos para la aparición de úlceras (36).

Los informes clínicos acumulados durante los últimos años, y que conducen a la erradicación de *H. pylori* muestran que en caso de recaída de enfermedad ulcerosa en pacientes tratados, la colonización de la mucosa por *H. pylori* precede a la reaparición de lesiones ulcerosas. Estas observaciones permiten en lo sucesivo rechazar los argumentos según los cuales *H. pylori* sería solamente un agente oportunista que prolifera dentro de la mucosa estomacal, se implanta y multiplica (37).

Estudios recientes, están a favor de que existe una asociación entre la presencia de *H. pylori* y la presencia de células gástricas atróficas. El ataque de la bacteria contra las células del epitelio gástrico es parecido al ocasionado por *Escherichia coli* enteropatógena; sus formas cocoides se cree que son formas terminales de la bacteria ya diferenciada, y parecen ser capaces de inducir cambios celulares, incluyendo fosforilación de tirosina en las proteínas del hospedero (37).

La infección por esta bacteria se acompaña de la formación de compuestos endógenos, intermediarios de nitrógeno, que pueden contribuir a dañar el ADN de las células del epitelio gástrico y producir apoptosis (37-39).

Esto sugiere la necesidad de realizar ensayos para analizar las propiedades bacterianas específicas de *H. pylori* que permitan determinar cuáles son los factores de virulencia que le permiten colonizar la mucosa gástrica, y que permitan predecir su poder patogénico y sus aptitudes para causar enfermedad (gastritis crónicas superficiales o atróficas, úlceras duodenales o gástricas y carcinomas) así como su persistencia dentro del hospedero.

polimerizada) de los flagelos fue clonado, y actualmente se conoce la secuencia de dicha proteína. Se han encontrado mutantes estables desprovistos de flagelos, y se ha observado falta de movilidad en mutantes creados por recombinación genética. El análisis con estos mutantes, confirma las observaciones realizadas por Eaton y colaboradores, que muestran que el factor de mayor virulencia de *H. pylori* es su alta capacidad de movilidad, condición indispensable para la colonización (41).

3.5.1.2 MULTIPLICACION E INSTALACION EN LA MUCOSA GASTRICA:

La bacteria se instala y multiplica asociada con la mucosa, en contacto con las células epiteliales gástricas utilizando la mucosa como lecho. En el microscopio electrónico se visualizan dos tipos de interacciones: una adhesión mediada por dos estructuras fimbricas, y una adhesión "estrecha" que se acompaña de abrasión local de las microvellosidades. Se han identificado tres tipos de adhesiones en cepas de *H. pylori* una estructura fimbrica capaz de asociarse a un receptor del tipo N-acetilneuraminil-lactosa. La segunda fue descubierta por Faauchère y Blaser quienes encontraron que *H. pylori* tiene un material superficial capaz de adherirse a líneas celulares de tipo HeLa. Ligwood y colaboradores describen la existencia de una estructura "exoenzima S" capaz de asociarse específicamente con glicerolípidos del tipo fosfatidiletanolamina, aisladas de células gástricas humanas. Es imposible decir que actualmente éstos tres tipos de adhesiones se encuentran presentes en todas las cepas de *H. pylori* o si es seguro que las cepas presentan un tipo de éstas (32,43).

3.5.1.3 RESISTENCIA A LA FAGOCITOSIS:

En *H. pylori* existen dos enzimas que se consideran candidatas para conferir resistencia a la fagocitosis: Una catalasa presente en todas las cepas de *H. pylori*, sintetizada en muy grandes cantidades y que se encuentra en el medio extracelular. Su presencia podría explicar las dificultades para la erradicación de la bacteria (32,44).

La superóxido dismutasa, es la segunda enzima que podría jugar un papel equivalente en la supervivencia permanente de la bacteria, en estrecho contacto con las células fagocíticas. Además presumiblemente con la catalasa ayuda a proteger a *H. pylori* de los metabolitos de oxígeno liberados por neutrófilos gástricos (32,44).

3.5.2. PODER PATOGENICO DE *Helicobacter pylori*:

En nuestro estado actual de conocimientos aún no está bien comprendido cuál es el daño real

REGION DE INTERES	PATOGENICIDAD ESTUDIADA
Región X	Segmento de ADN asociado con inversión en un punto de la secuencia de Cag, produciendo también cepas más variables genéticamente.

Referencias: 45-51.

El poder patogénico de *H. pylori* reside además en las siguientes características: deterioro de la mucosa, creación de una reacción inflamatoria persistente y perturbación de la regulación o funcionamiento de células parietales (52).

3.5.2.1 DETERIORO DE LA MUCOSA:

El primer determinante implicado directamente en las lesiones de tejido es la ureasa y sobre todo el amonio liberado por la hidrólisis de la urea. El amoníaco es tóxico para las células de los mamíferos, y puede causar daño a las células epiteliales. El amonio y el cloruro de amonio inhiben el crecimiento de células gástricas en la fase 'S', y éste mecanismo puede tener una contribución significativa en la producción de atrofia de la mucosa gástrica (53).

Un segundo factor incriminado, es una citotoxina "vacuolizante" que se produce "*in vitro*" sobre células de las siguientes líneas celulares: Vero, Hela y CHO, vacuolizándolas. Este fenómeno ha sido observado también en células epiteliales de pacientes infectados. La actividad de la citotoxina vacuolizante puede ser inhibida por medio del tratamiento con Tripsina, que es una proteína. Es importante mencionar que ésta actividad sólo la presentan el sesenta por ciento de las cepas aisladas. Un buen número de observaciones publicadas muestran una fuerte correlación entre la expresión de ésta proteína y la asociación con enfermedades ulcerosas (32).

H. pylori sintetiza dos fosfolipasas (A2 y C), cuya actividad puede afectar la integridad de células epiteliales de la mucosa gástrica y alterar la permeabilidad de membranas celulares (35).

3.5.2.2 INDUCCION Y PERSISTENCIA DE LA INFLAMACION:

Una de las hipótesis actuales reside en que la persistencia a la inflamación en el sitio de la

infección por *H. pylori* es directamente responsable de la alteración de las células de la mucosa gástrica, ya que éstas desempeñan un papel protector (células epiteliales), regulador (células G del antro) o secretor (células parietales del fondo) (32).

Ureasa, lipopolisacáridos, amoníaco y citotoxinas son los componentes bacterianos que pueden inducir una respuesta inflamatoria en las personas infectadas por *H. pylori*. Algunos autores sugieren que en la enfermedad ocasionada por *H. pylori* puede existir un fenómeno autoinmune; se ha podido demostrar "in vitro" que los factores mencionados anteriormente son capaces de activar los monocitos que entonces, expresan en su superficie los receptores HLA-DR, interleucina 2, superóxidos, Inteleucina-1 y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNFalfa). *H. pylori* puede producir también el Factor Activador de Plaquetas (PAF), presente en actividades pro-inflamatorias, éste puede producir cambios patológicos incluyendo ulceración gástrica (54).

Recientemente se ha encontrado una proteína del complejo de membrana externa asociada con las unidades de la urea (una proteína de 54 kilodaltons altamente inmunológica), que pertenece a la familia de las proteínas del shock térmico ("heat-shock") hsp60 que incluye partes de la proteína hsp65 de *Mycobacterium tuberculosis*. Esta última proteína es conocida por estimular los linfocitos T, capaces no solamente de reconocer las proteínas bacterianas sino también los epítomos homólogos de proteínas celulares secretadas en respuesta al estrés provocado en la célula. Esta similitud entre la proteína de 54 kD de *H. pylori* y la proteína de *M. tuberculosis* permite pensar en un modo de acción análogo. La hipótesis de que la enfermedad puede darse por un mecanismo autoinmune, permite comprender entonces las lesiones tisulares (54).

3.5.2.3 PERTURBACION DE LA REGULACION Y DEL FUNCIONAMIENTO DE LAS CELULAS PARIETALES:

Al parecer la reacción inflamatoria permite explicar en parte, el exceso de la síntesis de gastrina por parte de las células G del antro del estómago. La síntesis de la gastrina es un efecto positivamente regulado por las citoquinas (54).

3.6 RESPUESTA DEL HOSPEDERO A LA INFECCION OCASIONADA POR

***Helicobacter pylori*:**

La colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori* se acompaña de una respuesta en el hospedero, la cual puede ser local o generalizada, específica o inespecífica, y presenta ciertos

elementos que pueden intervenir en el tipo de patología ocasionada por *H. pylori* (55).

La respuesta local de la mucosa gástrica en la colonización por *H. pylori* es causada tanto por respuesta humoral como celular. Un infiltrado de células mononucleares se observa prácticamente en todos los tipos de gastritis; en los casos de gastritis ocasionada por *H. pylori* se ha demostrado que el infiltrado consiste principalmente de linfocitos T los cuales reconocen ciertos antígenos específicos de la bacteria. En las gastritis activas, asociadas a *H. pylori* se ha encontrado infiltrado de polimorfonucleares. Este conjunto de células participan en los fenómenos inflamatorios observados en el curso de la gastritis por *H. pylori*. Las enzimas lisosomales de polimorfonucleares pueden jugar un papel importante en las lesiones generadas (55).

Una respuesta humoral localizada específica ha sido descrita; las bacterias que colonizan la mucosa son las que más a menudo se recubren por anticuerpos específicos que son fácilmente detectados por inmunofluorescencia (10,15).

Una respuesta general acompaña generalmente a éste tipo de infección, la respuesta humoral se mide por medio de anticuerpos séricos, y por otros estudios a través de las reacciones serológicas como ELISA e INMUNO-BLOT (10,15).

Los pacientes colonizados por *H. pylori* tienen un título de anticuerpos superior al de los pacientes no colonizados. Este tipo de anticuerpos pertenecen a los tipos IgG, IgM o IgA, y están dirigidos contra los inmunógenos más grandes de la bacteria. Estos inmunógenos son principalmente los antígenos expuestos en la superficie y que comprenden ciertas unidades de la ureasa y adhesinas potenciales de la bacteria (56).

En la población en general, la prevalencia de anticuerpos anti-*H. pylori* aumenta regularmente con la edad. Veinte por ciento de sujetos entre los 20 años de vida y el sesenta por ciento de los de aproximadamente 60 años poseen anticuerpos anti *H. pylori* (57,58).

Aunque la respuesta inmune es muy completa, local o general, específica o inespecífica, el tipo de infección ocasionado por *H. pylori* es de tipo persistente y eventualmente reincidente. Se cree que la respuesta anti-*H. pylori* es inoperante para erradicar la bacteria, ya que los efectos de ésta respuesta son ineficaces a nivel de la mucosa gástrica. En efecto, las bacterias recubiertas de anticuerpos pueden sobrevivir muy bien y también multiplicarse, puesto que éstos anticuerpos no destruyen, pero pueden sensibilizar a las bacterias para la fagocitosis (opsonización) o ayudar para

que el complemento pueda actuar; aunque puede ser que en ambos casos la respuesta sea ineficaz a nivel gástrico. El mismo razonamiento puede tenerse con respecto a la respuesta celular. Otra posibilidad es que la gran cantidad de antígenos que permanecen en las bacterias sature parte, o bien la totalidad de los anticuerpos u otros elementos específicos de la respuesta, dejando entonces a las células bacterianas recubiertas (58).

3.7 METODOS DIAGNOSTICOS PARA *Helicobacter pylori*:

Se han propuesto diferentes técnicas para el diagnóstico de la infección causada por *H. pylori* basadas en los métodos clásicos, que son los métodos bacteriológicos directos o en los métodos de detección indirecta, no invasivos, que se han desarrollado recientemente (32,59).

3.7.1 METODOS DIRECTOS:

Para realizarlos se necesita un fibroscopio gástrico para poder tomar las muestras de biopsias.

En la práctica, el endoscopista debe tomar biopsias obligatoriamente a nivel del antro y cerca de dos centímetros alrededor del píloro. Deben tomarse cuatro biopsias de la misma región para los siguientes análisis: Investigación rápida de ureasa, preparación de un frote que será posteriormente teñido para la coloración de Gram, una para el cultivo y otra para el examen histológico. El estudio histológico de las biopsias es muy importante, ya que además de observar directamente el microorganismo, permite conocer el grado de lesión que ha ocasionado la bacteria a nivel del tejido (59).

3.7.1.1. CONSERVACION DE LA MUESTRA:

La biopsia destinada al examen anatopatológico se deposita en formol o en un reactivo similar. Si se va a realizar un examen inmunohistológico debe de congelarse a -80°C .

Para el examen bacteriológico, es preferible utilizar un medio de transporte como Cary Blair, que permite una conservación cerca de 48 horas a 4°C (32).

3.7.1.2 PRUEBA RAPIDA DE LA UREASA:

Esta prueba se basa en la existencia de una ureasa muy intensa que existe en *H. pylori* y que alcaliniza un medio muy rico en urea y hace virar un indicador de pH. Esta prueba es muy práctica y puede efectuarse en la sala de endoscopia: el endoscopista puede depositar un fragmento de biopsia en el medio y esperar el viraje del indicador, este viraje es rápido, en el 80 por ciento de los casos

utilizadas (1).

El signo histológico más comúnmente asociado con gastritis ocasionada por *H. pylori* es la inflamación mononuclear e infiltrado celular asociado con neutrófilos en el epitelio (1,10).

Concomitantemente existen cambios degenerativos de la superficie epitelial de las células, incluyendo depleción de mucina, vacuolización citoplasmática e irregularidad y desorganización glandular, así como pérdida de la polaridad del núcleo y aumento de tamaño del mismo (62).

El decremento de la inflamación crónica después de la erradicación de *H. pylori* ocurre lentamente, la normalización completa de la mucosa requiere meses y en algunos casos años (10,2).

Las técnicas inmunológicas también pueden utilizarse en los tejidos, fijando con formalina el tejido congelado y material de biopsias. La cuerda encapsulada, desarrollada por Schneider *et al* es una técnica que también puede ser utilizada (1,2,10).

3.7.1.5 CULTIVO:

La biopsia debe ser triturada, para dispersar las bacterias. *H. pylori* es una bacteria frágil y exigente. Pueden utilizarse tres medios: dos selectivos y uno no selectivo. Existen muchos medios selectivos comerciales, por ejemplo Bio-Mérieux y Biotech (París). El agar chocolate puede ser utilizado como medio no selectivo. Según la experiencia de muchos investigadores, se obtienen mejores resultados utilizando medios preparados recientemente, es decir, frescos. Los cultivos deben ser incubados en jarra con una atmósfera microaeróbica a 37°C (10,32).

En la identificación debe considerarse:

1. Una verificación de la morfología
2. Un estudio de características bioquímicas como: oxidasa, catalasa y urea, que deben ser todas positivas. Existe un conjunto de pruebas de identificación rápidas propuesta por API BioMérieux (RAPIDEC-pylori) que analiza ureasa, fosfatasa alcalina, gamaglutamiltransferasa y nitrato reductasa, pruebas que permiten un diagnóstico certero.

Es importante cultivar la bacteria, debido a que permite realizar susceptibilidad antibiótica y ésta es importante porque permite conocer la sensibilidad a los nitroimidazoles que son actualmente los más utilizados en los esquemas terapéuticos, al igual que los macrólidos y las fluoroquinonas. La resistencia es en efecto, predictiva para el esquema terapéutico. El método utilizado actualmente consiste en traspasar de un medio no selectivo a un estándar de McFarland 4 que será posteriormente

sembrado. La susceptibilidad de antibióticos es medida por medio del sistema del Epsilómetro, la lectura se realiza después de 3 días de cultivo y se observan las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC). Para el metronidazol el MIC menor o igual a 8 mg/ml es considerado como resistente (10,62).

3.7.1.6 AMPLIFICACION GENETICA:

3.7.1.6.A Beneficios y Limitaciones:

Actualmente, las sondas de ADN y la amplificación de ácidos nucleicos son muy útiles para caracterizar microorganismos de cultivo difícil. En muchos casos las pruebas serológicas carecen de sensibilidad y especificidad suficiente para encontrar las diferencias entre bacterias similares; por lo que se hace necesario el uso de metodología con mayor poder discriminante (63).

Es importante determinar también, que a pesar de su alta sensibilidad y especificidad, la amplificación o técnicas de ADN no reemplazan el cultivo y procedimientos serológicos convencionales en todas las situaciones, porque estos resultados proveen diferente información: La amplificación determina el ADN ó ARN de un microorganismo particular para saber si se encuentra presente en la muestra, sin embargo éstos métodos no revelan nada acerca de la viabilidad del microorganismo, ya que los detectan aunque esten vivos o muertos. El cultivo, por otra parte, demuestra claramente la viabilidad del organismo, o sugiere que éstos se encuentran involucrados en la infección (9).

3.9.1.6.B Definiciones:

• Acidos Nucleicos:

Existen dos tipos de ácidos nucleicos comúnmente encontrados en la mayor parte de organismos: ADN y ARN. El ADN nativo es una hélice doble compuesta por dos azúcares-fosfato, con pares de bases de nucleótidos unidos por puentes de hidrógeno. El ADN es el mayor depósito de información genética de la célula, mientras el ARN, se encuentra en distintas formas dentro de la célula y se ve involucrado en procesos de transferencia de información codificada en el ADN (9).

El ADN está compuesto por adenina, timina, guanina y citocina; las moléculas de adenina se encuentran opuestas a las de timina y las de guanina opuestas a las de citocina. El ARN es una sola molécula no enlazada, de composición química similar a la del ADN, excepto que las moléculas de timina son remplazadas por uracilo (9).

- **Desnaturalización:**

Las dos cadenas de ADN pueden separarse, o desnaturalizarse, por medio de calor o por rompimiento de bases por medio de álcalis o ácidos fuertes. Este es el primer paso en las reacciones que comprenden la hibridación del ADN (63,64).

- **Sondas de Acidos Nucleicos:**

Consisten en segmentos de ADN o ARN que pueden unirse con sus secuencias complementarias para formar una nueva molécula dúplex. Las sondas pueden ser marcadas con radioisótopos, enzimas, o moléculas quimioluminiscentes, para que la formación de las moléculas duplex puedan ser detectadas. Las sondas pueden ser hechas a medida del género, especie, o variantes de secuencias específicas de las cepas. Casi siempre todos los microorganismos contienen una única secuencia de nucleótidos en sus genomas que puede ser explotada o analizada a través de huella digital para su rápida investigación (64).

- **Huella digital:**

Es una técnica molecular, cuyo propósito es la tipificación y diferenciación de cepas muy parecidas de microorganismos de enorme importancia en microbiología clínica (65).

Es una tarea laboriosa y es difícil su aplicación en un laboratorio clínico de rutina, debido a los altos costos del material y equipo especializado, así como también a la falta de personal calificado, no así en un laboratorio de investigación o de referencia (65-67).

Esta técnica se basa en la digestión del cromosoma bacteriano con endonucleasas de restricción. Los fragmentos de ADN generados, son separados de acuerdo a su tamaño, por medio de electroforesis en geles de agarosa, dejando así una serie de bandas agrupadas de forma característica para cepas similares que constituyen la "huella digital". Las técnicas electroforéticas resuelven fragmentos ordenados entre un rango de cien a veinte mil bases (68-71).

Se ha demostrado en múltiples publicaciones que la huella digital puede ser aplicada a múltiples especies, incluyendo *H. pylori*, mostrando en dichos estudios la diversidad genética que posee esta bacteria (72-74).

• **Reacción en Cadena de la Polimerasa:**

La reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica que puede ser utilizada para encontrar muy bajas cantidades de un agente infeccioso presente en muestras clínicas, por medio del incremento de la cantidad de secuencias de nucleótidos específicos que contiene un determinado organismo, por síntesis directa de ADN. Según Mullis y Faloona el PCR consiste en tres pasos:

- a) Desnaturalización del ADN de la muestra.
- b) Unión de iniciadores específicos (segmentos cortos de ADN complementario, que llevan dirección de 5' a 3' de la secuencia que va a ser amplificada.
- c) Extensión de los iniciadores por medio de la polimerasa de ADN, para producir hebras de ADN que son copias idénticas de la hebra original, el ADN localizado entre los dos primers también es amplificado (75).

En cada ciclo de desnaturalización, se unen y extienden un determinado número de copias de ADN que posee un incremento de 2^n , donde "n" es el número de ciclos. Después de aproximadamente 30 ciclos puede obtenerse una amplificación de 10^6 segmentos de un ADN específico (75).

• **RAPD'S:**

Los RAPD'S (amplificación de segmentos de ADN al azar), pueden ser utilizados para distinguir entre diferentes cepas de bacterias de la misma especie, por ejemplo, *H. pylori*. Este método usa oligonucleótidos elegidos al azar para sintetizar ADN por medio de apareamiento de bases (75).

Los RAPD'S son usualmente visualizados por separación electroforética de ADN en agarosa o poliacrilamida y tinción con bromuro de etidio, o bien por autoradiografía o detección fluorométrica de productos de amplificación marcados. La huella digital se observa en dibujos de bandas que pueden ser comparadas visualmente. La investigación automatizada con densitómetro es necesaria cuando el número de huellas digitales es grande (75,76).

• **Genes de patogenicidad de *Helicobacter pylori*:**

Muchos genes que pueden afectar específicamente durante la colonización o afectar la severidad de la enfermedad son importantes para el estudio de la genética molecular de *H. pylori*. Estos han sido descubiertos y estudiados muy rápidamente durante la última década:

- **vacA:** Citotoxina que induce vacuolización citoplásmica en células eucariotas. Esencialmente todas las cepas acarrean éste gen, pero solo algunas pueden expresar la toxina que induce la vacuolización *in vitro* (45,46).

Experimentos en ratones indican que induce daño gástrico y que juega un rol importante en la inducción de necrosis del epitelio gástrico (47,48).

Este gen presenta dos regiones principales, que han sido llamadas: a) S (secuencia "notable"), y b) m (región media). La secuencia S contiene 3 alelos llamados: S1a, S1b y S2; y la región m dos alelos llamados m1 y m2 (47).

Análisis de una larga colección de aislamientos clínicos de *H. pylori* han demostrado la existencia de 5 diferentes combinaciones de alelos de éstas regiones de VacA: S1a/m1; S1b/m1; S1a/m2; S1b/m2; S2/m2 (48).

Se considera que ésta citotoxina es capaz de inducir úlcera péptica, la combinación de los alelos S1/m1 está más asociada con toxigenicidad y virulencia (47-49).

Se observó también una alta asociación entre la presencia de S1 con la presencia de CagA (48).

Se considera que esta región es el principal marcador de virulencia que ayuda a realizar una mejor determinación de la capacidad patogénica de las cepas de *H. pylori* (48).

- **Región Cag:** Secuencia de 40 Kilobases asociada con patogenicidad. Se encuentra principalmente en personas con enfermedad declarada y está ausente en muchas cepas de infecciones asintomáticas. La región entera contiene 31 pares de bases que se repiten. Las cepas que no la poseen (*cag* negativas) contienen un "sitio vacío", solo con 31 pares de bases, sugiriendo que la región puede ser perdida o adquirida por recombinación entre éstas secuencias repetidas (46,49).

Estudios histológicos han demostrado que la inflamación de la mucosa por neutrófilos es típicamente más severa en personas infectadas con cepas de *H. pylori* que poseen la región comparadas con aquéllas que no la poseen. Las infecciones en humanos por bacterias que poseen esta región, son características por inducir altos niveles de citoquinas como interleucina 8 y factor de quimiotaxis de neutrófilos (46,50).

En algunas cepas, la región *cag* está dividida en un segmento al lado derecho (*cag I*), y un segmento al lado izquierdo (*cag II*), por una secuencia de inserción (*IS605*). En la minoría de

las cepas, *Cag I* y *Cag II* están separadas por una secuencia cromosomal (51).

En Estados Unidos y Europa cerca del sesenta por ciento de todas las cepas de *H. pylori* poseen un gen llamado *cagA*, aunque este porcentaje varía en diferentes poblaciones. Este gen de función no conocida, es un marcador de la región *cag* o isla de patogenicidad. Actualmente se considera que la infección con cepas *CagA* positivas aumenta el riesgo de adquisición de úlceras duodenales y adenocarcinomas de la parte distal del estómago (51).

- *iceA*: Es un fragmento de ADN cuya expresión es inducida por contacto con células del epitelio gástrico. Existen dos secuencias diferentes denominadas *iceA1* y *iceA2* (45).

IceA1 se encuentra muy cercanamente relacionado (presenta homología) con una enzima de restricción denominada endonucleasa NlaIII (45).

iceA1 y *iceA2* se encuentran en el mismo locus. Cepas provenientes de pacientes con úlcera péptica suelen acarrear la secuencia *iceA1*, cepas de pacientes que padecen solo gastritis suelen acarrear *iceA2* (45).

- Marcadores Neutrales: Secuencias de inserción 605, 606, y Región X:

La secuencia de inserción 605 se repite dos veces en la región *cag*. Se encuentra asociada con una región de virulencia responsable de rearrreglos cromosomales, incluyendo deleciones y transposiciones. Esta región se ha encontrado en el cincuenta y seis por ciento de un grupo de 44 aislamientos clínicos estudiados (51).

Al igual que IS605, la IS606 es un elemento de transposición, que permite también más variabilidad en las cepas.

La región X es un segmento de ADN asociado con inversión en un punto de la secuencia de *cag*, recientemente descubierto (45).

3.7.2 METODOS INDIRECTOS:

3.7.2.1 PRUEBAS SEROLOGICAS:

Durante los primeros años siguientes al descubrimiento de *H. pylori*, la serología se utilizó con éxito para el diagnóstico de infecciones por esta bacteria. En efecto, anticuerpos IgG específicos y a veces tipo IgA están presentes en el suero de los sujetos infectados. Los estudios seroepidemiológicos indican que la prevalencia de la infección aumenta con la edad. La infección de la mucosa gástrica resulta en una respuesta local sistémica que incluye elevación de IgG, IgM e IgA

en el suero (77,78).

Los métodos serológicos son particularmente utilizados para investigar el status de infección de un gran número de individuos en estudios epidemiológicos (79,80).

Una gran variedad de técnicas serológicas han sido utilizadas para detección de anticuerpos específicos, incluyendo: fijación de complemento, hemaglutinación, inmunoblot, fluoroinmunoensayo, EIA, etc. (77).

En individuos no tratados y con infección de *H. pylori*, los niveles de anticuerpos están elevados establemente. Después de la erradicación, los niveles de IgG tienden a disminuir aproximadamente a la mitad de los niveles observados antes del tratamiento. Bajos niveles de IgG pueden persistir después de la erradicación, lo que permite evaluar objetivamente al paciente comparando muestras pre y post tratamiento. Si *H. pylori* es disminuído, pero no erradicado, los niveles de anticuerpos IgG pueden reducirse, pero después pueden eventualmente aumentar y sobrepasar los valores del pre-tratamiento (84).

En general, tres tipos de antígenos han sido utilizados en la detección. Estas preparaciones incluyen antígenos crudos, células enteras y fracciones de células. Así como extractos de glicerina y antígenos estables en calor, fracciones de antígenos enriquecidas como ureasa y la proteína de 120 kda. (85).

3.7.2.2 PRUEBA DE LA UREA MARCADA (Breath test):

Es utilizado generalmente por la fuerte actividad de la ureasa existente dentro del estómago cuando *H. pylori* está presente. La bacteria hidroliza la urea para convertirla en amonio (NH_3) e hidróxido de carbono (CO_2). La urea previamente marcada con ^{13}C es administrada. Al ser hidrolizada por *H. pylori* se liberará el hidróxido de carbono (CO_2) marcado, que será absorbido en la sangre y eliminado por el pulmón a través del aire expirado. Dos tipos de isótopos marcados de urea pueden utilizarse: ^{13}C y ^{14}C , aunque el último es más económico (86,87).

El test consiste en recuperar el aire espirado en una bolsa plástica. La proporción de ^{13}C es analizado por espectrofotometría de masa. El umbral de positividad se determina por un informe en tasa, proveniente de una base de datos (87).

Este método es sensible y específico, el inconveniente es el costo elevado de la urea marcada.

Actualmente ésta técnica es comercializada por Cambridge Isotope Laboratory (CIL, Woburn, Massachusetts, USA) y los análisis pueden ser efectuados por el Bureau of Stable Isotope Analysis (BSIA, Brentford, Inglaterra) y por Inbiomed International (Lyon, Francia) (87).

Uno de los análisis recientemente comercializados y denominado CLO-Test, es una modificación de la prueba de espiración, que contiene rojo de fenol como indicador, está disponible comercialmente, sus ventajas son que la reacción es visible más rápidamente y es menos costoso (88).

En conclusión, en estos días los métodos directos invasivos son todavía los mejores. Los elegidos o de preferencia son el test histológico y el cultivo. Este último es en efecto, fundamental porque permite medir la susceptibilidad a antibióticos. Sabemos hoy en día, que el mejor tratamiento son la amoxicilina y nitroimidazoles, y que el principal determinante de la terapéutica a elegir es justamente la resistencia a algunos nitroimidazoles.

La serología puede servir como prueba de seguimiento, a fin de eliminar la endoscopia en sujetos jóvenes seronegativos, sin embargo, no es tan recomendada debido a que la caída de la tasa de anticuerpos IgG es demasiado tardía.

Para poder evitar los inconvenientes de endoscopias repetidas el test de la urea marcada permite seguimiento de pacientes con una buena confiabilidad, pero su principal inconveniente es su elevado costo.

3.8 *Helicobacter pylori*: GASTRITIS Y PATOLOGIAS ASOCIADAS:

3.8.1 GASTRITIS CAUSADA POR *H. pylori*: *H. pylori* ocasiona principalmente gastritis crónica, predominantemente antral aparentemente de tipo B. Otros tipos de gastritis secundarios a causas conocidas como gastritis crónica corporal auto-inmune tipo A, gastritis de reflejo tipo C, etc., no se asocian con *H. pylori* (89).

En la gastritis tipo B, las células G del antro se encuentran reducidas, el fondo se encuentra de una manera variable y los niveles de gastrina están entre el rango normal. Los anticuerpos anti mucosa gástrica circulantes están ausentes en el suero (90).

En la mayoría de casos, la gastritis debida a *H. pylori* es asintomática y probablemente sin consecuencias visibles a largo plazo. Sin embargo, existen estados muy cercanos entre el cáncer gástrico y úlceras (en particular duodenal) y la gastritis crónica. También el riesgo de desarrollar un

cáncer es significativamente más elevado cuando existen estados avanzados de gastritis crónica atrofiante antral y del cuerpo del estómago, y el riesgo de desarrollar una úlcera duodenal se aumenta en casos de gastritis antral. Los estudios a largo plazo han mostrado que existen lesiones de gastritis precedentes a la aparición de éstas dos patologías (91,92).

3.8.2 ULCERA DUODENAL:

Esta afección es multifactorial, sin embargo está asociada en más del 90% de los casos con una infección por *H. pylori*. La ausencia de ésta bacteria debe hacer que se investiguen otras enfermedades específicas, como la enfermedad de Crohn, Síndrome de Zollinger Ellison y otros. La evolución de la úlcera duodenal después del tratamiento de ataque puede ser influenciada o no por la presencia de *H. pylori*. En los casos en que *H. pylori* se encuentra presente, las recaídas ulcerosas son frecuentes. Por el contrario, la ausencia de *H. pylori* inicialmente o después del tratamiento, se acompaña de un porcentaje de recaídas ulcerosas muy bajo (inferior al cinco por ciento en un año) (91,92).

Los resultados actuales y la ausencia de datos contradictorios afirman que la infección por *H. pylori* ocasiona enfermedad ulcerosa duodenal, sin embargo su modo de acción es aún hipotético. Existen dos acciones experimentales que apoyan este mecanismo de acción:

- La conservación de la duodenitis crónica causada por la colonización microbiana, que se asocia con la persistencia de úlcera. *H. pylori* es también responsable de debilitar la mucosa, que favorece la ulceración por los efectos producidos por el ácido.
- La producción de una hipergastrinemia post-prandial, reversible después de eliminar la infección, será la consecuencia de una infección antral (91).

3.8.3 ULCERA GASTRICA:

Según datos actuales disponibles, la úlcera gástrica es más común que la duodenal. La prevalencia de *H. pylori* al asociarlo con gastritis, es elevada comparada con la presencia de úlcera gástrica (93).

Se ha postulado que la actividad de ureasa por *H. pylori* es el factor capaz de romper el epitelio gástrico y con ello dar inicio al proceso ulceroso. Cornelius y colaboradores han sugerido que existen dos grupos de pacientes con úlcera gástrica: los que poseen *H. pylori* asociado con gastritis crónica y los que no poseen *H. pylori*, pero que toman drogas antiinflamatorias no

esteroideas, también capaces de romper la mucosa por diferentes mecanismos (90,94).

3.8.4 *H. pylori* Y DISPEPSIA NO ULCEROSA (DNU):

La DNU ha sido calificada como: dispepsia "pseudo-ulcerosa" o como dispepsia "motriz", frecuentemente asociada a quemaduras epigástricas (dolores) y a gastritis antral crónica determinada por histología, y a la vez relacionada con *H.pylori* (93).

3.8.5 *H. pylori* Y CANCER GASTRICO:

Datos epidemiológicos indican que el cáncer gástrico ocurre más frecuentemente en algunas poblaciones que tienen altos niveles de infección por *H. pylori*. Los niveles entre la infección por ésta bacteria y el cáncer gástrico correlacionan inversamente con el estado socioeconómico e incremento de la edad, y declinan sucesivamente en ciudades desarrolladas. También se observa que ocurre menos comúnmente en blancos que en Africanos e Hispanos en los Estados Unidos (94,95). *H. pylori* es actualmente considerado como el factor más importante en la adquisición de carcinoma gástrico (95,96). Se considera que ésta bacteria produce una progresión cronológica "preneoplásica", que inicia con gastritis superficial, continúa con gastritis atrófica, metaplasia intestinal, displasia y finalmente cáncer (95-99).

En dos estudios, publicados en 1,991 se evalúa la ayuda de serología específica en grupos de más de un millón de pacientes con elevado riesgo de contraer cáncer gástrico, que puede aparecer después de los 20 años. Los resultados van en favor de una asociación estadísticamente muy significativa entre la infección ocasionada por *H. pylori* y el argumento de un aumento de riesgo de contraer cáncer gástrico. Esta asociación es particularmente demostrada en casos de cáncer de tipo intestinal, que puede dar lugar a cáncer difuso (95).

Sin embargo, la mayor parte de pacientes infectados por *H. pylori* (50% de la población de adultos en general) no desarrolla cáncer gástrico, razón por la cual otros factores deben intervenir para aumentar el riesgo de cáncer en caso de infección por *H. pylori*. Esta bacteria es actualmente considerada como un cofactor necesario más no suficiente para adquirir el cáncer. La infección crónica por *H. pylori* constituye probablemente la primera etapa del proceso (95,96).

En Guatemala el cáncer de estómago es uno de los que muestra niveles más alarmantes, ocupando entre 1,975 y 1,992 el segundo lugar en general (entre hombres y mujeres), mientras en 1,993 y 1,994 ocupó en hombres el primer lugar, y en mujeres el cuarto. (100).

La implicación de *H. pylori* en las patologías inflamatorias y úlceras gastroduodenales es una realidad, su responsabilidad en la aparición de lesiones de gastritis crónica ha sido demostrada, no solo en ésta enfermedad, sino en otras patologías asociadas a la gastritis: úlcera, dispepsia y cáncer. Todas éstas enfermedades son problemas de salud pública que no pueden pasar desapercibidos o ser indiferentes (101).

3.9 ERRADICACION DE *Helicobacter pylori* :

Varios agentes terapéuticos y asociaciones de los mismos han sido ensayados para lograr la desaparición de *H. pylori* del antro gástrico. Existen tres tipos de terapias:

3.9.1 MONOTERAPIA:

- a) Las sales de bismuto: por sus propiedades antibacterianas bien conocidas, son utilizadas en primer orden, sus formas principales son los citratos o sulfatos de bismuto. Estos permiten una eliminación de la bacteria en el 40 a 70% de los casos (102).
- b) La amoxicilina está dotada de una importante actividad *in vitro*, y es uno de los antibióticos básicos, la eliminación se obtiene en dosis de 2 gramos por día (103).
- c) Otros antibióticos: entre estos pueden incluirse macrólidos, metronidazol, nitrofurantoina y furazolidona (103).
- d) Medicamentos anti-úlceras: los antihistamínicos H₂ son inactivos *in vitro* e *in vivo*. El sucralfato permite una eliminación de la bacteria muy variable, del 0 al 50%; los diferentes antiácidos son probablemente inactivos o muy poco activos. Por el contrario los inhibidores de la bomba de protones (omeprazole, lansoprazole, pantoprazole) poseen una actividad muy certera que ha sido demostrada *in vitro*, el omeprazole ha sido ensayado *in vivo* y se ha demostrado que permite una eliminación en el orden del 50% (104).

3.9.2 DOBLE TERAPIA:

La ineficacia relativa de las monoterapias ha llevado a ensayar asociaciones terapéuticas de bismuto y otros antibióticos o a asociar un anti-secretor con antibióticos.

- a) Bismuto-tinidazole: las tasas de erradicación son superiores a las encontradas en tratamientos donde solamente se aplica bismuto. La eficacia se encuentra en el orden del 40-70% (103).
- b) Amoxicilina-tinidazole: estos dos antibióticos son eficaces, su tasa de erradicación es similar a la asociación anterior (105).

c) Omeprazole-amoxicilina: tres estudios han demostrado que su tasa de erradicación se encuentra entre el 53-66.7%, un promedio de 59.4% (105).

3.9.3 TRIPLE TERAPIA:

a) Bismuto-dos antibióticos: Las asociaciones de bismuto-tetraciclina-metronidazol o bismuto-amoxicilina-tinidazol permiten un progreso importante, se han obtenido tasas de erradicación hasta del 90% (104).

b) Antisecretor-dos antibióticos: motivados por los resultados de la asociación omeprazole-amoxicilina, y por la no comercialización del Bismuto en Francia, las asociaciones de ranitidina-amoxicilina-tinidazol y omeprazol-amoxicilina-tinidazol han permitido una erradicación de la bacteria en el 80 al 90% de los casos. Los estudios utilizando el lansoprazole a la par de omeprazol se encuentran actualmente en curso (104).

4. JUSTIFICACION:

H.pylori es una bacteria que infecta alrededor del 50% de la población mundial. Existe clara evidencia de su patogenicidad como agente causal de gastritis activa crónica y úlceras gástrica y duodenal, sin embargo su participación en el desarrollo de cáncer gástrico no ha sido todavía claramente definida.

La población guatemalteca padece de una gran diversidad de enfermedades infecciosas, pues la mayoría vive en condiciones de extrema pobreza. Las familias son grandes y generalmente viven en condiciones de hacinamiento, se carece de higiene, el nivel de analfabetismo es alto; todas éstas condiciones son favorables para que la prevalencia de la infección por *H. pylori* sea más alta. En Guatemala, el uso de antibióticos es poco restringido. Debido al sobrediagnóstico de amebiasis intestinal el metronidazol es utilizado frecuentemente como amebicida, y esto podría promover la resistencia de *H. pylori* a dicho antibiótico.

Según las estadísticas reportadas por la Liga Nacional contra el Cáncer, en nuestra población, el cáncer de estómago ocupa el primer lugar de incidencia en el sexo masculino, y el cuarto sitio en el sexo femenino (100), considerándose entonces que deben efectuarse mayores esfuerzos para investigar las causas que lo producen; siendo *H. pylori* uno de los factores causales más estudiados hasta el momento, es sumamente importante conocer en nuestro medio los componentes patológicos genéticos que contienen las cepas que infectan a nuestra población, para ayudar de alguna manera a establecer una mejor comprensión de la epidemiología, transmisión, y evolución de la bacteria.

Por otra parte, actualmente se sabe que ciertas regiones genéticas de *H. pylori* se encuentran involucradas con patologías determinadas, por ejemplo VacA una citotoxina de vacuolización ha sido aislada en cepas de pacientes con úlcera duodenal, mientras la región Cag ha sido frecuentemente asociada en pacientes con gastritis. Entonces es importante conocer cuáles son las condiciones o el comportamiento de cepas aisladas de pacientes guatemaltecos que padecen éste tipo de enfermedades.

Es importante también reconocer que con propósitos epidemiológicos, se está utilizando con más frecuencia la tipificación de cepas bacterianas a través de técnicas de ADN, para evidenciar las diferencias microbiológicas "individuales", es decir procedimientos con más resolución y superior fiabilidad, todo esto con el objeto de realizar un mejor diagnóstico, prevención y tratamiento de

enfermedades infecciosas, como las ocasionadas por *H. pylori*.

5. **OBJETIVOS:**

5.1 Objetivo General:

- Examinar en detalle la epidemiología molecular de *Helicobacter pylori* en un grupo de pacientes guatemaltecos infectados.

5.2 Objetivos Específicos:

- Caracterizar la diversidad de cepas de *H. pylori* en un grupo de pacientes guatemaltecos a través de la técnica de RAPD'S.

- Determinar la susceptibilidad al Metronidazol de cepas guatemaltecas de *H. pylori*.

- Conocer la frecuencia de hallazgo de genes de patogenicidad (Cag, VacA, IceA, IS605, IS606, Región X) en cepas guatemaltecas de *H. pylori*.

- Establecer la diferencia entre cepas aisladas en diferentes porciones del estómago, en el mismo paciente, antes y después de tratamiento.

6. **HIPOTESIS:**

El presente trabajo de tesis es un estudio descriptivo, por lo que no incluye hipótesis.

7. MATERIALES Y METODOS:

7.1 Universo de Trabajo:

Pacientes que asistieron a la consulta externa de Gastroenterología del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social.

7.1.1 Muestra:

Este trabajo se realizó en 60 pacientes del Instituto Guatemalteco de Seguridad Social de Guatemala, que asistieron a la consulta de Gastroenterología, durante el período comprendido entre Agosto de 1,994 y Octubre de 1,997. Los criterios utilizados para poder incluir a un paciente en el estudio fueron los siguientes: que presentaran evidencia clínica de padecer una o más de las siguientes enfermedades: gastritis activa crónica, úlcera gástrica o duodenal; además de lograr el aislamiento de *H. pylori* en las diferentes porciones del estómago estudiadas.

El estudio fue de tipo retrospectivo. Las cepas fueron aisladas e identificadas en los laboratorios Dr. Leonardo Mata del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá, congeladas a -70 grados Celsius en leche descremada al diez por ciento para el estudio genético que se realizó posteriormente en el Departamento de Microbiología Molecular de la Universidad de Washington en San Luis Missouri, y posteriormente en el Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá bajo la supervisión del Dr. Douglas Berg.

7.2 Recursos:

7.2.1 Humanos:

- Br. Claudia María García González (tesista)
- Licda. Olga R. Torres de Matute (asesora)
- Dr. Roberto Schneider (gastroenterólogo)
- Dr. Douglas Berg (genetista, transferencia de tecnología)
- Licda. Virginia Hernández (colaboradora)
- Dra. Ausra Raudonikiene (colaboradora)
- Dra. Dangerura Kersulyte (colaboradora)
- Dra. Natalia Akopyants (colaboradora)
- Personal de los laboratorios Dr. Leonardo Mata

7.2.2 Institucionales:

- Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP)
- Departamento de Microbiología Molecular, Escuela de Medicina, Universidad de Washington, San Luis Missouri.

7.2.3 Físicos:

7.2.3.1 Materiales:

7.2.3.1.1 Materiales de Laboratorio:

- Cajas de Petri de 100 X 15 mm
- Asas bacteriológicas no calibradas
- Pipetas serológicas
- Pipetas automáticas
- Tips
- Hisopos
- Palillos
- Gradillas de metal y de plástico
- Servilletas de papel
- Papel parafinado
- Papel aluminio
- Papel plástico
- Parafilm
- Tubos Eppendorf
- Agitador magnético
- Papel filtro
- Guantes de látex
- Láminas portaobjetos
- Peines para formar pozos dentro de la agarosa
- Acetatos
- Papel de nitrocelulosa
- Placas para hibridizar
- Detergente para radioactividad

7.2.3.1.2 Cristalería:

- Beakers de 23, 50, 100, 250, 500 y 1,000 ml.
- Erlenmeyers de 250, 500, 1,000 y 2,000 ml.
- Balones aforados de 25, 100, 250, y 1,000 ml.
- Probetas de 100, 500 y 1,000 ml.
- Embudos
- Viales de un dragma
- Pipetas pasteur
- Tubos de ensayo con tapón de rosca de 13 X 100 mm.
- Tubos de vidrio para hibridación

7.2.3.1.3 Equipo:

- Autoclave (Castle)
- Campana Bacteriológica (Lab-con-co)
- Horno (Lab-line-Instruments)
- Horno Microondas
- Balanza (AND EK 120A)
- Incubadora (Thelco 32 M)
- Vortex (Super-Mixed)
- Refrigeradora (Westinghouse)
- Congelador -20 grados Celsius (Revco)
- Congelador -70 grados Celsius (Forma Scientific)
- Microcentrífuga Eppendorf (5415C)
- Baño de María con agitador (Hot-Shaker)
- Termociclador (Perkin Elmer)
- Cámara para electroforesis horizontal (Hofer Scientific)
- Fuente de poder para electroforesis (Hofer Scientific)
- Bomba de Vacío (Fisher Scientific)
- Pipetor automático (Pipet aid, Hot-line)
- Transiluminador (Fotodyne)

- Equipo fotográfico (McIntoch, Apple)
- Liofilizador
- Horno con luz Ultravioleta
- Gager para medir cargas radioactivas en filtros y materiales de hibridación
- Máquina reveladora de placas
- Cassettes para hibridación

7.2.3.1.4 Medios de Cultivo:

- Agar columbia base (sangre de carnero al 7% más Isovitalex al 1%)
- Agar BHI (sangre de carnero al 7% más Trimetropim 5mg/l, Vancomicina 6 mg/l, Anfotericina 8mg/l, metronidazol 2.4 mg/ml).
- Agar brucela (más 20% de glicerol)
- Agar Cary-Blair

7.2.3.1.5 Reactivos:

Para identificación

- H₂O₂ al 30%
- Urea ultrapura
- Rojo de Fenol
- Agua desionizada estéril
- Dihidrocloruro de N'N'N' tetrametil P-fenilendiamina
- Cristal Violeta
- Lugol
- Carbol-Fucsina
- Alcohol-acetona

Para Susceptibilidad al MTZ

- PBS (solución buffer de fosfatos)

Para extracción de ADN:

- Kit QIAmp (QIAGEN, Cat. No. 29306, 9600 De Soto Avenue, Chatsworth, CA 91311, USA)
- Etanol al 70 y al 95%

Para electroforesis

- Agarosa al 0.5, 1, 1.5 y 2%
- Tris-acetatos-EDTA 10% (TAE)
- Bromuro de etidio (Sigma, 10 mg/ml)
- Tris-boratos EDTA (TBE)
- Buffer de carga (Azul de bromofenol 0.25%, sucrosa en agua 40% p/v)
- Aceite mineral (Sigma)
- Marcadores de peso molecular de ADN (100 bp. de MBI-Fermentas. e-mail: info@fermentas.lt; y 1Kb de BRL)

Para purificación de ADN:

- Glassmilk (Stratagene)
- NaI 4M
- Buffer New

Para las reacciones de hibridación:

- Membrana de nylon Hybond
- Solución de desnaturalización (1.5M HCl, 0.5 N NaOH)
- Solución de Neutralización: (1M Tris pH 7.4, 1.5M NaCl)
- Solución de Hibridación (6X SSC, 5X denhardt's, 1% SDS, 100 microgramos de DNA de Salmón)
- Buffer SSC (0.1X SSC, 1% SDS)
- Kit para marcado de sondas (Stratagene)

Para reacciones de PCR:

- Buffer 10X (1 M Tris-HCl Ph. 8, 1 M KCl, 1 M MgCl₂)
- dNTP 2.5 mM. (adenina, citocina, guanina timina)
- Amplitaq polimerasa
- Agua desmineralizada estéril ultrapura

Se utilizaron los siguientes primers para las reacciones:

REACCION	PRIMERS UTILIZADOS Y SECUENCIAS DE LOS MISMOS	UBICACIÓN DEL SEGMENTO A AMPLIFICAR	PESO DEL PRODUCTO ESPERADO
Unión Izquierda	-Lum1 5' ACATTTTGGTAAATAAACGGCTG 3' -Lcag1 5' TCTCCATGTTGCCATTATGCT 3' -Lum3 5' ATAGCTTTTGTGCATAGAATTGCCG -ORFA1/R 5' CGTCTCGAGATCTTTAGTCTCTTTAGCTTCAG-TTG 3'	Extremo 5' a 330 bp a la izquierda de Cag PAI ¹ Extremo 5' a 47 bp a la izquierda final de Cag PAI ¹ Extremo 5' a 400 bp a la izquierda Cag PAI ¹ Extremo 5' a 476 bp a la izquierda final de Cag PAI ¹	360 bp 550 bp
Unión Derecha	-F4584 5' GCTAATAACAATAAGGTGTTTCCAAAAATC 3' -Rnew1 5' TCATGCCAGCGCGCATGTG 3'	Extremo 5' a 1102 bp a la derecha final Cag PAI ¹ Extremo 5' a 30 bp a la derecha de Cag PAI ¹	1,100 - 400 bp
Sitio Vacío I	-Lum1 5' ACATTTTGGTAAATAAACGGCTG 3' -Rnew1 5' TCATGCCAGCGCGCATGTG 3'	Extremo 5' a 330 bp a la izquierda de Cag PAI ¹ Extremo 5' a 30 bpa la derecha de Cag PAI ¹	360 bp
Sitio Vacío II	-Lum3 5' ATAGCTTTTGTGCATAGAATTGCCG 3' -R5280 5' GGTTCAGCCATTTTCCCTTAATC 3' -R4608 5' TTGAAACCACCTTTGTATTAGC 3' -F4210 5' GATCCTGCTAGTTTGTACGCCA 3'	Extremo 5' a 400 bp a la izquierda de Cag PAI ¹ Extremo 5' a 198 bp a la derecha de Cag PAI ¹ Extremo 5' a 4608 en el gen <i>CagA</i> ² en la unión <i>CagA</i>	650 bp 400 bp
<i>vacA</i> S/S2	-ValF 5' ATGGAATAACAACAACACAC 3' -ValR 5' CTGCTTGAATGCGCCAAAC 3' -SS1F 5' GTCAGCATCACACCCGCAAC 3' -SS3F 5' AGCGCCATACCGAAGAG 3'	797-1055 ³ 866-1055 ⁴ 869-1055 ⁵	259 bp o 190 bp. 190 bp 187 bp
<i>vacA</i> M/M2	-M1F 5' GGTCAAAATGGGTCATGG 3' -M1R 5' CCATGGTACCTGTAGAAAC 3' -M2F 5' GGAGCCCCAGGAAACATTG 3' -M2R 5' CATAACTAGCGCCTTGCAC 3'	2741-3030 ³ 976-1327 ⁴	290 bp 352bp
<i>iceA</i>	-R-Hpy 5' GGCCTACAACCGCATGGAATAT 3'	1380-1360 ⁵	900 (Más o menos)

REACCION	PRIMERS UTILIZADOS Y SECUENCIAS DE LOS MISMOS	UBICACIÓN DEL SEGMENTO A AMPLIFICAR	PESO DEL PRODUCTO ESPERADO
	-FysE 5' CGGCTGIAGGCACATAAAGCTA 3'	489-509	
<i>lecA tipo I y II</i>	-ICEAIF 5' TATTTCTGGAACCTTGGCAACCTGAT 5' -ICEA2-R 5' TCAATCCTATGTGAAACAATGATCGTT 3'	en el gen <i>CysE</i> 44-328 (Extremo 5' del gen <i>CysE</i>)	tamaño variable
<i>IS605</i>	-ORF19F 5' GGCTGTTCTAGGGTCGTGTATAAC 3' -ORF19R 5' CAAGCTAGATGCAATCTAGCTACC 3' -ORF18F 5' CGCCTTGATCGTTTCAGGATTAGC 3' -ORF18R 5' CAACCAACCCGAAGCAAGCATAATC 3'	Extremo 5' a 658 bp en ORFB de IS605 ⁶ Extremo 5' a 1319 bp en ORFB de IS605 Extremo 5' a 112 bp en ORFA de IS605 Extremo 5' a 482 bp en ORFA de IS605	600 bp 480 bp
<i>IS606</i>	-FB4 5' CCTTCTATGAAAGTCAATAAGGG 3' -RB8 5' GAGAAACCTTGATTGTTCCATG 3' -FB2 5' GGAGGGTAGTTGATAAGCAAATC 3' -RB3 5' GTTAGACTTTACACCCCTACGG 3'	Extremo 5' a 576 bp en ORFB de IS606 ⁷ Extremo 5' a 955 bp en ORFB de IS606 Extremo 5' a 327 bp en ORFB de IS606 Extremo 5' a 1393 bp en ORFB de IS606	380 bp 380 bp
<i>RAPDS</i>	-1254 5' CCGCAGCCAA 3' -1290 5' GCGATCCCCA 3' -1281 5' AACGCGCAAC 3'	Son amplificaciones de segmentos de ADN al azar. Se utiliza un solo primer debido a la alta diversidad de <i>H. pylori</i> , lo cual permite que cualquier cepa, se distinga de otras aisladas independientemente con un solo iniciador. ⁸	No tienen peso molecular esperado
<i>Región X</i>	-X5 5' GCTATAATAAAGCCCTAACTGAAAT 3' -R1155 5' CTAATTGAAAGATTATTGATAAAATTGC 3' -X6 5' ATGGAATACCGCTCTCTGTTAGCC 3' -FO405 5' CTAATTGTCCTCCCAACCAATTTTCTTTC 3'	Entre HPO510 y Hpo511 Extremo 5' de CagA En HPO510 Arriba de PicAB 570 bp	300 bp 400bp

¹ Akopyants, *et al.* (1,998) PAI= Isla de Patogenicidad ² Tumuru, *et al.* (1,996) ³ Zhi-Jun Pan, *et al.* (1,997)., estos iniciadores se utilizan en diferentes combinaciones para detectar S1, S1a, S1b y S2. Para M1 y S1 posiciones de nucleótidos en el gen *VacA* de la cepa 60190 de *H. pylori*. ⁴ Para M2 y S2 posiciones de nucleótidos en el gen *VacA* de la cepa 87202 de *H. pylori*. Para S1a posiciones en el gen *VacA* de la cepa Tx30a. No se conocen todavía publicaciones para cepas conocidas de la región S1a. ⁵ Acceso a Banco de Genes U43917 NID g1518451. ⁶ ORF= open reading frame A o B de *IS605*. Kersulyte, *et al.* (1,998) ⁷ ORF= open reading frame A o B en *IS606*. Kersulyte, *et al.* (1,998). ⁸ Berg, *et al.* (1,997).

7.3 Procedimientos:

7.3.1 Aislamiento e Identificación de *Helicobacter pylori*:

Las biopsias obtenidas por endoscopia fueron inoculadas en agar chocolate (sangre de camero al 7% y enriquecido con Isovitalex al 1%), y fueron incubadas a 37 grados Celsius en jarra anaeróbica con sobre Gaspak sin catalizador. También se realizaron directamente de la biopsia las pruebas de Ureasa y una coloración de Gram modificado.

Los cultivos fueron revisados 7 días después de la inoculación, y se procedió a buscar colonias características de *H. pylori*. Al encontrar colonias típicas se realizaron pruebas básicas de identificación como Oxidasa, Catalasa, Ureasa y Coloración de Gram modificado.

7.3.2 Preparación de Stocks y Recuperación:

Después del aislamiento y debida identificación, las cepas fueron colocadas en leche descremada al 10% y posteriormente congeladas a -70 grados centígrados.

Para trabajar nuevamente con la bacteria se colocaron los viales con leche descremada fuera del congelador, cuidando que los mismos no llegaran a descongelarse por completo, debido a que la bacteria podía perder viabilidad. Se tomó una asada de leche congelada con asas al rojo vivo (hirvientes), las cuales fueron inoculadas en agar BHI suplementado con sangre de camero al 7 por ciento, Isovitalex al uno por ciento, Trimetropim 5 mg/l, Vancomicina 6 mg/l, y Anfotericina 8 mg/l, posteriormente fueron incubadas en las siguiente condiciones: concentraciones estables de dióxido de carbono (5 %), oxígeno (10 %) y nitrógeno (85 %), durante tres-cuatro días.

7.3.3 Suceptibilidad al Metronidazol:

- a) Se preparó una suspensión bacteriana de *H. pylori* de acuerdo al estándar 0.5 de McFarland, con un cultivo bacteriano reciente, utilizando PBS (solución buffer de fosfatos estéril).
- b) Se colocaron 200 microlitros de la suspensión en una placa de agar chocolate enriquecido con Isovitalex al uno por ciento y con una concentración de metronidazol de 2.4 miligramos por mililitro, se utilizó como control una placa de agar chocolate enriquecida con Isovitalex al uno por ciento pero que carecía de metronidazol.
- c) Se incubaron los cultivos de acuerdo a la metodología descrita con anterioridad.
- d) Se revisaron los cultivos después de tres a diez días de incubación, los resultados se interpretaron de la siguiente manera: las cepas resistentes al metronidazol fueron aquellas que crecieron tanto en el medio que contenía dicho medicamento como en las cajas control, y se consideraron suceptibles aquellas en las que solamente se obtuvo crecimiento en el medio de cultivo

control, es decir en el que no contenía metrodinazol.

7.3.4 Extracción de ADN de *Helicobacter pylori* con el Kit QIamp:

- a) Se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mililitros, 180 microlitros buffer ATL.
- b) Se colocó todo el crecimiento bacteriano obtenido de una caja de Petri en el buffer.
- c) Se añadieron 20 microlitros de Proteinasa K (20 mg/ml) y la mezcla se dejó incubar 2 horas en baño de María a 55 grados Celsius. Se mezcló con vortex aproximadamente cada 30 minutos.
- d) Se preparó otro baño de María a 70 grados Celsius para el siguiente paso.
- e) Se agregó a las muestras 200 microlitros de buffer AL, se mezcló con el vortex y se incubó a 70 grados Celsius por 10 minutos.
- f) Se agregaron 210 microlitros de etanol (95 ó 100 por ciento), y se mezcló cuidadosamente.
- g) Se colocó la solución obtenida en la columna de elución (contiene una membrana de sílica que absorberá el ADN) cuidando de colocar un tubo Eppendorf en la parte inferior de la columna.
Nota: Se tuvo mucho cuidado de no tocar las columnas con las manos únicamente con pinzas.
- h) Se centrifugó a 6,000 gravedades (8,000 rpm) durante dos minutos.
- i) Se descartó el filtrado. Se agregaron 500 microlitros de buffer AW, y se centrifugó a 6,000 gravedades durante dos minutos.
- j) Se repitió el procedimiento anterior una vez más.
- k) Se cambió el tubo que se encuentra en la parte inferior de la columna de elución, y se rotuló adecuadamente. Se agregaron a la columna 200 microlitros de agua ultrapura y se centrifugó durante 3 minutos a 8,000 rpm. El producto eluído contenía el ADN bacteriano.
- l) Se descartó la columna. Se guardó el ADN a -20 grados Celsius si el mismo no sería utilizado en el momento, si sería utilizado en los 3 a 5 días después de la extracción se guardó solamente a 4 grados Celsius.

7.3.5 Determinación de la concentración de ADN:

- a) Se preparó un gel de agarosa al 1% en buffer TAE al 10% con una fila de pozos al inicio y otra en la parte media del gel.
- b) Se realizaron diluciones 1:10 para todas las muestras.
- c) Se inocularon en los pozos: 5 microlitros de la dilución, más 5 microlitros de agua ultrapura,

y 2 microlitros de buffer de carga. Para medir las concentraciones se utilizaron un marcador lambda (de concentración conocida), en concentraciones de: 25, 50 y 100 nanogramos.

d) Se dejó correr el gel en buffer TBE al 1%, a 40 miliamperios, durante dos horas.

7.3.6 Reacciones de PCR:

Se llevaron a cabo de la siguiente manera:

REACTIVO	1 Reacción	10 Reacciones	20 Reacciones	30 Reacciones
Buffer 10X	2.50	25.00	50.00	75.00
dNTP (2.5 mM)	2.50	25.00	50.00	75.00
Primer No. 1 (10pm/microlitro)	1.00	10.00	20.00	30.00
Primer No. 2 (10pm/microlitro)	1.00	10.00	20.00	30.00
Polimerasa Amplitaq	0.25	2.50	5.00	7.50
Agua ultrapura	15.75	157.50	315.00	472.50
Total (sin muestra de ADN)	23.00	230.00	460.00	690.00
Volumen final más muestra	25.00	250.00	500.00	750.00

* Todas las cantidades están dadas en microlitros

* Si el buffer de reacción no contiene MgCl₂, éste deberá considerarse dentro de la mezcla maestra. Después de agregar cada reactivo se debe lavar la punta en la solución, verificando que todo el contenido se vierta en el tubo. Después de agregar todos los reactivos deben mezclarse por centrifugación durante tres segundos.

La mezcla fue colocada en tubos Eppendorf debidamente rotulados, colocando en cada uno de ellos 23 microlitros.

- a) La mezcla se preparó tomando en consideración que todos los reactivos deberían permanecer en hielo. La polimerasa se sacó del congelador únicamente unos segundos antes de colocarla en la mezcla y se guardó de nuevo en el congelador inmediatamente.
- b) Se debieron considerar durante la preparación de la mezcla, cuidados especiales tales como: mantener la cadena de frío, calcular el número de muestras incluyendo los controles positivos y negativos, los tips utilizados fueron nuevos, las pipetas estaban calibradas y destinadas únicamente para trabajar PCR y se utilizaron guantes durante todo el procedimiento para evitar contaminaciones.
- c) En cada tubo Eppendorf que contenía la mezcla se colocaron 2 microlitros de las muestras de ADN que se encontraban en estudio.
- d) Se agregó una gota de aceite mineral a cada tubo.
- e) Se colocaron las muestras en el termociclador, utilizando el programa requerido, en la mayor parte de los casos las temperaturas que se utilizaron fueron:

Temperatura de hibridación de iniciadores: 94 grados Celsius, por un minuto.

Temperatura de pegado: 57 grados Celsius, por un minuto.

Temperatura final: 72 grados Celsius, con variaciones entre uno y dos minutos.

Generalmente se utilizaron 35 ciclos, al final se programaron 10 minutos a 72 grados Celsius para permitir la extensión de los productos.

7.3.7 Electroforesis de ADN:

- a) Se pesó la cantidad de agarosa dependiendo de la concentración de gel a utilizar, por ejemplo 3 gramos para un gel al 2 por ciento.
- b) Se colocó en un recipiente adecuado y se agregaron 150 mililitros de buffer Tris-Acetatos-EDTA (TAE) al 1 por ciento.
- c) Se calentó la mezcla en horno microondas durante dos o tres minutos, hasta lograr la completa disolución de la agarosa en el buffer.
- d) Se colocó el recipiente en Baño de María, hasta lograr que alcanzara aproximadamente una temperatura de 50 grados Celsius. Al alcanzar esta temperatura se agregaron 6 microlitros de bromuro de etidio, utilizando guantes.
- e) Se vertió el contenido del recipiente en moldes que contenían el o los peines apropiados, evitando formar burbujas.
- f) Se dejó solidificar durante aproximadamente 30 minutos.

7.3.7.1 Carga de las Muestras en el Gel:

- a) Se colocó un litro de buffer TAE al 1 por ciento en un tanque horizontal para electroforesis.
- b) Se mezclaron los productos de PCR con 3.5 microlitros de buffer de carga.
- c) Se colocaron las muestras en los pozos correspondientes evitando la formación de burbujas.
- d) Se incluyeron marcadores de peso molecular de ADN (100 bp ó 1 kb).
- e) Se corrieron las muestras a 20 Amp., por tiempos que variaron entre hora y media y tres horas, dependiendo del peso molecular del producto esperado.

7.3.7.2 Revelado del Gel y Fotografías:

Al observar con lámpara de luz ultravioleta, que la banda o bandas a identificar se encontraban en posición adecuada para tomar fotografía, se llevó el gel al cuarto oscuro, se colocó sobre el transiluminador, se tomó una fotografía de revelado inmediato, como récord permanente.

7.3.8 Purificación de ADN:

- a) Se cortaron las bandas con los productos deseados sobre el transiluminador.
- b) Los pedazos del gel que contenían el ADN en estudio se colocaron en un tubo Eppendorf, se les agregó solución stock de NaI 4M (2.5 ó 3 volúmenes solución).
- c) Se colocó la mezcla en baño de María a 55 grados Celsius, mezclando cada dos minutos. Después de transcurridos 5 minutos el gel se encontró completamente disuelto, la solución se tornó transparente.
- d) Se añadieron a la mezcla 5 microlitros de Glassmilk (silica), y se mezcló cuidando de mantener en forma de suspensión.
- e) Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, cuidando de mezclar cada minuto.
- f) Se centrifugó durante 25 segundos a 6,000 gravedades, y se removió el sobrenadante.
- g) Se lavó el pellet 4 veces en total, utilizando cada vez entre 300 y 500 microlitros de buffer New.
- h) Se eliminó todo el sobrenadante, se agregaron 10 microlitros de agua ultrapura. Se incubó entre 45-55 grados Celsius durante cinco minutos.
- i) Se centrifugó durante 25 segundos a 6,000 gravedades y se recogió el sobrenadante que contiene el ADN en tubos limpios debidamente rotulados.
- j) Se repitió el paso anterior para extraer la mayor concentración y cantidad de ADN posibles de recuperar.

7.3.9 Preparación de Sondas para Hibridación:

- a) Se utilizó una reacción de PCR, solamente con algunas variaciones:
- b) La mezcla contenía diferentes concentraciones de los reactivos:

REACTIVO	CANTIDAD
Cloruro de Magnesio	6 microlitros
Buffer 10X	5 microlitros
dNTP	6 microlitros
Primer No. 1	2 microlitros
Primer No. 2	2 microlitros
Agua Ultrapura	27 microlitros
ADN	2 microlitros
Amplitaq	0.5 microlitros

- a) Los ciclos utilizados fueron también 35, pero los tiempos y las temperaturas fueron diferentes:
- Temperatura Inicial: 94 grados Celsius, un minuto
 - Temperatura de pegado: 60 grados Celsius, un minuto
 - Temperatura final: 72 grados Celsius, 3 minutos.

7.3.10 Procedimiento para Hibridación:

7.3.10.1 Dot Blotting:

- a) En un transiluminador, se colocó un acetato que contenía los cuadros para numerar las muestras.
- b) Con guantes, se cortó la membrana de nylon Hybond, del tamaño del cuadrante a utilizar. Se cortó un extremo para saber el punto donde se colocará la muestra número uno. Se marcó con lápiz el filtro a fin de enumerar de una manera abreviada. El filtro se colocó sobre plástico.
- c) Se agregó 1.5 microlitros de ADN sobre cada uno de los cuadritos. Se anotó en un cuaderno el orden de las muestras.

- d) Se dejó secar el filtro con ADN durante 30-60 minutos a temperatura ambiente.
- e) Se colocó sobre una mesa un pedazo de plástico y se colocaron sobre éste 10 mililitros de solución de desnaturalización (1.5 M NaCl, 0.5 N de NaOH) y 10 mililitros (en dos porciones de 5 mililitros cada una) de solución de neutralización (1 M Tris pH 7.4, 1.5 M NaCl).
- f) Usando dos pinzas, se colocó el filtro primeramente en la solución de desnaturalización y se dejó sumergido durante 5 minutos. Luego se colocó sobre toallitas de papel para remover el exceso de solución. Se tuvo mucho cuidado para tratar de dejar caer el filtro todo al mismo tiempo sobre la solución para evitar escurrimiento de una muestra con otra.
- g) Se colocó el filtro sobre la solución de neutralización por cinco minutos. Posteriormente se colocó sobre toallas de papel para eliminar el exceso de solución.
- h) Se colocó nuevamente el filtro en la segunda porción de solución de neutralización durante cinco minutos, y posteriormente se volvió a remover el exceso.
- i) Se colocó nuevamente el filtro sobre toallitas de papel nuevas, hasta que éstas ya no quedaron mojadas.
- j) Se puso a secar el filtro cerca de algo caliente (por ejemplo bajo la luz de un bombillo) alrededor de 40-60 minutos.

k) Se fijó el filtro con luz Ultravioleta, durante aproximadamente 12 segundos.

7.3.10.2 Pre- Hibridación:

- a) Se colocó el filtro en un tubo de vidrio para hibridación.
- b) Se agregaron 6 mililitros de solución de hibridación (6X SSC, 5X Denhardt's, 1% SDS, 100 microgramos de DNA de salmón).
- c) Se colocó el tubo en el horno de hibridación durante 30-120 minutos.

7.3.10.3 Marcaje de la Sonda:

- a) Se tomaron 5 microlitros del ADN templado que se va a marcar (sonda), más 20 microlitros de agua ultrapura y 10 microlitros de primer (viene en el kit Estratagene de marcado, contiene 6 bp.)
- b) Se calentó la máquina de PCR (termoreciclador) a 100 grados Celsius durante cinco minutos. Se programó para que quede al finalizar el tiempo de incubación a 37 grados Celsius.
- c) Se agregaron 10 microlitros de buffer 5x (para CTP que viene también en el kit), más 3 microlitros de P^{32} y 0.7 microlitros de ADN polimerasa (Exo-Klenow). Se mezcló bien.

Se permitió que la reacción anterior se llevara a cabo a 37 grados Celsius durante 10 minutos.

- a) Posteriormente se llevó a 100 grados Celsius durante 5 minutos en el termoreciclador y al terminar este tiempo, se colocó el tubo de reacción en hielo.
- b) Se agregó la sonda al filtro, disolviéndola en el fondo del tubo de hibridación, cuidando de no tocar el papel.
- c) Se dejó en contacto, por medio de rotación durante toda la noche o durante 3 horas, dependiendo de si se esperaba buen marcado o marcado débil.

7.3.10.4 Exposición y Lavado del Filtro:

- a) Se sacó el filtro del tubo de vidrio y se puso a lavar en un refractario de vidrio con buffer SSC (0.1 SSC, 1% SDS) en baño de María a 55 grados centígrados, durante 5 minutos.
- b) Se pasó el filtro a un nuevo refractario con nuevo buffer, y se descartó el primer buffer de lavado en el garrafón de radioactividad.
- c) Se leyó con el gager la escala de lectura de radioactividad: si se observaba que leía en la segunda escala (1x) entonces se continuaba lavando. Si se observaba que leía alrededor de 3/4 de la escala 0.1x entonces se consideraba que el filtro tenía menos carga radioactiva.
- d) Se quitó el exceso de buffer con toallitas de papel y se forró con plástico un pedazo de película anteriormente usado.
- e) Se colocó el filtro sobre el plástico a modo de fijarlo sobre éste, y al mismo tiempo se envolvió con el pedazo de película Kodac envuelto también en papel plástico.
- f) Se colocó el filtro en un cassette de revelado, en un cuarto oscuro.
- g) Se guardó el cassette a -70 grados Celsius durante 2 horas o durante toda la noche, dependiendo del tipo de sonda utilizada.
- h) Se reveló el film en una máquina Minimed 90 (Konica)..

Nota: La solución de hibridación que contiene la sonda puede ser guardada y posteriormente utilizada. Todo el material contaminado con radioactividad debe

lavarse con detergente especial (Count off) y con suficiente agua.

Los filtros también pueden reusarse, únicamente requieren lavados con buffer SDS a 95 grados Celsius, durante quince minutos, dos veces. Pueden almacenarse dentro de un sobre de papel corriente.

8. RESULTADOS:

Se estudiaron un total de 60 pacientes, de los cuales únicamente en 19 pudieron aislarse cepas de *H. pylori* de dos regiones gástricas (antro y cuerpo de estómago); en 5 pacientes el aislamiento solo se logró en una región gástrica (en 3 casos del antro y en dos de los casos del cuerpo). En los sujetos restantes no pudieron aislarse cepas a pesar de haberse demostrado histológicamente la presencia de *H. pylori* a través de coloraciones especiales de material proveniente de las biopsias gástricas, se cree que el bajo porcentaje de aislamiento de cepas de *H. pylori* pudo deberse a muchos factores, por ejemplo el uso de antibióticos en los pacientes antes de la toma de muestra, lo que pudo provocar entonces la falta de crecimiento de la bacteria en los medios de cultivo. También las condiciones en que se realice el cultivo pueden afectar el crecimiento de la bacteria, por ejemplo: utilizar medios con o sin antibióticos durante la siembra de la biopsia o en las resiembras de cultivos stock, utilizar incubadoras especiales con concentraciones de dióxido de carbono más precisas, comparado con la utilización solamente de una jarra de incubación con sobre Gas-pak sin catalítico.

En éste estudio se incluyeron solamente las 44 cepas de *H. pylori* aisladas de los 19 sujetos anteriormente mencionados (incluyendo 3 aislamientos de Úlcera Duodenal de diferentes pacientes, y 3 aislamientos realizados pre y post tratamiento en 2 diferentes pacientes) eliminándose las 5 cepas pertenecientes a los pacientes en quienes solo se logró un aislamiento.

Las biopsias gástricas de los 19 pacientes incluidos en el estudio, además de ser positivas para el cultivo, revelaron a través de histología la presencia de *H. pylori*.

Para una mejor comprensión de los resultados, los pacientes fueron divididos en 3 grupos:

- Grupo I: Pacientes con Gastritis Activa Crónica + *H. pylori* sin Úlcera Duodenal
- Grupo II: Pacientes con Gastritis Activa Crónica + *H. pylori* con Úlcera Duodenal que erradicaron la infección gástrica.
- Grupo III: Pacientes con Gastritis Activa Crónica + *H. pylori* con Úlcera Duodenal que presentaban infección gástrica persistente. (Ver cuadro # 1).

8.1 DIVERSIDAD DE LAS CEPAS AISLADAS:

Las cepas fueron comparadas para establecer diferencias y similitudes entre:

- a) Las porciones del estómago o intestino de un solo paciente: antro, cuerpo, y en tres de los

casos de úlcera duodenal.

- b) Las cepas de todos los pacientes
- c) Cepas de algunos pacientes en los cuales se logró aislar *H. pylori* antes y después del tratamiento.

Las cepas fueron comparadas a través de la técnica de RAPD'S (amplificación de segmentos de ADN al azar), utilizando 3 iniciadores (primers) específicos distintos, y empleando ADN en tres diferentes concentraciones a fin de aumentar la sensibilidad y especificidad de los resultados. El porcentaje de similitud y diferencia entre las cepas, se obtuvo por un recuento de bandas de diferente peso molecular, a través de comparaciones entre los diferentes patrones encontrados.

El promedio de semejanza para los tres iniciadores utilizados, como muestra el cuadro # 2 fue del 80%, mientras el promedio de diferencia entre las cepas fue del 20%; demostrándose de ésta manera que generalmente es la misma cepa la que infecta las diferentes porciones del estómago de un mismo paciente.

Por el contrario, se observó que existe una gran variabilidad entre las cepas que infectaron a los 19 pacientes incluidos en el estudio, ya que todas mostraron diferentes patrones genéticos. De ésta manera se determinó que las cepas guatemaltecas, al igual que las aisladas en otras partes del mundo, presentan una alta diversidad genética.

8.2 SUCEPTIBILIDAD AL METRONIDAZOL:

A través de éste estudio se demostró la alta resistencia de cepas de *H. pylori* de Guatemala al metronidazol, uno de los medicamentos utilizados en la terapia contra dicho agente infeccioso.

Para el Grupo I la resistencia fue de un 71%, para el Grupo II de un 57% y para el grupo III de un 100%, encontrándose entonces un promedio del 74%. (Ver cuadro # 3).

8.3 FRECUENCIA DE HALLAZGO DE LOS DIFERENTES GENES DE PATOGENICIDAD DE *H. pylori*:

Las diferentes regiones estudiadas fueron analizadas en su mayoría utilizando la Reacción de Polimerasa en Cadena, y en algunas oportunidades los hallazgos fueron confirmados utilizando reacciones de hibridación.

Para la región *cag*, se encontró un porcentaje de positividad para el Grupo I de 71%, para el Grupo II de un 100%, y para el Grupo III del 84%, siendo el promedio para los tres diferentes grupos de estudio de un 74%. (Ver cuadro # 3).

Con respecto a la región *vacA* se encontró positividad del 71% para el Grupo I, 86% para el Grupo II, y de un 60% para el Grupo III, teniendo entonces un promedio de 74%. Para esta región se analizaron diferentes combinaciones de alelos, encontrándose: para la combinación de alelos de mayor virulencia S1/M1 un porcentaje de 65.9% (29 cepas de 44); para la combinación S2/M2 un porcentaje de 18.2% (8 cepas de 44); para la combinación S1/M2 un 4.5% (2 cepas de 44); se encontró también un 11.4% de cepas con mezclas o combinaciones de más de dos de estos alelos (5 de 44), por lo que no pudieron ser clasificadas. (Ver cuadro # 4).

Con respecto a la región *iceA* se encontró para el Grupo I un 86% del tipo I, y un 14% del tipo II; para el Grupo II un 43% del tipo I y un 57% del tipo II, y para el Grupo III, un 60% del tipo I y un 40% del tipo II; acarreando entonces la mayor parte de las cepas (63%) el tipo I.

Para la secuencia de inserción *IS605* los porcentajes de positividad fueron los siguientes: para el Grupo I 86%, para el Grupo II 100%, y para el Grupo III 100%. (ver Cuadro 3).

Para la secuencia de inserción *IS606* los resultados fueron: un 100% de positividad para los 3 grupos de estudio.

Y por último para la región *X* se obtuvo un 36.4% de positividad como promedio para los 3 grupos de estudio.

9. DISCUSION DE RESULTADOS:

9.1 Diversidad de las cepas:

De acuerdo a los resultados obtenidos para el conjunto de cepas guatemaltecas estudiadas, y a las comparaciones establecidas con respecto a los resultados obtenidos en otras poblaciones, se puede aseverar que el patrón genético de *H. pylori* es bastante diverso. Esto puede deberse a muchas razones, por ejemplo: a frecuentes mutaciones entre genes particulares, sustituciones de bases, sitios específicos de procesos de recombinación y transposición, cambios de orientación, recombinación entre secuencias repetidas (reportadas por Bukanow y Berg en 1,996), mutaciones dobles, por ejemplo mutaciones silenciosas, etc. Es importante mencionar que actualmente entre las regiones del mundo en que se conserva este patrón de alta diversidad, se pueden mencionar: Alaska, Perú, Estados Unidos y Europa (45).

9.2 Suceptibilidad al Metronidazol:

La alta resistencia al metronidazol encontrada en las cepas de *H. pylori* de Guatemala es consecuencia del uso no restringido de éste medicamento, el cual es ampliamente utilizado como amebicida. Y su uso indiscriminado ha promovido la adquisición de resistencia entre cepas de *H. pylori*, o bien entre otros microorganismos.

En un estudio longitudinal sobre diarrea, conducido en Guatemala por el Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá, la prevalencia de amebiasis por *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* fue del 0.01 por ciento; el diagnóstico fue realizado a través de coloración tricrómica. Sin embargo el porcentaje de recetas para metronidazol por amebiasis es elevado y el porcentaje de falsos positivos en el diagnóstico de amebiasis también lo es.

Se han reportado en diferentes partes del mundo diversos porcentajes de resistencia al metronidazol: Irlanda 33.8 por ciento, Holanda 41 por ciento, Australia 32 por ciento, Perú 71 por ciento (108-110). Como puede observarse los porcentajes son menores en las poblaciones Europeas, sin embargo en la otra población americana reportada (Perú), el porcentaje es casi tan alto o muy similar al de la población guatemalteca, cabe mencionar que en los estudios realizados en Perú también se reconoce el uso indiscriminado que se observa en dicha población del metronidazol.

9.3 Frecuencia de Hallazgo de los Diferentes genes de Patogenicidad:

Es importante recordar que la isla de patogenicidad *cag* se encuentra involucrada en

la producción de altos niveles de infiltración de neutrófilos e inflamación, además de asociarse significativamente con padecimientos de gastritis. En nuestra población el alto porcentaje de positividad encontrado para la isla de patogenicidad *cag*, no es tan elevado como el encontrado en poblaciones de alto riesgo en Perú, Thailandia o China, sin embargo es más alto que el encontrado en Alaska y en regiones de Estados Unidos y Europa, lo que nos lleva a concluir que nuestras cepas se encuentran en posición intermedia de acuerdo con los resultados encontrados en otras partes del mundo.

El hallazgo de un 84 por ciento de positividad para ésta región también demuestra que las infecciones en los pacientes estudiados son sintomáticas, además de que aumentan el riesgo de adquisición de úlceras duodenales y adenocarcinomas de la parte distal del estómago.

Para *vacA*, la citotoxina de vacuolización, los resultados del grupo de cepas guatemaltecas sugieren un alto potencial de capacidad de vacuolización, es decir mayor capacidad de inducir daño y necrosis de epitelio gástrico. La mayor parte de cepas estudiadas presentaron la combinación de alelos S1/M1 (65.9%) que están más relacionados con toxigenicidad y virulencia, lo que nos indica que la mayor parte de pacientes estudiados acarreaban cepas asociadas con enfermedad severa, con altas posibilidades de contraer úlcera péptica; y un porcentaje menor de dichos pacientes contenían los alelos menos patógenos. Las comparaciones entre diferentes poblaciones sugieren que las combinaciones de los alelos pueden cambiar geográficamente, mientras en Guatemala, Alaska y Perú la combinación más patógena es la que prevalece, en regiones Asiáticas como Shangai prevalece la combinación de alelos S1/M2. (Ver Cuadro #4).

La región *iceA* contiene dos genes principales: I y II. El tipo I está asociado con enfermedad más severa, pacientes que padecen de úlcera péptica, mientras el tipo II está presumiblemente asociado con cepas menos virulentas, y pacientes con padecimiento de gastritis. Estos resultados correlacionan bastante bien con la población guatemalteca estudiada, ya que la mayor parte corresponde al tipo I, y a la vez la mayor parte de sujetos incluidos en el estudio histológicamente presentaban Úlcera Duodenal.

Las secuencias de inserción *IS605* e *IS606*, al igual que la región *X*, son segmentos de ADN que permiten más variabilidad a las cepas, por promover procesos de transposición o inversión en diferentes puntos de la región *Cag*. Los porcentajes de hallazgo de estas regiones son bastante

elevados: para *IS605* de un 95 por ciento, para *IS606* de un 100 por ciento y para la *región X* de un 36.4 por ciento, lo que nos conduce a concluir que en el grupo guatemalteco estudiado esta puede ser una de las causas de la alta variabilidad de patrones genéticos encontrados en dichos pacientes.

Los perfiles de cepas encontrados al combinar los diferentes genes de patogenicidad presentes en las 44 cepas guatemaltecas estudiadas pueden observarse en los cuadros # 1 y 5. En general puede concluirse que el mayor porcentaje de cepas mostraron un patrón genético distinto, sin embargo con respecto a su poder patogénico son bastante similares, ya que poseen en su mayoría todos las secuencias estudiadas hasta el momento: *cagA*, *vacA*, *iceA* (los porcentajes más elevados son los alelos más severos patológicamente).

10. CONCLUSIONES:

10.1 Dentro del grupo de pacientes estudiados, la diversidad de patrones genéticos de *H. pylori* es bastante amplia, similar a la reportada para otras poblaciones como Alaska, Perú, y otras regiones Asiáticas y Europeas.

10.2 Las cepas de *H. pylori* incluidas en el estudio presentaron alto porcentaje de resistencia al metronidazol (74 %).

10.3 En el grupo de pacientes incluidos en el estudio se encontró un número elevado de cepas que presentaban los genes de patogenicidad estudiados (*cagA* 84%, *vacA* SIM1 74%, *vacA* S2M2 37%, *iceA* tipo I 63%, *iceA* tipo II 37%, *IS605* 100%, *IS606* 100%, *región X* 36.4%). Se considera que de acuerdo a los estudios realizados hasta el momento las cepas de Perú son las más agresivas, las de Alaska las menos patógenas y las de Guatemala se ubican intermedias a ambas. Sin embargo el potencial patógeno de este grupo de bacterias puede ser severo.

10.4 El alto porcentaje de positividad encontrado para la *región cag* (84%) o isla de patogenicidad explica los altos niveles de inflamación encontrados en los pacientes incluidos en el estudio.

10.5 Los resultados obtenidos para la *región vacA* y sus alelos demostraron que las cepas guatemaltecas estudiadas presentan un alto potencial para producir vacuolización, ya que la combinación de alelos que poseen en su mayoría son los más virulentos.

10.6 Los resultados obtenidos para el gen *IceA* muestran que las cepas guatemaltecas suelen acarrear en su mayoría el tipo I (63%), que generalmente es el más virulento y el que se encuentra asociado principalmente con úlceras duodenales.

10.7 Las secuencias de inserción *IS605* (100%), *IS606* (100%), y la *región X* (36.4%), a pesar de ser marcadores neutrales, podrían ser los responsables de la variabilidad de patrón genético en las

cepas de las diferentes regiones del mundo estudiadas hasta el momento.

10.8 El perfil genético de *H. pylori* encontrado asociando los distintos genes patógenos estudiados, demuestra que a pesar de la variabilidad genética, la mayoría de las cepas estudiadas posee todas las regiones de patogenicidad descritas y los alelos más patógenos encontrados hasta el momento, lo que nos lleva a concluir que el grupo de pacientes estudiados acarrea cepas de patogenicidad severa.

11. RECOMENDACIONES:

- 11.1 Se recomienda realizar un estudio, en el cual se determine qué condiciones de cultivo son las más favorables para *Helicobacter pylori*, ya que existen varias técnicas recomendadas en la literatura. En éste estudio se utilizaron dos metodologías para el cultivo: se utilizó agas chocolate con sangre de carnero al 7%, únicamente enriquecido con Isovitalax al uno por ciento, éstas cajas fueron incubadas en jarra con sobre Gas-pak sin catalítico. En reislamientos provenientes de cultivos stock se utilizó agar chocolate enriquecido con Isovitalax a la misma concentración pero también suplementado con antibióticos (Anfotericina B, Trimetoprim y Vancomicina), dichos platos de agar fueron incubados en concentraciones estables de gases (dióxido de carbono al 5%, oxígeno al 10% y Nitrógeno al 85%). Se obtuvo mayor cantidad de crecimiento al utilizar antibióticos y concentraciones estables de gases, sin embargo para cultivos iniciales (provenientes de biopsias) los medios que contenían antibiótico no funcionaron, pues disminuyó la cantidad de cultivos positivos. Se recomienda también estudiar la conveniencia de macerar o no las biopsias previo al cultivo.
- 11.2 Se recomienda continuar el estudio a fin de obtener resultados en un número mayor de pacientes guatemaltecos, con el objeto de poder conocer mejor el comportamiento de las cepas aisladas en nuestro medio, y poder concluir con más certeza acerca de los resultados encontrados.
- 11.3 Se recomienda también incluir en otros estudios, un grupo de pacientes con cáncer, a fin de conocer si las cepas aisladas en este tipo de pacientes presentan el mismo comportamiento que las aisladas en los otros grupos de estudio.
- 11.4 Se recomienda también para estudios posteriores utilizar un monitoreo del uso de antibióticos por parte del paciente, antes de la toma de muestra. Actualmente existen métodos sencillos y rápidos como tiras de medición en orina, que ya se encuentran a la venta en el mercado.

10. **REFERENCIAS:**

1. Stark RM, *et al.* Physiology and biochemistry of *Helicobacter pylori*. Br J Biomed Sci 1,995; 52:282-290.
2. Owen R. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* infection. CDR Review 1,993, 4:51-56.
3. Vettorazzi M. Detección de *Helicobacter pylori* en biopsias de mucosa gastrointestinal y correlación con microbiota gástrica autóctona. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1,992. 76p.
4. Lage A, *et al.* Rapid colorimetric hybridization assay for detecting amplified *Helicobacter pylori* DNA in gastric biopsy specimens. J Clin Microbiol 1,996; 33:918-923.
5. Taylor S, *et al.* Long term colonization with single and multiple strains of *Helicobacter pylori* assessed by DNA fingerprinting. J Clin Microbiol 1,995; 33:918-923.
6. Lage A, *et al.* Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR comparison with other invasive techniques and detection of CagA gene in gastric biopsy specimens. J Clin Microbiol 1,995; 33:2752-2756.
7. Warren Jr. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet 1,983; i:1311-1315.
8. Steer H, Colin J. Mucosal changes in gastric ulceration and their response to carbenoxolone sodium. Gut. 1,975; 16:590-597.
9. Murray P, *et al.* Manual of clinical microbiology. 6ed. Washington D.C:American Society for Microbiology 1,995. P.492-498.
10. Marshall B, Warren J. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1,984; 272:65-69.
11. Parsonnet J, *et al.* *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. N Engl J Med 1,991; 325:1127-1131.
12. Marshal J, *et al.* Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. Microbiol Letters 1,984; 25:83-88.
13. Goodwin C, *et al.* Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb.

- nov., respectively. *Int J Syst Bacteriol.* 1,989; 39:397-405.
14. Wesley I. *Helicobacter* and *Arcobacter* species risk for foods and beverages. *Journal of Food Protection* 1,996; 59:1127-1132.
 15. Dubois A. Spiral bacteria in the human stomach: The gastric helicobacters. *Emerg Inf Dis* 1,995; 1:79-85.
 16. Beji A, *et al.* Evidence of gastritis with several *Helicobacter pylori* strains. *Lancet* 1,989; ii:1402-1403.
 17. Hazzel S, *et al.* *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factor in colonization of the gastric epithelium. *J Infect Dis* 1,986; 153:658-663.
 18. Pytko-Polonczyk J, *et al.* Oral cavity as permanent reservoir of *Helicobacter pylori* and potential source of reinfection. *J Physiol Pharmacol* 1,996; 214:5-8.
 19. Smoot, D, *et al.* *Helicobacter pylori* ureasa activity toxic to human epithelial cells. *Infect Immun* 1,990:1992-1994.
 20. Lee A. The nature of *Helicobacter pylori*. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1,996; 214:5-8.
 21. Sarker S, *et al.* Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in infants and family contacts in a poor Bangladesh community. *Dig Dis Sci* 1,995; 40:2669-2672.
 22. Malaty H, *et al.* Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Korean children: inverse relation to socioeconomic status despite a uniformly high prevalence in adults. *Am J Epidemiol* 1,996; 143:257-262.
 23. Goodman K, Correa P. The transmission of *Helicobacter pylori*: A critical review of the evidence. *Int J Epidemiol* 1,995; 24:875:887.
 24. Neale K, Logan R. The epidemiology and transmission of *Helicobacter pylori* infection in children. *Aliment Pharmacol Ther* 1,995; 9:75-84.
 25. Veldhuyzen-van-Zanten S. Do socio economic status, marital status and occupation influence the prevalence of *Helicobacter pylori* infection?. *Aliment Pharmacol Ther* 1,995; 9:41-44.
 26. Czkwianiãnc E, *et al.* Prevalence of *Helicobacter pylori* in children dependently on age and living conditions. *J Physiol Pharmacol Ther* 1,995; 9:93-103.
 27. Fox J. Non human reservoirs of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 1,995; 47:203-

207.

28. Neri M, *et al.* Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in elderly inpatients and in institutionalized old people: Correlation with nutritional status. *Age Ageing* 1,996; 25:17-21.
29. Perez P, *et al.* Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Thailand. *J Infect Dis* 1,990; 161:1237-1241.
30. Megraud F. Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. *Aliment Pharmacol Ther* 1,995; 9:85-91.
31. Hulten K, *et al.* *Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru. *Gastroenterology* 1,996; 110: 1031-1035.
32. *Helicobacter pylori* le point en 1,992. GEFH Groupe d'Etude Francais d'Helicobacter. 1,992. p.1-36.
33. Ashorn M, *et al.* Seroepidemiological study of *Helicobacter pylori* infection in infancy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1,996; 74:141-142.
34. Sedlackova M, Soucek A, Dohnalova A. *Helicobacter pylori* infections: clustering and transmission. *Cas Lek Cesk* 1,995; 134:651-654.
35. PJB publications Ltd. Reducing the endoscopic workload by *H. pylori* screening. Published weekly. Dec. 1,995.
36. Cover T, Dooley CP, Blaser MJ. Characterization of a human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect Immun* 1,990;58:603-610.
37. Segal E, Falkow S, Tompkins L. *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins. *Proc Nat Acad Sci USA* 1,996; 93:1259-1264.
38. Mannick E, *et al.* Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: Effect of antibiotics and antioxidants. *Cancer Res* 1,996; 56:3238-3243.
39. Denizot Y, *et al.* Paf-acether synthesis by *Helicobacter pylori*. *Gut* 1,990; 31:1242-1245.
40. Eaton A, *et al.* Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* 1,991; 59:2470-2475.
41. Cline M, Drumm B. The urease enzyme of *Helicobacter pylori* does not function as an

- adhesin. *Infect Immun* 1,996; 64:2817-2820.
42. Fauchere J, Blaser M. Adherence of *Helicobacter pylori* cells and their surface components to Hela cell membranes. *Microb Pathogen* 1,990; 9:427-439.
 43. Vincent P, *et al.* *Campylobacter pylori* et acidité gastrique. *Gastroenterol Clin Biol* 1,988; 12:179.
 44. Matsui T, *et al.* Effect of ammonia on cell cycle progression of human gastric cancer cells. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1,995; 7:79-81.
 45. Berg D, *et al.* *Helicobacter pylori* infection and gastrointestinal disease in Alaska Natives. Grant Application. Doc. Tec. 1,997. 51p.
 46. Cover T, Berg D, and Blaser M. VacA and the Cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. Doc. Tec. Division of Infectious Diseases, Medical Center North, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN. USA. 1,996. 43p.
 47. Atherton J, *et al.* Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1,995;270:30:17771-17777.
 48. Cover T. The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* (MicroReview). *Mol Microbiol* 1,996;20:241-246.
 49. Ricci V, *et al.* Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cell migration and proliferation *in vitro*: role of VacA and CagA. *Infect Immun* 1,996;64:2829-2833.
 50. Xiang Z, *et al.* Detection in an enzyme immunoassay of an immune response to a recombinant fragment of the 128 kilodalton protein (CagA) of *Helicobacter pylori*. *Eur j Clin Microbiol Infect Dis* 1,993;12:739-745.
 51. Tummuru M, Cover T, and Blaser M. Mutation of the Cytotoxin-associated cagA gene does not affect the vacuolating cytotoxin activity of *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity* 1,994;62:2609-2613.
 52. Censini S, *et al.* Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1,996;93:14648-14653.
 53. Appelmek B, *et al.* Potential role of molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and host Lewis blood group antigens in autoimmunity. *Infect Immun* 1,996; 64:2031-2040.

54. Cave D, Vargas M. Effect of a *Campylobacter pylori* protein on acid secretion by parietan cells. *Lancet* 1,989; 2:187-189.
55. Blaser M. Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori* induced inflammation. A "slow" bacterial infection. *Gastroenterology* 1,992; 102:720-727.
56. Fauchere J, Rosenau A. *Campylobacter et Helicobacter* en pathologie digestive humaine. *Medecine/Sciences* 1,991; 7:138-152.
57. Andersen L, et al. Seroprevalence of Immunoglobulin G, M and A antibodies to *Helicobacter pylori* in a unselected Danish population. *Am J Epidemiol* 1,996; 143:1157-1164.
58. Pérez GI, et al. *Campylobacter pylori* specific serum antibodies in humans. *Ann Intern Med* 1,988; 109:11-17.
59. Rathbone B, Heatley RV. Immunology of *Campylobacter pylori* infection. *Blasser M J* 1,989; 135-140.
60. Megraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1,995; 9:507-518.
61. Bourguignon G, et al. In vitro study of different media to detect urease of *Campylobacter pylori*. *Gastrointestinal Pathology and Campylobacter pylori* 1,989; ICS847:49-52.
62. Hilzenrat N, et al. *Helicobacter heilmannii*-like spiral bacteria in gastric mucosal biopses. Prevalence and clinical significance. *Arch Pathol Lab Med* 1,995; 119:1149-1153.
63. Blaser, M. *H. pylori* of a slow bacterial infection. *Trends in microbiology* 1,993;7:255-260.
64. Wachsmuth K. Molecular epidemiology of bacterial infections, examples of methodology and of investigations of outbreaks. *Rev Infect Dis* 1,986; 8:682-692.
65. Arnold L, et al. Assay formats involving acridiniumester labeled DNA probes. *Clin Chem* 1,989; 35:1588-1594.
66. Sambrook JE, Fritsch E, and Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. N.Y, USA: Cold Spring Harbor, 1989.
67. Owen RJ. Chromosomal DNA fingerprinting a new method of species and strain identification applicable to microbial pathogens. *J Med Microbiol* 1,989;30:89-99.
68. Owen RJ, Costas ON, Dawson C. Application of different chromosomal DNA Restriction fingerprints to specific and subspecific identification of *Campylobacter* isolates. *J Clin Microbiol* 1,989;27:2338-2343.

69. McGeer A, *et al.* Use of molecular typing to study the epidemiology of *Serratia marcescens*. J Clin Microbiol 1,990;28:55-58.
70. López J. Infecciones por *Campylobacter jejuni* en niños: Infecciones recurrentes o persistentes? Comparación de cepas por ripo-tipia. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1,994. 60p.
71. Andrews A. Electroforesis; theory, techniques and biochemical and clinical applications. 2ed. Inglaterra: Oxford Clarendon Press, 1986.XXIII, 440.
72. Popovic T, *et al.* Rybotyping in Molecular epidemiology. Diagnostic Molecular Microbiology. American Society for Microbiology. Washington, D.C.1,993. 22p.
73. Akopyanz N, *et al.* DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. Nucleic Acids Research 1,992;20:5137-5142.
74. Tee W, *et al.* Ribotyping of *Helicobacter pylori* from clinical specimens. J Clin Microbiol 1,992;30:1562-1567.
75. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research 1,990;18:7213-7218.
76. Mullis K, and Faloona A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 1,987;155:335-550.
77. Belkum A. Current trends in typing of bacterial strains for medical purposes. Thesis Erasmus University Roherdam. 1,996. 170p.
78. Parsonnet J, Replogle M, and Yang S. Seroprevalence of CagA positive strains among *Helicobacter pylori* infected healthy young adults. J Infect Dis 1,997;175:1240-1242.
79. Rathbone B, *et al.* Systemic and local antibody responses to gastric *Campylobacter pylori* in non ulcer dyspepsia. Gut 1,986;27:642-647.
80. Megraud F, *et al.* Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* infection in various populations. J Clin Microbiol 1,989;27:1870-1873.
81. Reiff A, Jacobs E, Kist M. Seroepidemiological study of the immune response to *Campylobacter pylori* in potencial risk groups. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1,989;24:716-722.

82. Vaira D, Holton J, Cairns S. Antibody titers to *Campylobacter pylori* after treatment for gastritis. Br Med J 1,988;297:397.
83. van Bohemen C, et al. Rapidly decreased serum IgG to *Campylobacter pylori* following elimination of *Campylobacter* in histological chronic biopsy *Campylobacter* positive gastritis. Immunol Lett 1,989;20:59-61.
84. Sipponen P, et al. *Helicobacter pylori* infection and chronic gastritis in gastric cancer. J Clin Pathol. 1,992;45:319-323.
85. Newell D, Stacey A. Antigens for the serodiagnosis of *Campylobacter pylori* infections. Gastroenterol Clin Biol 1,989;13:37B-41B.
86. Hansson L, et al. *Helicobacter pylori* seropositivity is a risk factor for gastric adenocarcinoma. Gastroenterology 1,992;102:A361.
87. Gassmer D, Dreismann H. Rapid purification of urease from *Helicobacter pylori* and incorporation of the enzyme into second generation serologic test. Rev Esp Enf Digest 1,990,78:34.
88. Graham D, et al. *Campylobacter pylori* detected noninvasively by the ¹³C urea breath test. Lancet 1,987;i:1174-1177.
89. Mobley H, et al. Characterization of urease from *Campylobacter pylori*. J Clin Microbiol 1,988;26:831-836.
90. Coghlan J, et al. *Campylobacter pylori* and recurrence of duodenal ulcers a 12 month follow up study. Lancet 1,987;2:1109-1111.
91. Cornelius P, Cohen H. Clinical Significance of *Campylobacter pylori*. Ann Int Med 1,988;108:70-79.
92. Blasser M. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. J Infect Dis 1,990;161:626-633.
93. Carrick J, et al. *Campylobacter pylori*, duodenal ulcer, and gastric metaplasia: possible role of functional heterotopic tissue in ulcerogenesis. Gut 1,989;30:790-797.
94. Ormand J, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* in specific forms of gastritis. Further evidence supporting a pathogenic role for *H. pylori* in non specific gastritis. Dig Dis Sci 1991;36:142-145.

95. NIN Consensus Conference. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. JAMA 1,994;272:65-71.
96. Taylor D, Parsonnet J. Epidemiology and natural history of *Helicobacter pylori* infection. Infections of the Gastrointestinal Tract 1995;40:551-563.
97. Sipponen P, Seppala K. Gastric carcinoma: failed adaptation to *Helicobacter pylori*. Scand J Gastroenterol Suppl 1,992;27:33-38.
98. Correa P, Haenszel W, Cuello C. Gastric precancerous process in a highrisk population: cohort follow up. Cancer Res 1,990;50:4737-4740.
99. Siurala M, Varis K, Kekki M. New aspects on epidemiology, genetics and dynamics of chronic gastritis. Front Gastroenterol Res 1,980;6:148-166.
100. Registro Nacional de Cáncer de Guatemala. Informes años 1,993 y 1,994 Liga Nacional Contra el Cáncer, Septiembre 1,997. Doc. Tec.
101. Correa P, Cuello C, Duque E. Carcinoma and intestinal metaplasia of the stomach. J Natl Cancer Inst 1,990;44:297.
102. Lamouliatte H. Controlled study of omeprazole-amoxicillin-tinidazole vs. ranitidine-amoxicillin-tinidazole in *Helicobacter pylori* associated duodenal ulcers. Gastroenterology 1,991;100:A104.
103. Lamouliatte H. *Helicobacter pylori* eradication prevents duodenal ulcer relapse. Gastroenterology 1,991;100:A104.
104. Lamouliatte H. Traitement des gastrites crhoniques associées à *Campylobacter pylori*. Gastroentérol Clin Biol 1,989;13:101B-106-B.
105. Megraud F, Boyanova L, Lamouliatte H. Activity of lansoprazole against *Helicobacter pylori*. Lancet 1,991;i:1486.
106. Lange C, Rappuoli R, Covacci A. Functional and Biochemical Analysis of Molecules Encoded by the *cagI* Region of *Helicobacter pylori*. Posters of 97th. Meeting, Miami Beach, Florida, May 4-8, 1,997. Doc. Tec.
107. Akopyants N, Kersulyte D, Berg D. Specific DNA Inversion in the Genome of *Helicobacter pylori*. Posters of 97th General Meeting, Miami Beach, Florida, May 4-8, 1,997.

108. Xia H, *et al.* Prevalence of metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* in dyspeptic patients. *Ir J Med Sci* 1,993;162:91-94.
109. Noach L, *et al.* Impact of metronidazole resistance on the eradication of *Helicobacter pylori*. *Scand J Infect Dis* 1,994;26:321-327.
110. Midolo P, Lambert J, Turnidge G. Metronidazole resistance: a predictor of failure of *Helicobacter pylori* eradication by triple therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 1,996;11:290-292.
111. *Helicobacter pylori*: pathological mechanisms to practical management. Abbot Laboratorios, Doc Tec. Guatemala, 1,997;12 p.

11. ANEXOS:

CUADRO No. 1

NUMERO, EDAD Y SEXO DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS.

	NUMERO	EDAD AÑOS - S*	SEXO femenino/masculino
GRUPO I	7	45-49-14	3/4
GRUPO II	7	44-47-13	2/5
GRUPO III	5	48-51-14	1/4

Grupo I: pacientes con Gastritis Activa Crónica + *H. pylori* sin Ulcera duodenal

Grupo II: Pacientes con Gastritis Activa Crónica + *H. pylori* con Ulcera duodenal que erradicaron la infección.

Grupo III: Pacientes con Gastritis Activa Crónica + *H. pylori* con Ulcera duodenal y con infección persistente.

* Desviación estandar.

CUADRO No. 2

COINCIDENCIA ENTRE LAS CEPAS DE *H. pylori* AISLADAS DEL ANTRÓ Y CUERPO GÁSTRICOS DE LOS SUJETOS ESTUDIADOS SEGÚN EL RAPD (primer) UTILIZADO.

GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV	RAPD 1254		RAPD 1290		RAPD 1281		MEDIA ARITMÉTICA	
				SEMEJANZA	DIFERENCIA	SEMEJANZA	DIFERENCIA	SEMEJANZA	DIFERENCIA	POSITIVO	NEGATIVO
7	7	5	19	50%	50%	71%	29%	71%	29%	64	36
				100%	0%	80%	20%	80%	20%	87	13
				86%	14%	100%	0%	86%	14%	91	9
				78%	22%	84%	16%	79%	21%	80	20

Grupo I: pacientes con Gastritis Activa Crónica + *H. pylori* sin Ulcera duodenal

Grupo II: Pacientes con Gastritis Activa Crónica + *H. pylori* con Ulcera duodenal que erradicaron la infección.

Grupo III: Pacientes con Gastritis Activa Crónica + *H. pylori* con Ulcera duodenal y con infección persistente.

CUADRO No. 5

PERFIL GENERAL DE LOS GENES PATOGENOS PRESENTES EN LAS 38 CEPAS ESTUDIADAS.

	PERCENTAJE
1. CA2 - s1 - m1 - ICE1 - Mr	32.0 %
2. CA2 - s1 - m1 - ICE2 - Mr	16.0%
3. CA2 - s2 - m2 - ICE1 - Mr	10.5%
4. COO - s1 - m1 - ICE2 - Mr	7.8%
5. CA2 - s1 - m1 - ICE2 - Ms	7.8%
6. CA2 - s1 - m1 - ICE1 - Ms	5.3%
7. CA2 - s2 - m2 - ICE1 - Ms	5.3%
8. CA2 - s1 - m2 - ICE2 - Mr	5.3%
9. CA2 - s2 - m2 - ICE2 - Mr	5.3%
10. COO - s2 - m2 - ICE - Mr	5.3%

CA2= región Cag positiva

S1/M1=alelos de VacA

S1/M2=alelos de VacA

S2/M2=alelos de VacA

IceA1=tipo I de IceA

IceA2=tipo II de IceA

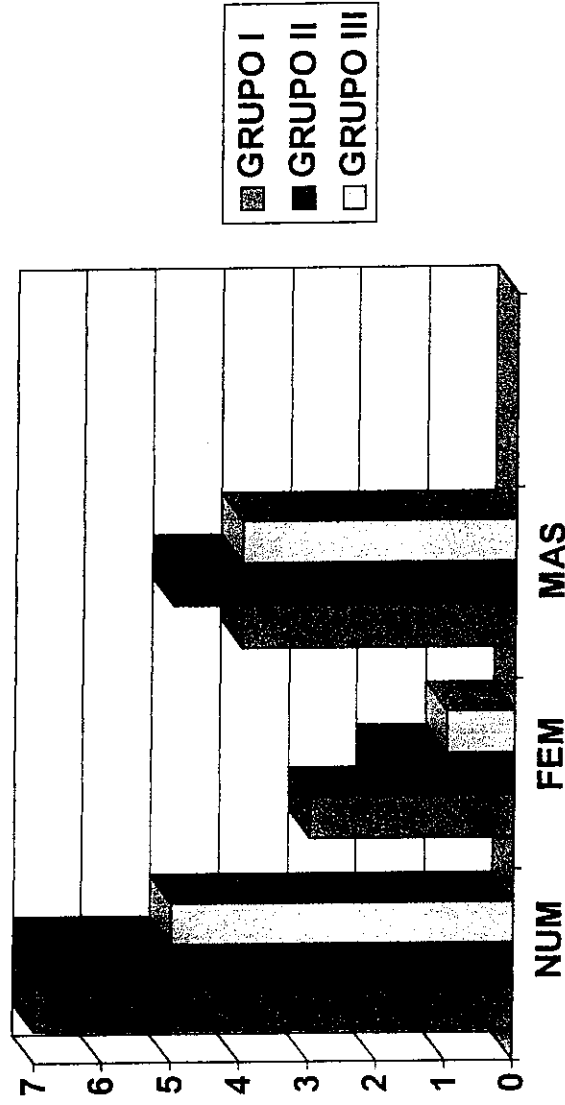
Mr=Metronidazol resistente

Ms=Metronidazole sensible

COO=región Cag negativa

S2/M2=alelos de VacA

GRAFICA No. 1
 NUMERO Y SEXO DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS

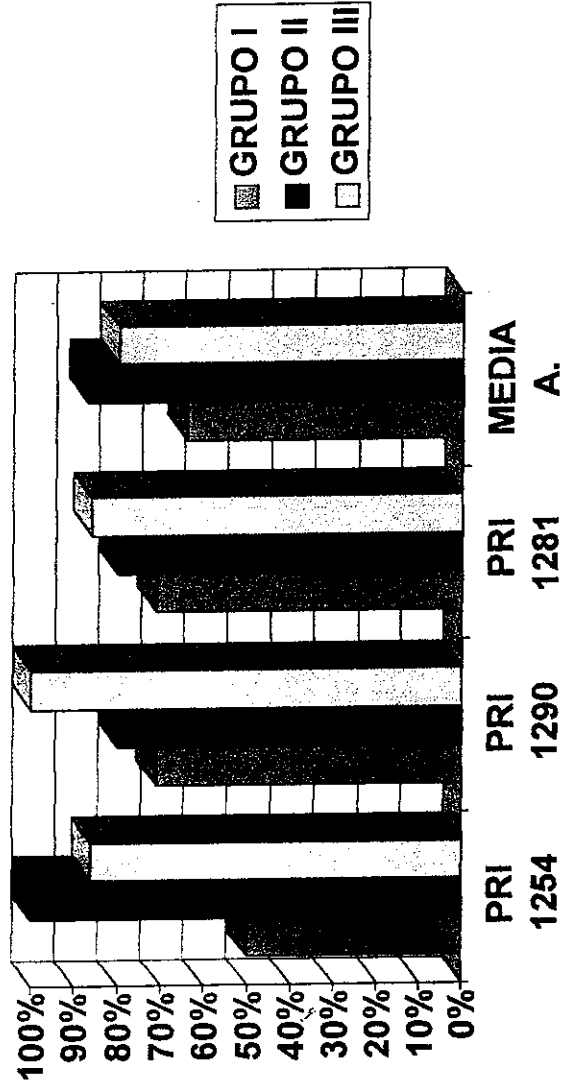


Num=número

Mas=sexo masculino

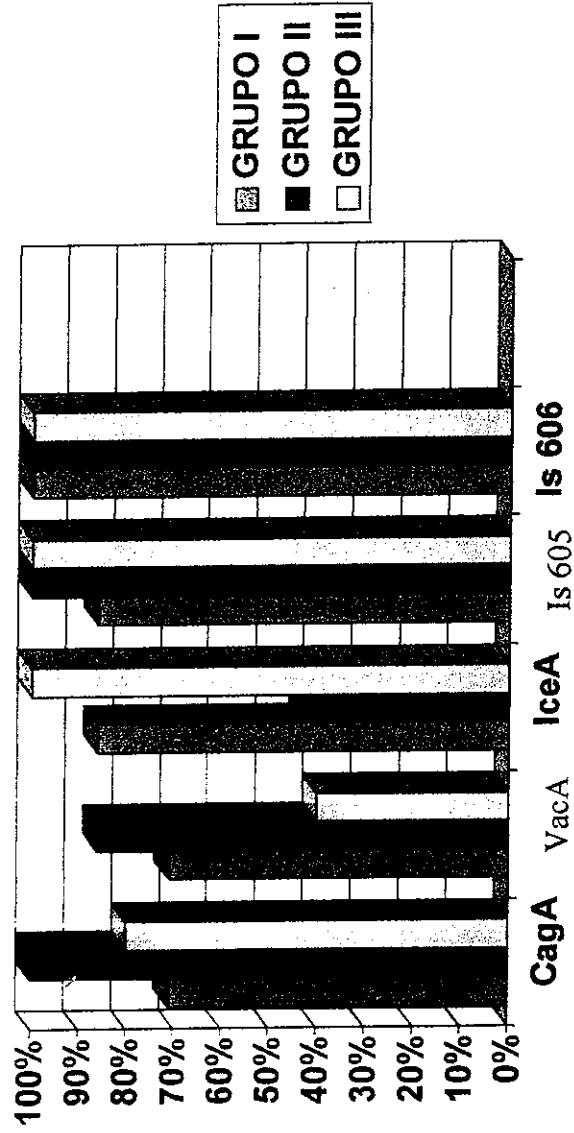
Fem sexo femenino

GRAFICA No. 2
SIMILITUD ENTRE LAS CEPAS DE *H. pylori* DE ACUERDO
AL PRIMER UTILIZADO

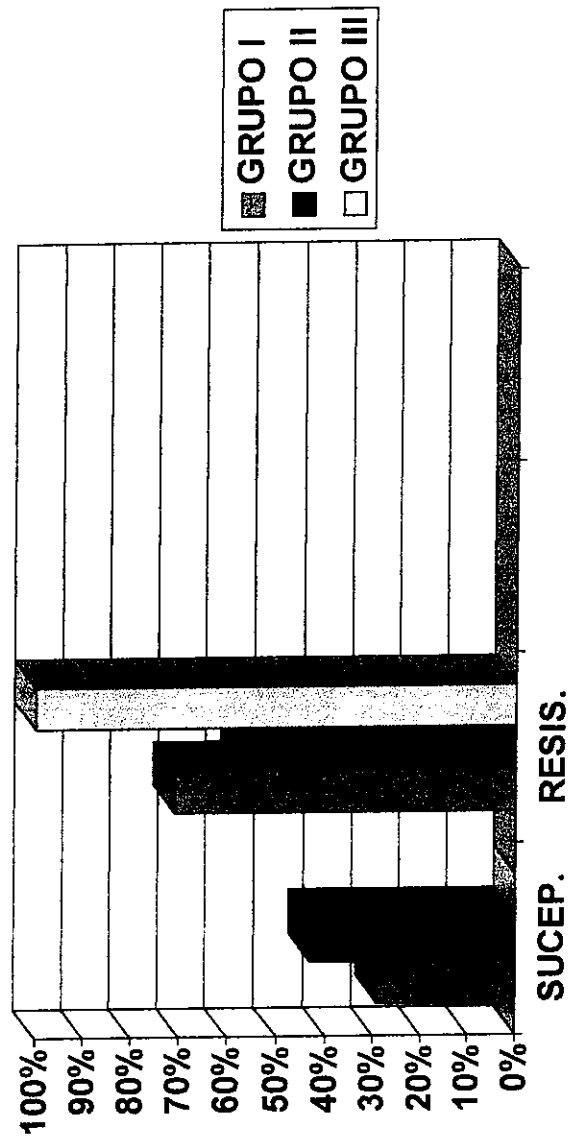


PRI= primer (iniciador)

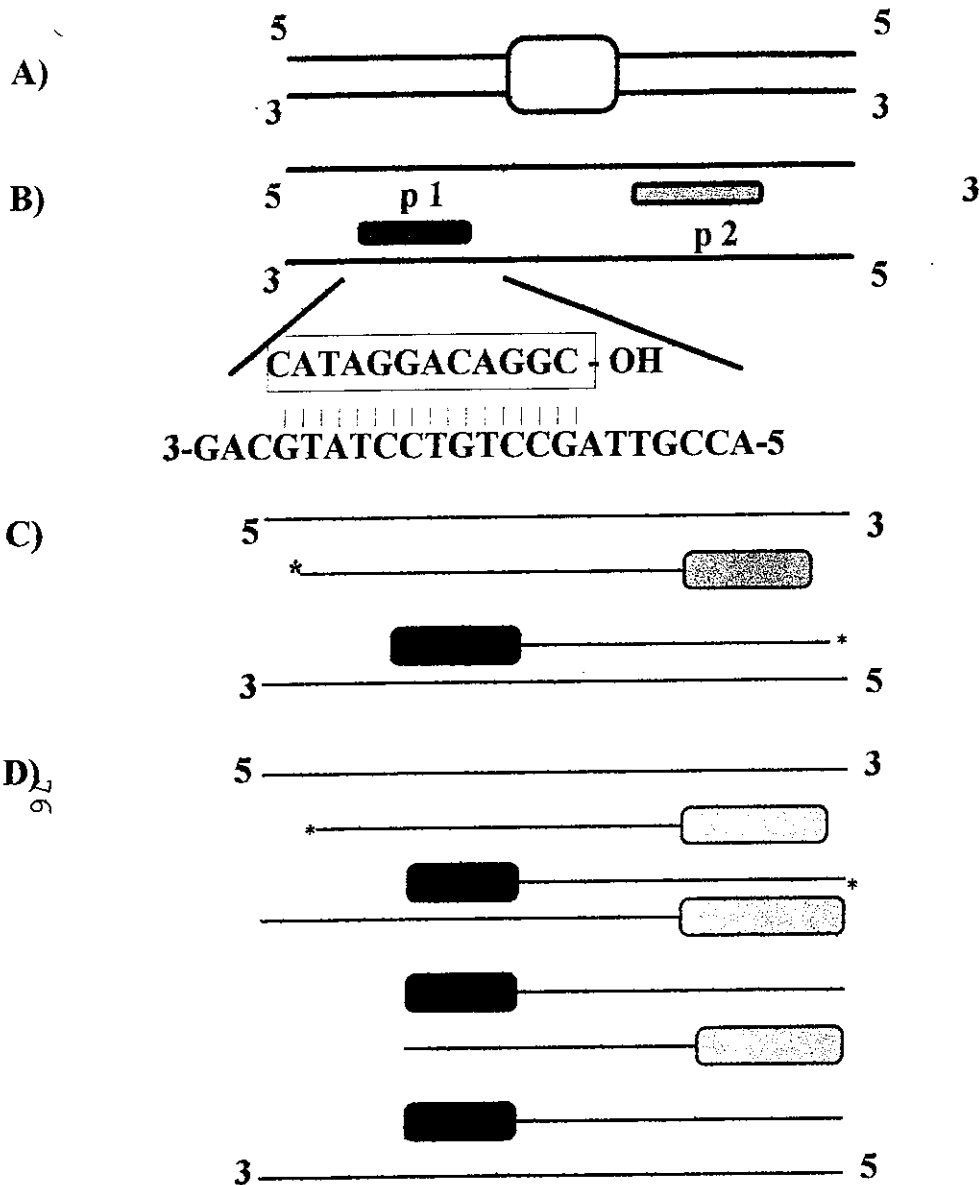
GRAFICA No. 3
FRECUENCIA DE LOS DISTINTOS GENES DE PATOGENICIDAD



GRAFICA No. 4
RESISTENCIA AL METRONIDAZOL



REACCION DE LA POLIMERASA



Principio de la reacción de polimerasa en cadena.

A) La secuencia blanco en una hebillas doble de una molécula de ADN esta indicada con una caja.

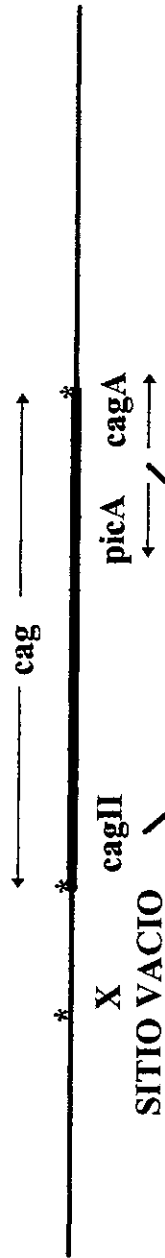
B) Después de que el ADN ha sido desnaturizado, los dos primers (iniciadores) p1 y p2 se pegan a las secuencias flanqueando el ADN blanco. La enlazación del extremo 3 del primer (por debajo) con la ADN polimerasa esta marcado con un asterisco. Abajo del primer uno aparecen los detalles del apareamiento de bases entre el primer (caja) y la hebra de DNA.

C) La DNA polimerasa extiende los dos primers. La region del producto complementario del otro primer se muestra con una línea punteada.

D) En el segundo ciclo de PCR, cada una de las cuatro hebras de ADN son extendidas subsecuentemente. Al completarse el segundo ciclo, hay 4 hebras dobles, copias del ADN blanco, que originalmente era una hebra doble. Dos de las ocho hebras son iguales en longitud a los 2 primers y al ADN blanco. Productos de este tamaño se acumulan exponencialmente en los ciclos siguientes.

LAS CEPAS cag NEGATIVAS TAMBIEN PUEDEN POSEER LA REGION X

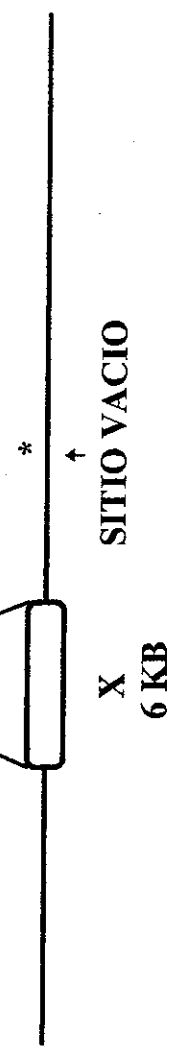
**ESTANDAR
CEPA cag +
(EG. 26695)**



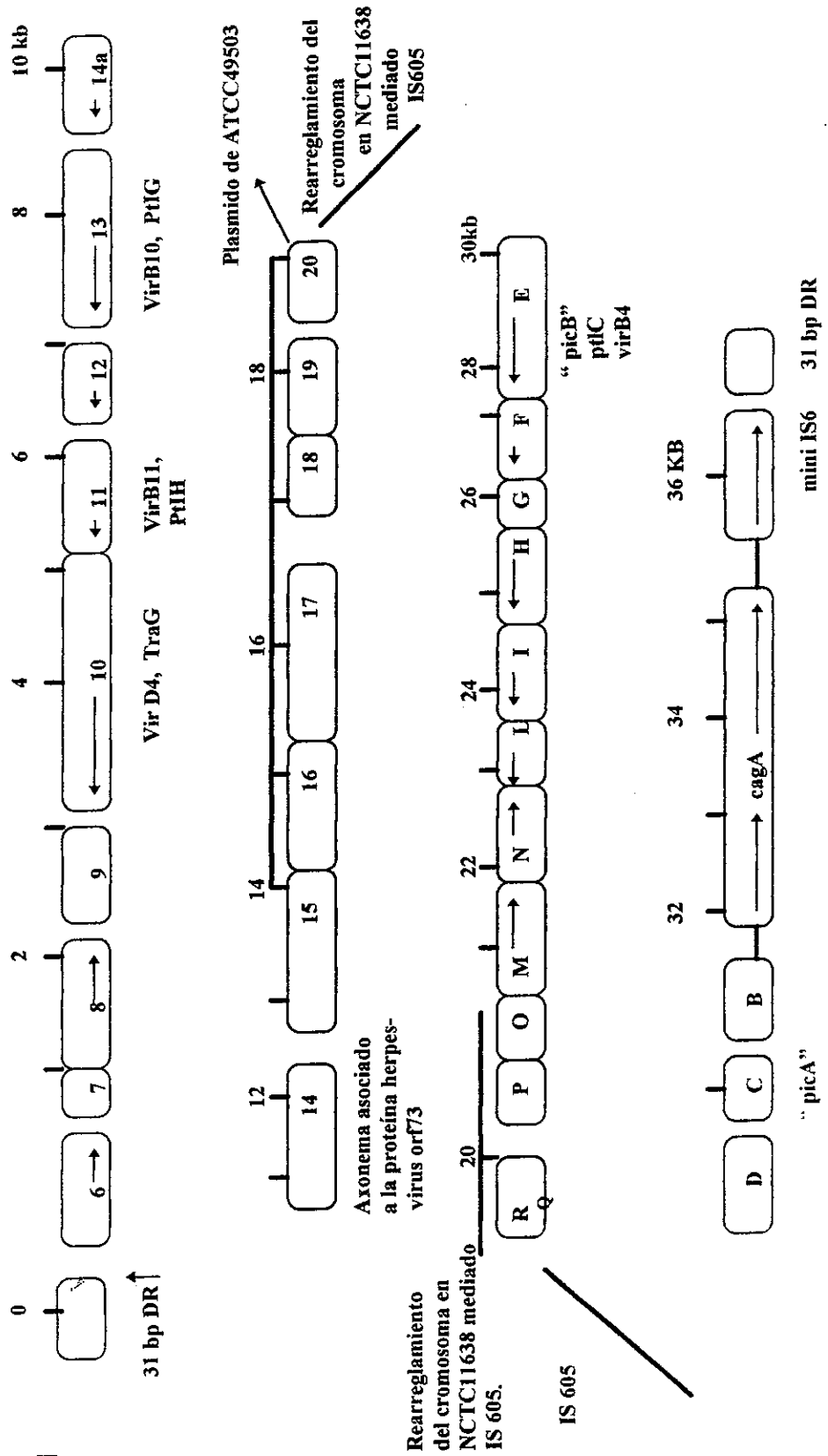
**ESTANDAR
CEPA cag -
(EG. WV99)**



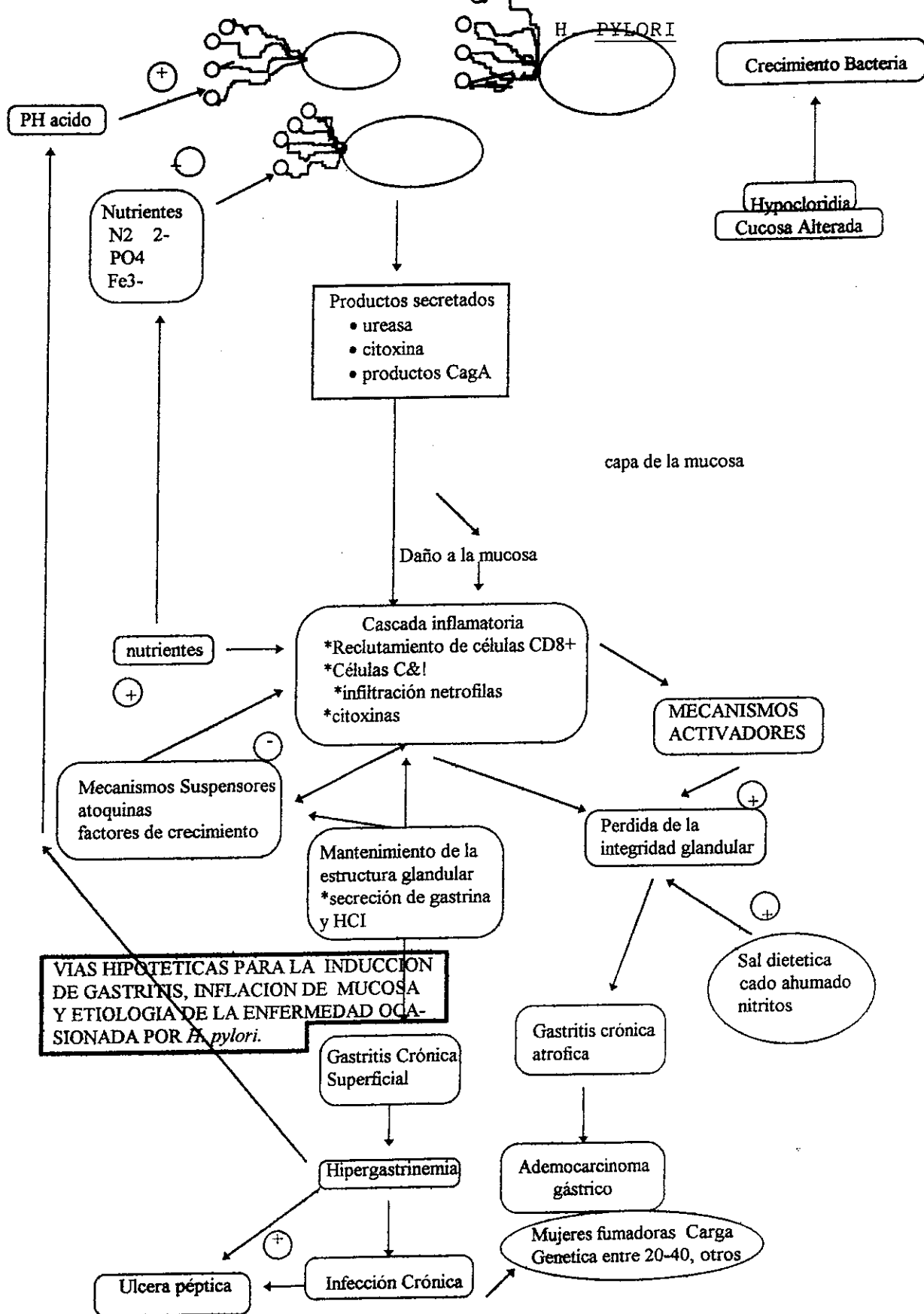
**CEPA cag -
QUE ACARREA
LA REGION X**



ORGANIZACION DE LA REGION COMPLETA *cag*. (DIVIDIDA POR IS605 BASADO EN EL REGLAMENTO EN NCTC11638)



VIAS DE INFECCION Y ETIOLOGIA DE LA ENFERMEDAD CAUSADA POR



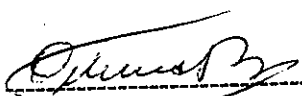
REFERENCIA. 32

TABLA No. 6 RESULTADOS DEL ANALISIS DE GENES DE VIRULENCIA DE CEPAS GUATEMALTECAS DE *H. pylori*

INFORMACION DE LAS CEPAS			SUCEPTIBILIDAD AL MTZ		CAG						YAC α			ICEx α			INSERCIONES			RAPD'S			REG.
CEPA	PTE	PAT	R	R	UNION DERECHA	UNION IZQUIERDA	SITIO VACIO		CAGA		CAG-II	HIBRI	S1 Y S2	M1 Y M2	NORM	TIPO I Y II	IS605	IS606	1254	1290	1281	X	
							1	2	HIBR	PCR													1290
6	1	cag+u	R	+	+	+			+		+		S1	M1	+	2	-	-	2-DB	3-DB	VCR	+	
7	1	cag+u	R	+	+	+			+		+		S1	M1	+	2	-	-	2-DB	3-DB	VCR	+	
11	2	cag	R	+	+	+			+		+		S1	M1	+	2	-	-				+	
12	3	cag+u	S	+	+	+			+		+		S1	M1	+	1	-	-	2-DB	VCR	3-DB	+	
13	3	cag+u	S	+	+	+			+		+		S1	M1	+	1	-	-	2-DB	VCR	3-DB	+	
14	4	cag	S	-	-	-	+	+	-		-		S2	M2	+	1	+	-	2-DB	VCR	CR	-	
15	4	cag	S	-	-	-	+	+	-		-		S2	M2	+	1	+	-	2-DB	VCR	CR	-	
20	5	cag	S	-	-	-	+	+	-		-		S2	M2	+	2	-	-	VCR	VCR	VCR	-	
21	5	cag	R	+	+	+	+	+	-		-		S2	M2	+	2	-	-	VCR	VCR	VCR	-	
25	6	cag+u	R	+	+	+			-?		+		S1	M2	+	2	+	-	VCR	VCR	VCR	+	
26	6	cag+u	R	+	+	+			-		+		S1	M2	+	2	+	-	VCR	VCR	VCR	+	
32	7	cag+u	S	+	+	+			+		+		S1	M1	+	2	-	-	VCR	VCR	VCR	-	
33	7	cag+u	S	+	+	+			+		+		S1	M1	+	2	-	-	VCR	VCR	VCR	-	
43	8	--	R	+	+	+			+		+		S1	M1	+	2	-	-	VCR	VCR	VCR	+	
75	9	cag+u	R	+	+	+			+		+		S1	M1	+	1	-	-				+	
76	9	cag+u	R	+	+	+			+		+		S1	M1	+	1	-	-	VCR	VCR	VCR	+	
88	10	cag+u	R	+	+	+			+		+		S1	M1	+	2	-	-	VCR	VCR	VCR	-	
97	11	cag	R	+	+	+			+		+		S1	M1	+	1	-	-				+	
98	11	cag	R	+	+	+			+		+		S1	M1	+	1	+	-	CR	VCR	3-DB	+	
99	12	cag	R	-	-	-	+	+	-		-		S2	M2	+	2	+	-	CR	VCR	3-DB	-	
107	19	cag+u	R	+	+	+			+		+		S1,S2	M1, M2	+	1	+	+				-	
108	19	cag+u	R	-	-	-	+	+	-		-		S2	M2	+	1	+	+				-	
109	19	cag+u	R	+	+	+			+		+		S2	M1, M2	+	1	+	+				-	
110	14	cag	R	+	+	+			-		+		S1	M1	+	1	-	-				-	
111	14	cag	R	+	+	+			+		+		S1	M1	+	1	-	-	VCR	VCR	VCR	-	
112	15	cag+u	R	+	+	+			+		+		S1	M1	+	1	-	-	VCR	VCR	VCR	+	



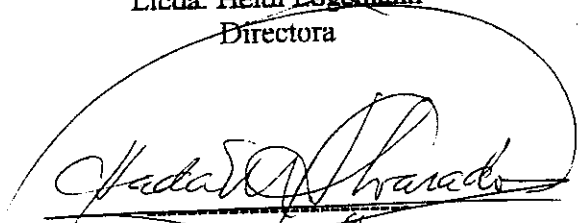
Claudia Maria Garcia Gonzalez
Tesisista



Licda. Olga Torres de Matute
Asesora



Licda. Heidi Logsmann
Directora



Licda. Hada Alvarado
Decana