

	GESTIÓN DE RECURSOS Y SERVICIOS BIBLIOTECARIOS	Código	FO-SB-12/v0 1
	ESQUEMA HOJA DE RESUMEN		Página

RESUMEN TRABAJO DE GRADO

AUTOR: NOMBRES Y APELLIDOS COMPLETOS

NOMBRES: Gabriel Ernesto APELLIDOS: Bautista Peñaloza

FACULTAD: Ciencias Agrarias y del Ambiente

PLAN DE ESTUDIOS: Ingeniería Biotecnológica

DIRECTOR:

NOMBRE: Mauricio

APELLIDOS: Corredor Rodríguez

TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS): DETERMINACIÓN DE PREVALENCIA USANDO GENES PAI COMO FACTOR DE VIRULENCIA Y SU RELACIÓN CON RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS, EN CEPAS DE *Helicobacter pylori* AISLADAS DE BIOPSIAS GÁSTRICAS DE PACIENTES DEL VALLE DE ABURRÁ

RESUMEN

Se identificaron factores de virulencia o genes oncogénicos (PAI) presentes en el genoma de *Helicobacter pylori* los cuales, por estudios previos, se han hallado en pacientes con enfermedades gástricas de gran mortalidad como cáncer gástrico, adenocarcinoma o linfoma del tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT). Estos factores se detectaron en pacientes con enfermedades gástricas leves tales como gastritis, ulcera péptica o ulcera duodenal. Además se evaluó la eficiencia de dos tipos de antibióticos para contrarrestar la infección de la bacteria concluyendo que el conjunto de antibióticos denominado tratamiento 2 presentó menor resistencia por parte de la bacteria y tuvo una tasa de erradicación muy alta.

PALABRAS CLAVE: Ulcera Gástrica, *Helicobacter pylori*, *cagA*, Linfoma MALT, Levofloxacina

CARACTERÍSTICAS:

PÁGINAS: 134 **PLANOS:** ___ **ILUSTRACIONES:** ___ **CD ROOM:** 1

Elaboró		Revisó		Aprobó	
Equipo Operativo del Proceso		Comité de Calidad		Comité de Calidad	
Fecha	24/10/2014	Fecha	05/12/2014	Fecha	05/12/2014

DETERMINACIÓN DE PREVALENCIA USANDO GENES PAI COMO FACTOR DE
VIRULENCIA Y SU RELACIÓN CON RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS, EN CEPAS
DE *Helicobacter pylori* AISLADAS DE BIOPSIAS GÁSTRICAS DE PACIENTES DEL
VALLE DE ABURRÁ

GABRIEL ERNESTO BAUTISTA PEÑALOZA

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2016

DETERMINACIÓN DE PREVALENCIA USANDO GENES PAI COMO FACTOR DE
VIRULENCIA Y SU RELACIÓN CON RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS, EN CEPAS
DE *Helicobacter pylori* AISLADAS DE BIOPSIAS GÁSTRICAS DE PACIENTES DEL
VALLE DE ABURRÁ

GABRIEL ERNESTO BAUTISTA PEÑALOZA

Trabajo de grado

Director:

Mauricio Corredor Rodríguez

Ph.D. En Ciencias, Fisiología y Genética, Université de Paris XI (Paris-Sud) Profesor
Asociado, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia.

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2016

ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 31 DE OCTUBRE DE 2016

HORA: 08:00 A.M.

LUGAR: AUDITORIO AULA SUR CUARTO PISO

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

TITULO: "DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA, USANDO GENES PAI COMO FACTOR DE VIRULENCIA Y SU RELACIÓN CON RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS, EN CEPAS DE *Helicobacter pylori* AISLADAS DE BIOPSIAS GÁSTRICAS DE PACIENTES DEL VALLE DE ABURRÁ"

MODALIDAD: INVESTIGACIÓN

JURADOS: LILIANA YANETH SUAREZ CONTRERAS
LADY YESENIA SUÁREZ SUÁREZ
HENRY ALFONSO ROJAS SARMIENTO

DIRECTOR: MAURICIO CORREDOR RODRIGUEZ

NOMBRE DEL ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
GABRIEL ERNESTO BAUTISTA PEÑALOZA	1610207	5.0

OBSERVACIONES:
LAUREADA

FIRMA DE LOS JURADOS:

Liliana Yaneth Suarez Contreras *Lady Yesenia Suarez Suarez* *Henry Alfonso Rojas Sarmiento*

Vo.Bo. Coordinador Comité Curricular

Mauricio Corredor Rodriguez

**FORMATO CARTA DE AUTORIZACIÓN DE LOS AUTORES PARA LA CONSULTA, LA
REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y LA PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TEXTO
COMPLETO**

Cúcuta, 2 de noviembre de 2016

Señores

BIBLIOTECA EDUARDO COTE LAMUS

Ciudad

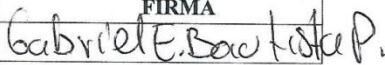
Cordial saludo:

Yo Gabriel Ernesto Bautista Peñaloza, identificado con la C.C. N° 1090373471, autor de la tesis y/o trabajo de grado titulado **DETERMINACIÓN DE PREVALENCIA USANDO GENES PAI COMO FACTOR DE VIRULENCIA Y SU RELACIÓN CON RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS, EN CEPAS DE *Helicobacter pylori* AISLADAS DE BIOPSIAS GÁSTRICAS DE PACIENTES DEL VALLE DE ABURRÁ**, presentado y aprobado en el año 2016 como requisito para optar al título de Ingeniero Biotecnológico; autorizo a la biblioteca de la Universidad Francisco de Paula Santander "Eduardo Cote Lamus", para que con fines académicos, muestre a la comunidad en general la producción intelectual de esta institución educativa, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo de grado en la página web de la Biblioteca Eduardo Cote Lamus y en las redes de información del país y el exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad Francisco de Paula Santander.
- Permita la consulta, la reproducción parcial o total, a los usuarios interesados en el contenido de éste trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato CD-ROM o digital desde Internet, Intranet, entre otros; y en general para cualquier formato conocido o por conocer.

Lo anterior de conformidad con lo establecido en el Artículo 30 de la Ley 1982 y el Artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, que establece que "los derechos morales del trabajo de grado son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

Para constancia se firma el presente documento en la ciudad de Cúcuta, a los 2 días del mes de noviembre de 2016.

NOMBRE DEL AUTOR	N° DE CÉDULA	FIRMA
Gabriel Ernesto Bautista Peñaloza	1090373471	

Dedicatoria

A mi madre, Patricia Peñaloza

Agradecimientos

Al Director del proyecto profesor Mauricio Corredor Rodríguez por su constante apoyo durante este trabajo.

A los profesores: Mauricio Camargo, Lina Barrera, Angélica Santa, Rodrigo Castaño, Jean Paul Delgado, Miembros del grupo Genética regeneración y Cáncer (GRC) por los conocimientos adquiridos durante la realización de experimentos, así como también por sus consejos y enseñanzas.

A la Universidad de Antioquia y a la Universidad Francisco de Paula Santander, por brindarme esta oportunidad.

A mis padres Patricia y César, es a mi madre a quien le pertenece este logro, a mi tío Fabio, mi primo Ricardo y mi abuela Blanca Josefa por su apoyo en la manutención.

Finalmente deseo agradecer al grupo GEBIOMIC y a mis compañeros: Mauricio Rivera, Diego Chávez, Luis Guerra, Simón Mejía, Laura Pabón, Antea Lopera, Andrea Gómez y Jeanneth Mosquera por su constante apoyo.

CONTENIDO

Introducción	15
Resumen	17
1. Problema	19
1.1 Título	19
1.2 Planteamiento Del Problema	19
1.3 Formulacion Del Problema	22
1.4 Objetivos	23
1.4.1 Objetivo General	23
1.4.2 Objetivos Específicos	23
1.5 Justificacion	24
1.6 Alcances Y Limitaciones	25
1.6.1 Alcances	25
1.6.2 Limitaciones	25
1.7 Delimitación	25
1.7.1 Delimitación Espacial	25
1.7.2 Delimitación Temporal	26
1.7.3 Delimitación Conceptual	26
2. Marco Referencial	28
2.1 Antecedentes	28
2.1.1. Antecedentes Empíricos	28
2.1.2. Antecedentes Bibliográficos	28
2.2 Marco Teórico	28
2.3 Marco Conceptual	37
2.4 Marco Contextual	42
2.4.1 Entorno Físico	42
2.4.2 Misión De La Udea	43
2.4.3 Visión De La Udea	43
2.5. Marco Legal	44
3. Diseño Metodológico	45
3.1 Tipo De Investigación	45

3.2 Poblacion Objeto Y Muestra	45
3.2.1 Población	45
3.2.2 Muestra	46
3.2.3 Hipótesis	46
3.2.4 Variables	46
3.3 Fases De La Investigación	47
3.4 Instrumentos Para La Recoleccion De La Información	48
3.4.1 Fuentes Primarias	48
3.4.2 Fuentes Secundarias	49
3.5 Tecnicas De Análisis Y Procesamiento De Datos	49
3.6 Procesamiento De Las Biopsias Gástricas.	50
3.6.1 Recolección De Muestras	51
3.6.2 Macerado De Las Biopsias	51
3.6.3 Extracción De ADN	52
3.6.4 Protocolo De Extracción De ADN	52
3.6.5 Reacción En Cadena De La Polimerasa	53
3.6.6 Contenido De Cada Reacción	56
3.6.7 Programación Del Termociclador	56
3.6.8 Electroforesis En Gel De Agarosa	57
3.7 Recolección De Datos De Tratamiento De Los Pacientes	59
3.8 Tratamiento Estadístico	59
4. Resultados Y Análisis	60
4.1 Definición De Variables	61
4.2 Variables Sociodemográficas De Los Pacientes	62
4.3 Diagnóstico Y Tratamiento	63
4.4 Geles De Agarosa	64
4.4.1 Gen <i>cagA</i>	66
4.4.2 Gen <i>vacA</i>	68
4.4.3 Gen <i>babA</i>	81
4.4.4 Gen <i>iceA</i>	83
4.5 Genotipo De La Cepa Que Infecta Cada Paciente.	87
4.6 Niveles De Gastritis Por Género	91

4.7 Erradicación.	93
5. Administración De La Investigación	113
5.1 Recursos Humanos	113
5.2. Recursos Institucionales	113
5.3. Recursos Materiales	113
5.4 Recursos Financieros	116
5.5 Cronograma De Actividades	116
5.6 Recomendaciones	117
6 Conclusiones	118
7 Referencias	122
Anexos	129

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Lista de oligonucleótidos utilizados en este estudio.	54
Tabla 2: Listado de los reactivos de la PCR	56
Tabla 3: Formato para recolectar la información de los pacientes.	59
Tabla 4: Definición de variables.	62
Tabla 5: Variables Sociodemográficas de los Pacientes.	63
Tabla 6: Diagnóstico y tratamiento.	63
Tabla 7: Lista de muestras <i>cagA</i>	67
Tabla 8: Lista de muestras <i>vacAs1/s2</i> .	71
Tabla 9: Lista de muestras <i>vacAs1a</i> .	73
Tabla 10: Lista de muestras <i>vacAs1b</i> .	75
Tabla 11: Lista de muestras <i>vacAs1c</i> .	77
Tabla 12: Lista de muestras <i>vacAm1</i> .	79
Tabla 13: Lista de muestras <i>vacAm2</i> .	81
Tabla 14: Lista de muestras <i>babA2</i>	83
Tabla 15: Lista de muestras <i>iceA1</i> .	85
Tabla 16: Lista de muestras <i>iceA2</i> .	87
Tabla 17: Genotipo de la cepa que infecta cada paciente.	88
Tabla 18: Niveles de gastritis por género.	92
Tabla 19: Prevalencia de alelos	112
Tabla 20: Material descartable.	114
Tabla 21: Reactivos	114
Tabla 22: Componentes del Kit QUIAGEN	114
Tabla 23: Material de Vidrio.	115
Tabla 24: Equipos.	115
Tabla 25: Presupuesto.	116
Tabla 26: Cronograma.	116

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sistema de secreción tipo IV.	33
Figura 2: Esquema general de procesamiento de las biopsias gástricas y el ADN bacteriano.	50
Figura 3: Resumen del procedimiento general a seguir para llevar a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa.	55
Figura 4: Bosquejo simplificado del protocolo de Electroforesis en gel de Agarosa.	58
Figura 5: Peso molecular en escalera de fragmentos de ADN.	65
Figura 6: Gel gen <i>cagA</i> .	66
Figura 7: Gel gen <i>vacAs1/s2</i> .	69
Figura 8: Gel gen <i>vacAs1a</i> .	72
Figura 9: Gel gen <i>vacAs1b</i> .	74
Figura 10: Gel gen <i>vacAs1c</i> .	76
Figura 11: Gel gen <i>vacAm1</i> .	78
Figura 12: Gel gen <i>vacAm2</i> .	80
Figura 13: Gel gen <i>babA2</i> .	82
Figura 14: Gel gen <i>iceA1</i> .	84
Figura 15: Gel gen <i>iceA2</i> .	86

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Presencia de los diferentes genes de <i>H. pylori</i> .	91
Gráfica 2: Niveles de gastritis por género.	92
Gráfica 3: Distribución del género de los pacientes.	93
Gráfica 4: Erradicación por género.	94
Gráfica 5: Erradicación de acuerdo al tratamiento.	96
Gráfica 6: Erradicación de <i>H. pylori cagA</i> .	97
Gráfica 7: Erradicación de <i>H. pylori cagA+</i> de acuerdo al tratamiento.	99
Gráfica 8: Erradicación de <i>H. pylori babA2+</i> de acuerdo al tratamiento.	100
Gráfica 9: Erradicación de <i>H. pylori vacAs1/s2+</i> de acuerdo al tratamiento.	101
Gráfica 10: Erradicación de <i>H. pylori vacAs1A+</i> de acuerdo al tratamiento.	102
Gráfica 11: Erradicación de <i>H. pylori vacAs1b+</i> de acuerdo al tratamiento.	103
Gráfica 12: Erradicación de <i>H. pylori vacAs1c+</i> de acuerdo al tratamiento.	104
Gráfica 13: Erradicación de <i>H. pylori vacAm1+</i> de acuerdo al tratamiento.	105
Gráfica 14: Erradicación de <i>H. pylori vacAm2+</i> de acuerdo al tratamiento.	106
Gráfica 15: Erradicación de <i>H. pylori iceA1+</i> de acuerdo al tratamiento.	108
Gráfica 16: Erradicación de <i>H. pylori iceA2+</i> de acuerdo al tratamiento.	109
Gráfica 17: Distribución de los genes PAI.	110
Gráfica 18: Prevalencia de alelos.	111

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es una bacteria espiral, Gram negativa en forma de espiral o de “s”, con flagelos polares, capaz de colonizar la mucosa gástrica humana y causar gastritis crónica, úlceras gástricas, duodenales, cáncer gástrico y linfoma del tejido linfoide asociado a mucosa (MALT) (Ameiva *et al*, 2008), habita en el mucus y la superficie del epitelio gástrico bajo condiciones microaerofílicas, con alta prevalencia en países de economía emergente, además es considerada la infección bacteriana crónica más común en el mundo (Correa S. *et al*, 2016) se puede adquirir de forma oral–oral u oral–fecal en cualquier etapa de la vida, por lo que se puede ver afectando niños de temprana edad o personas adultas mayores; la infección depende de muchos factores, entre ellos la influencia ambiental, los factores inmunes y genéticos del huésped y los factores de virulencia del microorganismo. La presencia de *H. pylori* en la mucosa estomacal genera una respuesta inmune e inflamatoria, lo que conlleva a la producción de citoquinas por parte de las células epiteliales generando como consecuencia enfermedades gástricas tales como gastritis crónica o atrófica, úlcera péptica y úlcera duodenal (Warren & Marshall, 1983).

H. pylori fue aislada por primera vez por Barry J. Marshall y J. Robín Warren en 1982, quienes recibieron el premio Nobel en 2005 por descubrir el agente etiológico de una enfermedad, 100 años después de que Robert Koch recibiera el mismo premio por un hallazgo similar, demostrando la relación entre *Micobacterium tuberculosis* y la enfermedad pulmonar del mismo nombre. Transcurrió un siglo hasta que el comité Nobel

volviera a entregar el galardón por el descubrimiento a las investigaciones de un agente etiológico (López *et al*, 2006).

Aunque la infección por *H. pylori* es altamente prevalente en pacientes con cáncer gástrico, la mayoría de las personas infectadas con *H. pylori* nunca desarrollan estas neoplasias siendo las personas infectadas con *H. pylori cagA+* quienes tienen mayor grado de inflamación y daño en células epiteliales que personas infectadas con *H. pylori cagA-*. CagA (Citotoquina asociada al gen A) aumenta la expresión de interleuquina I α , I β , IL-8 en biopsias gástricas comparado con personas no infectadas o pacientes CagA-. (Blaser *et al*, 1995), esta es una proteína altamente inmunogénica presente en aproximadamente en un rango del 50-70% de las cepas de *H. pylori* (Arévalo *et al* 2009).

La infección crónica con *H. pylori* se considera como el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades de gran mortalidad como linfoma MALT y adenocarcinoma gástrico (Nomura *et al*, 1991).

RESUMEN

Introducción: La infección crónica con *H. pylori* se considera como el principal factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades de gran mortalidad como linfoma MALT y adenocarcinoma gástrico. En Colombia el Instituto Nacional de Cancerología (INC) ha realizado varios estudios relacionados con la presencia de factores de virulencia del *H. pylori* y su asociación con la patología presentada, dentro de ellos los estudios demostraron que *cagA+*, *vacA+* podrían usarse como marcadores de virulencia de las cepas ya que estos factores se encontraron con mayor frecuencia en pacientes con gastritis crónica y úlcera péptica que en pacientes con gastritis no atrófica. En la ciudad de Medellín la prevalencia de la infección por *H. pylori* es del 77.2% discriminado por género, en hombres es del 78.4% y en mujeres del 72.6%; estos niveles de prevalencia están de acuerdo al perfil de la región latinoamericana, constituyendo un problema de salud pública debido a las altas tasas de mortalidad en Colombia y América Latina.

Objetivo: Determinar si cepas de *H. pylori* de acuerdo a su composición de genes y alelos PAI, son resistentes al tratamiento con antibióticos y si a su vez poseen el mismo genotipo.

Metodología: De 100 pacientes con patologías gástricas se seleccionaron 32, con úlcera gástrica y úlcera duodenal los cuales son tratados en la clínica SURA por el gastroenterólogo. Los pacientes oscilaron entre 25 y 69 años. El ADN total de la biopsia fue aislado con kit de DNA Mini de Qiagen. Los genes *cagA*, *iceA1*, *iceA2*, *babA2* y los alelos del gen *vacA*: *vacAs1/s2*, *vacAs1a*, *vacAs1b*, *vacAs1c*, *vacAm1*, *vacAm2*, fueron amplificados con sus 10 respectivas parejas de oligonucleótidos. Los datos fueron

recogidos y tabulados cotejándose la información con el tratamiento con antibióticos. Un análisis estadístico fue realizado en el programa R, se hizo diferenciación por edades y sexo.

Resultados: Los genes analizados de *H. pylori* se encuentran normalmente distribuidos y son frecuentes en la población del Valle de Aburrá. La erradicación de estas cepas en su mayoría fue exitosa en los pacientes. Nueve pacientes portaron cepas con el gen *vacA*, mientras que para los otros genes y alelos se pudo presentar una distribución parecida entre todos los pacientes, pero fueron más prevalentes los alelos *vacAs1/s2*, *vacAs1c* y *vacAm1* que el mismo *cagA*. La erradicación de la bacteria fue más efectiva en el género masculino que femenino. **Conclusión:** La erradicación fue variable y no tiene relación con los genes y alelos mencionados. Pacientes con cepas *cagA* negativo, *vacAs1/s2* y *vacAs1c* no todos eliminaron la bacteria. Varios pacientes con genes y alelos negativos no eliminaron la bacteria.

Los resultados demuestran un modelo típico, por ejemplo se pudo evidenciar que pacientes con la cepas *H. pylori cagA* positivo fue fácil de erradicar, mientras que *vacAs1/s2* y *vacAs1c* no presentaron dificultad.

1. PROBLEMA

1.1 TÍTULO

DETERMINACIÓN DE PREVALENCIA USANDO GENES PAI COMO FACTOR DE VIRULENCIA Y SU RELACIÓN CON RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS, EN CEPAS DE *Helicobacter pylori* AISLADAS DE BIOPSIAS GÁSTRICAS DE PACIENTES DEL VALLE DE ABURRÁ

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

H. pylori es de gran importancia como agente etiológico para el desarrollo del cáncer gástrico, pues aunque solo su presencia no desencadene la enfermedad, su presencia combinada con los factores fisiológicos del individuo y factores ambientales son los causantes de la patología (Otero *et al*, 2008).

En Colombia el Instituto Nacional de Cancerología (INC) ha realizado varios estudios relacionados con la presencia de factores de virulencia del *H. pylori* y su asociación con la patología presentada, dentro de ellos los estudios demostraron que los genes *cagA+*, *vacA+* podrían usarse como marcadores de virulencia de las cepas, ya que estos factores se encontraron con mayor frecuencia en pacientes con gastritis crónica y úlcera péptica que en pacientes con gastritis no atrófica (Cittelly *et al*, 2002). *H. pylori* es la principal causa de gastritis crónica, úlceras pépticas y duodenales (Marshall *et al*, 1985; Marshall *et al*, 1988;

Marshall *et al*, 1989; Trespacios *et al*, 2011). Sin embargo, los pacientes pueden desarrollar complicaciones como cáncer gástrico y linfoma MALT, cuyas variaciones clínicas le son atribuidas a factores medioambientales, del huésped y de la bacteria, ya que se ha asociado la severidad de éstas con los genes de virulencia que presenten la cepa infectante.

En la ciudad de Medellín la prevalencia de la infección por *H. pylori* es del 77.2% discriminado por género, en hombres es del 78.4% y en mujeres del 72.6%; estos niveles de prevalencia están de acuerdo al perfil de la región latinoamericana, constituyendo un problema de salud pública debido a las altas tasas de mortalidad en Colombia y América Latina, donde es altamente prevalente (Campuzano *et al*, 2007).

La escasa información referente a cáncer gástrico en el departamento de Antioquia, una de las regiones más pobladas del país con más de cinco millones de habitantes (DANE 2005 consultado el 20 de Abril de 2016), con un estimado actual de seis millones no permite conocer exactamente el papel que juega la bacteria en la salud de sus habitantes, si los infecta o no. Se precisa conocer a fondo el estado de la calidad de vida de esta población frente a *H. pylori*, patógeno que sería portado por más del 80% de los adultos equivalentes aproximadamente a unos dos millones de personas. El daño que puede causar la bacteria por el enorme tamaño de la población, afecta no solo la red del sistema de salud del departamento, sino que afecta también la fuerza laboral desde incapacidades y muertes tempranas.

La mucosa gástrica normalmente no contiene tejido linfoide, pero el tejido linfoide asociado a mucosas siempre aparece en respuesta a la colonización por *H. pylori*; en raros casos la población monoclonal de células B puede incrementarse de este tejido y lentamente proliferar a linfoma MALT, caso que ocurre en menos del 1% de pacientes infectados con el microorganismo. Aunque ensayos aleatorios del efecto de la erradicación de *H. pylori* en pacientes con linfoma MALT no son factibles (Kusters *et al*, 2006), se reporta que en varias serie de casos la erradicación la bacteria puede permitir la remisión total en un rango aproximado entre el 60 al 80% de los pacientes, en quienes un 10% continúa con enfermedad mínima residual.

El cáncer gástrico es el más frecuente en Colombia, sin diferencia entre ambos sexos y representa la primera causa de muerte por cáncer en el país. Entre el 2000 y el 2008, la tasa de mortalidad se ha mantenido relativamente constante, con diez muertes por cada 100.000 habitantes. Durante el período 2009-2010 se presentó una ligera disminución, pasando a 9 muertes por 100.000 habitantes. En 2011 la tasa de mortalidad por cáncer gástrico fue de 9,79 por 100.000 habitantes. La mayoría de los casos se diagnostican tardíamente, resultando en altas tasas de mortalidad (Otero *et al*, 2008).

H. pylori es una bacteria resistente a algunos de los antibióticos usados para su erradicación (Castaño *et al*, 2013). Causante de patologías de tan alta mortalidad como las mencionadas anteriormente o menos graves, pero igualmente costosas para el sistema de salud como úlceras o gastritis. Es de vital importancia saber si los pacientes que posean infección por *H. pylori*, poseen una de las cepas resistentes e identificar sus factores de

virulencia para formular un tratamiento acorde a las características de la cepa que infecta a cada paciente.

En esta investigación pretendemos evaluar el daño cromosómico de líneas celulares humanas y animales, causado por la infección de *H. pylori* con un genotipo de virulencia alta, cultivando dichas células con las cepas seleccionadas y de esta forma analizar el número de anomalías cromosómicas a partir de un cultivo *in vitro*. Lo anterior hace parte de un macroproyecto del las líneas de investigación de los grupos GEBIOMIC (Genética y Bioquímica de Microorganismos) y GRC (Genética Regeneración y Cáncer), acerca del cáncer gástrico. Debido a lo amplio y ambicioso de este proyecto se decidió focalizar esta investigación en uno de sus múltiples tópicos, entre ellos: la identificación de los factores de virulencia y la identificación de cepas para infectar las líneas celulares.

1.3 FORMULACION DEL PROBLEMA

Las recomendaciones de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC, por sus siglas del inglés), consisten en realizar pruebas de *H. pylori* a pacientes con úlceras de estómago actuales o previas, pacientes después de una cirugía de cáncer gástrico o linfoma MALT, para que reciban tratamiento, más no proponen la realización de pruebas más específicas como una identificación genética para determinar la presencia completa de la isla de patogenicidad PAI y su relación con la resistencia a ciertos antibióticos empleados en su erradicación.

Lo que pretende la medicina moderna es hacer un estudio más particularizado de sus pacientes y estudiar sus genes antes de iniciar un tratamiento con antimicrobianos, lo cual

es mucho más objetivo que iniciar un tratamiento con antibióticos sin saber cuál es el enemigo a tratar, con el riesgo latente de crear cepas resistentes, que a veces no son tan virulentas.

Estudios previos en Colombia (Arévalo, 2009; Trespalacios 2011) han demostrado una distribución de los genes PAI con prevalencia de genes *cagA*+ en pacientes afectados por úlcera péptica, que permiten inferir que existe una asociación entre los genes de virulencia con *cagA*+ y pacientes afectados con dispepsia, úlcera y linfoma MALT. Las preguntas que pretendemos responder en este proyecto son: 1- saber si en el modelo estudiado en pacientes del Valle de Aburrá se presenta un mismo patrón de factores de virulencia (*cag*, *vac*, *bab* e *ice*) y 2- si la prevalencia de la úlcera péptica, gástrica o duodenal, están asociada con bacterias *H. pylori cag A*+, 3- pretendiendo igualmente saber si existe una relación con resistencia o no a antibióticos.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo General

Determinar si las cepas de *Helicobacter pylori* dependiendo de la composición de su isla de patogenicidad, son resistentes al tratamiento con antibióticos y si a su vez poseen el mismo genotipo en varios pacientes.

1.4.2 Objetivos Específicos

Extraer el ADN de *H. pylori*, usando el kit de extracción QUIAMP, partiendo de las biopsias de pacientes con enfermedades gástricas.

Identificar el genotipo de *H. pylori* que infecta a cada muestra gástrica con oligos específicos.

Identificar en cepas de *H. pylori* la isla de patogenicidad más completa en pacientes con úlcera péptica, dispepsia funcional o cáncer gástrico.

1.5 JUSTIFICACIÓN

Actualmente en Colombia no se realiza una identificación genética, al menos parcial, de la isla de patogenicidad para establecer el nivel de virulencia de las cepas de *H. pylori*.

Enfermedades terminales como el cáncer gástrico, de alta prevalencia en Colombia y América Latina y linfoma MALT, son de alto costo para el estado generando una carga enorme para el sistema fiscal nacional; siendo *H. pylori* su principal agente etiológico el cual se puede erradicar con un tratamiento adecuado, este tipo de identificación genética, de ser un estándar nacional, podría no solo reducir los costos al erario público sino que reduciría la mortalidad en la población colombiana.

Controlar una infección en el cuerpo humano es mucho más fácil, con los antibióticos actuales y el diagnóstico adecuado, en lugar de apaciguar los efectos de una enfermedad terminal. Tan solo una infección bacteriana tratada erróneamente puede causar patologías de gran mortalidad, por lo cual es imperante dar inicio a estudios moleculares, de identificación genética del patógeno, con el fin de diseñar un tratamiento adecuado para el paciente con una cepa bacteriana en particular, ahorrando tiempo valioso, con el fin de

disminuir la prevalencia de *H. pylori* y evitando el uso indiscriminado de antibióticos. La consigna es evitar la génesis de cepas resistentes en el tratamiento clásico.

1.6 ALCANCES Y LIMITACIONES

1.6.1 Alcances

El presente proyecto pretende buscar y no solo identificar la presencia de la isla de patogenicidad PAI en las bacterias de los pacientes tratados, sino detectar cuál de estos pacientes tiene esta región de ADN más completa: indicando así el nivel de virulencia de *H. pylori* presente en cada paciente y hallando una relación entre una región PAI lo más completa posible, lo que permite obtener información de permanencia o erradicación con el uso de antibióticos, que desarrolla o no cepas resistentes a dichos antimicrobianos.

1.6.2 Limitaciones

En el desarrollo del presente proyecto, se pueden presentar retrasos en el cumplimiento de los objetivos debido a demoras en la aprobación de presupuestos, cotizaciones y envío de materiales por parte de los proveedores de la Universidad de Antioquia e imprevistos como un cese de actividades en la universidad.

1.7 DELIMITACIÓN

1.7.1 Delimitación Espacial

Este proyecto se llevó a cabo en los siguientes laboratorios de la *Ciudad Universitaria* de la Universidad de Antioquia (UdeA), ubicada en la calle 67 No. 53–108, Barrio Sevilla – Medellín – Antioquia – Colombia:

Genética Animal, ubicado en el bloque 7 aula 310,

Microbiología, ubicado en el bloque 7 aula 225,

y en el laboratorio del grupo Genética Regeneración y Cáncer, torre 2 aula 432 de la Sede de Investigación Universitaria (SIU) de la misma institución, ubicada en la calle 62 N° 52-59 Barrio Chagualo – Medellín – Antioquia – Colombia.

La UdeA es una universidad de carácter oficial acreditada como institución universitaria de alta calidad por el gobierno nacional de Colombia.

1.7.2 Delimitación Temporal

Para la ejecución de este proyecto se planeó utilizar un tiempo de doce meses contados a partir de la fecha de aprobación del anteproyecto.

1.7.3 Delimitación Conceptual

El proyecto de investigación, se fundamentará en conceptos tales como:

Cultivo anaerobio.

Electroforesis.

Factores de virulencia.

Isla de patogenicidad (PAI).

Linfoma MALT.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Toxina CagA.

Úlcera péptica.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 ANTECEDENTES

2.1.1. Antecedentes Empíricos

Para la elaboración de este anteproyecto se realizó una búsqueda en la base de datos disponibles *in sílico* en la Biblioteca Carlos Gaviria Díaz de la Universidad de Antioquia en la ciudad de Medellín, en la cual se incluyen artículos científicos de revistas indexadas, en su gran mayoría internacionales, en las cuales se tuvo acceso a la información requerida a partir de investigaciones previas desde los años 80 incluyendo desde premios Nobel en medicina, hasta estudios epidemiológicos nacionales. Cada una de estas referencias bibliográficas se encuentra detallada en el capítulo 6, Referencias.

2.1.2. Antecedentes Bibliográficos.

Todas las referencias bibliográficas consultadas para este anteproyecto se encuentran listadas detalladamente en el capítulo titulado Referencias.

2.2 MARCO TEÓRICO

Según el Programa de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales (SEER por siglas del inglés) del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (NCI, por sus siglas del inglés), se calculó que en 2013, 21.600 individuos de los Estados Unidos serían diagnosticados con cáncer gástrico y que 10.990 morirán por este cáncer. El cáncer gástrico

es la segunda causa más común de muertes relacionadas por cáncer en el mundo, y cobró aproximadamente 738.000 vidas en 2008 (Ferlay *et al*, 2010).

Dicho cáncer es menos común en los Estados Unidos y en otros países occidentales que en países asiáticos y sudamericanos. En general, la incidencia del cáncer gástrico está disminuyendo. Sin embargo, este descenso se presenta principalmente en los índices de cáncer gástrico no de la región del cardias (Anderson *et al*, 2010). El cáncer gástrico del cardias, el cual solía ser poco común, ha subido en incidencia en décadas recientes (de Martel, 2013). El cáncer gástrico, o cáncer de estómago, se consideraba antes como una sola entidad.

Ahora, los científicos dividen este cáncer en dos clases principales: cáncer gástrico del cardias (cáncer de la pulgada superior del estómago, donde se une al esófago) y cáncer gástrico no del cardias (cáncer en todas las otras zonas del estómago). *H. pylori* tiene diferentes relaciones con las dos clases principales de cáncer gástrico.

La infección por *H. pylori* es la causa principal que se identifica para el cáncer gástrico. Otros factores de riesgo de cáncer gástrico son la gastritis crónica; edad avanzada; sexo masculino; una dieta rica en alimentos salados, ahumados o mal conservados, y pobre en frutas y verduras; el tabaquismo; la anemia perniciosa; antecedentes de cirugía de estómago por padecimientos benignos; y antecedentes familiares de cáncer de estómago (Forman *et al*, 2006; Brenner *et al*, 2009).

Estudios epidemiológicos realizados anteriormente han mostrado que los individuos infectados por *H. pylori* tienen un riesgo más alto de adenocarcinomas gástricos (Atherton

et al, 2006; Kusters *et al*, 2006; Forman *et al*, 2001; Uemura *et al*, 2001). El aumento de riesgo parece estar restringido a cáncer gástrico. Tal como lo reportó Forman (*et al*, 2001), 12 estudios de casos y controles de *H. pylori* y de cáncer gástrico calculó que el riesgo de cáncer gástrico era casi seis veces más alto para gente infectada por *H. pylori* que para gente sin la infección. La comprobación científica adicional de asociación entre la infección por *H. pylori* y el riesgo de cáncer gástrico proviene de estudios como lo es el Estudio de Prevención de Cáncer con Alfatocoferol y Betacarotene (ATBC) en Finlandia (Olli *et al*, 1994). Al comparar los sujetos que presentaron cáncer gástrico con los sujetos de control sin cáncer, los investigadores encontraron que los individuos infectados por *H. pylori* tenían casi ocho veces más riesgo de cáncer gástrico (Kamangar *et al*, 2006).

Varios estudios han detectado una relación inversa entre la infección por *H. pylori* y el cáncer gástrico del cardias, aunque la evidencia no es completamente congruente. La posibilidad de una relación inversa entre la bacteria y el cáncer gástrico está apoyada por la disminución correspondiente de los índices de infección por *H. pylori*, en los países occidentales en el siglo pasado, el resultado de una mejor higiene y el uso extendido de antibióticos y el aumento de los índices de cáncer gástrico del cardias en esas mismas regiones (Ye *et al*, 2004, Kamangar *et al*, 2007). La evidencia epidemiológica sugiere que la infección por *H. pylori* puede estar asociada con un riesgo menor de adenocarcinoma esofágico. Por ejemplo, un estudio grande de casos y controles en Suecia mostró que el riesgo de adenocarcinoma esofágico en individuos infectados por *H. pylori* era un tercio de los individuos sin infección (Hansen *et al*, 1999; Islami *et al*, 2008).

Aunque no se sabe con certeza en qué forma la infección por *H. pylori* aumenta el riesgo de cáncer gástrico algunos investigadores especulan que la presencia por largo tiempo de una reacción inflamatoria, predispone las células epiteliales del revestimiento del estómago para convertirse en cancerosas. Esta idea se apoya en el resultado que una expresión mayor de una sola citoquina (interleuquina-1- β) en el estómago de ratones transgénicos, causa inflamación gástrica esporádica y cáncer (Tu *et al*, 2008). El trastorno celular mayor que resulta del daño celular continuo podría aumentar la probabilidad de que las células formen mutaciones dañinas.

Una hipótesis que puede explicar que haya menos riesgos de cáncer gástrico del cardias y de adenocarcinoma esofágico en individuos infectados por *H. pylori* está relacionada con la disminución de acidez estomacal que se observa después de décadas de colonización por *H. pylori*. Esta disminución podría reducir el reflujo ácido en el esófago, un factor principal de riesgo de adenocarcinomas que afectan el estómago superior y el esófago.

Algunas bacterias de *H. pylori* usan un apéndice proteico como aguja para inyectar una toxina producida por un gen llamado gen A asociado a citotoxina en las uniones en donde se juntan las células del revestimiento del estómago (Bangoli *et al*, 2005; Wen & Moss, 2009). Esta toxina, conocida como CagA, altera la estructura de las células del estómago y permite que la bacteria se adhiera a ellas con más facilidad. La exposición a la toxina por un tiempo largo causa inflamación crónica. Sin embargo, no todas las cepas de *H. pylori* portan el gen *cagA*. Las que sí lo portan se clasifican como *cagA* positivas.

Naomi Ohnishi *et al*, 2008 demostró *in vivo* que *cagA* es una oncoproteína bacteriana cuya expresión es suficiente para desarrollar neoplasias. La proteína CagA es traslocada a la célula huésped gracias al ya mencionado sistema de secreción tipo IV, interactuando con diversas vías de señalización, que desencadenan cambios en el citoesqueleto, en la morfología y en la movilidad de la célula huésped. Este mecanismo puede tener un efecto oncogénico directo sobre las células del epitelio gástrico por su oncoproteína CagA y no solamente de manera indirecta produciendo inflamación persistente e hiperproliferación con el riesgo de que radicales libres lesionen el ADN de estas células en rápido crecimiento. (Naomi Ohnishi *et al*, 2008).

La presencia de la isla de patogenicidad se ha estudiado usando como marcador el gen *cagA* y en varios de estos estudios a nivel mundial se ha reportado asociación entre la presencia de este factor de virulencia y la severidad de la enfermedad presentada por el paciente. (Hasan *et al* 2009)

Las toxinas producidas por la bacteria, una de ellas CagA, son las grandes responsables del daño tisular. La disrupción de la pared de la mucosa gástrica se refiere al daño que puede realizar la bacteria sobre la misma. La proteína CagA es uno de los factores de virulencia más ampliamente estudiados en *H. pylori*, el cual es codificado por el gen *cagA* localizado en un extremo del islote de patogenicidad *cag* (PAI); segmento de ADN el cual tiene aproximadamente 40 pares de kilobases, posee 31 genes, de los cuales la mayoría son codificantes para un sistema de secreción llamado tipo IV (T4SS), que actúa como una inyección molecular para depositar en la célula huésped la proteína CagA, y muy seguramente otras proteínas bacterianas (Trespalcios *et al*, 2011; Wen & Moss, 2009).

Para que la proteína CagA pueda ingresar en la célula epitelial de la mucosa gástrica, debe ser introducida a través del sistema de secreción tipo IV (T4SS). Los 18 genes que codifican para este sistema se encuentran ubicados en el islote de patogenicidad (cag PAI). El sistema es un “organelo” o estructura filamentoso que luego de que es ensamblado se localiza en un polo de la superficie bacteriana e interactúa específicamente con la integrina $\alpha 5\beta 1$, estableciendo un canal entre la bacteria y la célula que le permite a la primera inyectar diferentes proteínas bacterianas, entre ellas CagA (Trespalcios et al, 2011, Arévalo et al, 2009).

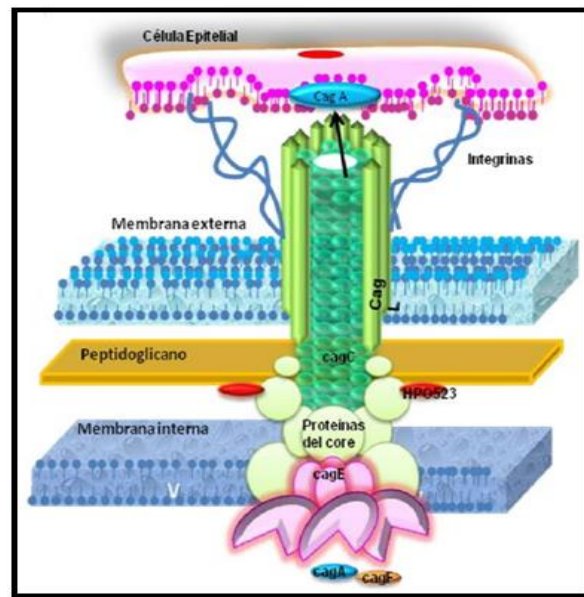


Figura 1: Sistema de secreción tipo IV.

(Fuente: Trespalcios *et al*, 2011)

La comprobación epidemiológica sugiere que la infección con cepas cagA positivas está asociada en especial con un riesgo mayor de cáncer gástrico, con riesgos menores de cáncer gástrico del cardias y de adenocarcinoma esofágico.

En un metanálisis de 16 estudios de casos y controles llevado a cabo en el mundo en el 2003, indicó que los individuos infectados por *H. pylori* con *cagA*+ tenían el doble de riesgo de cáncer gástrico que los individuos infectados por *H. pylori* sin *cagA* (Huang *et al*, 2003). Por otro lado, un estudio de casos y controles llevado a cabo en Suecia encontró que la gente infectada por *H. pylori* con *cagA*+ tenía un riesgo significativamente reducido de adenocarcinoma esofágico (Ye *et al*, 2004). De la misma forma, otro estudio de casos y controles llevado a cabo en los Estados Unidos encontró que la infección por *H. pylori* con *cagA*+ estaba relacionada con un riesgo menor de adenocarcinoma esofágico y de cáncer gástrico del cardias combinados, pero que la infección con cepas sin *cagA* no estaba asociada con el riesgo (Chow *et al*, 1998). Una investigación reciente ha sugerido un mecanismo potencial por el que *cagA*+ podría contribuir a la carcinogénesis gástrica. En tres estudios, la infección por *H. pylori* con *cagA*+ estuvo asociada con la inactivación de las proteínas supresoras de tumores, incluida la p53 (André *et al*, 2010; Wei *et al*, 2010; Tsang *et al*, 2010).

El linfoma gástrico MALT es un tipo poco común de linfoma no Hodgkin que se caracteriza por la multiplicación lenta de linfocitos B, un tipo de célula inmunitaria, en el revestimiento del estómago. Este cáncer representa aproximadamente 12% del linfoma no Hodgkin extraganglionar (afuera de los ganglios linfáticos) que ocurre en los hombres y aproximadamente 18% del linfoma no Hodgkin extraganglionar en las mujeres (Wu *et al*, 2009). Durante el período de 1999 a 2003, la incidencia anual del linfoma gástrico MALT en los Estados Unidos fue casi de un caso por cada 100.000 personas de la población.

Normalmente, el revestimiento del estómago carece de tejido linfoide (sistema inmunitario), pero la formación de este tejido se estimula con frecuencia como respuesta a la colonización del revestimiento por *H. pylori* (Kusters *et al*, 2006). Solo en pocos casos este tejido hace que surja el linfoma MALT. Sin embargo, casi todos los pacientes con linfoma gástrico MALT presentan signos de infección por *H. pylori*, y el riesgo de padecer este tumor es más de seis veces mayor en personas infectadas que en personas no infectadas (Sagaert *et al*, 2010, Parsonnet *et al*, 1994). Un seguimiento a largo plazo de datos de un estudio clínico aleatorizado llevado a cabo en Shandong, China, una región en donde los índices de cáncer gástrico son muy altos, encontró que el tratamiento a corto plazo con antibióticos para erradicar *H. pylori* redujo la incidencia de cáncer gástrico. Durante un período de casi 15 años después del tratamiento, la incidencia de cáncer gástrico se redujo casi 40% (Ma *et al*, 2012). Cuando se combinaron los resultados de este estudio con los resultados de varios estudios más pequeños para examinar los efectos en la incidencia de cáncer gástrico del tratamiento antibiótico para erradicar *H. pylori*, se observó una reducción similar.

En Colombia la prevalencia de la infección por *H. pylori* es alta en todas las regiones y adicional a esto se tienen identificadas las zonas donde el riesgo de contraer cáncer gástrico es más alto, específicamente en la cordillera de los Andes, en comparación con la costa Pacífica (Sablet *et al*, 2010). Es necesario establecer políticas serias de prevención que propicien hábitos de vida y alimentación saludable, donde cabe señalar que generalmente en Colombia el consumo de frutas y verduras es deficiente (I.C.B.F., 2010) mientras que el consumo de tabaco va en aumento.

Durante los últimos años las tasas más altas de mortalidad por cáncer gástrico se encuentran en los departamentos de Nariño Boyacá, Quindío, Cauca, Risaralda, Huila, Norte de Santander, Tolima y Caldas, lo que puede estar relacionado tal y como se menciona en el Atlas de Mortalidad por Cáncer del Instituto Nacional de Cancerología de Colombia, con las diferencias en los patrones culturales y medioambientales de las regiones de alta montaña que difieren de otras regiones como los valles de los ríos, llanos orientales y las zonas costeras (Trespacios *et al*, 2011).

Según los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC), las personas que tienen úlceras activas de estómago o de duodeno o antecedentes probados de úlceras, deberán hacerse pruebas para *H. pylori*, y, si tienen la infección, deberán recibir tratamiento. También se recomiendan las pruebas para la infección por *H. pylori* y su tratamiento después de una resección (cirugía) de cáncer gástrico inicial y para linfoma gástrico MALT de bajo grado.

Sin embargo, la mayoría de los expertos están de acuerdo en que la comprobación disponible no respalda que se hagan pruebas extendidas a la población para la infección por *H. pylori* y su erradicación.

El instituto Nacional de Cancerología de Colombia ha realizado diversos estudios de la relación que tiene la presencia de los factores de virulencia con el tipo de enfermedad presentada, por ello surge el interés por conocer la distribución de los diferentes genotipos de *H. pylori* en Colombia y el principal interés de este trabajo en Antioquia, el cual tiene como objeto además de conocer la distribución de los genotipos, determinar la prevalencia

de estos dentro de la población y poder visualizar a través de la identificación genética que porcentaje de la población esta propensa a desarrollar una enfermedad clínica o patologías gástricas avanzadas como el cáncer gástrico o el linfoma tipo MALT , y comparando estos genotipos con la literatura determinar las cepas resistentes a los antibióticos utilizados en el tratamiento para ir más allá de lo recomendado por los CDC y sentando un precedente que sirva de apoyo a una posible modificación de los protocolos establecidos internacionalmente y se incluya la genotipificación de las bacterias de *H. pylori* que infecten a los pacientes colombianos.

2.3 MARCO CONCEPTUAL

Para el entendimiento del contenido del proyecto se proporciona un marco conceptual fijando la atención en los elementos centrales.

Factores de virulencia: Son características intrínsecas de la bacteria. Los factores de virulencia de un organismo típicamente son proteínas u otras moléculas sintetizadas por enzimas y codificadas por genes en el ADN cromosómico, del bacteriófago o de plásmidos, los cuales le otorgan el grado de patogenicidad de un serotipo, de una cepa o de una colonia microbiana en un huésped susceptible.

Isla de patogenicidad PAI: Una isla de patogenicidad es una fracción del ADN genómico de un microorganismo patógeno que le faculta como virulento. Suele estar contenido en plásmidos, y su origen es una transferencia horizontal de material genético. Suele albergar las secuencias codificantes de adhesinas, factores de evasión de las defensas

del hospedador, toxinas, enzimas degradativas de componentes celulares, entre otros. Una cepa de *H. pylori* con una isla de patogenicidad PAI lo más completa posible posee más factores de virulencia que le confieren una mayor eficiencia a la hora de llevar a cabo la infección (B. A. Salih *et al*, 2014).

Linfoma MALT: El linfoma gástrico MALT es un tipo poco común de linfoma no Hodgkin que se caracteriza por la multiplicación lenta de linfocitos B, o leucocitos de los cuales depende la inmunidad, en el revestimiento del estómago. Este cáncer representa aproximadamente 12% del linfoma no Hodgkin extraganglionar que ocurre en los hombres y aproximadamente 18% del linfoma no Hodgkin extraganglionar en las mujeres. Durante el período de 1999 a 2003, la incidencia anual del linfoma gástrico MALT en los Estados Unidos fue casi de un caso por cada 100.000 personas de la población.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Ésta es una técnica de biología molecular que permite amplificar ADN artificialmente, o sacar muchas copias de una secuencia genética específica por medio de ciclos repetitivos, dirigidos por unos oligonucleótidos mediante una enzima ADN-POLIMERASA. El equipo llamado Termociclador se encarga de ajustar las temperaturas necesarias para todas las reacciones se llama Termociclador. El ADN se abre y se cierra como si se tratase de una cremallera por efecto del calor, se desnaturaliza a 92°C, en una primera etapa que se llama Desnaturalización, los oligonucleótidos se unen al ADN molde entre los 42°C y 65°C, (a esta temperatura se le llama T_m) y este paso recibe el nombre de Alineamiento. En el siguiente paso, Extensión, la ADN-POLIMERASA une los 4 dNTPS con su par complementario en la hebra de cadena sencilla recientemente desnaturalizada. Estos pasos conforman un ciclo, el cual vuelve a reiniciarse una vez la temperatura sube hasta los 92°C

para desnaturalizar de nuevo la cadena recientemente creada. La Elongación Final es una etapa única que se lleva a cabo a una temperatura de 70-74 °C durante 5-15 minutos tras el último ciclo de PCR. Con ella se asegura que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente amplificado.

Toxina BabA: es una proteína de membrana externa de 78 kDa, codificada por el gen *babA*, BabA que media la unión de *H. pylori* a un grupo de antígenos sanguíneos fucosilados presente en las células del epitelio gástrico de individuos secretores (Kusters et al 2006). Estudios en tres cepas (26695, J99 y HPAG1) de *H. pylori* han reportado la presencia de genes *babA* y *babB* en diferente localización genómica, adicionalmente en la cepa 26695 se encontró la presencia de otro gen similar a *babA* y *babB*, *babC* cuya función aún se desconoce. *babA* se ha encontrado tanto en el locus B como en el locus C e incluso se han encontrado copias de *babA* en dos locus diferentes lo cual nos podría indicar la recombinación intragenómica que realiza el microorganismo (Yamaoka et al 2008 y Trespalacios et al 2011). Hay dos alelos distintos del gen, *babA1* y *babA2* pero solamente *babA2* puede codificar para la proteína completa y activa (Kusters et al 2006). Esto posiblemente se deba a que el gen *babA1* se encuentra silenciado motivo por el cual se expresa el gen *babA2*; la razón por la cual no se expresa *babA1* es por la presencia de una delección en el péptido señal de 10 pb en la que se elimina el codón de iniciación traduccional. Sin embargo, en otras cepas de *H.pylori* no se ha encontrado ausencia de este codón de inicio por lo que se ha reportado como una mutación.

Toxina CagA: CagA (citoquina asociada al gen A), proteína la cual es uno de los factores de virulencia más ampliamente estudiados en *H. pylori*. Es codificada por el gen *cagA*, localizado en un extremo del islote de patogenicidad cag (PAI); este es un segmento

de ADN de aproximadamente 40 pares de kilobases que fue incorporada al genoma de *H. pylori* por transferencia horizontal de un origen desconocido. Contiene 31 genes, muchos de los cuales codifican para un sistema de secreción tipo IV (T4SS), que actúa como una jeringa molecular para liberar en la célula huésped la proteína CagA, peptidoglicano y probablemente otras proteínas bacterianas en el interior de las células eucariotas. CagA es una proteína de 121 a 145 kDa inmunodominante, con actividad tóxica para la célula de la mucosa gástrica. La presencia de CagA normalmente se utiliza como un marcador de la presencia de la región *cag* (PAI) en estudios epidemiológicos. Induce cambios morfológicos en las células epiteliales y han sido asociadas con un incremento en el riesgo de carcinogénesis gástrica (Kusters *et al* 2006), caracterizados por rearrreglos en el citoesqueleto que conducen a una elongación celular o fenotipo en forma de colibrí. También está asociada al crecimiento descontrolado de la célula epitelial gástrica, induce la producción de IL-8, apoptosis, inflamación severa, úlceras e incluso tumores.

Toxina VacA: Es codificada por el gen *vacA*, presenta variaciones su actividad vacuolizante debido a la heterogeneidad dentro del gen *vacA*. Estructuralmente comprende dos partes variables; una región *s* y existe como alelo *s1* o *s2* (*s1a*, *s1b*, *s1c*). La región media del gen (región *m*) puede tener los alelos *m1* o *m2*.

Los tipos de combinaciones alélicas entre las regiones *s* y *m* determinan la producción y el tipo de actividad de la citoquina, ya que por ejemplo cepas con la combinación *vacA s1/m1* producen grandes cantidades de toxina por lo que tienen una alta actividad vacuolizante. Las cepas *vacA s1/m2* producen cantidades moderadas de toxina y su actividad vacuolizante también es moderada, mientras que las cepas *vacA s2/m2* producen

muy poca toxina o no producen. Induce acidificación aumento de urea, aniones y bases débiles gracias a que contiene una bomba de protones tipo ATPasa.

La acumulación de estos componentes en el lumen de la vacuola conlleva a la hinchazón de la misma y aumento de la permeabilidad celular permitiendo la liberación de nutrientes y cationes que le permitirán al microorganismo sobrevivir.

Toxina IceA: Alelos *iceA1* e *iceA2*, se han considerado como un factor de virulencia debido a que es inducido tras la adherencia del microorganismo a la célula epitelial gástrica, y este tipo de interacción induce la expresión de genes involucrados con virulencia en otros patógenos gastrointestinales. Aunque se desconoce la función biológica exacta de *iceA*, es importante tener en cuenta que el que *H. pylori* tenga un gen que codifica para una metilasa (*hpyiIM*) y un gen que posiblemente codifica para una endonucleaza (*iceA1*) indica que *H. pylori* tiene mecanismos que le permiten proteger su genoma de endonucleasas, ADN foráneo. Las endonucleasas son enzimas que degradan el ADN bacteriano, se podría decir que el microorganismo cuenta con su propio sistema de restricción y modificación.

Úlcera: es toda lesión de la piel o membrana mucosa con forma crateriforme (forma de un cráter, al perderse parte del tejido) y con escasa o nula tendencia a la cicatrización. Una úlcera péptica o ulcus péptico es aquella que afecta la mucosa que recubre el estómago o el duodeno (la primera parte del intestino delgado). Se clasifican en úlceras gástricas y úlceras duodenales, estas últimas son mucho más frecuentes. Las úlceras pépticas pueden aparecer tanto en las mujeres como en los hombres desde la infancia hasta edades avanzadas. Se trata de una enfermedad común que afecta a una de cada 10 personas en algún momento de su vida. La causa de la úlcera es un desequilibrio entre los factores agresivos para la

mucosa gastroduodenal y los defensivos. Entre los agentes agresivos los más importantes son la secreción de ácido gástrico que se realiza por las células parietales -secretoras de ácido clorhídrico-, la infección por la bacteria *H. pylori* (causante de la mayoría de los casos) y los tratamientos con medicamentos Antiinflamatorios no esteroideos (AINES) como la aspirina y el ibuprofeno. Los factores protectores son la secreción gástrica de moco y bicarbonato, el flujo sanguíneo adecuado a la mucosa gastroduodenal, los mecanismos naturales de reparación de la mucosa y la secreción de prostaglandinas que estimulan la producción de moco y bicarbonato.

2.4 MARCO CONTEXTUAL

2.4.1 Entorno físico

Se incluyeron pacientes con úlcera gástrica y úlcera péptica, entre las edades de 18 y 70 años, remitidos a endoscopia digestiva para la extracción de biopsias previo consentimiento informado. Las biopsias se obtuvieron en la Clínica SURA y la Clínica el Rosario.

Este proyecto se llevó a cabo en una primera etapa en el laboratorio de la *Ciudad Universitaria* de la Universidad de Antioquia (UdeA), ubicada en la calle 67 No. 53–108, Barrio Sevilla – Medellín – Antioquia – Colombia:

Genética Animal, ubicado en el bloque 7 aula 310,

Microbiología, ubicado en el bloque 7 aula 225,

Y una segunda etapa en el laboratorio del grupo Genética Regeneración y Cáncer, torre 2 aula 432 de la Sede de Investigación Universitaria (SIU) de la misma institución, ubicada en la calle 62 N° 52-59 Barrio Chagualo – Medellín – Antioquia – Colombia.

La UdeA es una universidad de carácter oficial acreditada como institución universitaria de alta calidad por el gobierno nacional de Colombia.

2.4.2 Misión de la UdeA

Somos una universidad pública que en ejercicio pleno de su autonomía se compromete con la formación integral del talento humano, con criterios de excelencia, la generación y difusión del conocimiento en los diversos campos del saber y la preservación y revitalización del patrimonio cultural.

2.4.3 Visión de la UdeA

En el año 2016, seremos la principal universidad de investigación del país y una de las mejores de América Latina, con pregrados y posgrados de excelencia académica internacional, líderes en el aporte a la transformación socioeconómica del país, y un auténtico escenario de la diversidad y el diálogo intercultural, en el marco del respeto por el pluralismo y el ambiente.

2.5. MARCO LEGAL

Este proyecto de investigación está respaldado por el acuerdo firmado entre la Universidad de Antioquia y la Universidad Francisco de Paula Santander, documento que lleva como título, CONVENIO INTERINSTITUCIONAL DE COOPERACION CELEBRADO ENTRE LA UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER Y LA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA – FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES (INSTITUTO DE BIOLOGIA). El cual se presentará junto con los anexos.

Los protocolos seguidos con los pacientes fueron evaluados por los comités de Ética de la Universidad de Antioquia, las Clínicas del Rosario y la EPS Sura. Todos los pacientes firmaron los consentimientos informados y estuvieron completamente de acuerdo de participar en el estudio.

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

Investigación según el propósito: **Aplicada**, ya que lleva a la práctica teorías generales para resolver las necesidades concretas en pacientes con patologías gástricas.

Investigación según el nivel: **Descriptiva** y **Correlacional**, ya que se quiere determinar la prevalencia de los factores de virulencia y establecer la correlación porque se pretende medir el grado de relación entre las cepas altamente virulentas y la erradicación con el tratamiento de antibióticos.

Investigación según la estrategia: **Experimental**, debido a que tiene una hipótesis que se pretende comprobar y se realizan estudios de laboratorio con las biopsias gástricas.

3.2 POBLACION OBJETO Y MUESTRA

3.2.1 Población

Pacientes con patologías gástricas tales como úlcera gástrica y úlcera duodenal los cuales son tratados en la clínica SURA por el gastroenterólogo Rodrigo Castaño

A su vez comprenden la población, el autor, director y asesores del proyecto.

3.2.2 Muestra

Serán seleccionados los pacientes con patologías gástricas después de el tratamiento con antibióticos que aun reporten la presencia de *H. pylori*. Además se planea hacer un estudio de cohorte a 24 meses con aquellos pacientes que presentan las cepas más virulentas, pero este no es el objetivo de este proyecto de investigación.

3.2.3 Hipótesis

La alta prevalencia de los factores de virulencia, superior al 70%, en las biopsias gástricas de los pacientes del valle de Aburra seleccionados para el estudio.

Los pacientes con cepas muy virulentas debido a su genotipo, es decir con la isla de patogenicidad más completa, presentan resistencia al tratamiento con antibióticos aplicados, (Claritromicina, Levofloxacin, Metronidazol)

3.2.4 Variables

Variable principal: Prevalencia de los factores de virulencia de biopsias gástricas de pacientes del Valle de Aburra.

Variables Sociodemográficas:

Edad,

Sexo (F o M),

Estrato (1 a 6),

Fumar (1=Si, 0=No),

Alto consumo de sal (1=Si, 0=No),

Consumo de frutas y verduras (bajo, medio, alto).

Variables de resultados:

Erradicación (1=Si, 0=No): Corresponde a aquellas que luego del tratamiento con antibiótico se observa aun presencia de *H. pylori*.

Presencia de los genes *cagA*, *vacA*, *babA*, *iceA* (1=Si, 0=No).

3.3 FASES DE LA INVESTIGACIÓN

Este proyecto se dividió en 5 fases:

Fase I. Comprendió la revisión bibliográfica en la base de datos especializada en la biblioteca Carlos Gáviria de la UdeA, para este proyecto se tuvo en cuenta una bibliografía de artículos científicos en su gran mayoría tanto históricos como recientes con impacto.

Fase II. Comprendió el primer procesamiento que se le da a las biopsias gástricas que se encontraban en el laboratorio de GRC, en esta fase se realizará un inventario de las muestras y se seleccionaran las adecuadas para el proyecto de acuerdo con los reactivos que se cuentan, además se procesaran para hacer la extracción de ADN bacteriano y se realizará el procedimiento molecular de genotipificación.

Fase III. En esta fase se seleccionaron las cepas con la isla de patogenicidad más completa para su almacenamiento y posterior uso, esta fase comprende el segundo procesamiento de las muestras.

Fase IV. Este es el penúltimo paso del proyecto en el cual se realizaron los análisis estadísticos detallados en la sección 3.5 TÉCNICAS DE ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE DATOS. Es la etapa final de todo el proyecto de investigación y comprende el tiempo empleado para la elaboración y preparación del informe final así como de la sustentación ante los jurados en la UFPS.

3.4 INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCION DE LA INFORMACIÓN

Dentro de la investigación se tuvo en cuenta dos tipos de fuentes para obtener la información necesaria:

3.4.1 Fuentes primarias

Mauricio Corredor Rodríguez Ph.D. Ciencias Fisiología y Genética. Universidad de Paris XI. Profesor Asociado, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia Director del proyecto.

Mauricio Camargo Guerrero, Ph.D. Genética Humana y Biología Celular, Universidad de Minesota, Investigador Senior (IS), Instituto de Biología, director del laboratorio GRC, Universidad de Antioquia.

Rodrigo Castaño Llanos, Médico, Universidad Pontificia Bolivariana, Gastroenterólogo, Universidad de Antioquia. Grupo de Gastrohepatología Universidad de Antioquia.

Diego Chávez, estudiante de Estadística de la Universidad de Antioquia, asesor Técnico y Metodológico y Estadístico del grupo GEBIOMIC.

Lina Marcela Barrera Arenas Bióloga Msc., estudiante de Doctorado en Biología, Universidad de Antioquia.

Gloria Angélica Santa González Bióloga Msc., estudiante de Doctorado en Biología, Universidad de Antioquia.

Grupo Genética y Bioquímica de Microorganismos, GEBIOMIC, Grupo Genética Regeneración y Cáncer, GRC, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia.

3.4.2 Fuentes secundarias

Bases de datos bibliográficas especializadas de la Biblioteca Carlos Gaviria, Universidad de Antioquia.

Historias Clínicas de los pacientes con patologías gástricas del gastroenterólogo Rodrigo Castaño.

Resultados de pruebas de laboratorio

3.5 TECNICAS DE ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE DATOS

Se realizó estadística descriptiva univariada y bivariada de las variables de estudio. Se estableció la prevalencia de los factores de virulencia de biopsias gástricas de pacientes del

Valle de Aburra. Además, se llevó a cabo un análisis de correlación entre las variables de estudio.

3.6 PROCESAMIENTO DE LAS BIOPSIAS GÁSTRICAS.

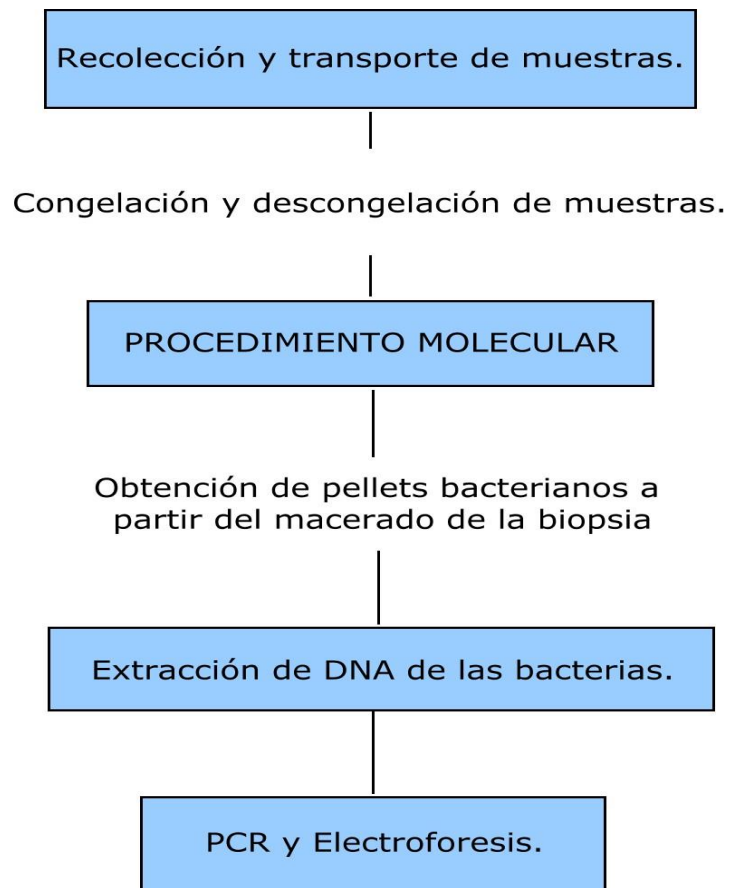


Figura 2: Esquema general de procesamiento de las biopsias gástricas y el ADN bacteriano.

3.6.1 Recolección de Muestras

Se incluyeron pacientes con úlcera gástrica y úlcera péptica, entre las edades de 25 y 69 años, remitidos a endoscopia digestiva para la extracción de biopsias previo consentimiento informado. Las biopsias se obtendrán en Clínica SURA y la Clínica el Rosario.

El médico tratante realizó la endoscopia digestiva tomando 5 biopsias gástricas. Estas biopsias fueron colectadas y conservadas en un criovial estéril de 2 ml, el cual contenía 800 μ L de medio de cultivo con 800 μ L de RPMI y 200 μ L de glicerol a una concentración del 20% previamente esterilizado. Las biopsias fueron utilizadas así: Una primera biopsia se utilizó para pruebas moleculares, y las demás fueron preservadas para estudios posteriores. Cabe aclarar que, la toma de biopsias se realiza estando el paciente en pleno conocimiento del estudio y habiendo firmado previamente el consentimiento informado. Una vez colectadas las muestras, las biopsias se mantuvieron en una nevera con gel refrigerante para mantener la cadena de frío. Así mismo fueron transportadas hasta la sede de investigación universitaria de la Universidad de Antioquia donde fueron congeladas a -20°C y -70°C hasta su posterior procesamiento.

3.6.2 Macerado de las Biopsias

Se sacó la biopsia de la nevera a -70°C e introducirla a una nevera de icopor con geles refrigerantes hasta su descongelación.

Una vez descongeladas las biopsias, se sacaron del criovial con ayuda de un asa de aro estéril.

Se introdujo la biopsia en un tubo de ensayo estéril.

Se adicionan 50µl de la mezcla de RPMI con glicerol del criovial de donde se retiró la biopsia.

Se Maceró la biopsia mientras se sigue adicionando 50µl del medio del criovial, hasta completar un volumen de 300 µl.

De ser necesario se continua el macerado hasta la destrucción total del tejido.

Los crioviales con las muestras maceradas fueron almacenados hasta su posterior uso para la extracción de ADN.

3.6.3 Extracción de ADN

Luego de la maceración del tejido (biopsia) en frio, en tubos falcon con ayuda de barras de vidrio estériles, se llevó a cabo el protocolo del QIAamp® ADN Mini de QIAGEN.

3.6.4 Protocolo de Extracción de ADN

Se tomaron 100µL de cada criovial con muestra macerada y de ser necesario se continuó con la destrucción parcial del tejido y homogenizó la muestra con 200 µL del buffer AL.

Se agregaron 20 µL de proteinasa k a cada criovial, con ayuda del vórtex.

Esta mezcla se incubó a 56°C por dos horas agitando con vórtex cada 20 minutos.

Se adicionó 200 µL de tampón AL agitando con vórtex y se incubó a 70°C por 10 minutos.

Se adicionó 200 µL de etanol al 100%, se agitó por vórtex 15 segundos.

La totalidad de esta mezcla se depositó en una columna de centrifugación QIAMP y se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto.

Se depositó la columna en un nuevo tubo de recogida y se añadió 500 µL de buffer AW1, y seguido a esto se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto.

En un nuevo tubo de recogida se agregó a la columna 500 µL del buffer AW2 y se centrifugó a 14000 rpm por 3 minutos.

A continuación la columna se colocó en un tubo de microcentrífugado de 1.5ml nuevo se le añadieron 200 µL de buffer AE y se incubó a temperatura ambiente.

Durante 1 minuto y se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto. Este último paso se realizó dos veces y el ADN obtenido se guardó congelado a -20°C hasta su posterior utilización.

3.6.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, nos permitió amplificar artificialmente las secuencias que forman los genes PAI seleccionados para esta parte del proyecto, entre los cuales están, *cagA*, *babA*, *iceA* y *vacA*, los oligonucleótidos para cada uno de los genes y sus respectivos alelos se encuentran detallados en la

Tabla 1.

Tabla 1: Lista de oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Gen	Oligonucleótidos	Referencia	Tm
<i>cagA</i>	F TTG ACC AAC AAC CAC AAA CCG AAG R CTT CCC TTA ATT GCG AGA TTC C	Van Doorn,L.J. 1998	55,9°C
<i>vacA s1/s2</i>	F ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC R CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	Atherton, J.C,1995, Erzin, Y. 2006	55.5°C
<i>vacA s1a</i>	F GTC AGC ATC ACA CCG CAA C R CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	Erzin, Y. 2006	56.3°C
<i>vacA s1b</i>	F AGC GCC ATA CCG CAA GAG R CTG CTT GAA TGC GCC AAA C	Erzin, Y. 2006	56.8°C
<i>vacA s1c</i>	F TTA GTT TCT CTC GCT TTA GTR GGG YT R CTG CTT GAA TGC GCC AAA	C Erzin, Y. 2006	56.6°C
<i>vacA m1</i>	F GGT CAA AAT GCG GTC ATG G R CCA TTG GTA CCT GTA GAA AC	Atherton, J.C,1995	52.5°C
<i>iceA1</i>	F. GTG TTT TTA ACC AAA GTA TC R. CTA TAG CCA STY TCT TTG CA	Van Doorn, 1998,Chomvarin, M.L, 2008	47,74°C
<i>iceA2</i>	F GTT GGG TAT ATC ACA ATT TAT R TTT CCC TAT TTT CTA GTA GGT	Chomvarin, M.L, 2008	46.7°C
<i>babA2</i>	F AAT CCA AAA AGG AGA AAA AGT ATG AAA R TGT TAG TGA TTT CGG TGT AGG ACA	Erzin, Y. 2006	53.9°C
<i>vacA m2</i>	F GCA GCC CCA GGA AAC ATT G R CAT AAC TAG CGG CTT CGA	Erzin, Y. 2006	55.2°C

Fuente: Trespalacios AA. *et al*, 2011).

Cada una de las biopsias gástricas se genotipificó para detectar cuales poseen la isla de patogenicidad más completa en su genoma y de esta forma identificar las cepas más virulentas para un posterior cultivo. El procedimiento de la PCR esta detallado en la **Figura 3**.

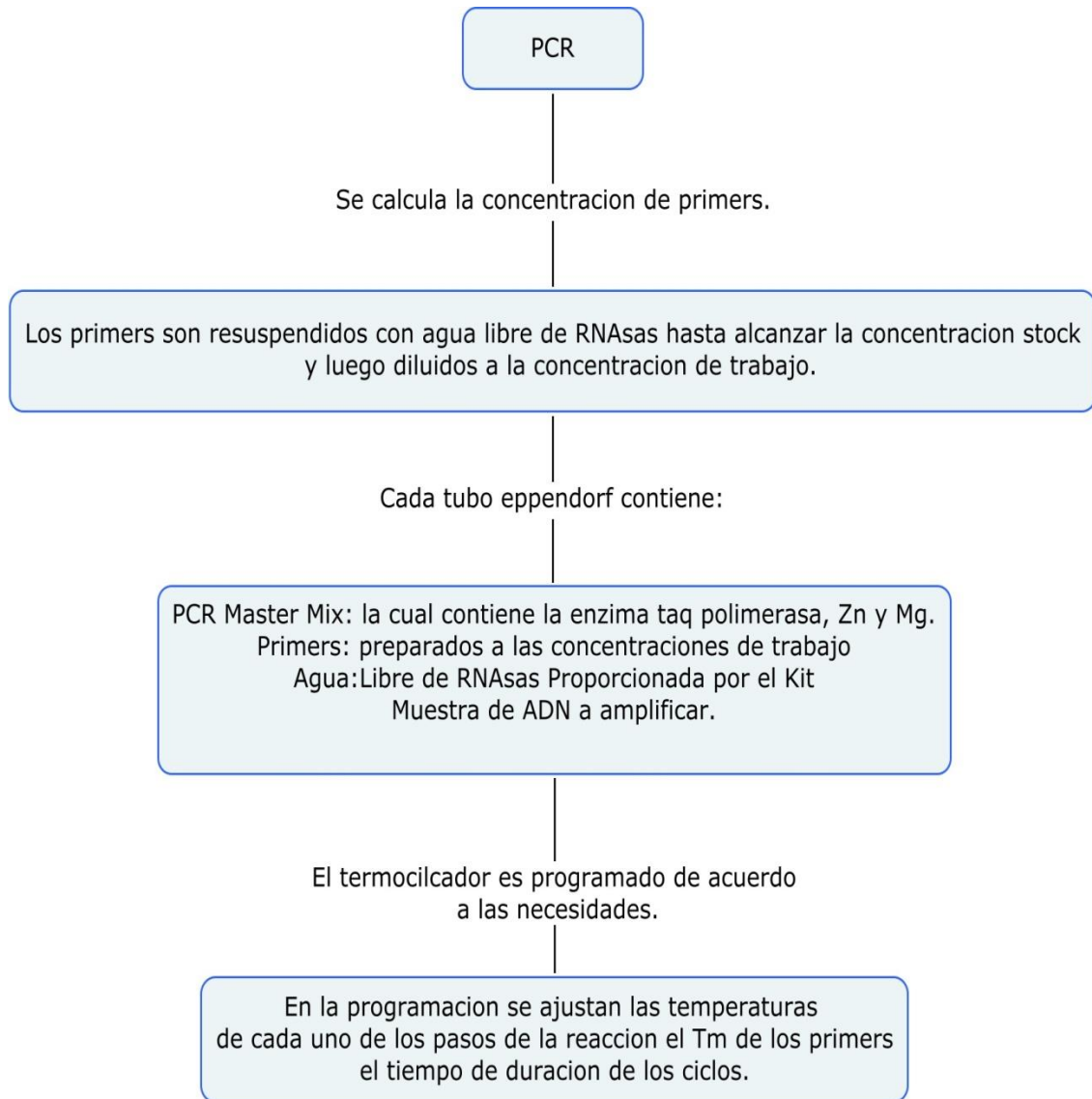


Figura 3: Resumen del procedimiento general a seguir para llevar a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

3.6.6 Contenido de cada Reacción

Dentro de cada tubo de reacción se depositaron los siguientes componentes y sus respectivos volúmenes. La **Tabla 2** muestra los volúmenes que se usan con cada componente.

Tabla 2: Listado de los reactivos de la PCR.

Componente	Volumen
Solución Maestra PCR	12.5uL
Agua	4.5uL
Oligo Reverso	1.5uL
Oligo Directo	1.5uL
ADN	5uL
Total	25uL

3.6.7 Programación del Termociclador

- Paso I 95⁰C 3 minutos
- Paso II 95⁰C 30 segundos
- Paso III Tm 30 segundos
- Paso IV 72⁰C 1 minuto
- Paso V GO TO STEP 2 39 ciclos
- Paso VI 72⁰C 5 minutos
- Paso VII 8⁰C 12 horas
- Paso VIII Fin

La temperatura (*melting*) T_M de cada primer puede consultarse en la **Tabla 1**. Una vez concluidos los 40 ciclos, se retiraban las muestras del termociclador y se almacenaban a -20°C hasta el momento de la preparación del gel.

3.6.8 Electroforesis en Gel de Agarosa

Para identificar los genes PAI, los productos de PCR amplificados se llevan a un gel de agarosa al 1% teñido con 120uL de Bromuro de Etidio y mezclados con un colorante (colorante de carga 2uL Thermo Scientific), utilizando TAE 1X como tampón de corrida. Se utilizó una corriente de 60V por 90 minutos y el gel se reveló en un Fotodocumentador. El procedimiento se describe en el diagrama de flujo mostrado en la **Figura 4**.

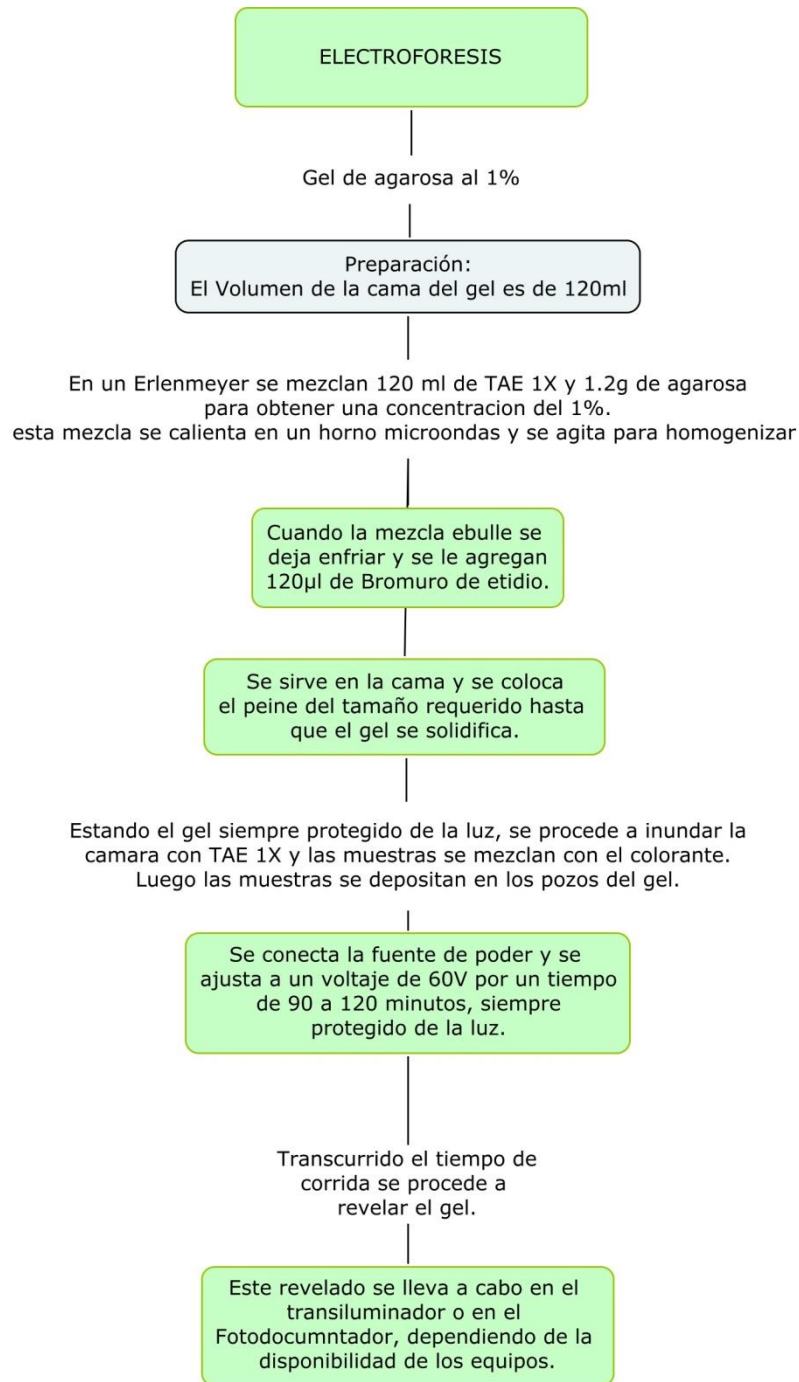


Figura 4: Bosquejo simplificado del protocolo de Electroforesis en gel de Agarosa.

Luego de haber realizado la genotipificación completa se escogieron un máximo de 5 cepas con la isla de patogenicidad más completa o con la mayor cantidad de factores de

virulencia, para cultivar la bacteria pura a partir de las biopsias gástricas, en un medio de cultivo selectivo para *H. Pylori* de acuerdo a lo reportado por (Trespacios AA. *et al* 2011). Dichas biopsias fueron almacenadas para su posterior cultivo y análisis, que hace parte de una posterior investigación.

3.7 Recolección de datos de tratamiento de los Pacientes

Se va a usar el formato mostrado en la **Tabla 3** para recabar la información de los pacientes.

Tabla 3: Formato para recolectar la información de los pacientes.

No	CÓDIGO DE RECOLECCION	NOMBRE PACIENTE	CODIGO DE BARRAS	ENTIDAD	EDAD	GRUPO ETAREO	FECHA DE RECOLECCION	DIAGNÓSTICO	Tipo Gastritis	MI	Atrofia	TTo	Erradica	GENOTIPOS	Antibióticos usados	Recaída
1																
2																

3.8 Tratamiento Estadístico

Los datos moleculares obtenidos de los genes de la isla PAI de cada cepa *H. pylori* fueron correlacionados con los datos de tratamiento con antibióticos.

Se determinó el porcentaje de resistencia a Claritromicina y Levofloxacina, así como el porcentaje de presencia del gen *cagA* y los diferentes alelos en los aislamientos analizados.

Se buscó asociación entre la presencia de los genes de virulencia y la resistencia a los antibióticos.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Se analizaron 32 biopsias de antro gástrico, todas con presencia de *H. pylori* según el estudio de histopatología realizado por cada EPS, el cual nos fue suministrado por el gastroenterólogo tratante de cada paciente.

A las 32 muestras se les realizó extracción de ADN, PCR y electroforesis en gel de agarosa para determinar la presencia o ausencia de los genes a estudiar. Todas las tablas y graficas presentadas a continuación son de elaboración propia.

La eficiencia de los tratamientos a los que fue sometido cada paciente, y si dichos tratamientos con antibióticos lograron erradicar la bacteria causante de las patologías diagnosticadas, fue uno de los propósitos de esta investigación, con el fin de detectar genes presentes en biopsias gástricas de pacientes terminales víctimas de cáncer gástrico, adenocarcinoma o linfoma MALT, reportados en otros estudios, en pacientes con un diagnóstico temprano de patologías gástricas leves en comparación con estadios de dichas patologías demasiado avanzados.

A continuación, se presentan tablas, gráficas e imágenes que sustentan los resultados obtenidos en el proyecto, incluyendo el Diagnóstico de cada paciente, tratamiento al cual fue sometido, se suministraron dos tipos de tratamientos con antibióticos, uno con Levofloxacina y otro con Claritromicina; así como el genotipo de cada paciente identificado con un código asignado por el equipo investigador para proteger su identidad. Los datos fueron analizados para lograr determinar la prevalencia de la isla de

patogenicidad (PAI) en estos pacientes y además identificar si poseían una cepa resistente o no a cierto antibiótico usado en el tratamiento.

4.1 Definición de Variables

La **Tabla 4** muestra la definición de las variables utilizadas en ésta investigación, con su correspondiente codificación.

Tabla 4: Definición de variables.

CÓDIGO	Número formado por uno o dos dígitos, seguido de tres letras, que identifican el sitio de toma de la muestra. SUR: Clínica Suramericana CER: Clínica El Rosario
ENTIDAD	Centro hospitalario donde se realizó el procedimiento de toma de muestra
EDAD	Edad de los pacientes.
GRUPO ETÁREO	Grupo de edad al cual pertenece el paciente
DIAGNÓSTICO	Diagnóstico entregado por el Médico tratante, tomado de la historia clínica.
GASTRITIS	Nivel de Gastritis: G. Crónica no atrófica = 1 G. Crónica atrófica = 2 G. Crónica activa = 3
MI	Metaplasia Intestinal: Ausencia = 0 Presencia = 1
ATROFIA	Atrofia: Ausencia = 0 Presencia = 1
TTO	Combinación de dos antibióticos (A=Amoxicilina, C=Claritromicina, L=Levofloxacina) y un Bloqueador de la Bomba de Protones: BBP, A, C = 1 BBP, A, L = 2
ERRADICA	No = 0 Si = 1
PRESENCIA DEL GEN	No = 0 Si = 1

4.2 Variables sociodemográficas de los pacientes

La **Tabla 5** muestra los datos del diagnóstico dado por el médico gastrohepatólogo Rodrigo Castaño Llano, coinvestigador de esta investigación, junto con algunos datos propios de cada paciente proporcionados por ellos mismos, previa firma del consentimiento informado. (Ver anexos al final de la tesis). Por cuestiones éticas no se muestran los datos personales que permitan identificar al paciente.

Tabla 5: Variables Sociodemográficas de los Pacientes.

No.	CÓDIGO	ENTIDAD	EDAD	GRUPO	GENERO
1	HP0001 SUR	SURA	51	46-55	F
2	HP0012 SUR	SURA	57	56 o más	M
3	HP0016 CER	SURA	62	56 o más	F
4	HP0016 SUR	SURA	64	56 o más	F
5	HP002 SUR	SURA	66	56 o más	M
6	HP003 SUR	SURA	53	46-55	F
7	HP0038 SUR	SURA	37	36-45	M
8	HP004 CER	SURA	26	25-35	F
9	HP0042 SUR	SURA	32	25-35	M
10	HP0045 SUR	SURA	35	25-35	F
11	HP0047 SUR	SURA	26	25-35	M
12	HP0049 SUR	SURA	53	46-55	F
13	HP005 SUR	SURA	60	56 o más	F
14	HP0061 SUR	SURA	25	25-35	F
15	HP0065 SUR	SURA	30	25-35	F
16	HP0071 SUR	SURA	58	46-55	F
17	HP001ROS	CER	49	46-55	F
18	HP002ROS	CER	43	36-45	F
19	HP0029 SUR	SURA	62	36-45	F
20	HP0030 SUR	SURA	39	36-45	F
21	HP0031 SUR	SURA	56	46-55	F
22	HP0046 SUR	SURA	46	46-55	F
23	HP0048 SUR	SURA	45	35-45	M
24	HP0052 SUR	SURA	66	56 o más	M
25	HP0054 SUR	SURA	34	25-35	F
26	HP0060 SUR	SURA	58	56 o más	M
27	HP0062 SUR	SURA	49	46-55	F
28	HP0063 SUR	SURA	28	25-55	F
29	HP0068 SUR	SURA	48	46-45	M
30	HP0070 SUR	SURA	31	25-35	F
31	HP009 CER	CER	69	56 o más	M
32	HP003ROS	CER	47	46-55	F

4.3 Diagnóstico y Tratamiento

La , causante de la infección.

Tabla 6 muestra el resultado del diagnóstico de los pacientes, el tratamiento al que fueron sometidos y si tuvo o no erradicación de la bacteria *H. pylori*, causante de la infección.

Tabla 6: Diagnóstico y tratamiento.

No.	CÓDIGO	DIAGNÓSTICO			TRATAMIENTO	
		Gastritis	MI	Atrofia	TTo	Erradica
1	HP0001 SUR	1	0	0	1	0
2	HP0012 SUR	1	0	0	1	1
3	HP0016 CER	1	0	0	2	1
4	HP0016 SUR	1	0	0	1	0
5	HP002 SUR	1	0	0	1	0
6	HP003 SUR	3	0	0	2	1
7	HP0038 SUR	1	0	0	2	1
8	HP004 CER	3	0	0	2	1
9	HP0042 SUR	1	0	0	2	1
10	HP0045 SUR	1	0	0	1	1
11	HP0047 SUR	1	0	0	2	1
12	HP0049 SUR	1	0	0	1	0
13	HP005 SUR	2	1	1	2	0
14	HP0061 SUR	1	0	0	1	1
15	HP0065 SUR	2	0	0	1	0
16	HP0071 SUR	2	1	1	1	1
17	HP001ROS	3	0	0	2	1
18	HP002ROS	3	0	0	2	1
19	HP0029 SUR	2	1	1	2	1
20	HP0030 SUR	1	0	0	1	1
21	HP0031 SUR	1	0	0	1	0
22	HP0046 SUR	3	0	0	2	1
23	HP0048 SUR	1	0	0	2	1
24	HP0052 SUR	1	0	0	2	1
25	HP0054 SUR	1	0	0	2	1
26	HP0060 SUR	2	1	1	2	1
27	HP0062 SUR	3	0	0	2	1
28	HP0063 SUR	1	0	0	2	1
29	HP0068 SUR	3	0	0	2	1
30	HP0070 SUR	1	0	0	2	1
31	HP009 CER	2	1	1	2	1
32	HP003ROS	3	0	0	1	0

4.4 Geles de Agarosa

La **Figura 5** muestra la escala de pesos moleculares con la que se trabajó y el nombre del marcador de peso molecular, aclarando que se usaron geles de agarosa al 1% en los cuales se pueden visualizar los productos de PCR amplificados de los genes y alelos en mención.

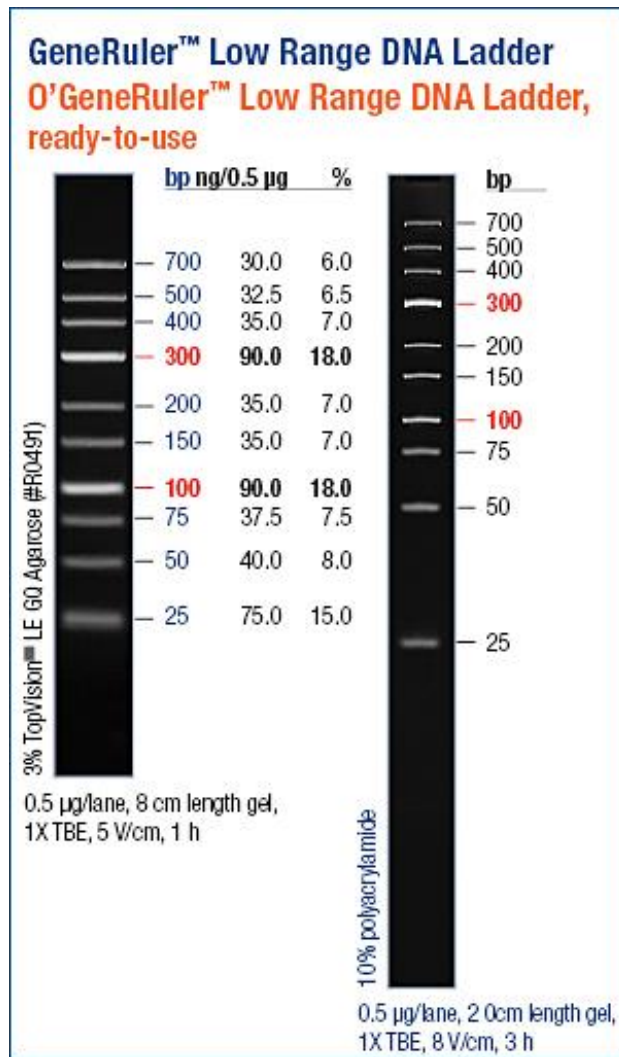


Figura 5: Peso molecular en escalera de fragmentos de ADN.

4.4.1 Gen *cagA*

La **Figura 6** muestra una fotografía del gel de agarosa 1% que contiene las 32 muestras analizadas y entre ellas las 10 *cagA* (+). El gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con Bromuro de etidio al 1%, nos enseña pozos con muestras de ADN de los pozos 2 al 36, los pozos 27, 28, 37, 38 y 39 se encuentran vacíos el marcador de peso molecular se encuentra en el pozo 1 y 40. Se buscaba identificar una banda de 183 bp correspondiente al gen *cagA*. En esta ocasión se observan bandas en el lugar correcto de cuerdo al marcador de peso molecular correspondiente a *cagA* 183bp.

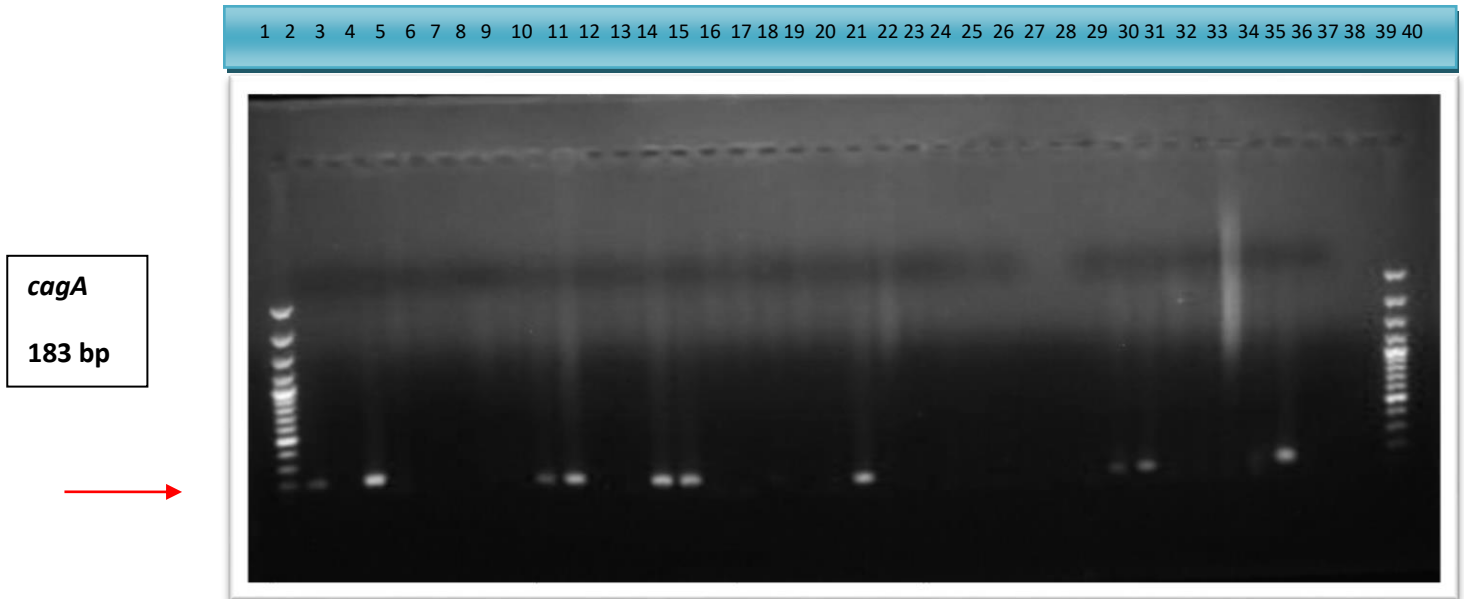


Figura 6: Gel gen *cagA*.

La **Tabla 7** muestra el orden de las muestras *cagA* cargadas en los pozos. La presencia de dicho gen se codifica con un “1” en la columna a la derecha del código del paciente. Como dato importante aparece que el total de pacientes cuya cepa de *H. pylori* tiene el gen *cagA* en su isla de patogenicidad es 10. También contiene dos muestras de dos pacientes

que fueron excluidos de los análisis estadísticos de este estudio, HP009SUR y HP044SUR (marcadas con *), luego de realizar las pruebas moleculares mencionadas, porque no se logró recabar la totalidad de los datos necesarios para poder incluirlos en esta investigación debido a que su historia clínica estaba incompleta. Así, de 32 muestras de ADN de *H. pylori* analizadas en el laboratorio se detectó la presencia de 9 muestras positivas (con información completa) para el gen *cagA*. En esta como en todas las fotografías, el control negativo se puede observar en la última posición junto al marcador de peso molecular ubicado en el extremo derecho década fotografía de cada gel de agarosa.

Tabla 7: Lista de muestras *cagA*

POZO	CONTENIDO	<i>cagA</i> (+)	POZO	CONTENIDO	<i>cagA</i> (+)
1	GENERULER	0	21	HP045SUR	1
2	HP071SUR	1	22	HP016CER	0
3	HP004CER	0	23	HP068SUR	0
4	HP042SUR	1	24	HP054SUR	0
5	HP012SUR	0	25	HP063SUR	0
6	HP016SUR	0	26	HP070SUR	0
7	HP047SUR	0	27	VACIO	0
8	HP001SUR	0	28	VACIO	0
9	HP009SUR	0*	29	HP003ROS	0
10	HP003SUR	1	30	HP0001ROS	1
11	HP065SUR	1	31	HP002ROS	1
12	HP060SUR	0	32	HP02SUR	0
13	HP062SUR	0	33	HP05SUR	0
14	HP052SUR	1	34	HP09CER	0
15	HP044SUR	1*	35	HP049SUR	0
16	HP048SUR	0	36	HP061SUR	1
17	HP046SUR	0	37	HP038SUR	0
18	HP031SUR	0	38	VACIO	0
19	HP029SUR	0	39	VACIO	0
20	HP030SUR	0	40	GENERULER	0
TOTAL					10

4.4.2 Gen *vacA*

Alelo *s1s2*.

La **Figura 7** muestra una fotografía del gel de agarosa 1% que contiene las 32 muestras analizadas y entre ellas las 25 con la sub región *vacAs1/s2* en su isla de patogenicidad. El gel de agarosa al 1% en TAE 1X teñido con Bromuro de Etidio al 1%, nos muestra pozos con muestras de ADN, de los pozos 2 al 36, el marcador de peso molecular se encuentra en el pozo 1 y 40. Se buscaba encontrar una banda de 259 bp correspondiente a la región *s1* y de 286bp para la región *s2*. En esta ocasión se observan bandas en el lugar correcto de acuerdo al marcador de peso molecular para *vacAs1/s2* 259bp/286bp. Este y todos los geles con productos de PCR fueron revelados en un transiluminador UV. En esta figura se muestra una banda de 259 pares de bases para la región *s1* y 286 pares de bases para la región *s2*. La flecha roja indica la banda de 300bp del marcador de peso molecular con el fin de facilitar la ubicación de la banda del alelo *vacAs1/s2*.

La presencia del gen *vacA* se tipificó con la presencia de las regiones o alelos *s1s2*, *s1a*, *s1b*, *s1c*, *m1* y *m2* del gen *vacA*.

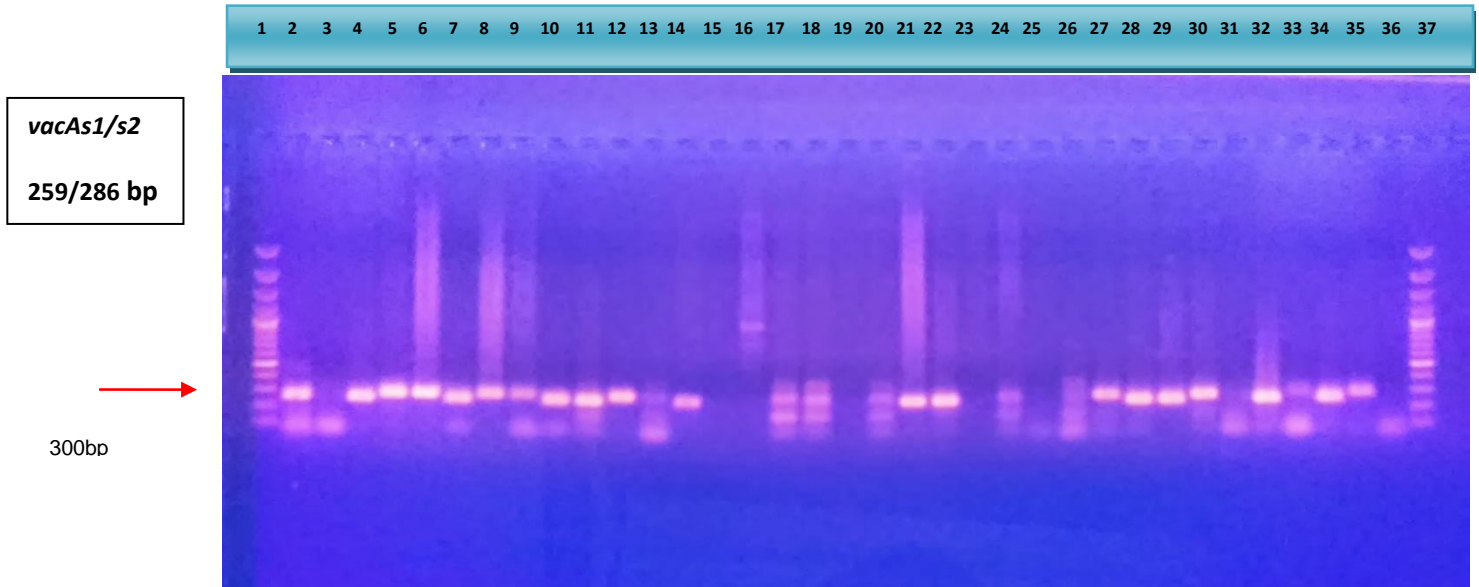


Figura 7: Gel gen *vacAs1/s2*.

En la **Tabla 8** se hace referencia a los pozos cargados con ADN bacteriano y su respectivo código correspondiente a cada biopsia. En ella se muestra el orden de las muestras cargadas en los pozos. Como dato importante se muestran los 25 pacientes infectados con una cepa de *H. pylori* que tiene el alelo *vacAs1/s2* en su isla de patogenicidad. La presencia de dicha sub región del gen se contabiliza con un “1” a la derecha del código del paciente.

Se encontró la presencia de los alelos *vacAs1/s2* en el 75% de las 32 muestras de ADN de *H. pylori* estudiadas, siendo esta la sub región más frecuente entre las biopsias de cada paciente. En esta como en todas las fotografías, el control negativo se puede observar en la última posición junto al marcador de peso molecular ubicado en el extremo derecho de cada fotografía de cada gel de agarosa.

Tabla 8: Lista de muestras *vacAs1/s2*.

POZO	CONTENIDO	<i>vacAs1/s2</i>	POZO	CONTENIDO	<i>vacAs1/s2</i>
1	GENERULER	0	21	HP045SUR	1
2	HP071SUR	1	22	HP016CER	1
3	HP004CER	0	23	HP068SUR	0
4	HP042SUR	1	24	HP054SUR	1
5	HP012SUR	1	25	HP063SUR	0
6	HP016SUR	1	26	HP070SUR	1
7	HP047SUR	1	27	HP003ROS	1
8	HP001SUR	1	28	HP0001ROS	1
9	HP009SUR*	1	29	HP002ROS	1
10	HP003SUR	1	30	HP02SUR	1
11	HP065SUR	1	31	HP05SUR	0
12	HP060SUR	1	32	HP09CER	1
13	HP062SUR	0	33	HP049SUR	0
14	HP052SUR	1	34	HP061SUR	1
15	HP044SUR*	0	35	HP038SUR	1
16	HP048SUR	0	36	CONTROL	0
17	HP046SUR	1	37	GENERULER	0
18	HP031SUR	1	TOTAL		25
19	HP029SUR	0			
20	HP030SUR	1			

Alelo *sIa*

La **Figura 8** muestra la fotografía del gel de agarosa al 1% que contiene las 32 muestras analizadas y entre ellas las 9 *vacAsIa*(+), en esta figura se muestra una banda de 190 pares de bases para la región *sIa*. Con ayuda de una flecha roja se señala la posición de la banda.

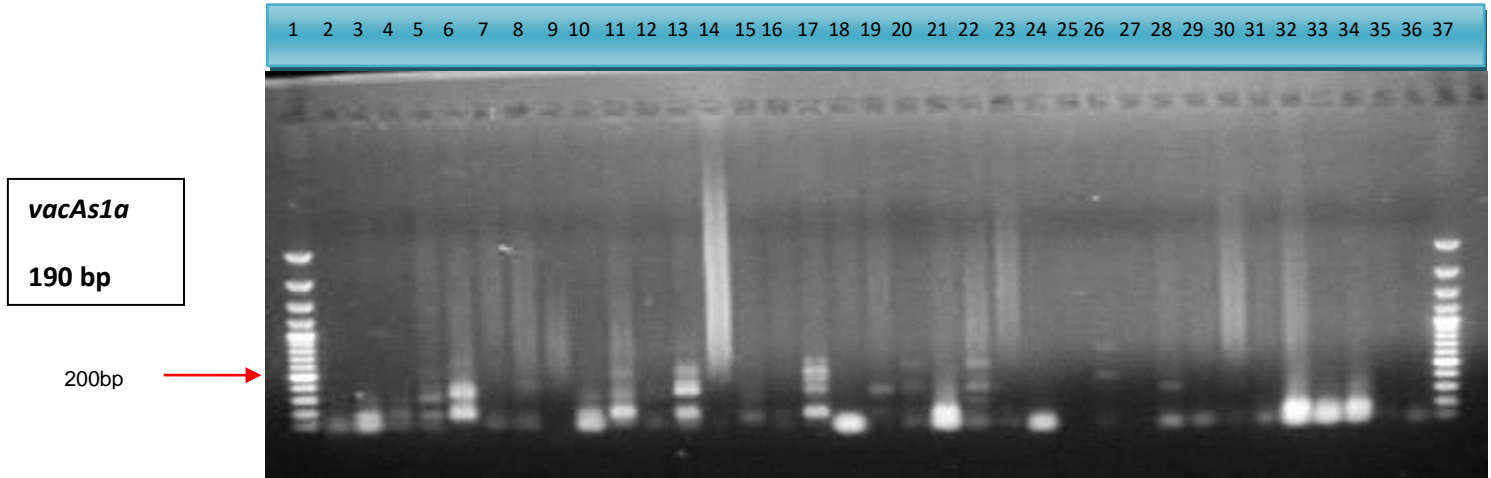


Figura 8: Gel gen *vacAsIa*.

La **Tabla 9** muestra el total de pacientes infectados con una cepa de *H. pylori* que contiene el alelo *sIa* del gen *vacA* en su isla de patogenicidad. En el caso de este alelo son 9 pacientes correspondientes a un 28.13% de la muestra.

Se encontró la presencia del alelo *vacAsIa* en el 28.13% de los 32 pacientes analizados como se muestra contabilizado en la **Tabla 9**, y de forma visual en la **Figura 8** en la cual se observa el gel de agarosa al 1% y en donde se pueden observar los productos de PCR y las bandas de 190 pares de bases correspondientes al alelo *vacAsIa* en los respectivos carriles o pozos.

En los carriles 1 y 37 se encontraba el marcador de peso molecular Gene Ruler Low Range DNA Ladder, las muestras de ADN de *H. pylori* se encontraban depositadas de los pozos 2 al 35, en el pozo o carril 36 corrió el control negativo. En los pozos 9 y 15 se encontraban las muestras de los pacientes HP0009SUR y HP0044SUR respectivamente, los cuales no fueron incluidos en el análisis estadístico debido a falta de datos necesarios para completar los registros. En esta como en todas las fotografías, el control negativo se puede observar en la última posición junto al marcador de peso molecular ubicado en el extremo derecho década fotografía de cada gel de agarosa.

Tabla 9: Lista de muestras *vacAs1a*

POZO	CONTENIDO	<i>vacAs1a</i>	POZO	CONTENIDO	<i>vacAs1a</i>
1	GENERULER	0	19	HP0029SUR	0
2	HP0071SUR	0	20	HP0030SUR	0
3	HP0004CER	1	21	HP0045SUR	1
4	HP0042SUR	0	22	HP0016CER	0
5	HP0012SUR	0	23	HP0068SUR	0
6	HP0016SUR	1	24	HP0054SUR	0
7	HP0047SUR	0	25	HP0063SUR	0
8	HP0001SUR	0	26	HP0070SUR	0
9	HP0009SUR*	0	27	HP0003ROS	0
10	HP0003SUR	1	28	HP0001ROS	0
11	HP0065SUR	1	29	HP002ROS	0
12	HP0060SUR	0	30	HP002SUR	0
13	HP0062SUR	1	31	HP005SUR	0
14	HP0052SUR	0	32	HP009CER	1
15	HP0044SUR*	0	33	HP0049SUR	0
16	HP0048SUR	0	34	HP0061SUR	1
17	HP0046SUR	1	35	HP0038SUR	0
18	HP0031SUR	0	36	CONTROL	0
			37	GENERULER	0
				TOTAL	9

Alelo *s1b*

La **Figura 9** muestra la fotografía del gel de agarosa al 1%, teñido con Bromuro de etidio al 1% en el que se observan las 3 bandas de 187 pares de bases del subtipo alelo *s1b* del gen *vacA*.

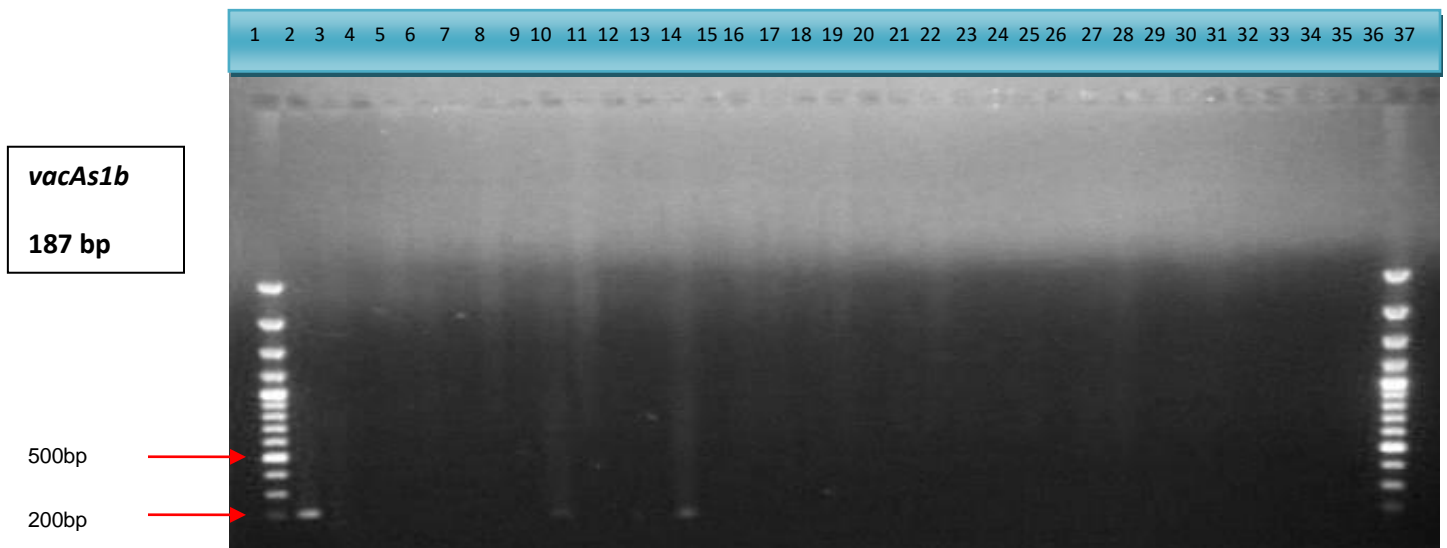


Figura 9: Gel gen *vacAs1b*.

La **Tabla 10** muestra el listado del total de pacientes cuyo subtipo *s1b* del gen *vacA*, se encuentra presente en la isla de patogenicidad de la cepa de *H. pylori* que lo infecta. En el caso de este alelo son 3 pacientes correspondientes a un 9.4%

Como resultado de los análisis de laboratorio se encontró que, del total de pacientes, el 9.4% tenían el alelo *vacAs1b* lo cual quiere decir que este porcentaje de la muestra, es decir 3 pacientes, tienen una cepa de *H. pylori* con el subtipo *vacAs1b* en su isla de patogenicidad tal y como se puede apreciar en la fotografía del gel de agarosa de la **Figura 9**, en la cual se

observan las bandas de 187 pares de bases propias de esta región y los carriles en los cuales se encontraban depositados los productos de PCR. El orden de los carriles se observa en la **Tabla 10** en donde también se contabiliza el total de los pacientes positivos para este alelo.

En esta como en todas las fotografías, el control negativo se puede observar en la última posición junto al marcador de peso molecular ubicado en el extremo derecho década fotografía de cada gel de agarosa.

Tabla 10: Lista de muestras *vacAs1b(+)*

POZO	CONTENIDO	<i>vacAs1b</i>	POZO	CONTENIDO	<i>vacAs1b</i>
1	GENERULER	0	20	HP0030SUR	0
2	HP0071SUR	1	21	HP0045SUR	0
3	HP0004CER	0	22	HP0016CER	0
4	HP0042SUR	0	23	HP0068SUR	0
5	HP0012SUR	0	24	HP0054SUR	0
6	HP0016SUR	0	25	HP0063SUR	0
7	HP0047SUR	0	26	HP0070SUR	0
8	HP0001SUR	0	27	HP0003ROS	0
9	HP0009SUR*	0	28	HP0001ROS	0
10	HP0003SUR	1	29	HP002ROS	0
11	HP0065SUR	0	30	HP002SUR	0
12	HP0060SUR	0	31	HP005SUR	0
13	HP0062SUR	0	32	HP009CER	0
14	HP0052SUR	1	33	HP0049SUR	0
15	HP0044SUR*	0	34	HP0061SUR	0
16	HP0048SUR	0	35	HP0038SUR	0
17	HP0046SUR	0	36	CONTROL	0
18	HP0031SUR	0	37	GENERULER	0
19	HP0029SUR	0		TOTAL	3

Alelo *sIc*

En la **Figura 10** se observa la fotografía del gel de agarosa al 1% y teñido con Bromuro de Etidio al 1%, en el cual se identifican las 21 bandas de 220 pares de bases correspondientes al alelo *sIc* del gen *vacA*. A su vez es posible apreciar las bandas en el lugar correspondiente de acuerdo tamaño de las mismas.

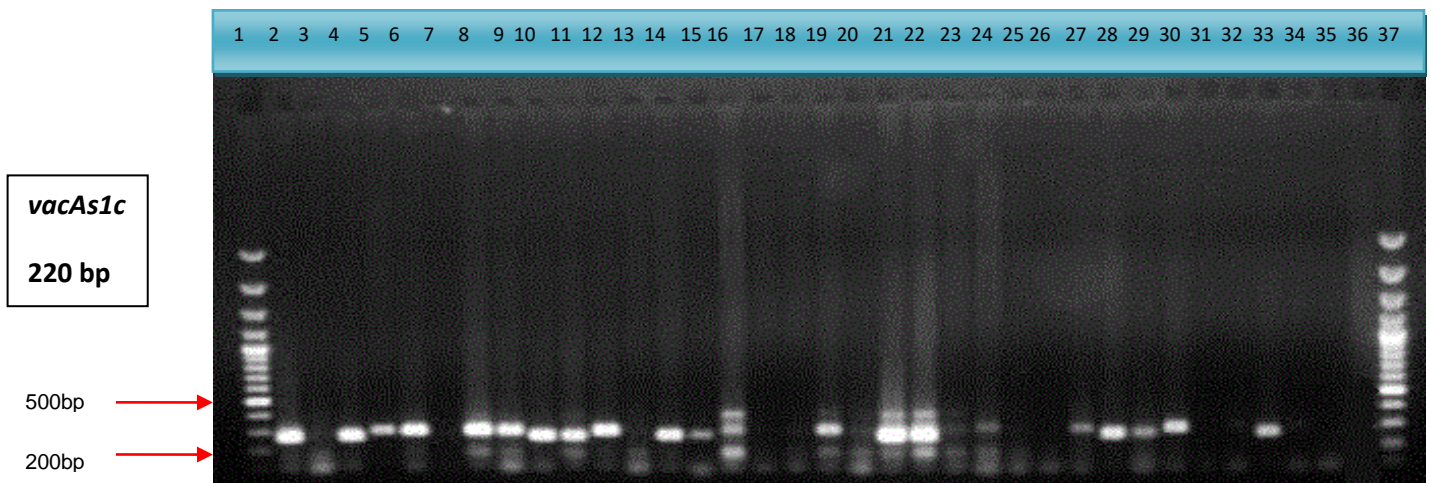


Figura 10: Gel gen *vacAs1c*.

En la **Tabla 11** se contabiliza el total de los pacientes infectados con la cepa de *H. pylori* que contiene el alelo *vacAs1c* en su isla de patogenicidad.

Éste total corresponde al 59.4% de los pacientes del presente estudio. En total 19 pacientes poseen una cepa con esta región en su genoma, del total de 32 pacientes que conforman la muestra de este estudio.

En la **Tabla 11** se encuentran marcados con un asterisco los pacientes HP0009SUR y HP0044SUR también positivos, en este caso, no se incluyeron en el análisis estadístico debido a que su historia clínica estaba incompleta, y no fue posible contactar al paciente

para el análisis de resultados de las pruebas moleculares. Los resultados de estos dos pacientes tan solo se reportaron ya que igual tienen validez clínica pero para efectos de este estudio fueron excluidos y serán analizados en estudios posteriores. En esta como en todas las fotografías, el control negativo se puede observar en la última posición junto al marcador de peso molecular ubicado en el extremo derecho de cada fotografía de cada gel de agarosa.

Tabla 11: Lista de muestras *vacAsIc*

POZO	CONTENIDO	<i>vacAsIc</i>	POZO	CONTENIDO	<i>vacAsIc</i>
1	GENERULER	0	19	HP0029SUR	1
2	HP0071SUR	1	20	HP0030SUR	0
3	HP0004CER	0	21	HP0045SUR	1
4	HP0042SUR	1	22	HP0016CER	1
5	HP0012SUR	1	23	HP0068SUR	0
6	HP0016SUR	1	24	HP0054SUR	1
7	HP0047SUR	0	25	HP0063SUR	0
8	HP0001SUR	1	26	HP0070SUR	0
9	HP0009SUR*	1	27	HP0003ROS	1
10	HP0003SUR	1	28	HP0001ROS	1
11	HP0065SUR	1	29	HP002ROS	1
12	HP0060SUR	1	30	HP002SUR	1
13	HP0062SUR	0	31	HP005SUR	0
14	HP0052SUR	1	32	HP009CER	0
15	HP0044SUR*	1	33	HP0049SUR	1
16	HP0048SUR	1	34	HP0061SUR	0
17	HP0046SUR	0	35	HP0038SUR	0
18	HP0031SUR	0	36	CONTROL	0
			37	GENERULER	0
TOTAL					21

Alelo *mI*

En la **Figura 11** el marcador de peso molecular de 100 bp no se puede observar, pero sirve de constancia de que la banda corresponde a las 290 bp del alelo *mI* del gen *vacA* al encontrarse por debajo de la banda de peso molecular correspondiente a 300 bp. En la **Figura 11** se observan dos flechas rojas que indican la posición de las bandas de marcador de peso molecular para 500bp y para 300bp con el fin de ayudar a ubicar más fácilmente las bandas del alelo *mI* del gen *vacA*. En ésta fotografía, del gel de agarosa al 1% teñido con Bromuro de Etidio al 1%, se pueden observar las 14 bandas de 290 bp correspondientes a la subregión *mI* del gen *vacA*. En esta como en todas las fotografías, el control negativo se puede observar en la última posición junto al marcador de peso molecular ubicado en el extremo derecho década fotografía de cada gel de agarosa.

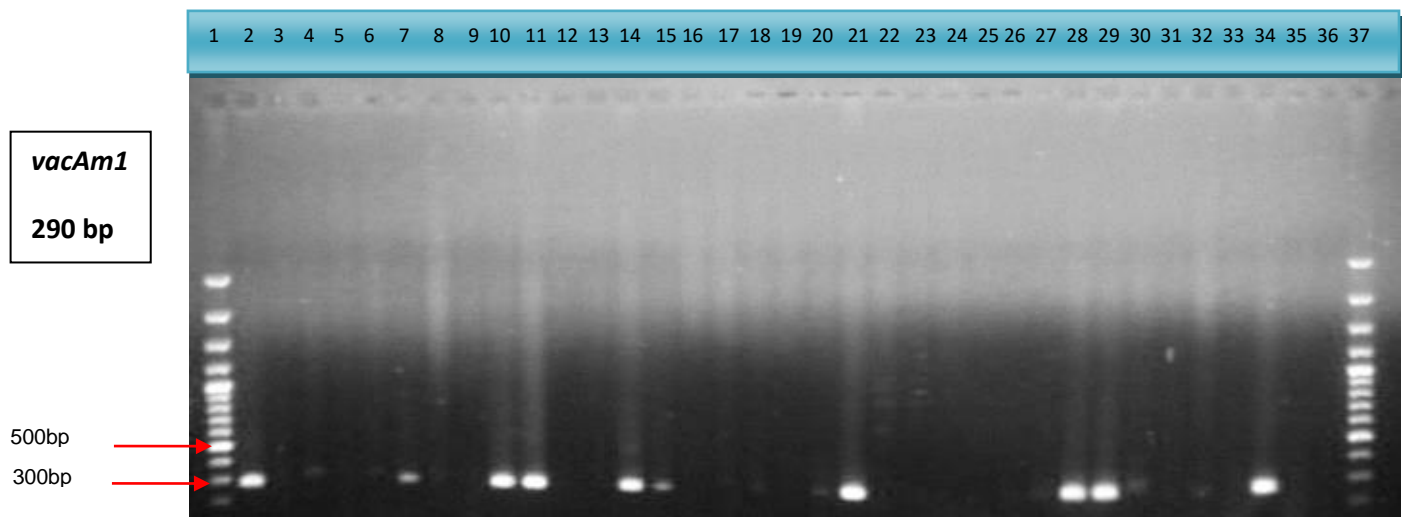


Figura 11: Gel gen *vacAm1*.

En total fueron 13 los pacientes infectados con una cepa de *H. pylori* que posee esta subregión en su isla de patogenicidad, correspondientes a un 40.6% del total de pacientes analizados en este estudio.

El paciente con código HP0044SUR también resultó positivo para este alelo pero no se incluyó en los análisis estadísticos. En la **Tabla 12** se puede comprobar la cantidad de pacientes con el alelo *vacAm1* de acuerdo a los resultados arrojados por la electroforesis de los productos de PCR de este alelo.

Tabla 12: Lista de muestras *vacAm1*.

POZO	CONTENIDO	<i>VacAm1</i>	POZO	CONTENIDO	<i>VacAm1</i>
1	GENRULER	0	19	HP0029SUR	0
2	HP0071SUR	1	20	HP0030SUR	1
3	HP0004CER	0	21	HP0045SUR	1
4	HP0042SUR	1	22	HP0016CER	0
5	HP0012SUR	0	23	HP0068SUR	0
6	HP0016SUR	0	24	HP0054SUR	0
7	HP0047SUR	1	25	HP0063SUR	0
8	HP0001SUR	0	26	HP0070SUR	0
9	HP0009SUR*	0	27	HP0003ROS	0
10	HP0003SUR	1	28	HP0001ROS	1
11	HP0065SUR	1	29	HP002ROS	1
12	HP0060SUR	0	30	HP002SUR	1
13	HP0062SUR	0	31	HP005SUR	0
14	HP0052SUR	1	32	HP009CER	0
15	HP0044SUR*	1	33	HP0049SUR	0
16	HP0048SUR	0	34	HP0061SUR	1
17	HP0046SUR	0	35	HP0038SUR	0
18	HP0031SUR	1	36	CONTROL	0
			37	GENRULER	0
			TOTAL		14

Alelo *m2*.

En este caso el marcador de peso molecular de 100bp puede observarse más claramente, la flecha roja indica la posición de la banda del alelo *vacAm2* de 352bp entre las posiciones de 300bp y 400bp del marcador de peso molecular Gene Ruler Low Range DNA Ladder.

Figura 5.

De acuerdo con la fotografía del gel de agarosa de la **Figura 12** fueron 7 los pacientes infectados con una cepa de *H. pylori* que posee el alelo *vacAm2* del gen *vacA* correspondientes al 21.9% de la muestra.

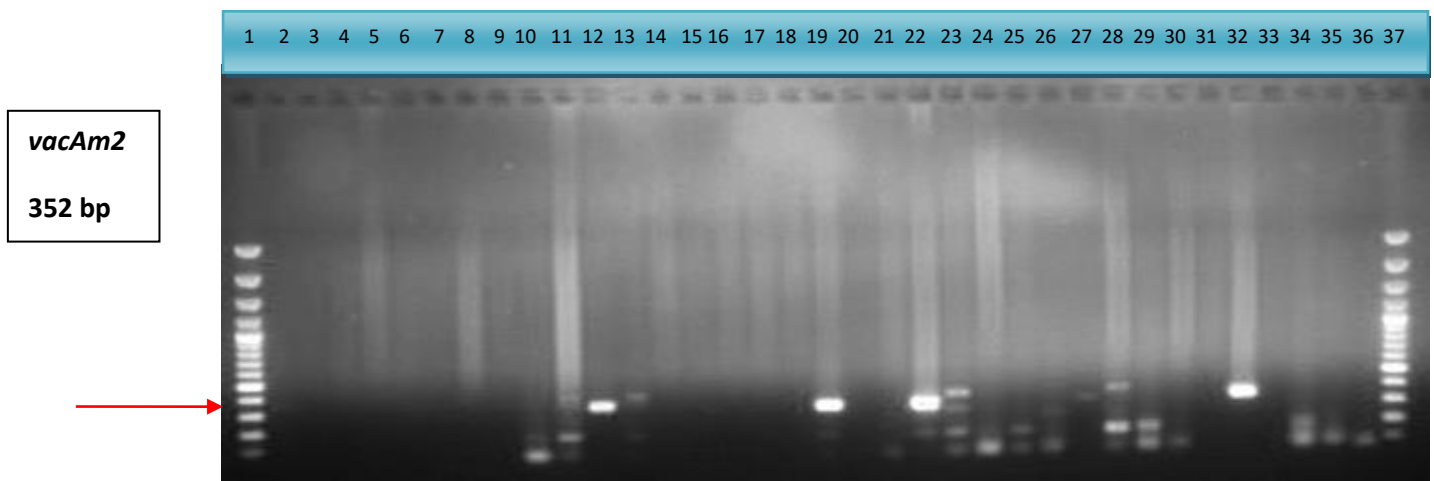


Figura 12: Gel gen *vacAm2*.

En la **Tabla 13** se presenta un listado de los 7 pacientes *vacAm2* (+) en la que además se indica la posición de los productos de PCR en los carriles del gel de agarosa indicando con un uno “1” la presencia o con un cero “0” la ausencia de el gen *vacAm2*. Vale aclarar que

los resultados se reportaron de esta forma para todos los genes y sus respectivos alelos o subtipos.

Tabla 13: Lista de muestras *vacAm2*

POZO	CONTENIDO	<i>VacAm2</i>	POZO	CONTENIDO	<i>VacAm2</i>
1	GENERULER	0	20	HP0030SUR	0
2	HP0071SUR	0	21	HP0045SUR	0
3	HP0004CER	0	22	HP0016CER	1
4	HP0042SUR	0	23	HP0068SUR	1
5	HP0012SUR	0	24	HP0054SUR	0
6	HP0016SUR	0	25	HP0063SUR	0
7	HP0047SUR	0	26	HP0070SUR	0
8	HP0001SUR	0	27	HP0003ROS	0
9	HP0009SUR*	0	28	HP0001ROS	1
10	HP0003SUR	0	29	HP002ROS	0
11	HP0065SUR	0	30	HP002SUR	0
12	HP0060SUR	1	31	HP005SUR	0
13	HP0062SUR	1	32	HP009CER	1
14	HP0052SUR	0	33	HP0049SUR	0
15	HP0044SUR*	0	34	HP0061SUR	0
16	HP0048SUR	0	35	HP0038SUR	0
17	HP0046SUR	0	36	CONTROL	0
18	HP0031SUR	0	37	GENERULER	0
19	HP0029SUR	1		TOTAL	7

4.4.3 Gen *babA*

Se encontró el alelo *babA2* del gen *babA* en el 6.2% de las muestras analizadas, ya que es el único que codifica la proteína completa.

En la **Figura 13** se muestra el gel agarosa al 1% en TAE 1X teñido con Bromuro de Etidio 1%, nos enseña pozos con muestras de ADN de los pozos 2 al 36, los pozos 1 y 40 corresponden al marcador de peso molecular. De acuerdo con la fotografía del gel de

agarosa, fueron 2 los pacientes infectados con una cepa de *H. pylori* que posee el gen *babA2* correspondientes al 6.25% de la muestra.

En la **Figura 13** se puede observar la banda de 832 bp del alelo *babA2* claramente identificada y con la ayuda de la flecha roja se señala sobre el marcador de peso molecular que el tamaño de la banda es el esperado.

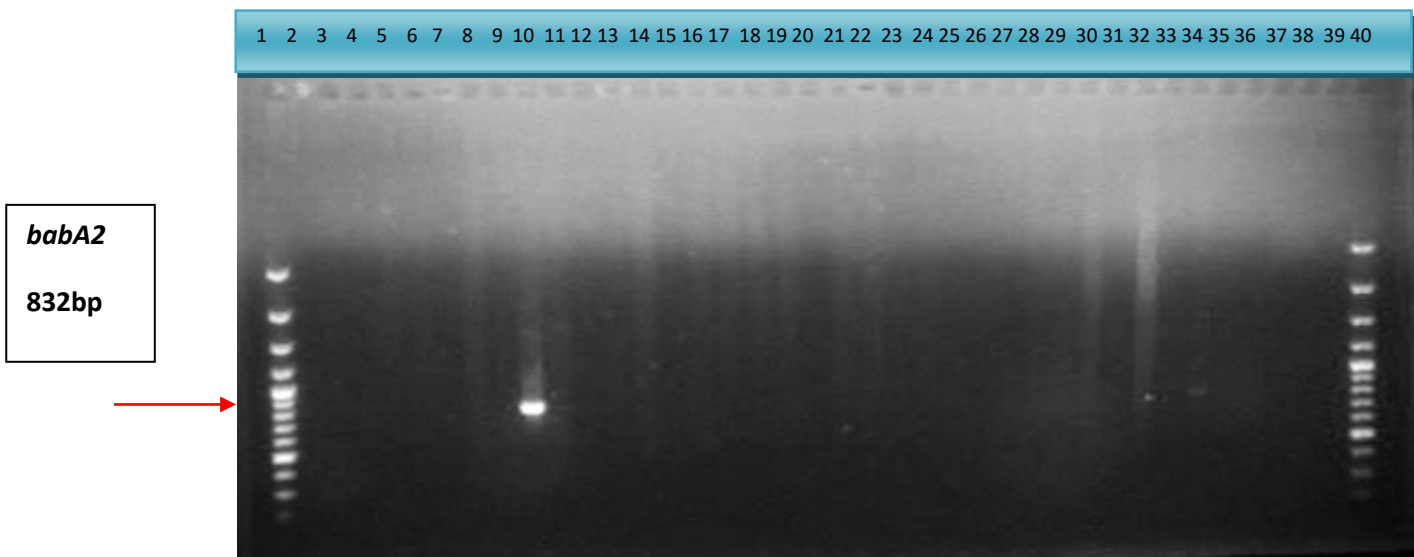


Figura 13: Gel gen *babA2*.

En la **Tabla 14** se presenta un listado de los pacientes *babA2* (+) en la que además se indica la posición de los productos de PCR en los carriles del gel de agarosa indicando con un uno “1” la presencia o con un cero “0” la ausencia del alelo *babA2* del gen *vacA*. Vale aclarar que los resultados se reportaron de esta forma para todos los genes y sus respectivos alelos o subtipos.

Tabla 14: Lista de muestras *babA2*

POZO	CONTENIDO	<i>babA2</i>	POZO	CONTENIDO	<i>babA2</i>
1	GENERULER	0	20	HP0030SUR	0
2	HP0071SUR	0	21	HP0045SUR	0
3	HP0004CER	0	22	HP0016CER	0
4	HP0042SUR	0	23	HP0068SUR	0
5	HP0012SUR	0	24	HP0054SUR	0
6	HP0016SUR	0	25	HP0063SUR	0
7	HP0047SUR	0	26	HP0070SUR	0
8	HP0001SUR	0	27	HP0003ROS	0
9	HP0009SUR*	0	28	HP0001ROS	0
10	HP0003SUR	1	29	HP002ROS	0
11	HP0065SUR	0	30	HP002SUR	0
12	HP0060SUR	0	31	HP005SUR	0
13	HP0062SUR	0	32	HP009CER	0
14	HP0052SUR	0	33	HP0049SUR	0
15	HP0044SUR*	0	34	HP0061SUR	1
16	HP0048SUR	0	35	HP0038SUR	0
17	HP0046SUR	0	36	CONTROL	0
18	HP0031SUR	0	40	GENERULER	0
19	HP0029SUR	0		TOTAL	2

4.4.4 Gen *iceA*

Alelo *iceA1*.

Las flechas rojas en la **Figura 14** señalan las bandas de marcador de peso molecular sobre las cuales se ubica la banda del alelo *iceA1* correspondiente a 247bp, como se observa en la figura, dicha banda se encuentra entre las bandas de 200bp y 300bp del

marcador de peso molecular. La banda de 100bp del marcador de peso molecular no se puede observar en esta fotografía.

En la **Figura 14** se pueden observar las 9 que corresponden a pacientes infectados con cepas de *H. pylori*, con este alelo en la isla de patogenicidad. El paciente HP0009SUR también posee una de estas cepas y fue reportado como positivo pero no se incluyó en los análisis estadísticos por falta de datos en la historia clínica, de esta forma es imposible tenerlo en cuenta.

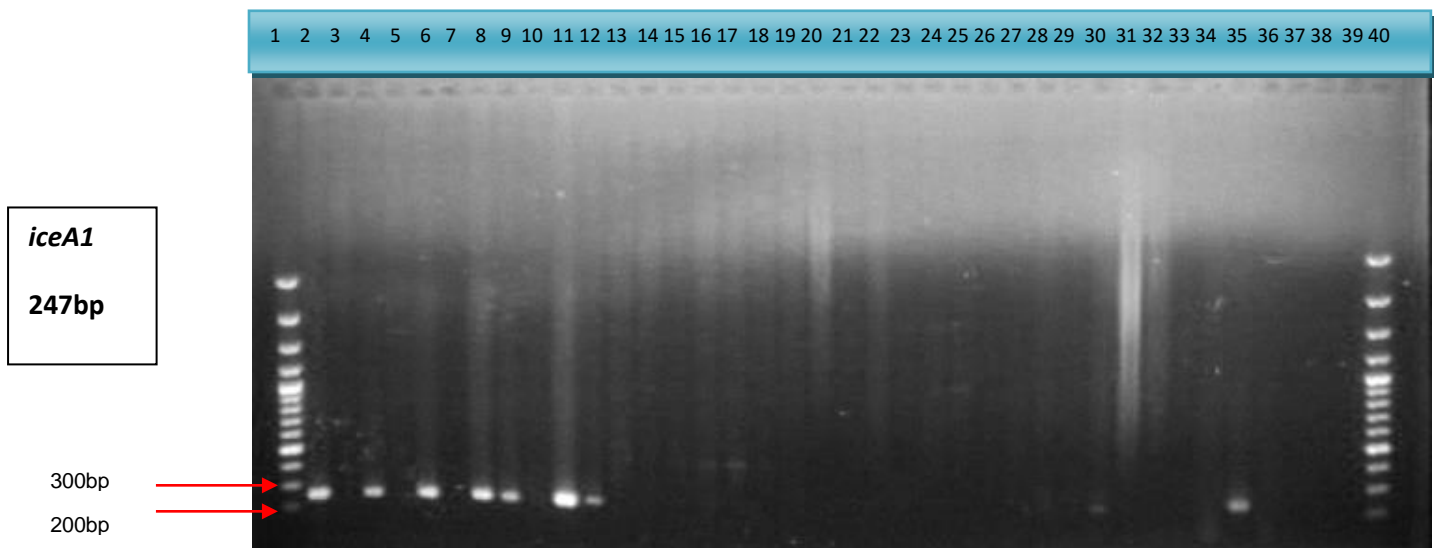


Figura 14: Gel gen *iceA1*.

La **Tabla 15** muestra el total de pacientes, incluidos los 9 que estaban infectados con una cepa de *H. pylori* que contenía el alelo *iceA1* del gen *iceA* en su isla de patogenicidad. El paciente de código HP0009SUR es *iceA1* (+) se reportó en esta tabla, mas no fue incluido en los análisis estadísticos debido a falta de datos en su historia clínica.

Tabla 15: Lista de muestras *iceA1*

POZO	CONTENIDO	<i>iceA1</i>	POZO	CONTENIDO	<i>iceA1</i>
1	GENERULER	0	20	HP0030SUR	0
2	HP0071SUR	1	21	HP0045SUR	0
3	HP0004CER	0	22	HP0016CER	0
4	HP0042SUR	1	23	HP0068SUR	0
5	HP0012SUR	0	24	HP0054SUR	0
6	HP0016SUR	1	25	HP0063SUR	0
7	HP0047SUR	0	26	HP0070SUR	0
8	HP0001SUR	1	27	HP0003ROS	0
9	HP0009SUR*	1	28	HP0001ROS	0
10	HP0003SUR	0	29	HP002ROS	0
11	HP0065SUR	1	30	HP002SUR	1
12	HP0060SUR	1	31	HP005SUR	0
13	HP0062SUR	0	32	HP009CER	0
14	HP0052SUR	0	33	HP0049SUR	0
15	HP0044SUR*	0	34	HP0061SUR	0
16	HP0048SUR	0	35	HP0038SUR	1
17	HP0046SUR	0	36	CONTROL	0
18	HP0031SUR	0	40	GENERULER	0
19	HP0029SUR	0	TOTAL		9

Subtipo *iceA2*

En la **Figura 15** se observa el gel de agarosa en el cual se encuentran las bandas de 229bp correspondientes al gen *iceA2* que se encontraron en 5 de las cepas que infectan a cada paciente analizado en este estudio correspondientes al 15.6% del total.

En los carriles 1 y 38 se encuentra el marcador de peso molecular, en el carril 37 el control negativo y de los carriles 2 al 36 las muestras de ADN de *H pylori*. Se necesita de la ayuda de dos flechas rojas para indicar la posición del marcador de peso molecular y ubicar la banda del alelo *iceA2* ya que la banda indicadora para 100bp del marcador de peso molecular no puede observarse a simple vista.

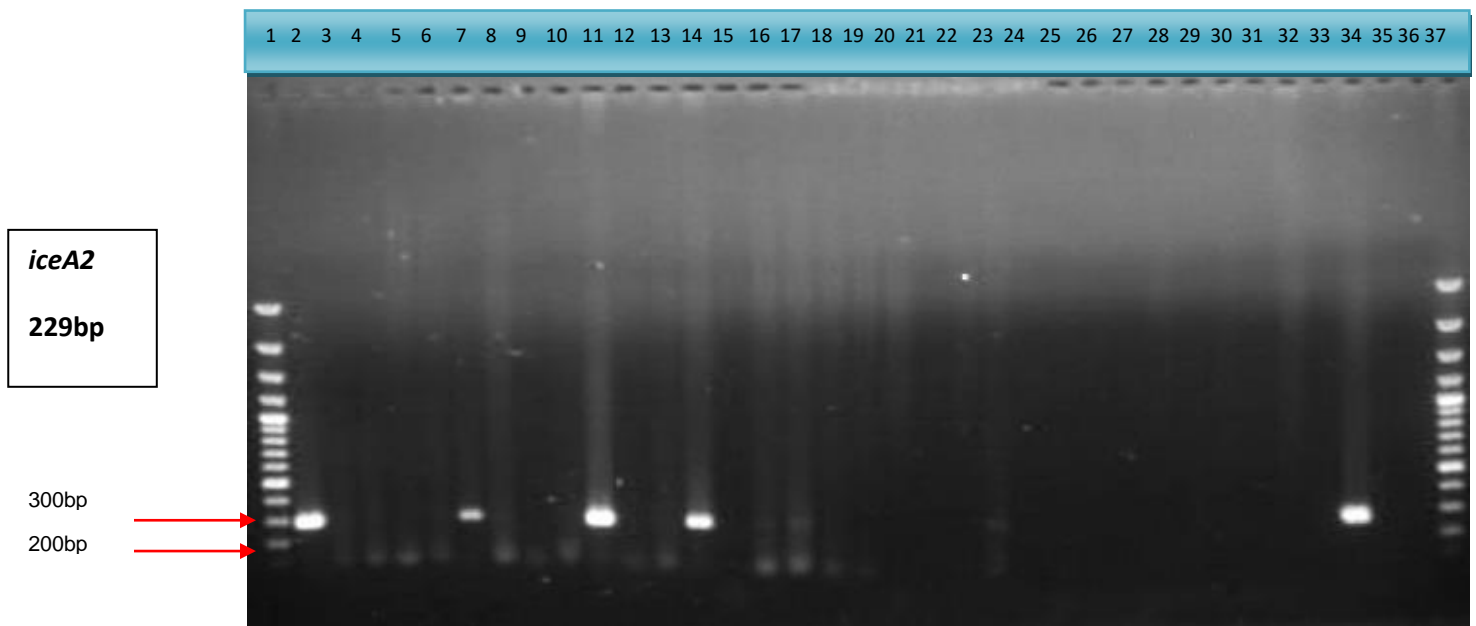


Figura 15: Gel gen *iceA2*.

En la **Tabla 16** se presenta el listado total de los pacientes incluidos los 5 infectados con una cepa que posee el gen *iceA2* en su isla de patogenicidad

Tabla 16: Lista de muestras *iceA2*

POZO	CONTENIDO	<i>iceA2</i>	POZO	CONTENIDO	<i>iceA2</i>
1	GENE RULLER	0	20	HP0030SUR	0
2	HP0071SUR	1	21	HP0045SUR	0
3	HP0004CER	0	22	HP0016CER	0
4	HP0042SUR	0	23	HP0068SUR	0
5	HP0012SUR	0	24	HP0054SUR	0
6	HP0016SUR	0	25	HP0063SUR	0
7	HP0047SUR	1	26	HP0070SUR	0
8	HP0001SUR	0	27	HP0003ROS	0
9	HP0009SUR*	0	28	HP0001ROS	0
10	HP0003SUR	0	29	HP002ROS	0
11	HP0065SUR	1	30	HP002SUR	0
12	HP0060SUR	0	31	HP005SUR	0
13	HP0062SUR	0	32	HP009CER	0
14	HP0052SUR	1	33	HP0049SUR	0
15	HP0044SUR*	0	34	HP0061SUR	1
16	HP0048SUR	0	35	HP0038SUR	0
17	HP0046SUR	0	36	CONTROL	0
18	HP0031SUR	0	37	GENE RULLER	0
19	HP0029SUR	0		TOTAL	5

4.5 Genotipo de la cepa que infecta cada paciente.

Todos los datos presentados con anterioridad se resumen en la Tabla de Genotipo (**Tabla 17**) en la cual se detalla la presencia o ausencia de cada gen y su respectivo subtipo con un uno “1” para indicar la presencia o un cero “0” para indicar la ausencia de cada uno de los genes o alelos. Así como en la **Tabla 6** se resume el diagnóstico de cada uno de los pacientes información que conforma la base de datos que se elaboró a partir de los resultados de esta investigación y se presenta en este documento.

Tabla 17: Genotipo de la cepa que infecta cada paciente.

No	CODIGO	<i>cagA</i>	<i>vacAS1/S2</i>	<i>vacAS1a</i>	<i>vacAS1</i>	<i>vacAS1</i>	<i>vacAm</i>	<i>vacAm2</i>	<i>babA2</i>	<i>iceA1</i>	<i>iceA</i>	Factor de virulencia
1	HP003 SUR	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	7
2	HP0065	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	7
3	HP0071	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	7
4	HP0061	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	6
5	HP0052	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	6
6	HP0042	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	5
7	HP0045	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	5
8	HP001ROS	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	5
9	HP0016	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	4
10	HP002 SUR	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	4
11	HP002ROS	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	4
12	HP0060	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	4
13	HP0001	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	3
14	HP0016	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	3
15	HP0047	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	3
16	HP009 CER	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	3
17	HP0012	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
18	HP0038	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	2
19	HP0029	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2
20	HP0030	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2
21	HP0031	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2
22	HP0046	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2
23	HP0054	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
24	HP0062	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2
25	HP003ROS	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2
26	HP004 CER	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
27	HP0049	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
28	HP0048	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
29	HP0068	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
30	HP0070	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
31	HP0005SUR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	HP0063	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL		9	24	9	3	19	13	7	2	8	5	

En la **Tabla 17** se puede apreciar el genotipo completo de la cepa de *H. pylori* que infecta a cada paciente y el número de alelos que posee determinada cepa.

En algunos casos, por ejemplo el paciente con el código HP0071 SUR, posee una de las cepas con la isla de patogenicidad más completa de las cepas analizadas en este estudio, lo cual sugiere mayor control a los pacientes infectados con cepas de mayor cantidad de genes PAI, entre ellos le siguen los pacientes con código HP003SUR, HP0061SUR, HP0065SUR y HP0052SUR.

Una cepa de *H. pylori* con una isla de patogenicidad PAI lo más completa posible posee más factores de virulencia que le confieren una mayor eficiencia a la hora de llevar a cabo la infección. De igual manera son más comúnmente halladas este tipo de cepas en pacientes con enfermedades de alta mortalidad, como por ejemplo linfoma tipo MALT o cáncer gástrico. Los datos presentados en estas tablas conforman la totalidad de las variables a analizar en este estudio y a partir de los cuales se obtuvieron las conclusiones presentadas más adelante.

La casilla Factor de Virulencia de la **Tabla 17** agrupa la cantidad de alelos que tiene cada una de las cepas que infecta a cada paciente y va desde 0 hasta 7, siendo estos la cantidad de alelos detectados en cada una de las cepas de *H. pylori* convirtiéndose en un dato interesante de analizar a la hora de realizar un diagnóstico molecular ya que una cepa de *H. pylori* con una isla de patogenicidad lo más completa posible se convierte en un factor de riesgo para el paciente y un reto para erradicar la infección de su cuerpo ya que estas cepas de *H. pylori* se hallan con mayor frecuencia en pacientes con linfoma tipo MALT o cáncer gástrico. Una isla de patogenicidad es una fracción del ADN genómico de un microorganismo patógeno que le faculta como virulento. Suele estar contenido en plásmidos, y su origen es una transferencia horizontal de material genético. Suele albergar

las secuencias codificantes de adhesinas, factores de evasión de las defensas del hospedador, toxinas, enzimas degradativas de componentes celulares, entre otros.

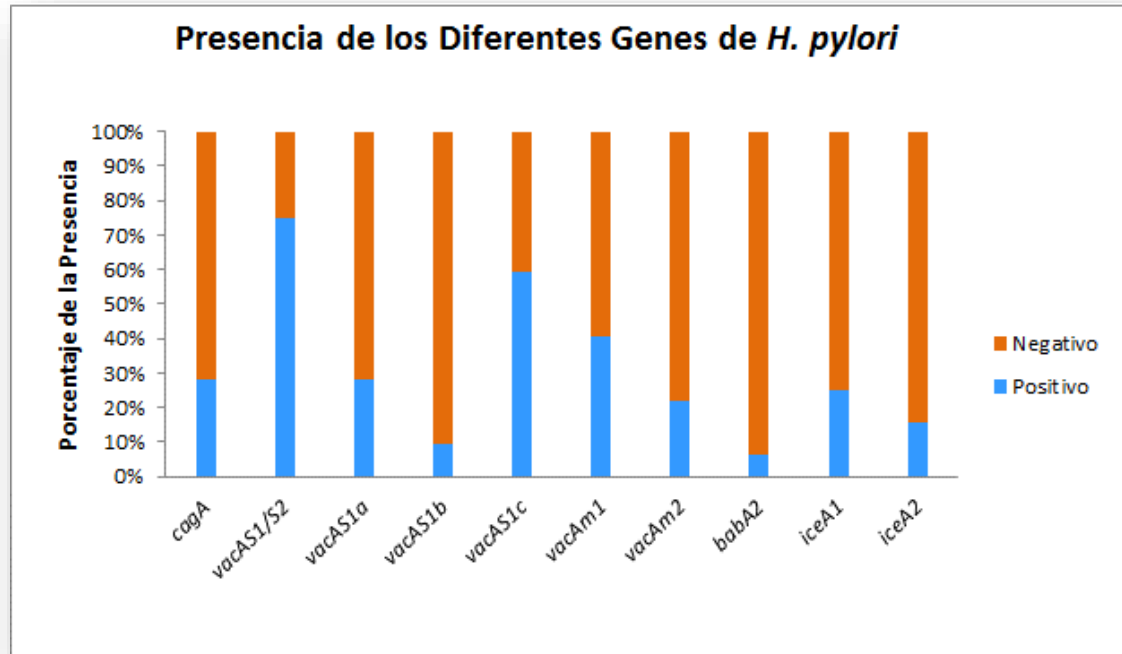
En la **Tabla 17** se reporta el genotipo de la cepa que infecta cada paciente siendo uno “1” indicador de la presencia del gen o cero “0” el cual indica la ausencia del mismo.

Se seleccionaron 5 cepas con la mayor cantidad de alelos o factores oncogénicos para futuros estudios ya sean en el ámbito molecular, celular o bioinformático.

Dichas cepas son:

1. HP003SUR
2. HP0065SUR
3. HP0071SUR
4. HP0061SUR
5. HP0052SUR

De esta lista el paciente con código HP0065SUR es el único paciente que no logro erradicar la bacteria.



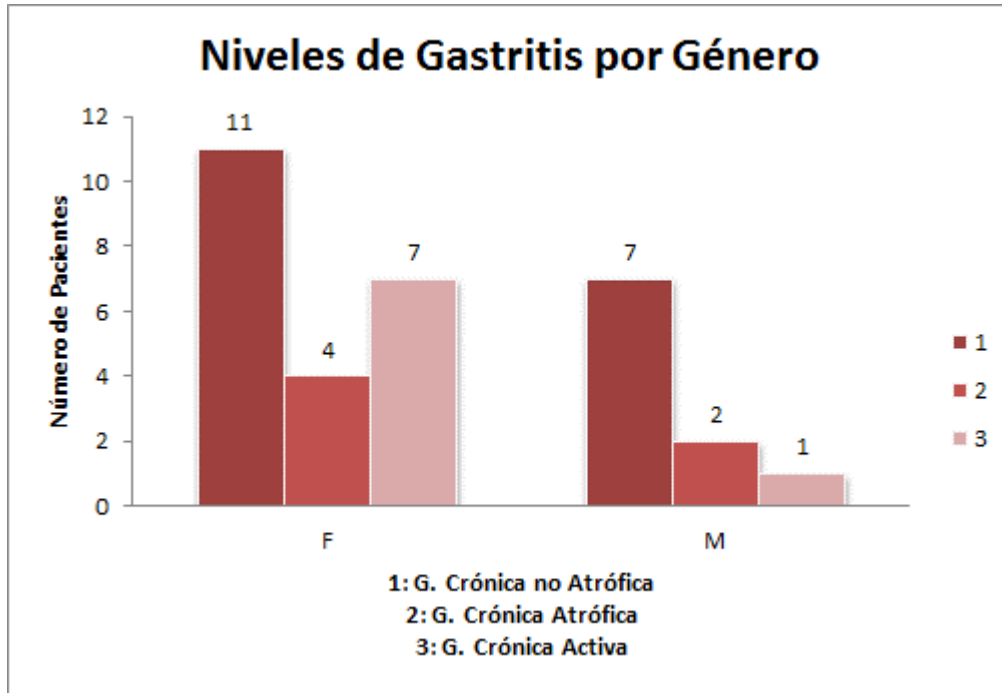
Gráfica 1: Presencia de los diferentes genes de *H. pylori*.

En la **Gráfica 1** se realiza un recuento de algunos de los genes que comprenden la isla de patogenicidad de *H. pylori* siendo estos la totalidad de los genes utilizados en esta investigación. Estos genes se encontraban en las cepas de la bacteria que infectaba a cada paciente y corresponde a un resumen de la **Tabla 16**.

4.6 Niveles de Gastritis por Género

Como se aprecia en la **Gráfica 2** el número de mujeres con respecto a hombres con el mismo diagnóstico, se llega incluso a duplicar. El grupo de pacientes seleccionados para este estudio, que presentaban infección de la bacteria *H. pylori* entre otras causante de este tipo de enfermedades gástricas, son en su mayoría, ya que son quienes con mayor

frecuencia asisten a consulta por este tipo de síntomas, lo que presenta un signo de alarma a este grupo de la población y es un dato importante para futuros estudios y/o campañas de prevención que son la mejor forma de erradicación de la bacteria en toda la población.



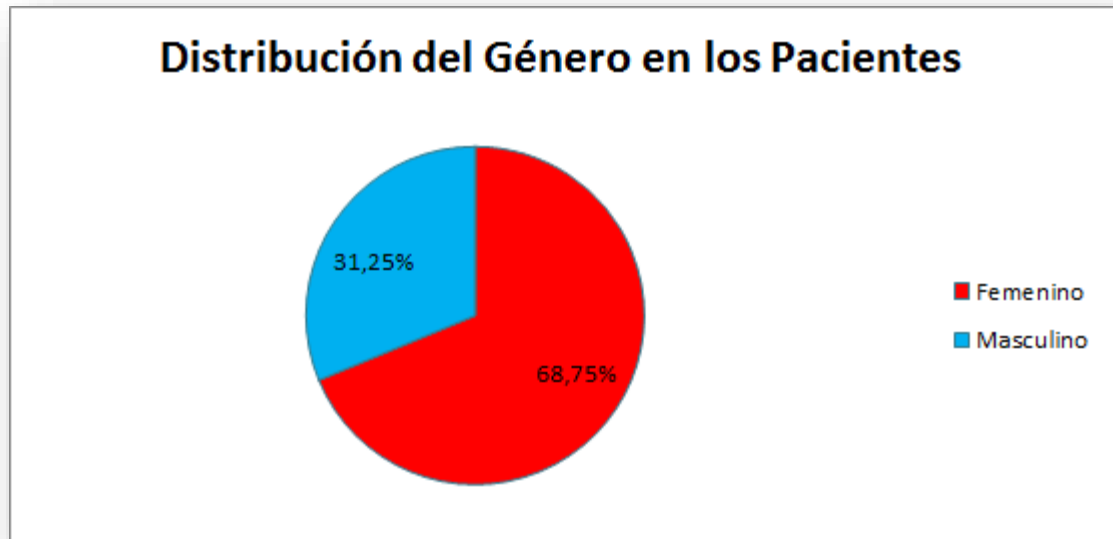
Gráfica 2: Niveles de gastritis por género.

En la **Tabla 18** se aprecia el total de pacientes hombres y mujeres con cada una de los 3 tipos de gastritis. 1- Crónica no Atrófica, 2- Crónica Atrófica, 3- Crónica Activa.

Tabla 18: Niveles de gastritis por género.

Niveles de Gastritis por Género				
Género	1	2	3	Total
F	11	4	7	22
M	7	2	1	10
Total	18	6	8	32

Distribución de los Géneros de los Pacientes



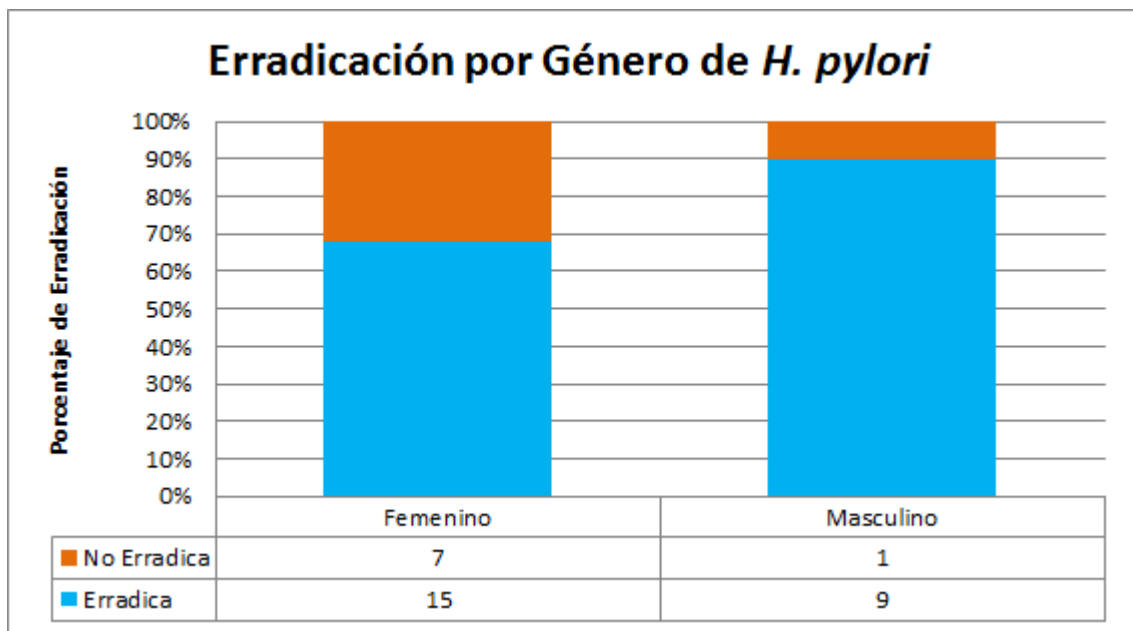
Gráfica 3: Distribución del género de los pacientes.

Al igual que la **Gráfica 3**, la **Gráfica 4** muestra que es mayor el número de mujeres las que padecen de enfermedades gástricas, lo cual las hace una población vulnerable a estas patologías al menos dentro de los pacientes analizados en esta investigación.

4.7 Erradicación.

La **Gráfica 5** nos enseña el porcentaje de erradicación de la infección por *H. pylori* en cada uno de los pacientes de acuerdo al sexo, en donde se aprecia un porcentaje mayor de erradicación de los pacientes de género masculino que en concordancia con la **Gráfica 3** y la **Gráfica 4** confieren a los pacientes de género femenino una mayor prevalencia de la

infección por *H. pylori* en contraste con los pacientes de sexo opuesto. De acuerdo a la **Gráfica 5** se erradicó *H. pylori* en el 90% de los pacientes de género masculino contrastando con los pacientes de género femenino en los cuales la erradicación fue del 68%. Al ser tan pequeño el tamaño de la muestra los resultados no son estadísticamente significativos, sin dejar de llamar la atención el dato de que en las mujeres es más difícil de erradicar la bacteria.

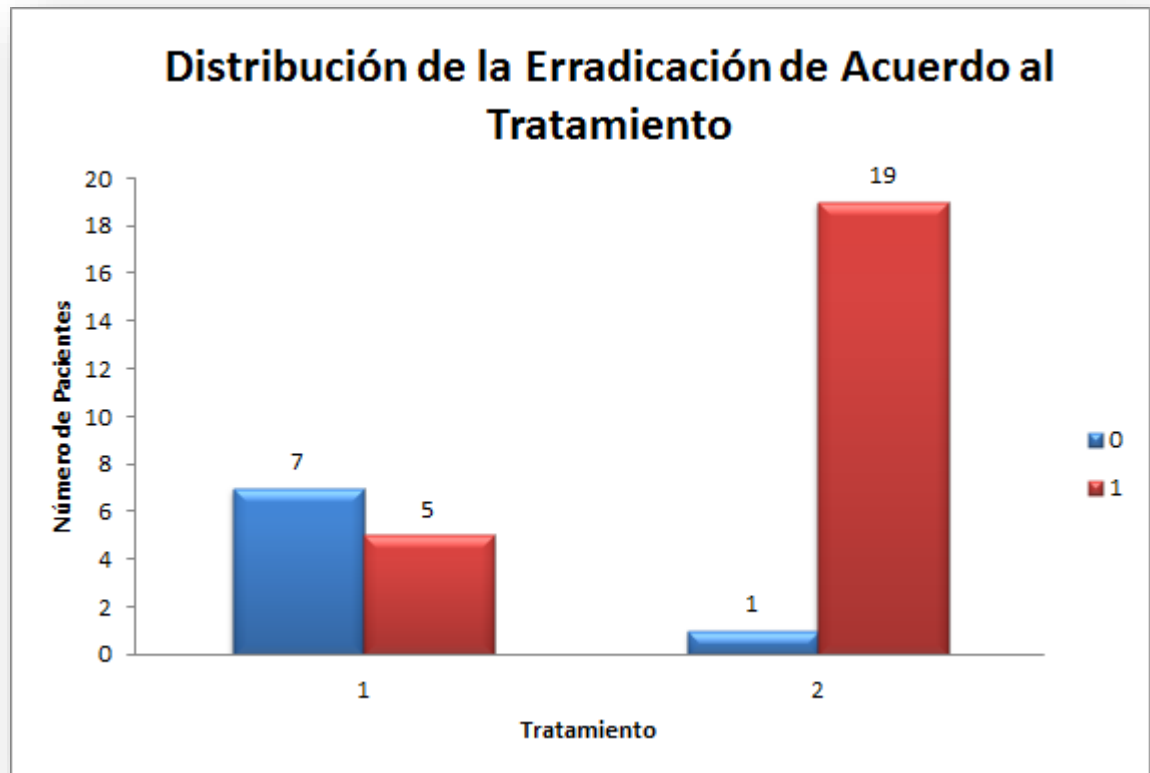


Gráfica 4: Erradicación por género.

La **Gráfica 5** muestra claramente una mayor efectividad del tratamiento 2 con Levofloxacin, en comparación con el tratamiento 1 que incluye claritromicina. “0” corresponde a No Erradica y “1” corresponde a Erradica.

De los 32 pacientes tratados, hubo 20 a los cuales se les suministró el tratamiento 2 (BBP, A, levofloxacina). Dicho tratamiento arrojó un porcentaje de erradicación del 95%, en contraste con los pacientes tratados con el tratamiento 1 (BBP, A, claritromicina) con un porcentaje de erradicación del 42%. Éstos resultados le confieren una mayor efectividad al segundo tratamiento y está en concordancia con un estudio realizado por Castaño *et al* en el 2013 en el cual se demostró que la erradicación con Levofloxacina, antibiótico de segunda generación de la familia de las quinolonas, es mucho más eficiente. Este medicamento no se encuentra dentro del listado del POS en Colombia. El tratamiento que se administra a los pacientes con infección por *H. pylori* y que se encuentra incluido en el POS es con Bomba de Protones, amoxicilina y claritromicina, antibiótico al cual la bacteria tiene un porcentaje muy alto grado de resistencia de acuerdo a estudios realizados en Colombia.

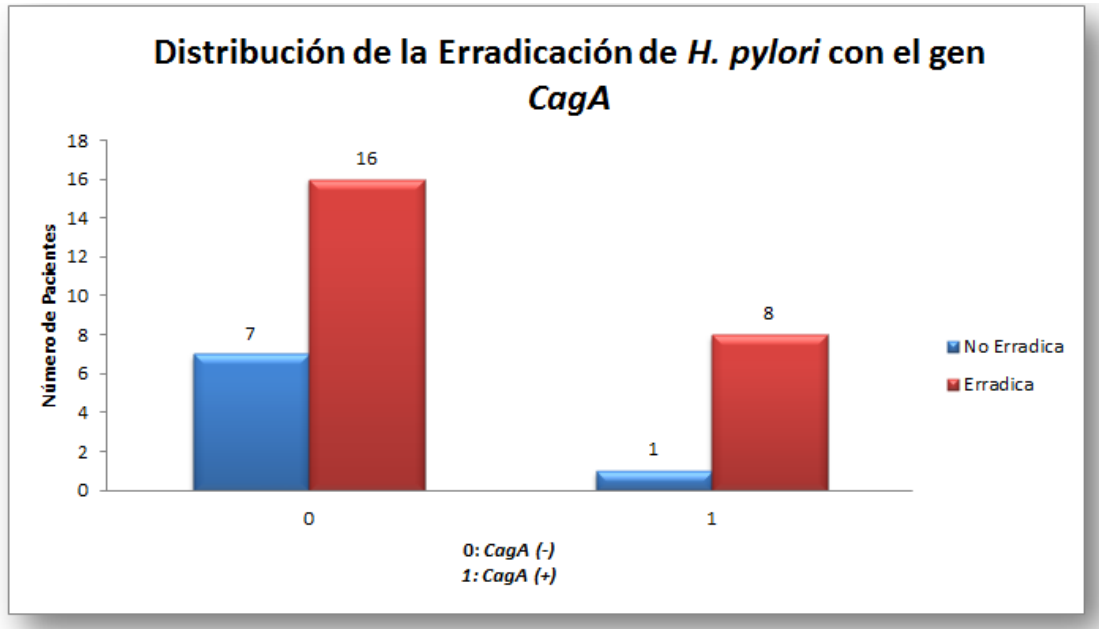
De acuerdo a los estudios realizados por Trespacios en el 2011 en la Universidad Javeriana, los resultados presentados en este estudio están en plena concordancia ya que ella encontró altos niveles de resistencia en cepas colombianas de *H. pylori* a la claritromicina el cual es el antibiótico que se suministra a un amplio porcentaje de pacientes a nivel nacional y es el que cubre la seguridad social de los colombianos de acuerdo al Plan Obligatorio de Salud (POS) dictado por el Ministerio de Salud y Protección Social.



Gráfica 5: Erradicación de acuerdo al tratamiento.

La **Gráfica 6** nos permite apreciar que de los 8 pacientes *cagA*(+) que lograron erradicar la bacteria de su cuerpo, 5 correspondientes al 62.5% recibieron el tratamiento 2, con medicamentos fuera del POS del Ministerio de Salud y Protección social en contraste a 3 pacientes correspondientes al 37.5% que erradicaron la bacteria gracias al tratamiento 1 con Claritromicina, antibiótico que está incluido en el POS del Ministerio de Salud y Protección Social.

Se muestra claramente el nivel de erradicación de la bacteria con el gen *cagA* en cualquiera de los dos tratamientos.

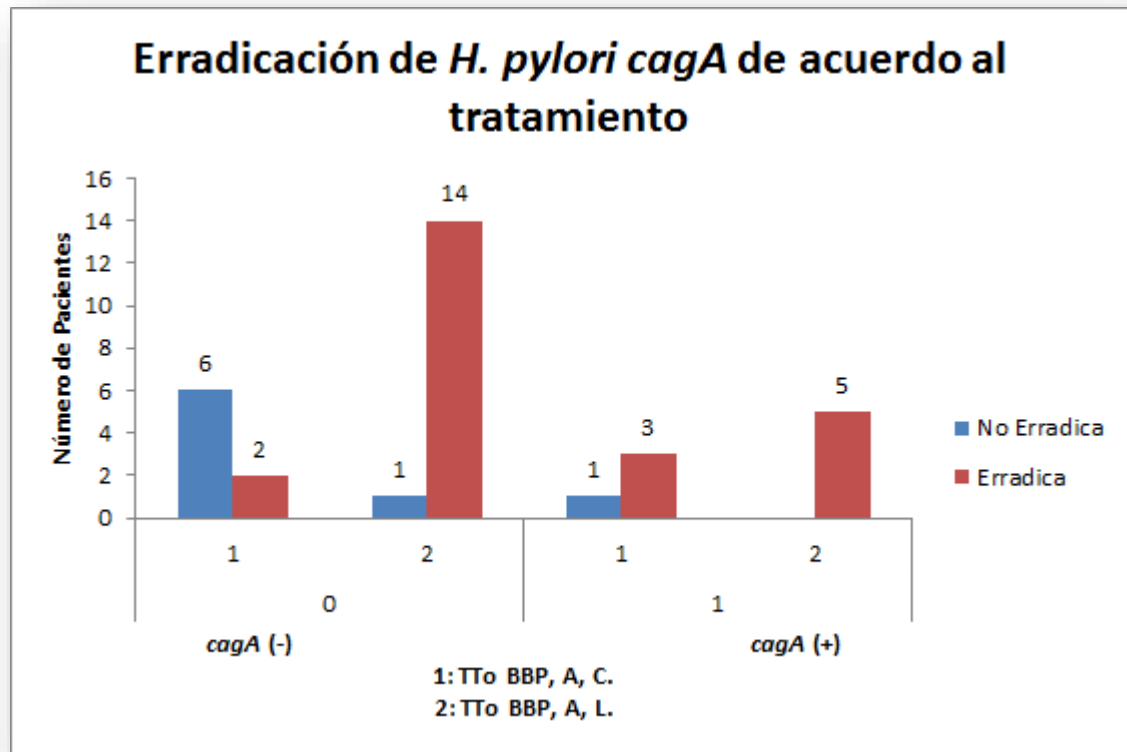


Gráfica 6: Erradicación de *H. pylori cagA*.

La **Gráfica 7** nos permite ver que el único paciente que no erradicó la bacteria *cagA*(+) le fue suministrado el tratamiento 1 que consta de la bomba de protones, amoxicilina y claritromicina. Haciendo una comparación de la **Tabla 5**, **Tabla 6**, y la **Tabla 16** es posible identificar al paciente con código HP065SUR, el cual pertenece al género femenino y es uno de los que posee la isla de patogenicidad más completa en este estudio, lo cual llama la atención considerablemente al sumar la mayor cantidad de factores de virulencia

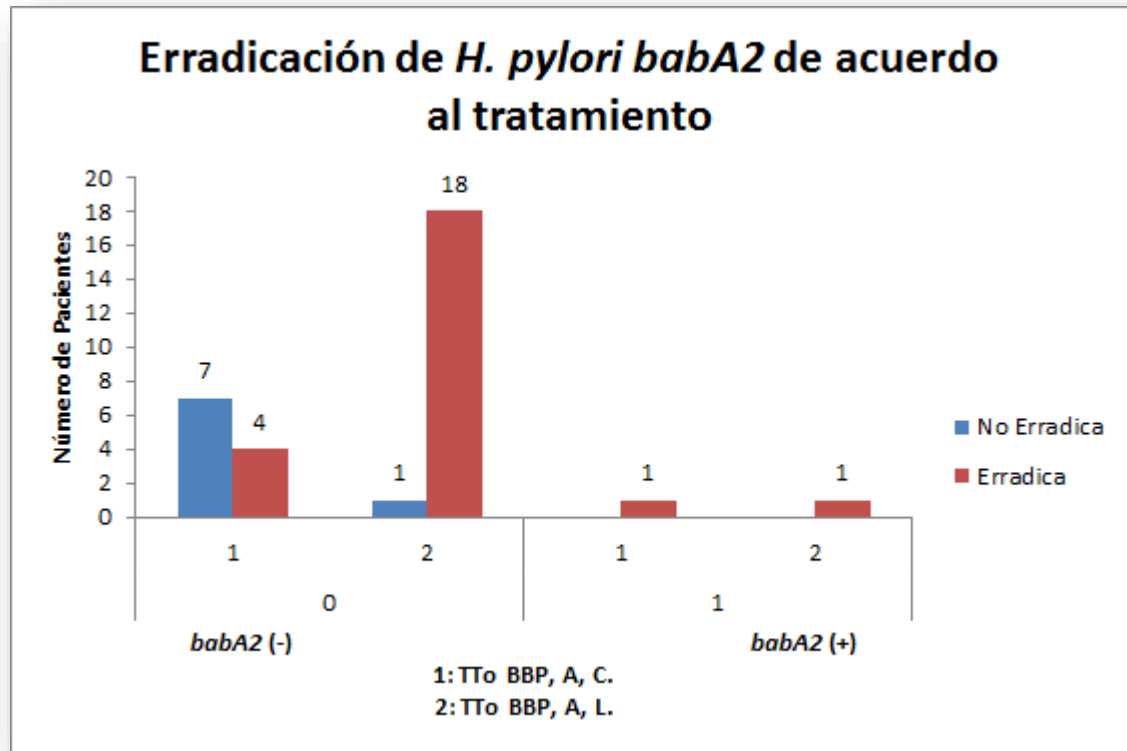
encontrados en este estudio, pertenecer al género femenino y ser tratada con un tratamiento obsoleto en el país, siendo una sumatoria de cofactores que sin saber su estilo de vida a mayor profundidad le convierten en un lamentable candidato a sufrir una patología de alta mortalidad.

La comparación realizada con las tablas en mención correspondió a la búsqueda de los pacientes *cagA*(+) que recibieron el tratamiento 1 que no erradicaron, de esta forma se encontró que fue el paciente de código HP065SUR (30 años). La erradicación en los pacientes infectados con cepas de la bacteria que poseían el gen *cagA* en su genoma fue del 75% en quienes recibieron el tratamiento “1” y de 100% en los pacientes que recibieron el tratamiento “2”. También se presentaron casos de pacientes infectados con cepas de la bacteria que no poseían el gen *cagA* en su isla de patogenicidad, en estos pacientes la erradicación fue de 25% en los pacientes que recibieron el tratamiento “1” y de 93% en los pacientes que recibieron el tratamiento “2”.



Gráfica 7: Erradicación de *H. pylori cagA*+ de acuerdo al tratamiento.

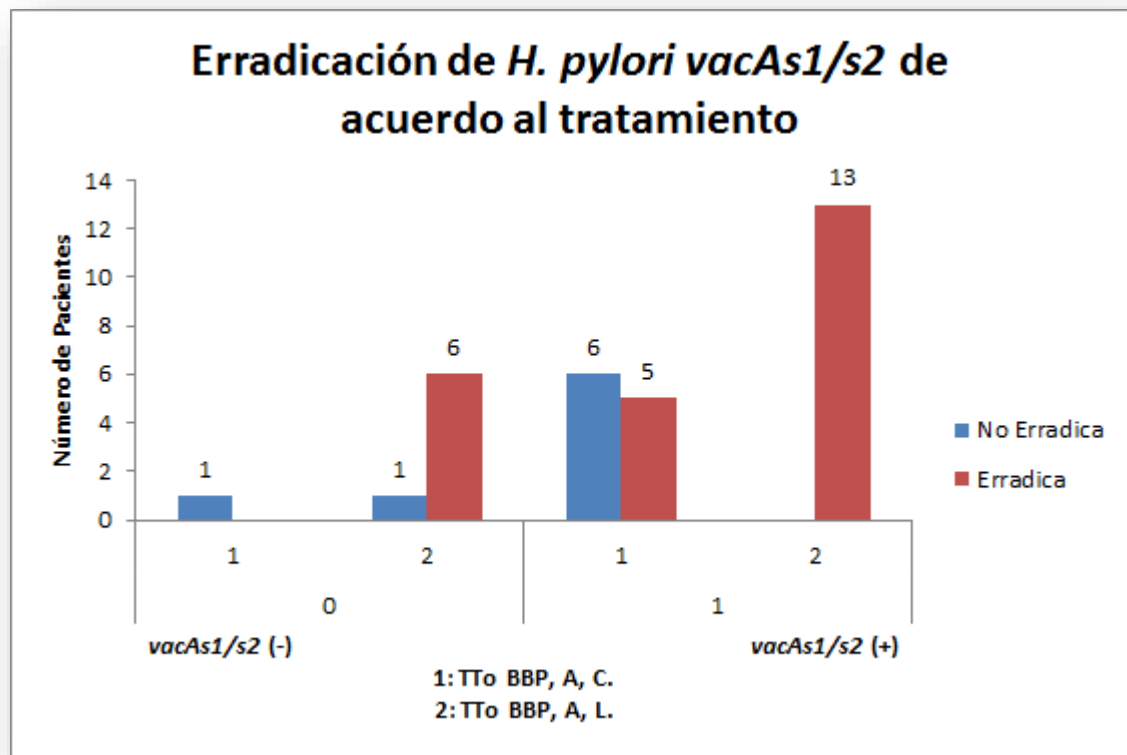
La **Gráfica 8** muestra los dos pacientes *babA2*(+) que lograron erradicar la bacteria de su cuerpo, uno de ellos el paciente con código HP003SUR (53 años) presentaba una de las islas de patogenicidad mas completa en este estudio con 7 factores de virulencia o genes oncogenicos al igual que el paciente con código HP065SUR es un paciente de género femenino. La erradicación en los pacientes infectados con la bacteria que poseía el alelo *babA2* fue del 100% con los tratamientos “1” y “2”, siendo este el único caso en el que los resultados de erradicación del tratamiento “1” igualaron los del tratamiento “2”.



Gráfica 8: Erradicación de *H. pylori babA2+* de acuerdo al tratamiento.

Como se puede ver en la **Gráfica 9** se encontraron 2 pacientes con infección por *H. pylori* que no tenían en su genoma el subtipo *vacAs1/s2* dentro de su isla de patogenicidad (PAI) los cuales no lograron erradicar la bacteria. Cada uno de dichos pacientes recibió uno de los dos tratamientos, encontrándose que el paciente con el código HP0049SUR (53 años) recibió el tratamiento 1 y el otro paciente de código HP0005SUR (60 años) recibió el tratamiento 2. Ambos pacientes pertenecen al género femenino y se encuentran en un rango de edad similar al igual que el paciente HP0003SUR, dato que comienza a ser inquietante

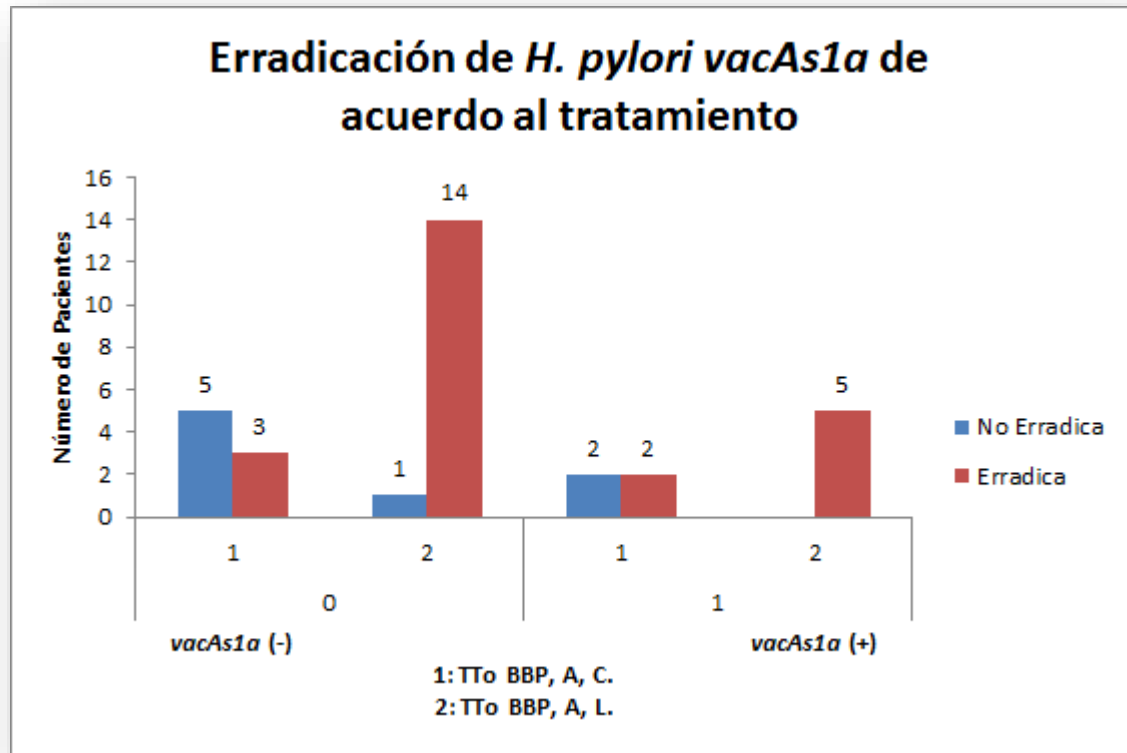
al igual que ilustrativo. La erradicación en los pacientes infectados con cepas de la bacteria que poseían el alelo *vacAs1/s2* en su genoma, fue de 45% en quienes recibieron el tratamiento “1” y de 100% en los pacientes que recibieron el tratamiento “2”.



Gráfica 9: Erradicación de *H. pylori vacAs1/s2+* de acuerdo al tratamiento.

Los dos pacientes infectados con una cepa de *H. pylori* que contenía el subtipo *vacAs1a* del gen *vacA*, que no lograron erradicar la bacteria de su cuerpo corresponden a los pacientes con código HP0065SUR (30 años) y HP0016SUR (64 años) ambos del género

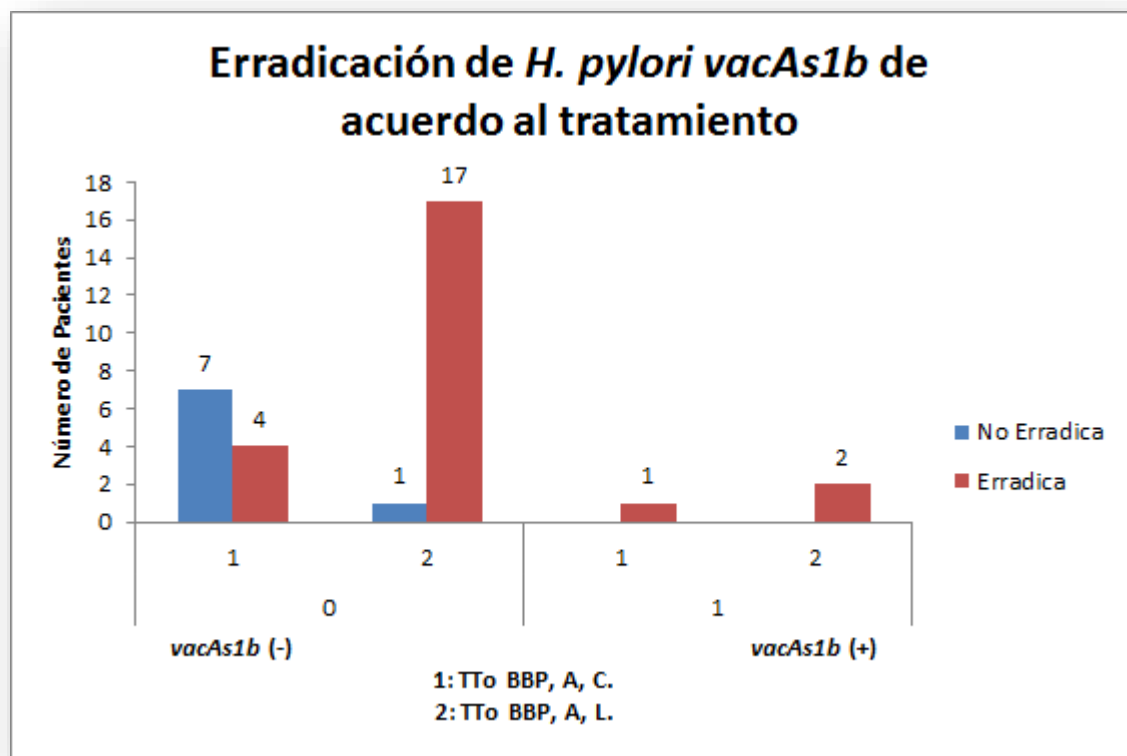
femenino y tratados con el mismo tratamiento 1. Estos pacientes cuentan con 7 y 4 factores de virulencia respectivamente, ver la **Tabla 17**.



Gráfica 10: Erradicación de *H. pylori vacAs1a* de acuerdo al tratamiento.

Como se puede ver en la **Gráfica 11**, los pacientes infectados con la cepa de *H. pylori vacAs1b*(+) lograron erradicar la bacteria de su cuerpo en un 100%, con los dos tratamientos de antibioticos suministrados. En este caso el tratamiento “2” tuvo el doble de efectividad, contrario al tratamiento “1”. Es importante señalar que la erradicación en los pacientes infectados con cepas de *H. pylori vacAs1b*(-) a los cuales se les suministró el

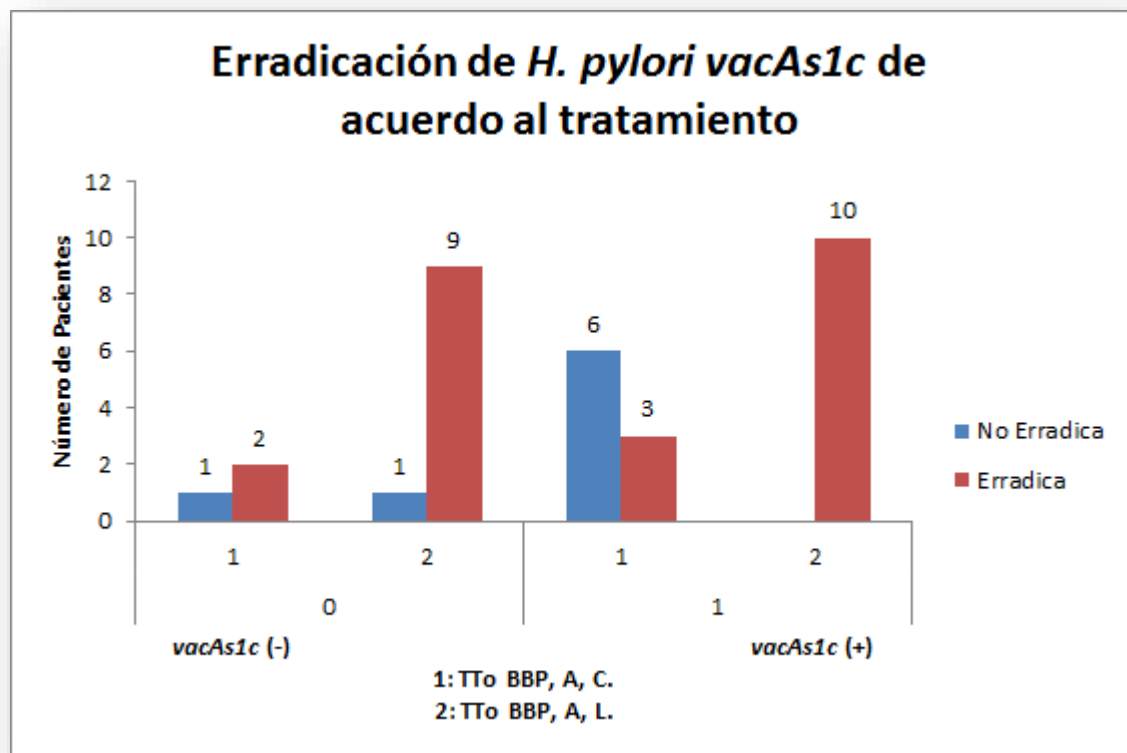
tratamiento “2” (BBP, A, L.), fue del 94%, mientras que en los pacientes tratados con (BBP, A, C.) fue de 36% demostrando una vez mas mayor eficiencia del segundo tratamiento a la hora de erradicar la bacteria del estómago de los pacientes y en concordancia con estudios previos realizados en Colombia en los cuales la resistencia de la bacteria al tratamiento “1”. El paciente infectado con la cepa *vacAs1b*(-), al que se le suministró el tratamiento 2 pero que no logró erradicar le corresponde el código HP0005SUR.



Gráfica 11: Erradicación de *H. pylori vacAs1b*+ de acuerdo al tratamiento.

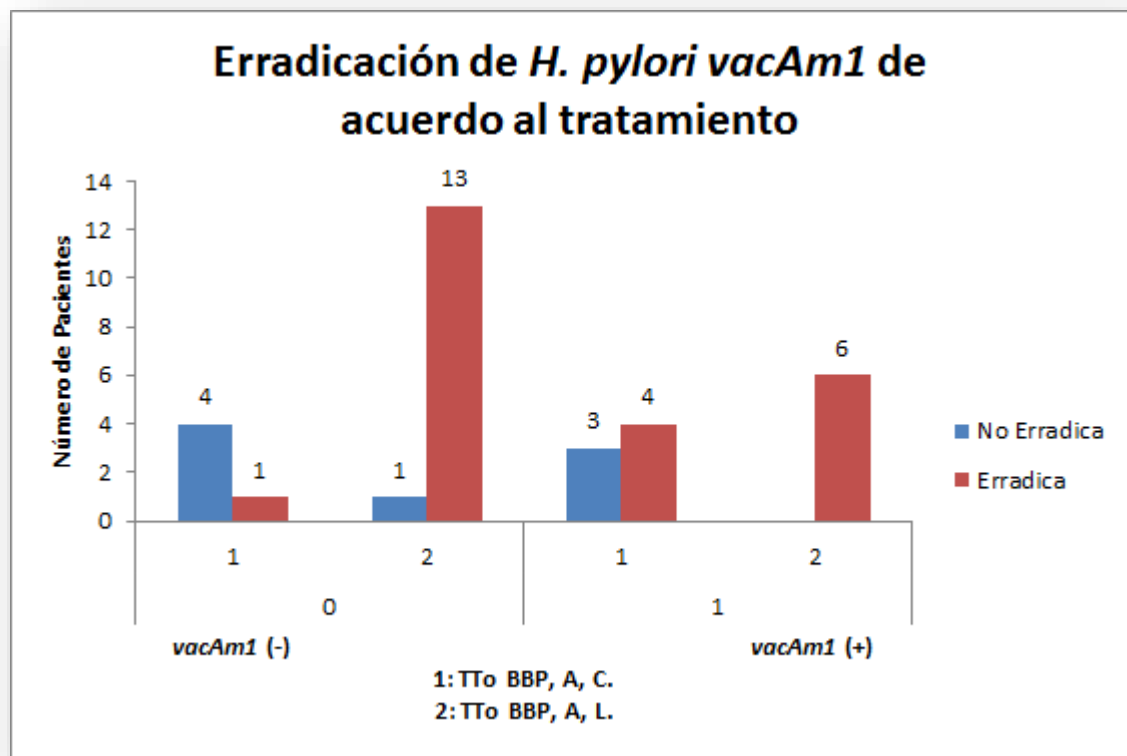
La **Gráfica 12** muestra los pacientes infectados con la cepa de *H. pylori vacAs1c(+)* a quienes se les suministró el tratamiento “2” obtuvieron una erradicación del 100%, en contraste con los pacientes que recibieron el tratamiento “1”, en los cuales la erradicación fue del 33%.

La erradicación en los pacientes infectados con cepas de la bacteria que no poseían el alelo *vacAs1c* en su genoma, fue del 90% en los pacientes que recibieron el tratamiento “2” y del 66% en los pacientes que recibieron el tratamiento “1”.



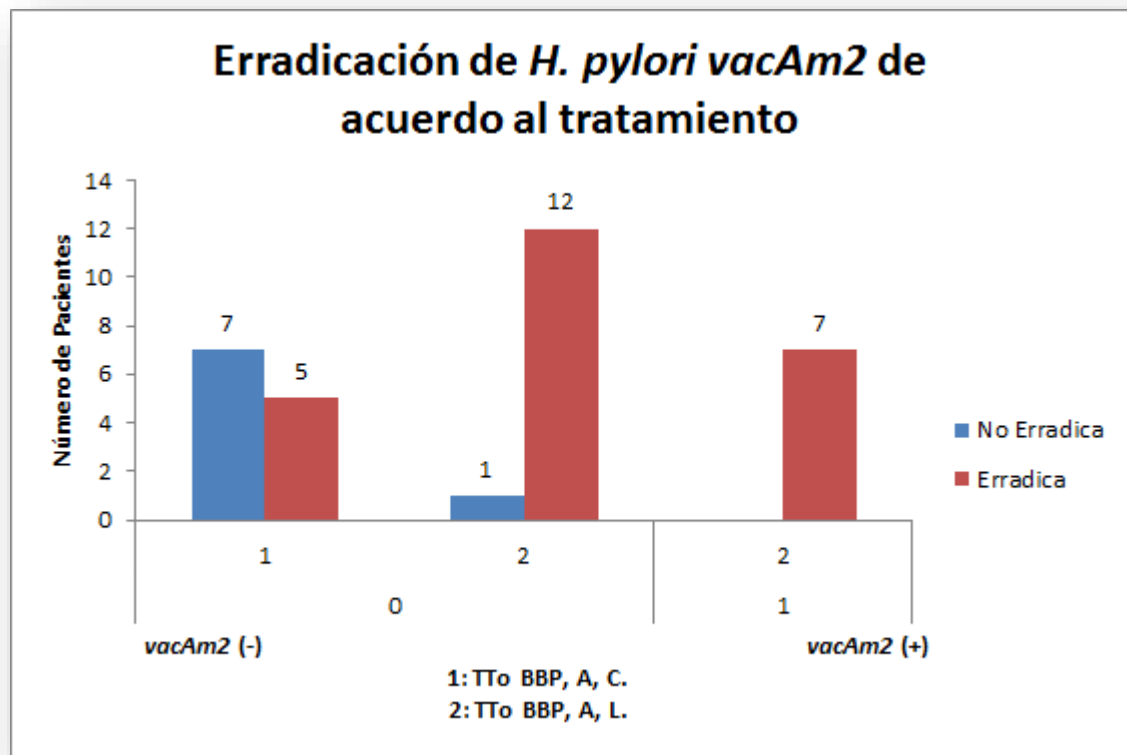
Gráfica 12: Erradicación de *H. pylori vacAs1c+* de acuerdo al tratamiento.

La **Gráfica 13** muestra los pacientes infectados con la cepa de *H. pylori vacAm1* (+) que recibieron el tratamiento “2” lograron erradicar la bacteria en un 100%, contrastando con los pacientes que recibieron el tratamiento “1” a quienes la erradicación fue del 57%. Contrariamente los pacientes infectados con la bacteria, pero que no poseían el alelo *vacAm1* en su isla de patogenicidad lograron una erradicación del 93% con el tratamiento “2”, mientras que con el tratamiento “1” la erradicación fue de 20%.



Gráfica 13: Erradicación de *H. pylori vacAm1*+ de acuerdo al tratamiento.

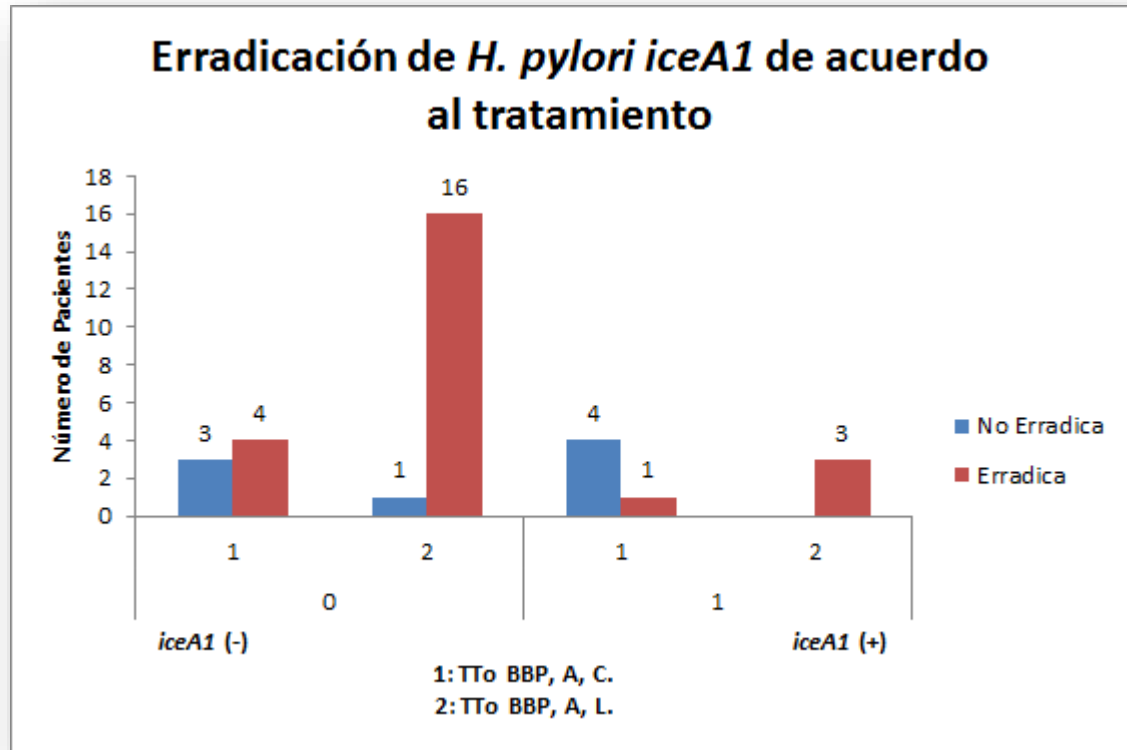
En la **Gráfica 14** nos muestra los pacientes infectados con cepas de la bacteria que poseían en su Isla de Patogenicidad (PAI) el alelo *vacAm2*, lograron un porcentaje de erradicación del 100% con el tratamiento “2”, mientras que, los pacientes infectados con cepas de la bacteria que no poseían este alelo en dicha región de su genoma obtuvieron un porcentaje de erradicación del 92% con el tratamiento “2” y de 42% para los pacientes que recibieron el tratamiento “1”.



Gráfica 14: Erradicación de *H. pylori vacAm2+* de acuerdo al tratamiento.

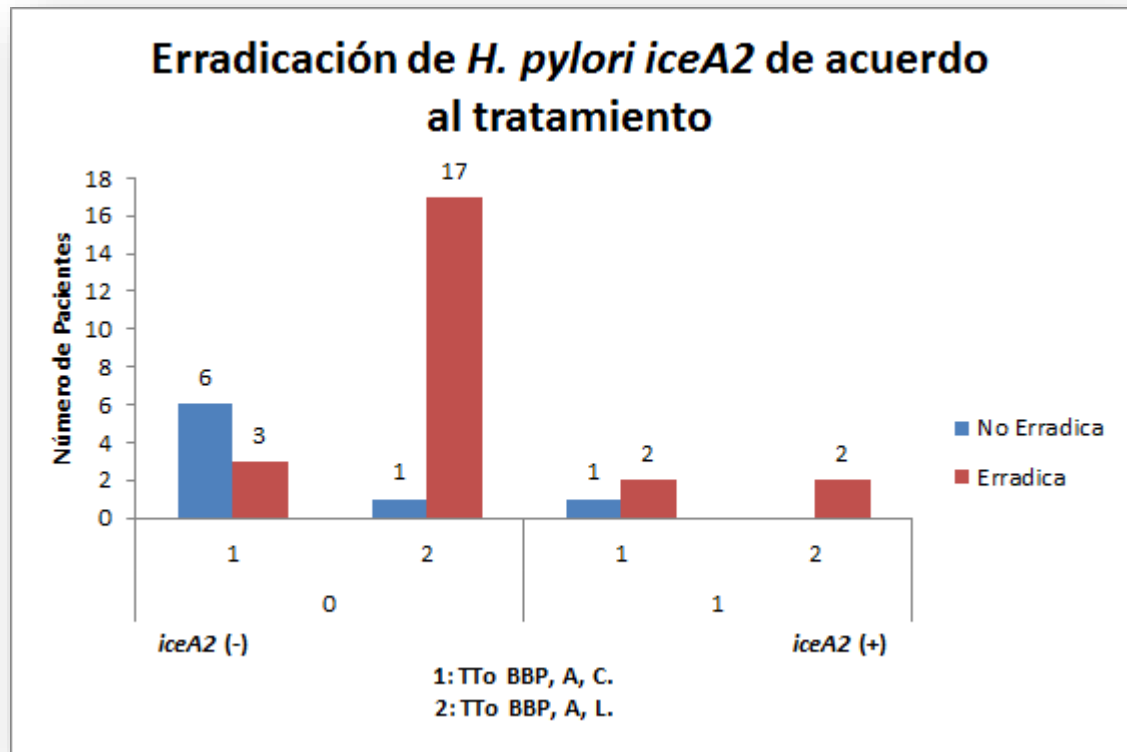
La erradicación en los pacientes infectados con cepas de la bacteria que poseían el alelo *iceAI* en su genoma, fue del 100% quienes recibieron el tratamiento “2”, como se puede ver en la **Gráfica 15** mientras que en los pacientes que recibieron el tratamiento “1” la erradicación fue del 20%.

Como en todos los casos, hubo pacientes infectados con cepas de la bacteria que no poseían el alelo en su Isla de Patogenicidad, en estos pacientes la erradicación fue de 57% en los pacientes que fueron tratados con el tratamiento “1” y de 94% en los pacientes que recibieron el tratamiento “2”. En la **Gráfica 15** se puede identificar a un paciente *iceAI* (+) al cual se le suministró el tratamiento “1” y que logró erradicar la bacteria de su cuerpo, este paciente corresponde al código HP0071SUR y posee en la escala de virulencia un factor de 7. Ver **Tabla 6** y **Tabla 17**



Gráfica 15: Erradicación de *H. pylori iceA1+* de acuerdo al tratamiento.

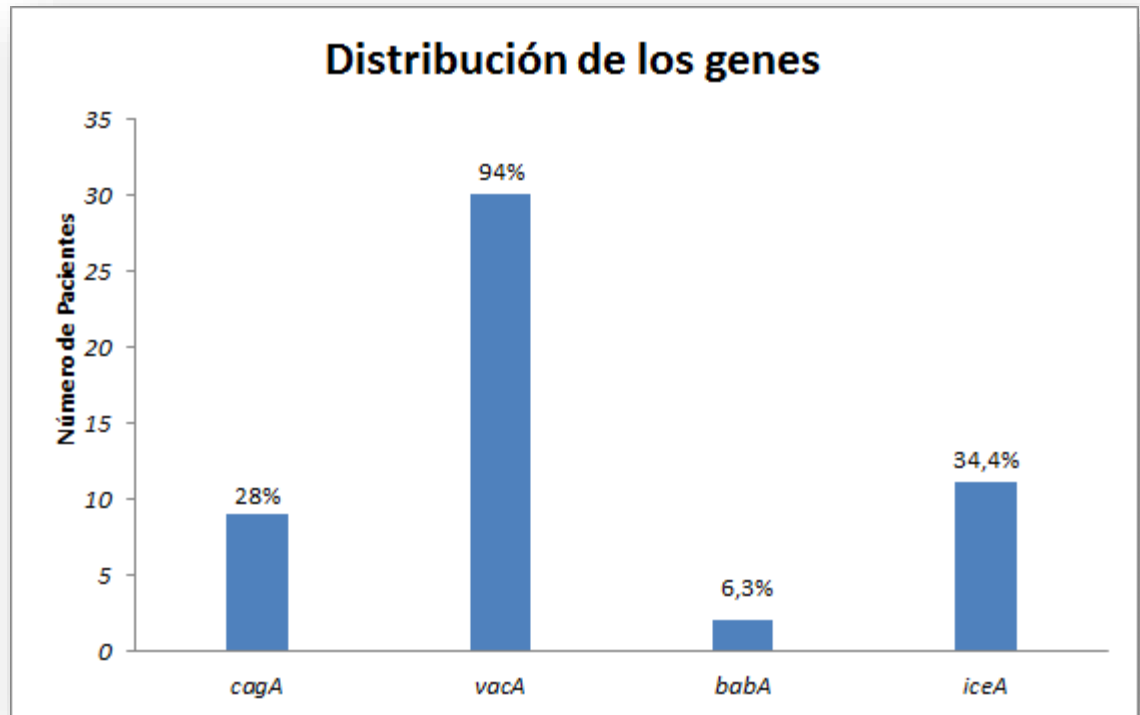
En la **Gráfica 16** podemos ver el resultado del tratamiento “1” el cual logró una erradicación del 66% en contraste con el tratamiento “2” en cuyo caso la erradicación fue del 100%, ambos casos para pacientes infectados con cepas de *H. pylori iceA2* (+). En el caso de pacientes infectados con *H. pylori iceA2* (-), la erradicación lograda con el tratamiento “1” fue de 33% y con el tratamiento 2 de 94%.



Gráfica 16: Erradicación de *H. pylori iceA2+* de acuerdo al tratamiento.

En la **Gráfica 17** se observa la distribución de la presencia de los genes PAI analizados en esta estudio.

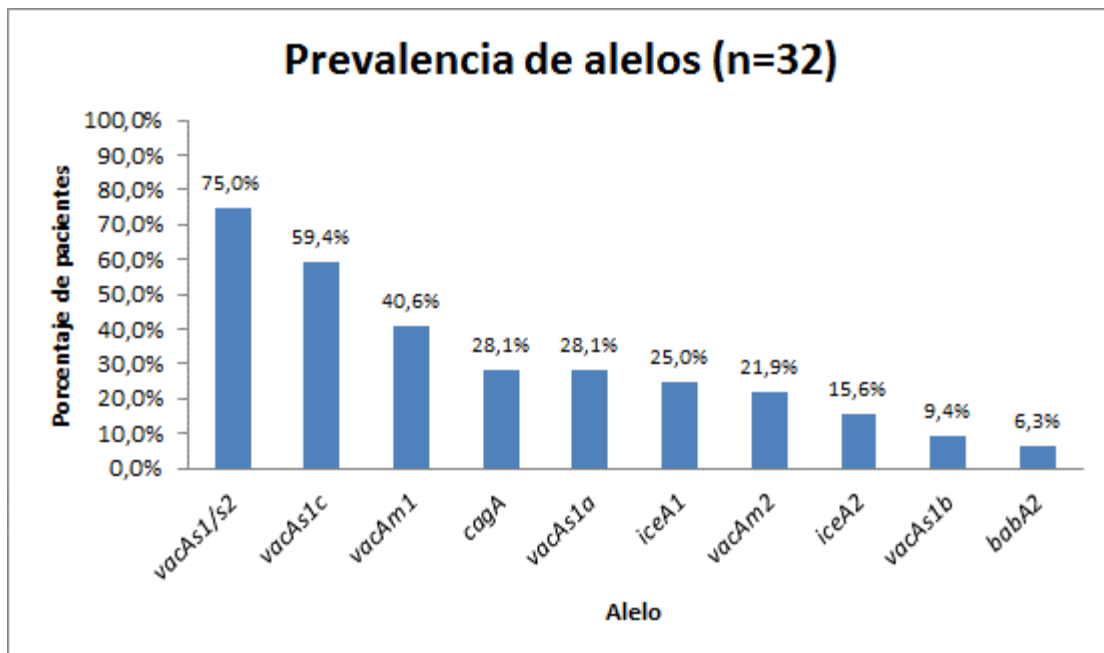
Es de resaltar que el gen *vacA* y todos sus alelos son las sub regiones genómicas que mas prevalencia tienen en este estudio. Al estar considerada ésta proteína como una de las mas virulentas en estudios a nivel mundial y en los que ha estado asociada a la incidencia de enfermedades gástricas severas es deseable seguir de cerca estos pacientes con el fin de que dichas patologías sigan su curso y evolucionen a un punto no deseado.



Gráfica 17: Distribución de los genes PAI.

En la **Gráfica 18** se observa la prevalencia de los sub tipos o alelos de los genes identificados en este estudio. En ésta grafica los alelos se encuentran ordenados de mayor a menor en función de su presencia en cada una de las 32 muestras analizadas tanto genética como molecularmente. Se puede apreciar que alelos del gen *vacA* como *s1/s2*, *s1c*, *m1*, se encuentran en los primeros tres lugares de mayor prevalencia seguidos por el gen *cagA*.

Esto significa que los pacientes que comprenden la muestra de este estudio poseen cepas virulentas que han sido reportadas por otros investigadores en otras latitudes y han estado asociadas a enfermedades gástricas de gran mortalidad, convirtiendo estos resultados en una señal de aviso de ahondar más en estos estudios y seguir de cerca a estos pacientes.



Gráfica 18: Prevalencia de alelos

En la **Tabla 19** encontramos ordenada de mayor a menor en función de su presencia en cada una de las 32 muestras analizadas.

Tabla 19: Prevalencia de alelos

Alelo	n	%
vacAs1/s2	24	75%
vacAs1c	19	59%
vacAm1	13	41%
cagA	9	28%
vacAs1a	9	28%
iceA1	8	25%
vacAm2	7	22%
iceA2	5	16%
vacAs1b	3	9%
babA2	2	6%

5. ADMINISTRACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

5.1 RECURSOS HUMANOS

Gabriel Ernesto Bautista Peñaloza, estudiante de Ingeniería Biotecnológica. Universidad Francisco de Paula Santander. Autor del proyecto.

Biólogo Mauricio Corredor Rodríguez, Ph.D. Ciencias Fisiología y Genética. Profesor Asociado, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia. Director del proyecto.

Diego Chávez, estudiante de Estadística de la Universidad de Antioquia, asesor Técnico y Metodológico y Estadístico del grupo GEBIOMIC.

5.2. RECURSOS INSTITUCIONALES

Base de datos bibliográfica de la Biblioteca Carlos Gaviria, Universidad de Antioquia.

S.I.U. Sede de Investigación Universitaria

5.3. RECURSOS MATERIALES

Material General

La **Tabla 20** muestra la lista del material que se descartará luego de su uso.

Tabla 20: Material descartable.

Material Desechable
Guantes de Nitrilo y Latex.
Servilletas.
Tapabocas.
Tubos eppendorf 1.5ml, 100ul
Tubos Falcon de 15ml.
Puntas estériles de 10 ul, 200ul.

La **Tabla 21** muestra la lista de los reactivos a emplear en el proyecto.

Tabla 21: Reactivos

Reactivos
Agar sangre
Medio Brucella
Primers
PCR MASTER MIX
Kit de extracción QIAamp®
Agua libre de Nucleasas.

La **Tabla 22** muestra el contenido del kit de Extracción de AD

Tabla 22: Componentes del Kit QUIAGEN

Contenido del kit QIAamp® ADN Mini de QIAGEN.
Proteinasa k
Buffer A1
Buffer AW1
Buffer AW2
Buffer AE

La **Tabla 23** muestra el material de vidrio necesario en el proyecto.

Tabla 23: Material de Vidrio

Material de Vidrio
Cajas Petri
Erlenmyer 250ml, 500ml, 1l.
Biker 250ml, 500ml, 1l.
Varillas de vidrio estéril.
Probeta 50ml, 500ml, 1l.

La **Tabla 24** muestra los equipos necesarios para la realización de todas las fases del proyecto.

Tabla 24: Equipos

Equipos	Características	Función
Cámara de fuljo laminar.	Burnswuick	Cultivo Celular
Autoclave.	Seco Y Húmedo	Esterilización
Cámara de extracción.	Burnswuick	Preparación del gel
Congelador -18°C .	Haceb 250L	Almacenamiento
Fotodocumentador UV.	BioRad	Electroforesis
Retroiluminador.	BioRad	Electroforesis
Termociclador.	Longgene	PCR
Cámara de Electroforesis.	BioRad	Electroforesis
Centrifuga.	BioRad	Extracción de ADN
Horno Microondas.	Haceb	Preparación del gel
Microbalanza	BioRad	Preparación del gel y agar
Calentador.	Longgene	Preparación del gel
Cámara de Anaerobiosis.	BioRad	Cultivo Bacteriano
Incubadora.	BioRad	Cultivo Bacteriano
Nevera.	Haceb	Almacenamiento
Nevera portátil.	Coleman	Transporte de Muestra
Equipo de computación e impresión.	Sony	Procesamiento Datos
Agitador Magnético	BioRad	Preparación de agar
Micropipeta 10ul, 20ul, 50ul, 100ul.	CAPP	PCR, Electroforesis

5.4 RECURSOS FINANCIEROS

Relación de gastos necesarios para el proyecto.

Tabla 25: Presupuesto

PRESUPUESTO	
INGRESOS	
Gabriel Ernesto Bautista Peñaloza. Autor del proyecto.	\$ 6.700.000
TOTAL	\$ 6.700.000
EGRESOS	
Material general	\$ 3.0000.000
Reactivos	\$ 3.000.000
Transporte	\$ 200.000
Imprevistos	\$ 500.000
TOTAL	6.700.000

5.5 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

La **Tabla 26** especifica la cantidad de tiempo estimado en el que se llevó a cabo el proyecto.

Tabla 26: Cronograma

Revisión Bibliográfica	FASE I			
Macerado de las Biopsias Gástricas.	FASE I	FASE II		
Extracción de ADN Bacteriano.		FASE II		
Cuantificación de ADN con Nanodrop		FASE II		
Diagnóstico molecular mediante PCR.		FASE II	FASE III	
Electroforesis en Gel de Agarosa.			FASE III	
Cálculos Estadísticos				FASE IV
Preparación de la Publicación e informe final				FASE IV

5.6 RECOMENDACIONES

Si el tamaño de muestra lo permite, es necesario usar la Regresión Logística Multinomial para establecer la relación de la alta virulencia y la resistencia a el tratamiento con antibióticos aplicado, en futuras investigaciones con el fin de obtener resultados de mayor validez estadística.

6 CONCLUSIONES

Se presentó menor resistencia a la erradicación en los pacientes tratados con el conjunto de antibióticos denominado “tratamiento 2” el cual empleaba levofloxacin. Estudios previos ya habían reportado resultados similares, con lo que se deduce una mayor efectividad de este antibiótico.

Se encontró una gran diversidad de genotipos en las muestras procesadas, lo cual es normal al tratarse de una bacteria que al igual que otras son altamente diversas y complejas, seguramente es por esto que en el planeta Tierra habitan más microorganismos que mamíferos, tan solo por citar un ejemplo.

Solo en el caso del gen *babA2* el tratamiento “1” logró igualar el nivel de erradicación del tratamiento “2” al contrario del resto de genes en los que la erradicación siempre fue mayor con el tratamiento “2” (BBP, A L.)

Incluso cuando los pacientes estaban infectados con cepas que no poseían los alelos analizados, la erradicación fue superior con el tratamiento “2”

La erradicación se da con mayor frecuencia en los pacientes varones, dejando en evidencia un posible riesgo de los pacientes de género femenino. A nivel general con cualquiera de los dos tratamientos y sin importar la cepa que infecte a cada paciente la erradicación en varones fue más del doble de efectiva en comparación con pacientes de género femenino.

Al parecer, si un paciente es hombre y presenta un diagnóstico similar al que aquejaba a los pacientes analizados en este estudio, tendrá una erradicación, de lejos, altamente efectiva si recibe el tratamiento “2” (BBP, A, C.) A nivel general los pacientes que recibieron el tratamiento “2” obtuvieron una erradicación de más del doble en comparación con los pacientes que recibieron el tratamiento “1”.

Cabe mencionar que es necesario que se tomen las medidas pertinentes para aprovechar la baja resistencia a la erradicación que posee el tratamiento 2 evitando que las cepas a nivel general alcancen la resistencia que poseen al tratamiento con claritromicina o “tratamiento 1”.

Todo el ADN bacteriano extraído de las biopsias gástricas fue obtenido con el mismo kit de extracción mencionado en capítulos previos y se encuentra almacenado en el laboratorio de Genética Regeneración y Cáncer de la Sede de Investigación Universitaria de la Universidad de Antioquia, Medellín Colombia.

De cada biopsia procesada se obtuvo el genotipo completo con los oligos específicos que se mencionaron en capítulos previos de este documento. Este genotipo se presentó en el capítulo 4 y hace parte de los datos obtenidos en esta investigación.

De los 5 pacientes infectados con las cepas más virulentas o con factores de virulencia más altos, que se mencionan en la **Tabla 16**, solo uno no logró erradicar la bacteria. Este paciente recibió el tratamiento “1” con BBP, A C.

De las 5 cepas seleccionadas, para futuros estudios, por tener una Isla de Patogenicidad más completa solo una no logro ser erradicada del paciente al cual infecta. De dichas cepas

las que fueron combatidas con el tratamiento “2” lograron ser eliminadas en su totalidad, mientras que las que se trataron con el tratamiento “1” se eliminaron en su mayoría.

Aunque hay una gran diversidad de genotipos en las cepas halladas, son los alelos más asociados a enfermedades gástricas de alta mortalidad, los más frecuentes entre los demás. Sin duda esta es una llamada de alerta para proceder de la mejor forma que la ciencia lo permita para erradicar la bacteria de estos pacientes, con enfermedades gástricas leves que poseen una cepa de alta virulencia y al momento de publicar este documento probablemente el estadio “leve” de la enfermedad sea un caso de mayor complejidad.

Es importante conocer el nivel de virulencia que posee una bacteria al momento de la infección. Esto se puede conocer con estudios moleculares a muestras de la zona de infección del paciente, en el caso de esta investigación biopsias gástricas, con el fin de proceder de la forma más adecuada, no tanto a la hora de formular un tratamiento por parte del médico tratante, sino del seguimiento posterior necesario a cada caso, ya que una infección causada por una cepa virulenta diagnosticada a tiempo, permitiría tomar las medidas necesarias para evitar enfermedades de alta mortalidad.

Es necesario realizar estudios posteriores con un mayor número de muestra que incluyan a población rural y urbana de todas las edades realizando un seguimiento efectivo tanto a esos futuros casos como a los pacientes evaluados en esta investigación.

Debido a que el tamaño de la muestra fue muy limitado no es posible obtener conclusiones de mayor peso estadístico, pero son suficientes para inferir que, en el caso de los pacientes de género femenino, su prevalencia es mayor que en los pacientes de género

masculino; el tratamiento con levofloxacina es más efectivo que el tratamiento con claritromicina, llevando los niveles de erradicación con el tratamiento 2 a más del doble con respecto al tratamiento 1, en algunos casos.

La erradicación fue variable y no tiene relación con los genes y alelos mencionados. Pacientes con cepas *cagA* negativo, *vacA s1/s2* y *vacA s1c* no todos eliminaron la bacteria. Varios pacientes que no reportaron cepas con alelos como *cagA*, *vacAs1/s2* y *vacAs1c* no eliminaron la bacteria.

En algunos casos el tratamiento con claritromicina obtuvo altos niveles de erradicación, sin embargo estos casos fueron poco frecuentes. Comparando los dos tratamientos el nivel de efectividad siempre fue mayor con el tratamiento 2, sin distinción del genotipo.

7 REFERENCIAS

- Amieva M.R, Omar E.E. Host Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterology*.(2008); 134 (1): 306-329.
- Anderson WF, Camargo MC, Fraumeni JF, et al. Age-specific trends in incidence of noncardia gastric cancer in US adults. *JAMA* (2010); 303(17):1723–1728.
- André AR, Ferreira MV, Mota RM, et al. Gastric adenocarcinoma and *Helicobacter pylori*: Correlation with p53 mutation and p27 immunoexpression. *Cancer Epidemiology* (2010); 34(5):618–625.
- Arévalo, A., Trespacios, A. A. & Otero, W. Importancia de la proteína CagA en infección por *Helicobacter pylori* *Rev Col Gastroenterol* (2009). 24, 388-395.
- Atherton JC. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastro-duodenal diseases. *Annual Review of Pathology* (2006); 1:63–96.
- Bagnoli F, Buti L, Tompkins L, Covacci A, Amieva MR. *Helicobacter pylori* CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA* (2005); 102(45):16339–16344
- Barik A. Salih, Ahmet Guner, Ahu Karademir , Merve Uslu, Mehmet Akif Ovali, Duygu Yazici, Bora Kazim Bolek, Soykan Arikan. Evaluation of the effect of cagPAI genes of *Helicobacter pylori* on AGS epithelial cell morphology and IL-8 secretion. *Antonie van Leeuwenhoek – Springer*. (2014) 105:179–189.

- Blaser J.M. Infection with *Helicobacter pylori* Strains Possessing *cagA* Is Associated with an Increased Risk of Developing Adenocarcinoma of the Stomach. *Cancer Research* (1995) 55. 2111-2115. Mayo .
- Brenner H, Rothenbacher D, Arndt V. Epidemiology of stomach cancer. *Methods in Molecular Biology* (2009); 472:467–477
- Campuzano-Maya G, Hoyos-Castaño D, Calvo-Betancur VD, Suárez-Ramírez OA, Lizcano-Cardona D, Rojas-Arbeláez CA Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in physicians in Medellín, Colombia. (2007) *Acta Gastroenterol Latinoam* VOL 37:Nº2
- Castaño R. Estudio Aleatorizado Comparando Una Primera Línea De Terapia Estándar Contra *Helicobacter Pylori* Con Claritromicina Versus Levofloxacin Por 10 Días. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. (2013) vol. 28 No. 2.
- Cittelly D.M, Huertas G.M, Martínez J.D, Oliveros R, Posso H, Bravo M.M, Orozco O. Los Genotipos de *Helicobacter Pylori* en Gastritis no Atrófica Difieren de los Encontrados en Úlcera Péptica, Lesiones Premalignas y Cáncer Gástrico. Colombia. *Rev. Med. Chile*. (2002); 130 (2): 1-12
- Chow WH, Blaser MJ, Blot WJ, et al. An inverse relation between *cagA*+ strains of *Helicobacter pylori* infection and risk of esophageal and gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Research* (1998); 58(4):588–590
- Correa, G., et al. "Prevalencia de *Helicobacter pylori* y características histopatológicas en biopsias gástricas de pacientes con síntomas dispépticos en un centro de referencia de Medellín." *Revista Colombiana de Gastroenterología* 31.1 (2016): 9-15.

- De Martel C, Forman D, Plummer M. Gastric cancer: Epidemiology and risk factors. *Gastroenterology Clinics of North America* (2013); 42(2):219-240.
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística. CENSO 2005 [en línea].
http://www.dane.gov.co/files/censo2005/PERFIL_PDF_CG2005/05000T7T000.PDF
 [Consultado el 20 de Abril de 2016]
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer* (2010); 127(12):2893–2917.
- Forman D, Burley VJ. Gastric cancer: Global pattern of the disease and an overview of environmental risk factors. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* (2006); 20(4):633–649
- Forman D, *Helicobacter* and Cancer Collaborative Group. Gastric cancer and *Helicobacter pylori*: A combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts. *Gut* (2001); 49(3):347–353.
- Hansen S, Melby KK, Aase S, Jellum E, Vollset SE. *Helicobacter pylori* infection and risk of cardia cancer and non-cardia gastric cancer. A nested case-control study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* (1999); 34(4):353–360.
- Hasan Umit, Ahmet Tezel, Sebnem Bukavaz, Gulbin Unsal, Muserref Otkun, Ali Riza Soyly, et al. The Relationship between Virulence Factors of *Helicobacter pylori* and Severity of Gastritis in Infected Patients. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 103-110.
- Huang JQ, Zheng GF, Sumanac K, Irvine EJ, Hunt RH. Meta-analysis of the relationship between *cagA* seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology* (2003); 125(6):1636–1644
- Instituto Colombiano del Bienestar Familiar. Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia ENSIN [en línea].

<http://www.icbf.gov.co/portal/page/portal/Descargas1/Resumenfi.pdf> [Consultado el 15 de abril de 2016]

- Islami F, Kamangar F. *Helicobacter pylori* and esophageal cancer risk: A meta-analysis. *Cancer Prevention Research* (2008); 1(5):329–338
- Kamangar F, Qiao YL, Blaser MJ, et al. *Helicobacter pylori* and oesophageal and gastric cancers in a prospective study in China. *British Journal of Cancer* (2007); 96(1):172–176.
- Kamangar F, Dawsey SM, Blaser MJ, et al. Opposing risks of gastric cardia and noncardia gastric adenocarcinomas associated with *Helicobacter pylori* seropositivity. *Journal of the National Cancer Institute* (2006); 98(20):1445–1452.
- Kusters J.G, Vliet A.M.A.M, Kuipers E.J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, (2006) July 19(3).449-490.
- López Y., Ponce de León. Editorial: Reflexiones a propósito del premio Nobel, el *Helicobacter pylori*, la úlcera péptica y paradigmas científicos. *Revista de Investigación Clínica*, (2006); 58(1), pp 6-8.
- Ma JL, Zhang L, Brown LM, et al. Fifteen-year effects of *Helicobacter pylori*, garlic, and vitamin treatments on gastric cancer incidence and mortality. *Journal of the National Cancer Institute* (2012); 104(6):488-492.
- Marshall, B. J., McGeachie, D. B., Rogers, P. A. & Glancy, R. J. *Pyloric* Campylobacter infection and gastroduodenal disease. *Med J Aust* (1985)142, 439-444.
- Marshall, B. J., Goodwin, C. S., Warren, J. R., Murray, R., Blincow, E. D., Blackbourn, S. J., Phillips, M., Waters, T. E. & Sanderson, C. R. Prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of Campylobacter *pylori*. *Lancet* (1988). 2, 1437-1442.

- Marshall, B. J., Warren, J. R. & Goodwin, C. S.). Duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. *Lancet* (1989) 1, 836-837.
- Naomi Ohnishi, Hitomi Yuasa, Shinya Tanaka, Hirofumi Sawa, Motohiro Miura, Atsushi Matsu, et al. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *PNAS* 2008; 105: 1003-1008.
- Nomura A., Stemmerman G.N., Chyou P.H., Kato I., Perez-Perez G.I. Blaser M.J. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N. England J. Med* (1991); 330: 1267-71
- Olli P, J.K. Huttunen, D, Albanes, The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. The effects of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. *New England Journal of Medicine* 1994;330:1029–35.
- Otero W. Cáncer gástrico en Colombia: un diagnóstico tardío que amerita el compromiso del Estado. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. (2008); 4(23): p. 302 - 304.
- Parsonnet, J, Hansen S, Rodriguez L, et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *New England Journal of Medicine* (1994); 330(18):1267–1271.
- Sablet T, Piazuelo B, Shaffer C, Schneider B, Asim M, Chaturvedi R. European Phylogenetic Origin of *Helicobacter pylori* Strains as a Risk Factor for Premalignant Gastric Lesions in Colombia. Publicación electrónica del 111 encuentro anual de la Asociación Gastroenterológica Americana AGA (2010); DDW-2010, New Orleans, LA.
- Sagaert X, Van Cutsem E, De Hertogh G, Geboes K, Tousseyn T. Gastric MALT lymphoma: A model of chronic inflammation-induced tumor development. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* (2010); 7(6):336–346.

- Trespalacios AA. Estudio de la resistencia de *Helicobacter pylori* a los antimicrobianos e implicaciones en las terapias de erradicación. Repositorio Institucional Pontificia Universidad Javeriana. (2011); Tesis Doctorado en Ciencias
- Trespalacios AA, Otero W, Mercado M. Resistencia de *Helicobacter pylori* a metronidazol, claritromicina y amoxicilina en pacientes colombianos. Revista Colombiana de Gastroenterología. (2011) Vol. 25 No 1 enero – marzo.
- Tu S, Bhagat G, Cui G, Takaishi S, Evelyn A. Kurt-Jones, Rickman B, Kelly S. Betz, Penz M, Bjorkdahl O, James G. Fox, Timothy C. Wang. Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. *Cancer Cell*. (2008) November 4; 14(5): 408–419. doi:10.1016/j.ccr.2008.10.011.
- Tsang YH, Lamb A, Romero-Gallo J, et al. *Helicobacter pylori* CagA targets gastric tumor suppressor RUNX3 for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* (2010); 29(41):5643–5650
- Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, et al. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *New England Journal of Medicine* 2001; 345(11):784–789.
- Warren JR, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* (1983); 1: 1273-5.
- Wei J, Nagy TA, Vilgelm A, et al. Regulation of p53 tumor suppressor by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* (2010); 139(4):1333–1343.
- Wen, S. & Moss, S. F. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Lett* (2009) 282, 1-8.

- Wu XC, Andrews P, Chen VW, Groves FD. Incidence of extranodal non-Hodgkin lymphomas among whites, blacks, and Asians/Pacific Islanders in the United States: Anatomic site and histology differences. *Cancer Epidemiology* (2009); 33(5):337–346.
- Yamaoka. Roles of *Helicobacter pylori* BabA in gastroduodenal pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. (2008). 14(27): 4265-4272.
- Ye W, Held M, Lagergren J, et al. *Helicobacter pylori* infection and gastric atrophy: Risk of adenocarcinoma and squamous-cell carcinoma of the esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia. *Journal of the National Cancer Institute* (2004); 96(5):388–396.
- Ye W, Held M, Lagergren J, Engstrand L, William J. Blot, Joseph K. McLaughlin, Olof N. OXFORD UNIVERSITY PRESS. *Journal of the National Cancer Institute*, (2004) Vol. 96, No. 5.

ANEXOS

Anexo 1

**CONVENIO INTERINSTITUCIONAL DE COOPERACION CELEBRADO
ENTRE LA UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER Y LA
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA – FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y
NATURALES (INSTITUTO DE BIOLOGÍA).**

Anexo 2

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estimado paciente:

Usted ha sido enviado por su médico tratante para realizarle una endoscopia de vías digestiva alta, la cual será realizada por gastroenterólogos expertos y al final de la misma como es usual, estos profesionales, le darán un resultado. Teniendo en cuenta que en el momento los profesionales de esta unidad de gastroenterología, están realizando una investigación, nos parece muy importante que usted conozca lo siguiente: *Helicobacter pylori* es una bacteria que infecta el estómago de los seres humanos y produce gastritis crónica, la cual generalmente no produce ninguna molestia, sin embargo la infección puede producir úlceras en una de cada seis personas y ocasionalmente también puede producir tumores aunque en una menor proporción que puede ser aproximadamente en uno de cada 100 personas infectadas. Actualmente existen varias combinaciones de antibióticos para eliminar esta infección, pero cada día esta bacteria, desarrolla resistencia a los antibióticos

y por ello un grupo de investigadores, expertos en la infección por *Helicobacter pylori* de la Universidad de Antioquia , la Universidad Nacional de Colombia y la Universidad Javeriana estamos realizando una investigación con el propósito de estudiar si los genotipos que le causan a usted la enfermedad son susceptibles o resistente a el tratamiento con los antibióticos que escoja el gastroenterólogo. Para este estudio se incluirán 150 pacientes de la ciudad de Medellín. Si el gastroenterólogo determina que usted tiene la infección, nosotros los investigadores, lo invitamos a participar en el estudio, el cual consiste en lo siguiente:

1. Durante la endoscopia, le serán tomadas unas biopsias (unas muestras muy pequeñas del tejido que recubre el estómago), las cuales pueden causar una molestia pero son requeridas por el médico independientemente de su participación o no en el estudio, para determinar si usted tiene la infección por *Helicobacter pylori*. También se le tomarán otras muestras para estudiar si la bacteria que usted tiene en su estómago, es resistente o no a los antibióticos que se utilizan como los de primera línea para tratar la infección. Los riesgos o molestias causados por este procedimiento será asumido por su EPS, pues este procedimiento es necesario para el diagnóstico de su enfermedad independientemente de su participación o no en el proyecto.

2. Si se comprueba que usted tiene la infección, a usted se le dará uno de dos esquemas de tratamiento con eficacia comprobada para esta infección determinado por el

gastroenterólogo. Cualquiera de ellos se considera que son excelentes pero para los propósitos de la investigación, los investigadores y usted sólo sabrán que recibió la combinación #1 o # 2, que tendrán una duración de diez días. En cada grupo habrá aproximadamente 75 pacientes. El gastroenterólogo escogerá los siguientes antibióticos que hacen parte de estos esquemas son Amoxicilina, Claritromicina y Levofloxacin los cuales se combinarán con otro medicamento llamado esomeprazol, el cual se utiliza para el tratamiento de úlceras y del reflujo gastroesofágico. Todos estos medicamentos se utilizan de manera rutinaria en pacientes con diversas infecciones y por lo tanto no son sustancias experimentales. Lo que se desea saber es si la bacteria que Ud. porta es resistente o susceptible al tratamiento escogido por el gastroenterólogo.

3. Una vez usted haya sido confirmado como apto para participar en el estudio será citado por el gastroenterólogo para recetarle los medicamentos necesarios para eliminar la bacteria correspondientes a la combinación #1 o #2, al tiempo se le tomará una muestra de sangre con la que se realizará una prueba serológica para buscar anticuerpos específicos contra *Helicobacter pylori*. Su muestra será guardada en los laboratorios de la Universidad de Antioquia con el fin de conformar un banco de biopsias con la bacteria para el análisis del genotipo de virulencia de la bacteria que Ud. porta.

4. Usted será contactado por teléfono al cuarto y al décimo día de su tratamiento con el fin de verificar el manejo que le ha dado a su tratamiento y se le hará un interrogatorio sobre los posibles efectos adversos que pueda causar el tratamiento.

5. Ocho semanas después de terminar el tratamiento, a usted se le realizará una prueba llamada “test de aliento”, que determinará si la infección fue curada. Esta prueba también se realiza de manera rutinaria en todo el mundo y simplemente se va a seguir utilizando en su caso.

6. Al finalizar el estudio, a usted se le informará sobre los resultados de su caso, así como también sobre la eficacia o no de los medicamentos en toda la población de pacientes que participaron en el mismo.

7. El beneficio de esta investigación es múltiple: en su caso recibir un tratamiento eficaz para erradicar la infección y más específicamente para el departamento de Antioquia poder determinar si *Helicobacter pylori* en nuestro medio, responde mejor a uno de los dos esquemas de tratamiento o si ambos son iguales. Con base en esos resultados, otros pacientes se beneficiarán de las conclusiones de esta investigación.

8. Se deberá demostrar su mayoría de edad para la participación en el estudio.

9. Usted y su información se mantendrán en confidencialidad relacionada con su privacidad.

10 .Las muestras de las biopsias, y su ADN podrá ser utilizado en estudios futuros.

11. En caso de alguna duda o problema con el estudio puede acudir a Rodrigo Castaño (medico gastroenterólogo) o Mauricio corredor (investigador principal).

Si usted no desea participar en el estudio, su atención médica no se modificará y se le atenderá con la misma ética, dedicación y alta calidad independientemente de que no participe. Aunque los medicamentos que usted recibirá son utilizados rutinariamente, nadie sabe si usted pueda tener algún efecto colateral (diarrea, alergias, sabor metálico, alteraciones de las prueba del hígado, etc.) y por lo tanto, se le llenara una encuesta para determinar la frecuencia de estos.

En cualquier momento usted es libre de retirarse de la investigación, sin detrimento en la calidad de su atención médica. Cualquier información adicional, Gustosamente será suministrada por nosotros. La decisión que usted tome es voluntaria y no influirá en el tratamiento que recibe de esta institución.

Investigador principal

Testigo 1

Relación con el paciente

Dirección

Teléfono

Testigo 2

Relación con el paciente

Dirección

Teléfono

NOMBRE DEL PACIENTE: _____

HC: _____

DIAGNÓSTICO: _____

FECHA: _____

Luego de conocido el objetivo de la presente, yo _____

_____ identificado con C.C. _____,

Acepto mi participación voluntaria en el estudio a realizar.

Firma _____ Fecha _____

Anexo 3

Declaración de la pertinencia social.

Este tipo de proyectos a través de sus resultados permite concientizar tanto a la comunidad médica como a la comunidad en general de las enfermedades a causa de *H. pylori* se puede mejorar a través de la entrega de resultados, de un buen tratamiento, y la generación de nuevos conocimientos acerca del tema, además el conocimiento de cuáles son las cepas que están afectando a la población Antioqueña, cuáles son las más predominantes y cuales las mas virulentas, estará beneficiando dicha población en el sentido de que se podrán generar mejores propuestas acerca de un tratamiento más acertado para ellos, y la disminución en el tiempo y costo del tratamiento de erradicación lo que podría mejorar de una gran manera la condición de vida de las personas.

