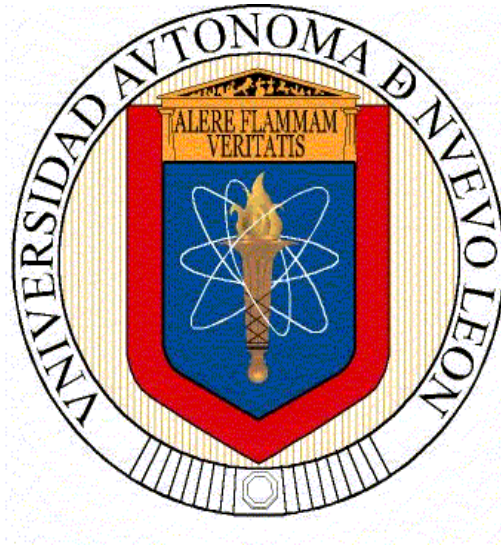


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**DETECCIÓN MOLECULAR DE *Helicobacter pylori* Y
GENOTIPIFICACIÓN CON BASE EN SUS GENES DE VIRULENCIA
cag A Y *vac A* EN PLACA DENTOBACTERIANA EN PACIENTES DE
LA REGIÓN DE ESQUIPULAS, CHIAPAS**

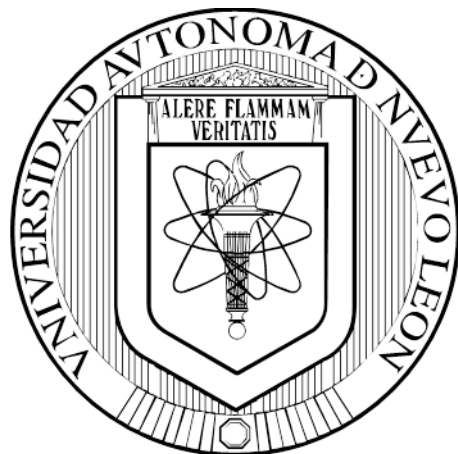
POR

C. D. CARLOS EDUARDO FLORES TREVIÑO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA CON ORIENTACIÓN EN
INMUNOBIOLOGÍA**

OCTUBRE, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**DETECCIÓN MOLECULAR DE *Helicobacter pylori* Y
GENOTIPIFICACIÓN CON BASE EN SUS GENES DE VIRULENCIA
cag A Y *vac A* EN PLACA DENTOBACTERIANA EN PACIENTES DE
LA REGIÓN DE ESQUIPULAS, CHIAPAS**

POR

C. D. CARLOS EDUARDO FLORES TREVIÑO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAestrÍA EN CIENCIA CON ORIENTACIÓN EN
INMUNOBIOLOGÍA**

OCTUBRE, 2017

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA**



**DETECCIÓN MOLECULAR DE *Helicobacter pylori* Y
GENOTIPIFICACIÓN CON BASE EN SUS GENES DE
VIRULENCIA *cag A* Y *vac A* EN PLACA DENTOBACTERIANA EN
PACIENTES DE LA REGIÓN DE ESQUIPULAS, CHIAPAS**

Por

C. D. CARLOS EDUARDO FLORES TREVIÑO

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIA CON ORIENTACIÓN EN
INMUNOBIOLOGÍA**

Octubre, 2017

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y VIROLOGÍA**



**DETECCIÓN MOLECULAR DE *Helicobacter pylori* Y
GENOTIPIFICACIÓN CON BASE EN SUS GENES DE
VIRULENCIA *cag A* Y *vac A* EN PLACA DENTA BACTERIANA
EN PACIENTES DE LA REGIÓN DE ESQUIPULAS, CHIAPAS**

Por

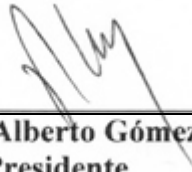
C. D. CARLOS EDUARDO FLORES TREVIÑO

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIA CON ORIENTACIÓN EN
INMUNOBIOLOGÍA**

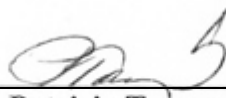
Octubre, 2017

**DETECCIÓN MOLECULAR DE *Helicobacter pylori* Y
GENOTIPIFICACIÓN CON BASE EN SUS GENES DE
VIRULENCIA *cag A* Y *vac A* EN PLACA DENTOBATERIANA EN
PACIENTES DE LA REGIÓN DE ESQUIPULAS, CHIAPAS**

Comité de Tesis



Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores
Presidente



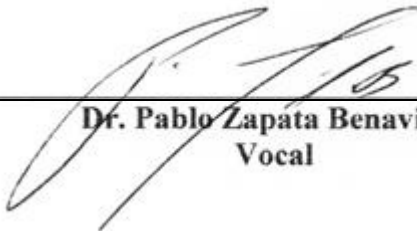
Dra. Patricia Tamez Guerra
Secretario



Dr. Edgar Mendoza Gamboa




Dr. Moisés Armides Franco Molina
Vocal




Dr. Pablo Zapata Benavides
Vocal

**DETECCIÓN MOLECULAR DE *Helicobacter pylori* Y
GENOTIPIFICACIÓN CON BASE EN SUS GENES DE
VIRULENCIA *cag A* Y *vac A* EN PLACA DENTOBACERIANA EN
PACIENTES DE LA REGIÓN DE ESQUIPULAS, CHIAPAS**

Dirección de Tesis



Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores
Director



Dra. Myriam Angélica De La Garza Ramos
Director Externo

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme culminar esta etapa de mi vida.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, a la Unidad de Inmunobiología y Acarreadores de Drogas del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas; y a la Unidad de Odontología Integral y Especialidades del Centro de Investigaciones y Desarrollo en Ciencia de la Salud, CIDICS-UANL por darme la oportunidad de desarrollarme científicamente y su apoyo brindado en el desarrollo de esta investigación.

A la Dra. Diana Reséndez Pérez y personal de Subdirección de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas por su tiempo y orientación en mi estancia durante el posgrado.

A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla por la confianza brindada al aceptarme como estudiante de posgrado en la maestría en ciencias con orientación en Inmunobiología.

Al Dr. Ricardo Gómez Flores y a la Dra. Myriam de la Garza por su disponibilidad, apoyo y consejos que me brindaron para el desarrollo material e intelectual de este trabajo de tesis.

Y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico y respaldo en el proceso de realización de mis estudios con el No. de beca 357368.

A todos los profesores, maestros y doctores que de manera desinteresada me transmitieron sus conocimientos y experiencias.

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación lo dedico con todo cariño

A mis padres Carlos José Flores González y Ofelia Treviño Casillas por apoyarme incondicionalmente en este proyecto, así como por dedicarme, las palabras de aliento que necesitaba en aquellas ocasiones en las que pensaba que no podría culminar este proyecto. A ambos gracias por su apoyo, consejos, comprensión y amor. Esto es un pequeño regalo para ustedes, por fin les entrego este título por el cual luché y me esforcé teniendo como gran motor para realizarlo, la confianza y amor que me han inculcado.

A mi hermana Karen Anal Flores Treviño, por su apoyo, por creer en mí, y estar siempre ofreciéndome, su amor y calidez humana.

A mi hermano David Andrés Flores Treviño, por ser un pilar importante en el trayecto de esta investigación, por creer en mí y apoyarme en cada idea que tengo.

A cada una de las personas que desinteresadamente me brindaron su ayuda para poder culminar este proyecto y de las cuales aprendí, el verdadero sentido de la amistad, agradezco sus consejos, apoyo, las mil veces que me escucharon y la confianza que me tuvieron en mi persona.

ÍNDICE

CONTENIDO	Página.
COMITÉ DE TESIS	I
DIRECCIÓN DE TESIS.....	II
AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIA	IV
ÍNDICE	V
INDICE DE TABLAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	III
RESUMEN.....	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Microbiología de <i>Helicobacter pylori</i>	3
2.2 Características del Genoma.....	4
2.3 Factores de Virulencia.....	5
2.3.1 Citotoxina Asociada al <i>gen A (cag A)</i>	5
2.3.2 Citotoxina vacuolizante <i>vac A</i>	7
2.4 Patogenicidad.....	10
2.5 Respuesta Inmune del Huésped a <i>H. pylori</i>	10
2.6 Epidemiología	12
2.7 Detección de <i>H.pylori</i> en la cavidad oral.....	13
2.8 Diagnóstico para <i>H.pylori</i>	13
2.8.1 Cultivo microbiológico.....	14
2.8.2 Reacción en cadena de la polimerasa (<i>PCR</i>).....	14
3. JUSTIFICACIÓN	15

4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVOS	17
5.1 Objetivo general	17
5.2 Objetivos específicos	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
6.1 Lugar y área de estudio.....	18
6.2 Estrategia experimental	18
6.3 Descripción del estudio.....	18
6.3.1 Criterios de selección.....	18
6.3.2 Operacionalización de variables de estudio.....	20
6.3.3 Reclutamiento de participantes	20
6.4 Obtención de la muestra de placa dentobacteriana	20
6.5 Aislamiento y cultivo de <i>H. pylori</i> a partir de muestras de placa dentobacteriana	21
6.6 Aislamiento de ADN genómico	21
6.7 Cuantificación de ADN.....	21
6.8 PCR cuantitativa (qPCR)	21
6.9 Procesamiento de datos y análisis estadístico.....	23
7. RESULTADOS.....	24
7.1 Cuantificación <i>H. pylori</i> por PCR cuantitativa	24
7.1.1 Validación de técnica de qPCR	24
7.2 Identificación de la presencia de <i>H. pylori</i> en placa dentobacteriana	25
7.2.1 Cuantificación relativa de <i>H. pylori</i> por qPCR	25
7.2.2 Comparación de detección de <i>H. pylori</i> contra estándar de oro y electroforesis.....	27
7.3 Descripción de participantes del estudio.....	29
7.4 Relación entre salud odontológica y presencia de <i>H. pylori</i>	31
8. DISCUSIÓN.....	33
9. CONCLUSIONES	35
10. PERSPECTIVAS	36
11. BIBLIOGRAFÍA.....	37
RESUMEN BIOGRÁFICO.....	43

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Secuencias de oligonucleótidos utilizados en la identificación de <i>H. pylori</i>	22
Tabla 2. Valores de Cp. (punto de cruce)	27
Tabla 3 Porcentaje de PSR	30

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura del <i>gen cag A</i> de <i>Helicobacter pylori</i>	6
Figura 2. Presentación esquemática del <i>gen vac A</i> de <i>Helicobacter pylori</i>	9
Figura 3. Estrategia experimental.	19
Figura 4. Curvas de disociación de los primers para la amplificación de <i>16SRNAr</i> , <i>vac A</i> y <i>cag A</i>	24
Figura 5. Determinación de <i>H. pylori</i> por PCR tiempo real (qPCR).	25
Figura 6. Determinación de <i>cag A</i> por PCR tiempo real (qPCR)	26
Figura 7. Presencia y frecuencia de <i>vac A</i> y <i>cag A</i>	26
Figura 8. Confirmación de <i>H. pylori</i> por tinción de Gram.	28
Figura 9. Confirmación de la presencia de <i>H. pylori</i> por el <i>gen 16SRNAr</i> en electroforesis de gel de agarosa.	28
Figura 10. Confirmación de la presencia de <i>H. pylori</i> por el <i>gen cag A</i> en electroforesis de gel de agarosa.	29
Figura 11. Relación de género y edad de los pacientes de Esquípuilas, Chiapas	29
Figura 12. Índice de PSR, en relación al género de los pacientes de Esquípuilas, Chiapas.	30
Figura 13. Relación PSR y <i>gen vac A</i>	31
Figura 14. Relación PSR y <i>gen cag A</i>	32

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Ácido desoxirribonucleico	ADN	Reacción en cadena de la Polimerasa cuantitativa.....	qPCR
Ácido ribonucleico	RNA	Kilobases	kb
ADN de doble cadena	SSADN	Pares de base.....	bp
Guanina	G	Producto amplificado	PA
Nanogramo	ng	Reacción en cadena de la polimerasa .	PCR
Microlitro	μL	RNA mensajero	mRNA
Factor nuclear de transcripción ...	NFκB	Examen y registro periodontal.....	PSR

RESUMEN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria Gram-negativa, que logra infectar la mucosa del epitelio gástrico del estómago humano. La infección por *H. pylori* es la más común en el mundo y está asociada a diversas patologías del aparato gastrointestinal, entre ellas se encuentra gastritis crónica, úlceras pépticas, duodenales, cáncer gástrico. Aunque no se sabe con exactitud por qué la infección produce diversos desenlaces clínicos, se considera que para la generación de los mismos participan características genéticas del huésped, factores ambientales y factores de virulencia de este microorganismo. Epidemiológicamente se indica que la mayoría de las infecciones por *H. pylori* son adquiridas desde la infancia. La prevalencia está asociada a las condiciones socioeconómicas, siendo esta infección más común en países en vías de desarrollo que en países desarrollados. El objetivo del presente trabajo fue destacar la importancia del diagnóstico de *H. pylori* en la cavidad bucal (placa dentobacteriana) como sitio de reservorio de este microorganismo de manera sensible y no invasiva. Dentro de estos factores se eligieron los genotipos que se consideran más agresivos, tales como *cag A*, *vac A*, y se determinaron mediante qPCR 38 muestras en placa dentobacteriana de la región posterior de la cavidad bucal de pacientes originarios de la región de Esquipulas Chiapas teniendo el 89.5% para pacientes del género femenino y el 10.5 % para pacientes del género masculino; la media de edades de 47.11 (± 12.48). Adicionalmente se realizó la extracción de ADN genómico, para realizarle la técnica de qPCR y mostraron que el 63% de las muestras (n = 24) fueron positivas a la presencia de *H. pylori* por la amplificación de los genes *16s* y el gen de virulencia *vac A*. Asimismo, se detectó que el 20 % (n = 5), con respecto a los positivos, contaban con el gen perteneciente a la isla de patogenicidad *cag A*, característico de las cepas de *H. pylori*.

Se recomienda que se realicen estudios a largo plazo en dichos pacientes con el fin de determinar si hacia el futuro la infección implica algún riesgo para la aparición de enfermedades gastrointestinales.

ABSTRACT

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a Gram-negative bacterium that infects the gastric epithelium of the human stomach. *H. pylori* infection is the most common in the world and is associated with various pathologies of the gastrointestinal tract, including chronic gastritis, peptic ulcers, duodenal, gastric cancer. Although it is not known exactly why the infection produces several clinical outcomes, it is considered that for the generation of the same the host's genetic characteristics, environmental and virulence factors of this microorganism participate. Epidemiologically it is indicated that the majority of *H. pylori* infections are acquired from infancy. Prevalence is associated with socioeconomic conditions, with this infection being more common in developing countries than in developed countries. The objective of the present study was to highlight the importance of the diagnosis of *H. pylori* in the oral cavity (dentobacterial plaque) as a sensitive and noninvasive reservoir site of this microorganism. Among these factors, genotypes considered to be more aggressive, such as *cag A*, *vac A*, were chosen and 38 plaque samples from the posterior region of the oral cavity were determined by qPCR from patients from the Esquipulas Chiapas region with 89.5 % for female patients and 10.5% for male patients; The mean age of 47.11 (\pm 12.48). In addition, genomic ADN extraction was performed to perform the q PCR technique and showed that 63% of the samples (n = 24) were positive for the presence of *H. pylori* by the amplification of the *16s genes* and the *vac A* virulence gene. It was also detected that 20% (n = 5), with respect to the positives, had the gene belonging to the island of pathogenicity *cag A*, characteristic of the strains of *H. pylori*.

It is recommended that long-term studies be conducted in these patients in order to determine if the future infection poses any risk for the development of gastrointestinal diseases.

1. INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es un bacilo microaerófilo, Gram-negativo, pleomorfo móvil gracias a la presencia de flagelos polares. Presenta una forma de espiral o “s”, capaz de colonizar la mucosa gástrica humana y causar diversas patologías gastrointestinales. La infección por *H. pylori*, sucede en todo el mundo, pero la prevalencia se ve relacionada con el área geográfica, siendo de mayor porcentaje en países en vías de desarrollo y desarrollo nulo. El microorganismo puede ser adquirido por vía oral – oral u oral – fecal, en cualquier etapa de la vida, siendo en la infancia la etapa de mayor riesgo, el microorganismo logra colonizar la mucosa gástrica por largo tiempo y en la mayoría de las ocasiones con ausencia de síntomas.

La evolución clínica del *H. pylori* está determinada por la influencia del ambiente, características inmunes y genéticas del huésped, así como los diversos factores de virulencia del microorganismo. Cuenta con factores de permanencia, que le permiten colonizar la mucosa gástrica y de esta manera mantenerse por largo tiempo en el huésped y con factores de virulencia, que favorecen sus efectos clínicos adversos; diversos factores poseen ambas funciones, dicho de otra manera, son tanto factores de virulencia como de permanencia. Una vez adquirido el *H. pylori* se traslada hacia la mucosa gástrica y hace uso de sus flagelos y a través de la producción de ureasa, logra aminorar el pH del estómago. Al estar cerca del epitelio gástrico, utiliza sus adhesinas, para impedir ser retirada por el vaciado gástrico.

Después de ser adherido emprende el ensamblaje del sistema de secreción tipo IV (SST4) en el cual es posible la transmisión de ADN y la secreción de la proteína cag A, que se encuentra en el 50-70% de las cepas de este microorganismo; ésta es codificada por el gen *cag A* que se localizan dentro del islote de patogenicidad *cag* (*cagPAI*), representando con ello un marcador genómico de PAI. Una vez liberada *cag A* dentro de la célula epitelial, es tirosinfosforilado en motivos proteicos EPIYA, generando procesos de señalización intracelular que conduce a cambios en la morfología celular y el estímulo de interleucinas proinflamatorias. El gen de virulencia *vac A*, que codifica para la citotoxina se encuentra

presente en todas las cepas del *H. pylori*, no obstante, no todas las cepas lo expresan. La importancia de estos factores de virulencia, no solo radica en la capacidad patogénica que se le confiere a la cepa infectante, sino que diversos estudios han logrado asociar su presencia con algunas formas de diversas patologías gástricas.

Se ha determinado la presencia de *H. pylori*, en cultivos de placa dentobacteriana provenientes de pacientes, con esto se llegó a la insinuación de este biofilm puede ser responsable de la transmisión de esta bacteria y a si mismo lograría actuar como una fuente de reinfección tras el tratamiento de su erradicación. A partir de esto la cavidad bucal comenzó a ser de interés como un posible reservorio, para esta bacteria, conociendo que la placa dentobacteriana muestra diversas particularidades bioquímicas, en las cuales permite la colonización y adhesión de diversos microorganismos.

El propósito de este trabajo fue detectar la presencia y el genotipo circulante de *H. pylori* mediante amplificación del gen *I6s*, y sus genes de virulencia, *cag A* y *vac A*, utilizando PCR cuantitativa (qPCR) en placa dentobacteriana procedente de los pacientes originarios de Esquipulas, Chiapas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Microbiología de *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori (*H. pylori*) pertenece a la subdivisión de Proteobacteria, orden *Campylobacter*, de la familia *Helicobacter*. Hoy en día se reconocen 20 especies, este microorganismo tiene la propiedad de ser microaerofílico y de ser catalasa, oxidasa y ureasa positivo en la mayoría de los casos (Tomb *et al.*, 1997).

Los linajes en que podemos encontrar las especies de *Helicobacter* se puede subdividir en: *Helicobacter* gástricos y entero hepáticos; estos muestran una alta prevalencia de ser órgano-específico, ya que los *Helicobacter* gástricos no presentan la capacidad de colonizar intestino e hígado. *H. pylori* es una bacteria Gram-negativa que mide de 2-4 μm de largo y de 0.5 a 1 μm de ancho, usualmente tiene forma de espiral o de "s", en condiciones adversas también se puede encontrar en su forma bacilar o cocoide (Goodwin y Worsley., 1993), se le puede considerar una forma latente de la bacteria, esta posee de 2- 6 flagelos de aproximadamente 3 μm de largo, y estos a su vez le confieren movilidad, permitiéndole así desplazarse en diversas soluciones viscosas. *Helicobacter* presenta una envoltura muy similar a las de otras bacterias Gram-negativas, ya que esta consta de una membrana interna citoplasmática, peptidoglucano, membrana externa y el periplasma. La pared celular presenta también un lipopolisacárido (LPS) con una actividad inmunológica débil y este a su vez incita a la producción de algunas citocinas proinflamatorias.

En cuanto a los postulados de Koch sobre transmisión en enfermedad, infecciones relacionadas a *H.pylori*, se han realizado en cerdos, ratas y monos en los cuales se ha producido gastritis después de la infección con dicha bacteria ,así mismo Marshall y Collingridge ingirieron una solución la cual estaba infectada con *H.pylori*, produciendo así una gastritis que lograron aliviar utilizando bismuto (Marshall B. J *et al.*, 1985). En la actualidad, la forma de erradicación de esta bacteria es mediante tratamientos específicos.

2.2 Características del Genoma

H. pylori presenta, un genoma de 1,667,867 pares de bases (pb) incluido en un solo cromosoma circular y un contenido de G+C de 39%, dentro del genoma presenta cinco regiones que poseen una composición diferente de G+C, en las cuales 2 poseen una o más copias de secuencias de inserción IS605, secuencias de RNA ribosomal 5S en los extremos y una duplicación de 521 pb cerca una a la otra (Logan., 1996). Estas dos regiones también contienen genes involucrados en el procesamiento del ADN y en esta región presenta el gen ortólogo *virB4/ptI* de *Agrobacterium*, que codifica para el sistema de secreción tipo IV. Una de las regiones de mayor importancia es la isla de patogenicidad (PAI) la cual se encuentra asociada a *cag* la cual parece ser que confiere la transferencia lateral de genes (Suerbaum *et al.*, 1999).

Tomb *et al.*, (1997) identificaron que *H. pylori* tienen un punto isoelectrico de 7 en más de 70% de las proteínas, en estas hay más frecuencias de aminoácidos de cadena lateral básica, arginina y lisina, lo cual podría ser la manera de adaptación en el ambiente ácido del estómago. *H. pylori* presenta un mecanismo similar a *E. coli* en cuanto a su replicación (Dueber *et al.*, 2011) aunque carece de algunas proteínas involucradas en la formación del primosoma (ADN C, MinC, chaperonas secretorias SecB), lo que sugiere que hay otras proteínas diferentes que realizarían las funciones de estas. Cuenta con un sistema de recombinación y reparación del ADN mediante metil-transferasas, *mutS* y *uvrD*.

La transcripción y la traducción también es muy similar a *E. coli* presentando diferencias en estos procesos: la maduración del t-RNA, presenta una ausencia de genes que codifica para la catálisis de este, así mismo solo posee una ribonucleasa fosfato, en lugar de tres para lograr degradar el mRNA, no presenta “gen” que codifique el Asn-tRNAAsintetas a en lugar forma Asn-tRna-Asn a partir de Aso-Trna mediante una transamidación (Mierzejewska y Jagura-Burdzy., 2012).

H. pylori a diferencia de otras bacterias es genéticamente heterogéneo, esto se debe principalmente a las secuencias repetitivas en el ADN estas secuencias se encuentran

mediando un control transcripcional ya que se encuentran presentes en regiones promotoras y posiblemente pueden estar involucradas en la adaptación a las condiciones ambientales del hospedero (Tomb *et al.*, 1997). También dicha heterogenicidad puede ser debida a que en pacientes infectados con más de una cepa de este microorganismo, favorecen el intercambio de ADN entre las diferentes cepas; los cambios en el genoma ocurren ya sea por inserciones o selecciones de secuencias y/o por mutaciones en la fase trasduccional (Kuster *et al.*, 2006).

2.3 Factores de Virulencia

La infección de *H. pylori* origina principalmente gastritis y uno de los principales factores de riesgo para desarrollar adenocarcinoma gástrico y linfoma de MALT, el desarrollo de estas patologías clínicas está influenciado por diversos aspectos, susceptibilidad genética del huésped, el ambiente, y los factores de virulencia de la cepa infectantes; siendo este uno de los más importantes (Atheron., 1998). Los factores de virulencia son productos bacterianos o estrategias que confieren a la patogenicidad. Las bacterias necesitan penetrar en el organismo hasta llegar a la zona donde van a persistir y producir sus efectos patógenos. (Dun y Phadnis., 1999). En *H. pylori* se han propuesto varios factores de virulencia como *cag A*, *vac A*, entre otros, ninguno implica por sí mismo el desarrollo de una enfermedad en concreto. El riesgo de desarrollar alguna patología clínica aumenta cuantos más factores de virulencia acumule la bacteria (Justin y Lee-Ann., 2006; Wen y Moss., 2009).

2.3.1 Citotoxina Asociada al gen A (*cagA*)

Esta proteína que tiene un peso aproximado de 140 kDa, es altamente inmunogénica, y es codificada por el gen *cag A*, este gen está se encuentra presente en los países occidentales en un 60-70% de las bacterias aisladas (Tummuru *et al.*, 1993; Miehke., 2000). Las cepas de *H. pylori*, asociadas a *cag A* son un marcador genómico de la isla de patogenicidad (PAI) que presenta aproximadamente 40 kb y dependiendo de la cepa codifica entre 27 y 31 proteínas. La isla de patogenicidad *cag PAI* se divide en dos regiones (Maeda., 1999). Una región superior que recibe el nombre de *cagII* y que contienen al menos 14 genes y la región inferior llamada *cagI* que contiene 16 genes. En la región más inferior *cag I*, es

donde se localiza el gen *cag A* (Censini *et al.*,1996). En diversas cepas entre estas dos regiones se interpone un segmento llamado “insertion secuencia 605” (IS605). Este segmento es una secuencia móvil que en algunas cepas puede interrumpir, mutilar, o incluso eliminar partes de la isla (Montecucco y Rappuoli., 2001).

Dieciocho de las proteínas codificadas por la región *cag PAI* codifican un sistema de secreción de proteínas tipo IV, el cual transporta *cag A*, peptidoglucano y otros factores de la bacteria dentro de la célula blanco del huésped (Kutter *et al.*, 2008). El sistema de secreción tipo IV (SST4), es un organelo filamentosos que al ser inducido, se localiza en un polo de la superficie bacteriana, y una vez que este se ha ensamblado para que logre transportar *cag A*, requiere que interaccione con un receptor específico en la célula del huésped; se ha propuesto que este receptor podría ser la integrina $\alpha 5\beta 1$; no obstante, para que *cag A* logre ser transportado requiere de una proteína adicional, *cag F*, que actuara como chaperona trasladándola desde el interior bacteriano hasta la célula blanco (Backert y Selbach., 2008).

La diana molecular más estudiada para *cag A* es la fosfatasa SHP-2 (proteína tyrosine phosphatase). En el gen que codifica esta proteína se han logrado encontrar mutaciones y polimorfismos relacionadas con la carcinogénesis gástrica (Saadat *et al.*, 2007). La activación de SHP-2 por *cag A* logra contribuir a la proliferación celular excesiva. También, los cambios que se producen en la expresión génica tras la infección por *H. pylori* en las células epiteliales suelen ser dependientes del sistema de secreción codificado por la *cagPAI*.

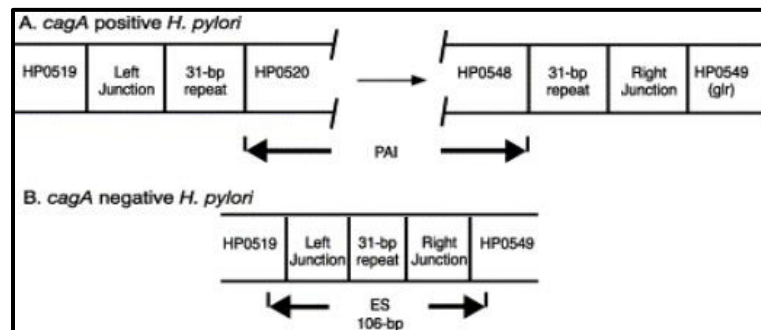


Figura 1. Estructura del gen *cag A*. A) Isla de patogenicidad (PAI) en las cepas *cag A* positivas. B) Se muestra la región “empty-site” en todas las cepas *cag A* negativas (Sicinschi., 2003).

La formación del complejo CagA-SHP2 estimula la actividad fosfatasa de SHP2. Que esta actúa en vías de señalización para lograr estimular la transcripción del factor de crecimiento, inducir proliferación, morfogénesis y motilidad celular. Adicionalmente, SHP-2 tiene la capacidad de activar Erk MAP quinasas tanto de manera dependiente como independiente de Ras, dentro de las funciones de Erk es que esta es necesaria para que la célula logre pasar de la fase G1 a la fase S en el ciclo celular, lo cual significa que la formación del complejo CagA-SHP2 puede inducir el crecimiento descontrolado de la célula epitelial gástrica, la activación de Erk en la célula epitelial a la vez activa factor nuclear de transcripción NF- κ B el cual consecutivamente inducirá la producción de IL-8, aunque *cag A* también tiene la capacidad de inducir IL-8 (Audibert *et al.*, 2006). Los productos de la *cagPAI* están asociados con un aumento de la producción de otras citocinas como la IL-1 β , TNF- α (Hatakeyama y Higashi., 2005).

Las cepas de *H.pylori* de acuerdo a la presencia del gen *cag A* se han denominado como *cag A+* o *cag A-*. En cuanto a la cepas *cag A+* su principal importancia radica en que son más agresivas ya que tienen la capacidad de causar inflamación severa, úlceras e incluso tumores. Saadat *et al.*, 2007 han demostrado que *cag A* es una oncoproteína bacteriana cuya expresión es suficiente para desarrollar neoplasias. Sin embargo, lo que hace a algunas cepas de *H. pylori* más agresiva que otras, podría explicarse por la presencia de polimorfismos en la proteína *cag A*, ya que estos varían dependiendo del área geográfica.

La detección del gen *cag A* se puede realizar mediante la realización de una PCR al ADN de la cepa bacteriana a estudiar o mediante serología. Mediante la PCR se puede detectar el gen *cag A*, que es un marcador de la isla de patogenicidad (Giono *et al.*, 2006). La mayoría de estudios moleculares han determinado el estatus *cag A* mediante la presencia o ausencia con primers específicos o sondas para este gen (Sicinschi *et al.*, 2003).

2.3.2 Citotoxina vacuolizante *vac A*

En diversos estudios (Leunk *et al.*, 1988), demostraron que algunas cepas de *H. pylori* producían una proteína en el sobrenadante de cultivos, dichas proteínas inducían

vacuolización en células epiteliales, la muerte celular y la destrucción de la integridad epitelial por tal se designó a la proteína como citotoxina vacuolizante (*vac A*).

La proteína *vac A* es codificada por el gen *vac A*, y a pesar que solo el 50% de las cepas muestran actividad citotóxica detectable, el gen *vac A* está presente en todas las cepas de *H. pylori*, forma parte de un complejo multimérico de aproximadamente 100 kDa y este presenta a su vez al menos dos partes variables (Phadnis *et al.*, 1994), sin embargo, estas presentan variaciones en su actividad vacuolizante debido a la heterogenicidad dentro del gen *vac A* (Cover *et al.*, 1994).

El gen comprende dos partes variables; una región que codifica para el péptido señal conocida como región “s” y está localizada en la región 5’ final del gen y existe como alelo s1 o s2, dentro del tipo s1 hay varios subtipos (s1a, s1b, s1c). La región media del gen (región m) puede tener los alelos m1 o m2. Respectivamente a los subtipos de s1, se ha reportado que aquellas cepas que expresan el subtipo s1a son más patógenas que las cepas s1b o s2 (Amieva y Omar., 2008).

Se ha descrito una nueva región en el gen *vac A* denominado región intermedia (i) (Rhead, *et al.*, 2007). Localizado entre las regiones s y m. La importancia de esta región es su relación con el cáncer gástrico. Un hallazgo importante del estudio de (Ogiwara H *et al.*, 2008) es la presencia de una cuarta región llamada *vac A d*, y presenta una selección de 81 pb entre la región i y m, esta región podría estar involucrada en la unión de la toxina a las células del epitelio gástrico y la importancia de esta es ser un marcador más sensible que s o m de inflamación severa y atrofia de la mucosa gástrica, así mismo esta región presenta dos variantes d1 y d2.

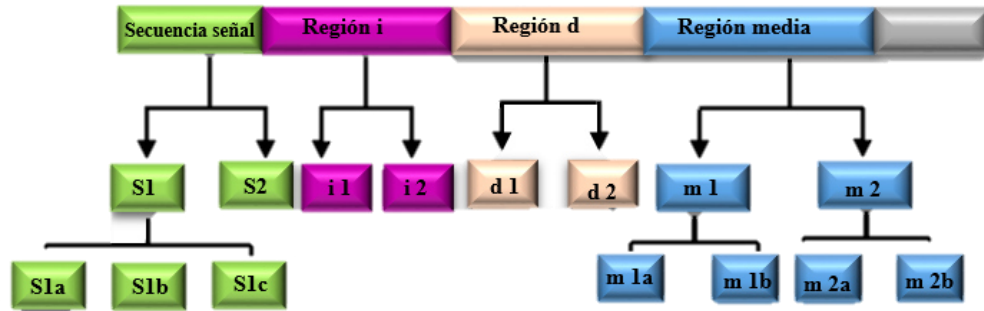


Figura 2. Presentación esquemática del gen *vac A* de *Helicobacter pylori*. Se presenta gráficamente la estructura del gen *vac A* y su diversidad alélica.

La proteína *vac A* es una pro-toxina de 140 kDa constituida por una región aminoterminal que consta de 33 aminoácidos y estos constituyen el péptido señal, el cual se encarga de enviar la pro-toxina del citoplasma al periplasma bacteriano, esta pro-toxina en su forma madura de (88kDa) está lista para ser secretada. La forma oligomérica de la proteína es activada por la exposición al medio ácido o alcalino, siendo resistente a pH de 1.5 (de Bernard *et al.*, 1995).

vac A puede inducir la muerte programada, de manera independiente a la vacuolización, ya que induce la liberación del citocromo C de las mitocondrias a través de proteínas proapoptóticas Bax y Bak. Esta a su vez participa en el proceso de la apoptosis por la activación del receptor Fas/CD95, a través de caspasa 3 y la ruptura de la membrana mitocondrial que, altera el ciclo celular al perturbar la concentración de ATP celular (Reyrat *et al.*, 2001).

La vacuolotoxina también afecta la respuesta inmune, en las células presentadoras de antígeno CPA ya que afecta la presentación antigénica a través del complejo mayor de histocompatibilidad II (CMHC II) ya que este induce una disminución de la actividad proteolítica en las vías endocíticas por este motivo la estimulación de los linfocitos T no solo alteraran la presentación del antígeno ya que también *vac A* tiene la capacidad de inhibir la producción de IL2 y esta es necesaria para la proliferación de los linfocitos T, dicho efecto atribuye a que *vac A* inhibe el factor nuclear de activación de células T (NFAT) este es un factor de transcripción que actúa como regulador de los genes

involucrados en la respuesta inmune requerido para la activación de los linfocitos T (Sewald *et al.*, 2008).

2.4 Patogenicidad

H. pylori presenta múltiples mecanismos para dañar la mucosa gástrica. La forma que presenta en espiral “s” y los flagelos le confieren movilidad a través del moco que recubre la superficie celular. *H. pylori* puede adherirse a las células gástricas en zonas específicas, como ejemplo de ello sería en los antígenos Lewis B presentes en la población con grupo sanguíneo O.

La supervivencia en el ambiente gástrico y las lesiones de la mucosa son ocasionadas por cuatro enzimas; ureasa, catalasa, fosfolipasa y proteasa. La ureasa origina amoníaco; que es un tóxico celular. La catalasa salvaguarda contra la peroxidación de los polimorfonucleares. La fosfolipasa y la proteasa permiten la digestión de las membranas de las células epiteliales gástricas y de la barrera mucosa, aumentan la humidificación y solubilidad del moco. Así mismo el *H. pylori* produce citotoxinas que forman vacuolas en las células epiteliales. Resultando así un daño celular que quizás produzca la salida de nutrientes desde la submucosa (Neri *et al.*, 1994).

2.5 Respuesta Inmune del Huésped a *H. pylori*

Las personas infectadas con *H. pylori* presentan una inflamación de la mucosa gástrica, la respuesta inflamatoria se produce al reclutamiento de neutrófilos continuando con linfocitos T, linfocitos B, células plasmáticas y macrófagos en torno de la célula epitelial que se encuentra dañada. La adherencia de la bacteria desencadena la respuesta primaria de la célula epitelial, accionando a células dendríticas, monocitos, macrófagos y neutrófilos (Ihan *et al.*, 2012; Wilson y Crabtree., 2007).

La proteína D surfactante puede detener al patógeno en la mucosa, uniéndose al LPS O de la bacteria impidiendo su movilidad y disminuyendo así la probabilidad a la infección. Cuando la bacteria es adherida a la mucosa esta puede ser reconocida por receptores de tipo Toll (TLR 2,4,5) y receptores NOD principalmente NOD 1. El reconocimiento inicial sería por TLR 4 que este se encarga de reconocer LPS pero este es un mal activador de la

respuesta inmune innata y podría no detectarlo, de este modo la bacteria podría no ser detectada. En la mucosa gástrica se encuentra otro de los receptores de tipo Toll que es el TLR 5, este se encarga de reconocer las flagelinas, aunque también el reconocimiento es muy débil, lo cual probablemente se debe a que en personas infectadas con *H. pylori* este se localiza en la parte basolateral y no en la apical donde generalmente encontraríamos a la bacteria. El tripéptido de muramil del peptidoglucano que es secretado gracias al sistema de secreción tipo IV, desencadena la activación de NF- κ B y la posterior secreción de IL-8 y este es reconocido por el receptor de tipo NOD 1; por lo que podemos indicar que los receptores NOD son de mayor importancia que los TLR en este tipo de casos (Ihan *et al.*, 2012; Wilson y Crabtree., 2007).

Cuando es reconocida la bacteria por alguno de los receptores es fagocitada y procesada para ser presentada al (CMH) de clase II, no obstante *H. pylori* tiene la capacidad de evadir estos pasos ya que este produce arginasa, antes y después de la fagocitosis de esta manera no permite al macrófago utilizar la arginina para la producción posterior de óxido nítrico y de esta manera evita su muerte provocándosela al macrófago. Este proceso produce la secreción de la IL-12 y de citotoxinas pro inflamatorias como IL-1, TNF- β , IL-6 (O'keeffe y Moran., 2008).

La infección por *H. pylori* induce una fuerte respuesta inmune celular y humoral en la mucosa gástrica, la producción de diversos anticuerpos no permite erradicar la infección pero contribuye así al daño del tejido. En la inmunidad específica se generan linfocitos T cooperadores inmaduros (Th0) y estos expresan CD4, estos a su vez pueden diferenciarse en Th1 (son inducidas por patógenos intracelulares, y se caracterizan por secretar IL-2, INF γ) o Th2 (son inducidas por patógenos extracelulares secretan IL-4, IL-5, IL 10 y estimulan a los linfocitos B) dependiendo del estímulo (Ihan *et al.*, 2012; Wilson y Crabtree., 2007).

Debido a que *H.pylori*, no es un patógeno invasivo e induce una fuerte respuesta humoral, se observará un aumento de distintas inmunoglobulinas (IgM, IgA e IgG). En la fase aguda

de la infección se producirá una respuesta humoral de tipo IgM. Las IgA produce un bloqueo de la adhesión y de la motilidad de esta bacteria (Crabtree., 2007).

Las IgA pueden recubrir a *H.pylori* pero este como se menciona con anterioridad pueden escapar de la fagocitosis, evitando así su eliminación (Aceti *et al.*, 1991). La respuesta humoral mediada por IgG facilita la eliminación de *H. pylori* por opsonización, activación de los leucocitos polimorfonucleares y la liberación secundaria de mediadores proinflamatorios (Valnes y Brandtzaeg., 1989; Rathbone, *et al.*, 1986).

2.6 Epidemiología

La localización geográfica, el grupo étnico, el estado socioeconómico y la edad son variables que influyen directamente en la prevalencia de *H. pylori* (Fennerty., 2005). Diversos estudios han revelado que existen varias formas mediante las cuales *H.pylori* puede ser adquirido, dentro de estas formas se ha contemplado una ruta de transmisión gastro-oral, oro-fecal que se cree que es la principal forma de transmisión especialmente en países subdesarrollados (Anexo 4).

Diversos alimentos y/o el agua contaminada funcionan como un vector importante (Magalhanes y Luzzza., 2006) reportaron la importancia del agua como vector en países en vías de desarrollo o con desarrollo nulo, ya que encontraron este microorganismo en 33% de 36 muestras fecales humanas, en el 66% de muestras de aguas negras y en un 11% en muestras de río; Así mismo se apoya la ruta de transmisión fecal- oral. No obstante, se ha observado *H. pylori* se encuentra unido a levaduras, lo cual hace pensar que *H. pylori* tiene una asociación simbiótica con las levaduras y estas le servirían como reservorio y vehículo.

Se ha planteado una vía de transmisión intrafamiliar, en la que si uno de los padres está infectado, el hijo también lo estará; otra posibilidad es la transmisión directa de madre a hijo (Go., 2002). Ha reportado el hallazgo de cepas provenientes del jugo gástrico de niños de madres infectadas con el mismo patrón genético que las que provenían de sus progenitoras.

El principal reservorio encontrado hasta el momento es el estómago del hombre, por lo que la transmisión persona a persona, vía oral-oral o fecal-oral, parece la fuente de contagio más importante (Best *et al.*, 1994).

2.7 Detección de *H.pylori* en la cavidad oral

Diversos estudios han evaluado la placa dentobacteriana y la saliva como posibles muestras para el diagnóstico de *H.pylori* empleando diversas técnicas. El cultivo de la bacteria a partir de la cavidad oral, pocas veces se ha logrado aislar con éxito. Con las distintas técnicas moleculares, se han reportado mejores resultados al emplear la placa dentobacteriana y la saliva como muestras para la detección del *H.pylori* (Kignel *et al.*, 2005). La cavidad bucal se le ha considerado un reservorio de infección de dicho microorganismo. La mayoría de los estudios han demostrado la presencia de *H.pylori* en muestras de la cavidad bucal, a partir de muestras de placa dentobacteriana (Gebara E.G *et al.*, 2004) en pacientes que muestran tener alguna complicación periodontal, motivo por el cual la American Dental Association desarrollaron el índice de detección y registro periodontal (PSR) para mejorar la detección de la enfermedad periodontal (Landry R.G, Jean M., 2002). La presencia de esta bacteria en cavidad bucal se ha postulado como una importante fuente potencial de reinfección después de haberla erradicado del estómago (Mapstone *et al.*, 1993). Bürgers *et al.*, 2008 en su investigación demostraron que la presencia del *H. pylori* puede ocurrir en la cavidad oral de forma independiente a la colonización del estómago.

Hasta el momento la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) se ha descrito como la más adecuada para detectar la presencia de *H.pylori* en cavidad bucal ya que puede detectar un número bajo de dicha bacteria (Sepúlveda, *et al.*, 2008).

2.8 Diagnóstico para *H.pylori*

La infección por *H.pylori* se puede diagnosticar por métodos invasivos (Son técnicas diagnósticas disponibles, que requieren la realización de una endoscopia digestiva para la obtención de una muestra de tejido gástrico o no invasivos (Son pruebas diagnósticas, que

no requieren endoscopia, como ejemplo: El test del aliento con urea marcada, la serología, la PCR de saliva y placa dentobacteriana o de heces) (Cohen and Laine., 1997).

El método diagnóstico ideal debería ser uno mínimamente invasivo o no invasivo, de precio accesible, seguro, y que se pueda encontrar en todos los centros de salud. Ninguno de los métodos que existen en la actualidad cumple todas estas características. Todos los métodos hasta el momento presentan ventajas e inconvenientes. En el momento que elijamos uno, hay que tomar en cuenta cual será el fin de su aplicación (epidemiológico, diagnóstico o de seguimiento), el centro de salud dónde se realice el diagnóstico y las características del paciente (Steven J., 2005).

2.8.1 Cultivo microbiológico

El cultivo más habitual es el de biopsias gástricas, también se han cultivado con éxito el jugo gástrico y las heces. La principal ventaja que presenta es permitir el estudio de la sensibilidad antibiótica y la caracterización molecular de la cepa. Este método ha presentado una sensibilidad del 95% y total especificidad, para el diagnóstico de *H.pylori* (Thomas *et al.*,1992).

2.8.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Hasta el momento la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) se ha descrito como la más adecuada para detectar la presencia de *H.pylori* en cavidad bucal ya que puede detectar un número bajo de dicha bacteria (Sepúlveda *et al.*, 2008).

Con la PCR se ha podido detectar *H. pylori* en muestras que no son de biopsias gástricas es así como se ha podido determinar su presencia en muestras de placa dentobacteriana, saliva, jugos gástricos y heces, de esta manera se puede ofrecer una mejor alternativa el diagnóstico clínico y para estudios de investigación relacionados con su modo de transmisión. La PCR se trata de un método altamente sensible y específico, que permite determinar la presencia de *H.pylori* (De La Garza *et al.*, 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

H. pylori está considerada como el agente causal más común de la gastritis y úlceras gástrica y duodenal. Así mismo, este microorganismo se destaca como un precursor en la patogénesis del linfoma de MALT y el adenocarcinoma gástrico. Se ha determinado que esta bacteria se propaga por las vías oral-oral y fecal-oral. Múltiples investigaciones plantean que al menos mitad de la población mundial se ve afectada por *H. pylori* en algún momento de la vida, teniendo una repercusión clínica más notoria en los países de tercer mundo, donde existe la mayor incidencia (Brown L.M., 2000).

Existen diversos estudios donde se han determinado la presencia de *H. pylori* en placa dentobacteriana y saliva, mediante cultivo microbiológico, lo que patentiza que éste se encuentra alojado en la cavidad oral y se mantiene debido a la atmósfera húmeda y un ambiente reducido en oxígeno. Sin embargo, detectar este agente por estos métodos representa un reto debido a la escasa cantidad de unidades formadoras de colonias. La PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR) es una técnica molecular adecuada para este tipo de situaciones, debido a su alta sensibilidad y especificidad. Los genes de virulencia de *H. pylori* representan buenos marcadores para la detección sensible de esta bacteria y lograr diferenciar personas infectadas sean o no sintomáticas y con mayor riesgo de desarrollar enfermedades asociadas a este patógeno.

Teniendo en cuenta que en México hay una alta prevalencia (70%) del microorganismo, y existen patologías severas asociadas a éste, es relevante el diagnóstico genotípico de *H. pylori*, empleando la qPCR para la detección de los factores de virulencia y con ello determinar las variantes circulantes. Aunado a ello, es importante que se realice con una reducida invasividad al paciente, ya que usualmente, se utilizan biopsias gástricas para esta finalidad.

Por lo anteriormente expuesto, el propósito de esta investigación es destacar la importancia del diagnóstico de *H. pylori* en la cavidad bucal (placa dentobacteriana) como sitio reservorio de este microorganismo y de manera sensible y no invasiva.

4. HIPÓTESIS

Es posible detectar la presencia y el genotipo circulante de *Helicobacter pylori* mediante la amplificación del *gen 16SRNAr* y sus genes de virulencia *cag A* y *vac A* utilizando PCR cuantitativa (qPCR) en placa dentobacteriana procedente de pacientes de la región de Esquipulas, Chiapas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Identificar la presencia de *Helicobacter pylori* mediante la amplificación del gen *16SRNAr* y sus genes de virulencia *cag A* y *vac A* en muestras de placa dentobacteriana de pacientes de la región de Esquipulas, Chiapas.

5.2 Objetivos específicos

- Aislar y purificar el material genético de *H. Pylori* a partir de las muestras de placa dentobacteriana de pacientes de la región de Esquipulas, Chiapas.
- Detectar la presencia de *H. pylori* por la amplificación del gen de la unidad ribosomal *16SRNAr* y *gen vac A*.
- Detectar las cepas de *H. pylori* con presencia del gen del factor de virulencia *cag A*, a partir de los pacientes positivos a este microorganismo.
- Confirmar la presencia de *H. pylori* en placa dentobacteriana mediante técnicas microbiológicas

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Lugar y área de estudio

El presente estudio fue realizado en la Unidad de Immunobiología y Acarreadores de Drogas del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas; en colaboración con la Unidad de Odontología Integral y Especialidades del Centro de Investigaciones y Desarrollo en Ciencia de la Salud, CIDICS-UANL.

6.2 Estrategia experimental

Para la realización de este trabajo, cada uno de los objetivos planteados fue dividido en metas para obtener una mejor distribución y realización del trabajo (Figura 3).

6.3 Descripción del estudio

Se realizó un estudio observacional, descriptivo, abierto y transversal correlacional. Este protocolo fue sometido y aprobado por Comité de Ética de la Unidad de Odontología Integral y Especialidades del Centro de Investigaciones y Desarrollo en Ciencia de la Salud, CIDICS-UANL, de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La recolección de datos fue retrospectiva; se reclutaron todos los pacientes que acudieron a la clínica de Esquipulas, Chiapas donde se les realizó su expediente clínico dental. Tras acceder al participar en el estudio, los pacientes firmaron la ficha de consentimiento informado y se procedió a tomar la muestra de placa dentobacteriana.

6.3.1 Criterios de selección

Para la realización del siguiente estudio, fueron incluidos todos los pacientes que llegaron a la clínica de Esquipulas, Chiapas, durante el período comprendido 22 – 30 abril del 2016, excluyendo a todo aquel paciente que durante ese periodo se encontrara bajo tratamiento de antibióticos (amoxicilina, claritromicina, tetraciclina o metronidazol) durante un período igual o superior a 14 días durante los seis meses anteriores al estudio, así como pacientes sometidos a tratamiento de erradicación de *H. pylori* que pudieran sesgar los resultados. Se excluyeron aquellas muestras que tuvieran algún incidente durante el proceso de recolección, así como aquellos que no aceptaron participar en el estudio.

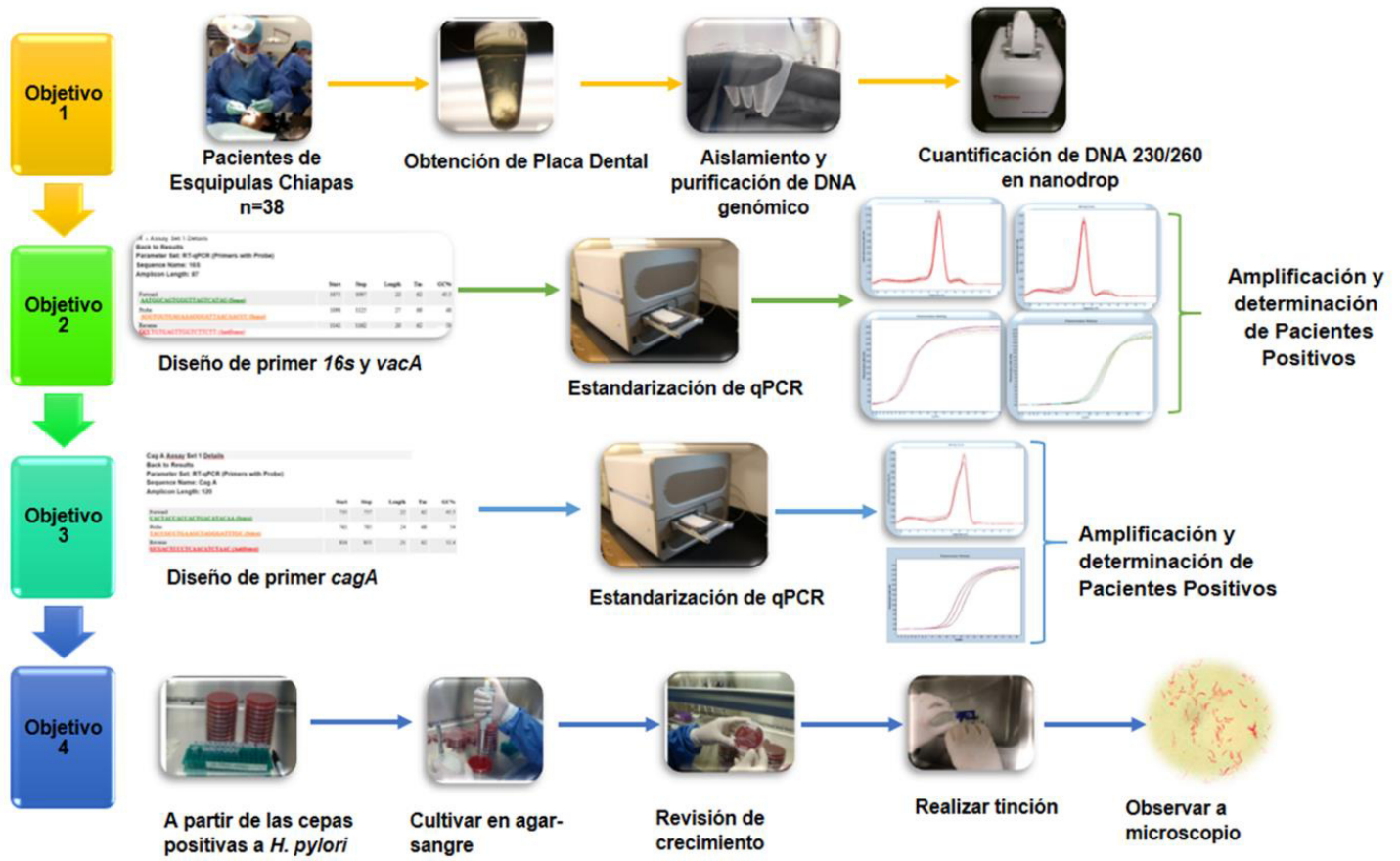


Figura 3. Estrategia experimental. Se muestra el diagrama de flujo con las metas principales y metodologías a desarrollar para la ejecución de cada objetivo propuesto para el desarrollo de esta tesis.

6.3.2 Operacionalización de variables de estudio

Se consideraron como variables independientes aquellos datos descriptivos de los sujetos analizados, tales como edad, sexo, etc. La presencia/ausencia de *H. pylori* en placa dentobacteriana fue utilizada como variable dependiente.

6.3.3 Reclutamiento de participantes

Se incluyeron todos los pacientes que acudieron a una atención dental, dentro de la clínica de Esquipulas, Chiapas durante el período comprendido 22–30 abril del 2016 y que aceptaron participar en el estudio (Anexo 5), obteniendo un total de 38 muestras de placa dentobacteriana (n = 38).

6.4 Obtención de la muestra de placa dentobacteriana

Se procedió a tomar las muestras de placa dentobacteriana en condiciones de esterilidad, a los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión. Para la toma de la muestra se empleó un palillo estéril de madera de forma cilíndrica de 1 mm de diámetro, el cual fue modificado en uno de sus extremos con una hoja de bisturí para crear una parte activa en forma de pala, y tomar la muestra de placa dentobacteriana ubicada en la cara lingual dentro del surco gingival de molares inferiores. Se escogió la zona por ser un medio básicamente anaerobio en contraste con el medio supragingival. Se colocó la muestra en un tubo Eppendorf con un contenido de: 500 µL de tripticaseína de soya como medio de transporte.

Asimismo, se les realizó el estudio de PSR utilizando una sonda periodontal Hu – friedy, en donde se examinan al menos seis profundidades alrededor de cada diente, introduciendo suavemente (20g) la sonda periodontal en el surco gingival o surco gingivodentario: mesiovestibular, vestibular, distovestibular, mesiopalatino/lingual, palatino/lingual y distopalatino/lingual.

6.5 Aislamiento y cultivo de *H. pylori* a partir de muestras de placa dentobacteriana

Muestras aleatoriamente se hicieron crecer en cajas petri con agar Campy con 10% de sangre de carnero ppm. Según las condiciones del fabricante (BioMérieux). Se homogenizó el medio de transporte con la muestra de placa dentobacteriana, y en ambiente de esterilidad y se sembró por difusión colocando y distribuyendo 200 µL de la muestra desde el centro de la caja; posteriormente, cada placa fue incubada a 35 °C ±2 en condiciones microaerófilas (CO₂ al 10%) por siete días (Hernández C, Rivera P, 2003). Algunas fueron seleccionadas para realizar tinción de Gram para observar las características morfológicas específicas para *H. pylori*, bajo el microscopio óptico (4X, 40X y objetivo de inmersión 100X).

6.6 Aislamiento de ADN genómico

Para la extracción del material genético utilizado para su posterior identificación por qPCR, se utilizó el reactivo Trizol (Cat. No. 15596026, Thermo Fisher) teniendo en cuenta las instrucciones del fabricante. Las muestras se almacenaron a -20°C para su uso posterior.

6.7 Cuantificación de ADN

Para la cuantificación de la concentración y determinación de la pureza del ADN, se analizó en un NanoDrop ND-1000, colocando 1µL de muestra y verificando que la relación A230/260 estuviera entre 1.9 y 2.1. Para la calidad de las muestras, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, con tinción con bromuro de etidio (0.5 µg/ µL) y visualización bajo luz UV.

6.8 PCR cuantitativa (qPCR)

Para el análisis de amplificación por PCR en tiempo real (qPCR), se diseñaron oligonucleótidos dirigidos a los genes *vac A*, *cag A*, y el gen de referencia la unidad ribosomal *16SRNA*r. Dichas secuencias fueron previamente diseñadas en el laboratorio utilizando la base de datos del GenBank (NCBI) y utilizando el programa Primer quest (Tabla 1) (Urrutia-Baca., 2016).

Se prepararon las reacciones de amplificación en placas de 96 pozos (Anexo 6); para cada reacción se utilizaron 12.5 μ L de Syber Green qPCR master mix 2X (No. Cat. K0221, Thermo Scientific), 0.5 μ L de cada uno de los oligonucleótidos, 40 ng de templado de ADN y agua libre de endonucleasas a un volumen final de 25 μ L. adicionalmente, se utilizó una curva de calibración a 10, 20, 40 y 80 ng para cada gen, con la finalidad de realizar una cuantificación relativa.

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en la identificación de *H. pylori*.

Gen	Forward	Reverse	Tm (°C)
<i>16s</i>	ggagtagcggcgcagattaaa	ctagcggattctccaatgtaa	55
<i>CagA</i>	gaccgactcgatcaaatagca	ttagctgaaagccctacctac	55
<i>vacA</i>	cctactgagaatggtggcaata	gttcttcacgagagcgtagtt	55

La reacción de qPCR se realizó en un termociclador LighCycler 480 (Roche, Basilea Suiza), programado con el sistema de detección de Sybr Green I, en cuatro etapas; un ciclo de pre-incubación, 40 ciclos de amplificación, un ciclo para la curva de disociación (melting) y un ciclo de enfriamiento:

1. **Pre-incubación:** Un ciclo de 95 °C por 10 min con un descenso de 4 °C/s.
2. **Amplificación:** 40 ciclos de amplificación (95 °C por 10 s y con un descenso de 4 °C/s; alineamiento a 55 °C por 10 s y descenso de 2 °C/s); un ciclo de extensión a 72° C por 10 s, con un descenso de 4 °C/s en el modo de adquisición individual;
3. **Curva de disociación:** Un ciclo de 95 °C por 5 s con un descenso de 4 °C/s, a 65 °C por 1 min con un descenso de 2°C/s y 97 °C en modo de adquisición continuo con un descenso de 5 °C/s.
4. **Enfriamiento:** Un ciclo de 40°C por 30 s y a 2 s a 1.5 °C/s.

Utilizando la curva de calibración realizada, se realizó un análisis expresión relativa utilizando la técnica de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, donde se utilizaron los valores de ciclo umbral (Cycle threshold -Ct-), con ayuda del software de LightCycler 480 II (Roche, Basilea, Suiza). Las muestras que resultaron positivas, se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, con tinción con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) y visualización bajo luz UV.

6.9 Procesamiento de datos y análisis estadístico

A los pacientes que cumplieron los criterios de selección se les recabo su información para colocarla en un formato único de recolección de datos. Con los datos obtenidos se realizó el análisis estadístico descriptivo de la una base de datos creada, en el programa SPSS, utilizando una chi- cuadrada, con un $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Cuantificación *H. pylori* por PCR cuantitativa

7.1.1 Validación de técnica de qPCR

Se determinó la presencia de *H. pylori* por medio de la técnica de PCR cuantitativa (qPCR) con una química de detección por SYBR Green. Para ello, previamente se verificó que los primers utilizados para amplificar los genes *16s*, *vac A*, *cag A* empleados por Urrutia-Baca (2016) efectivamente fueran específicos para nuestra bacteria. Para este propósito, se verificó por medio de la curva de disociación (melting) obtenida por la qPCR, fuera específica, y no hubiera artefactos de la técnica, tales como amplificaciones inespecíficas, dímeros de primers, etc (**Figura 4**).

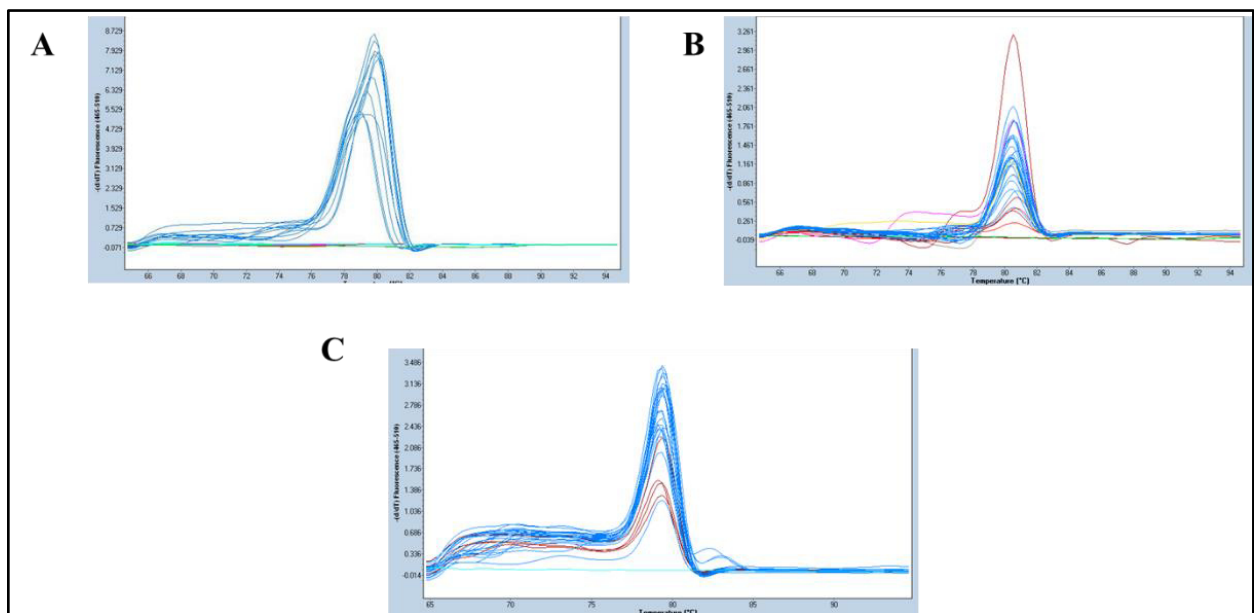


Figura 4. Curvas de disociación de los primers para la amplificación de *16s*, *vac A* y *cag A*. En las siguientes figuras se observan que los primers utilizados son específicos para los genes evaluados en esta tesis. **A)** Curva de disociación del gen *16s*; **B)** Curva de disociación del gen *cag A*; **C)** Curva de disociación del gen *vac A*

7.2 Identificación de la presencia de *H. pylori* en placa dentobacteriana

7.2.1 Cuantificación relativa de *H. pylori* por qPCR

Se procedió a realizar la identificación de la presencia de *H. pylori* en las muestras de placa dentobacteriana recolectadas por qPCR, comparándolas con una curva de calibración con la cepa control. Los resultados obtenidos por medio de la qPCR mostraron que el 63% de las muestras (n =2 4) fueron positivas a la presencia de *H. pylori* por la amplificación de el *gen 16SRNAr* y el gen de virulencia *vacA* (**Figura 5**).

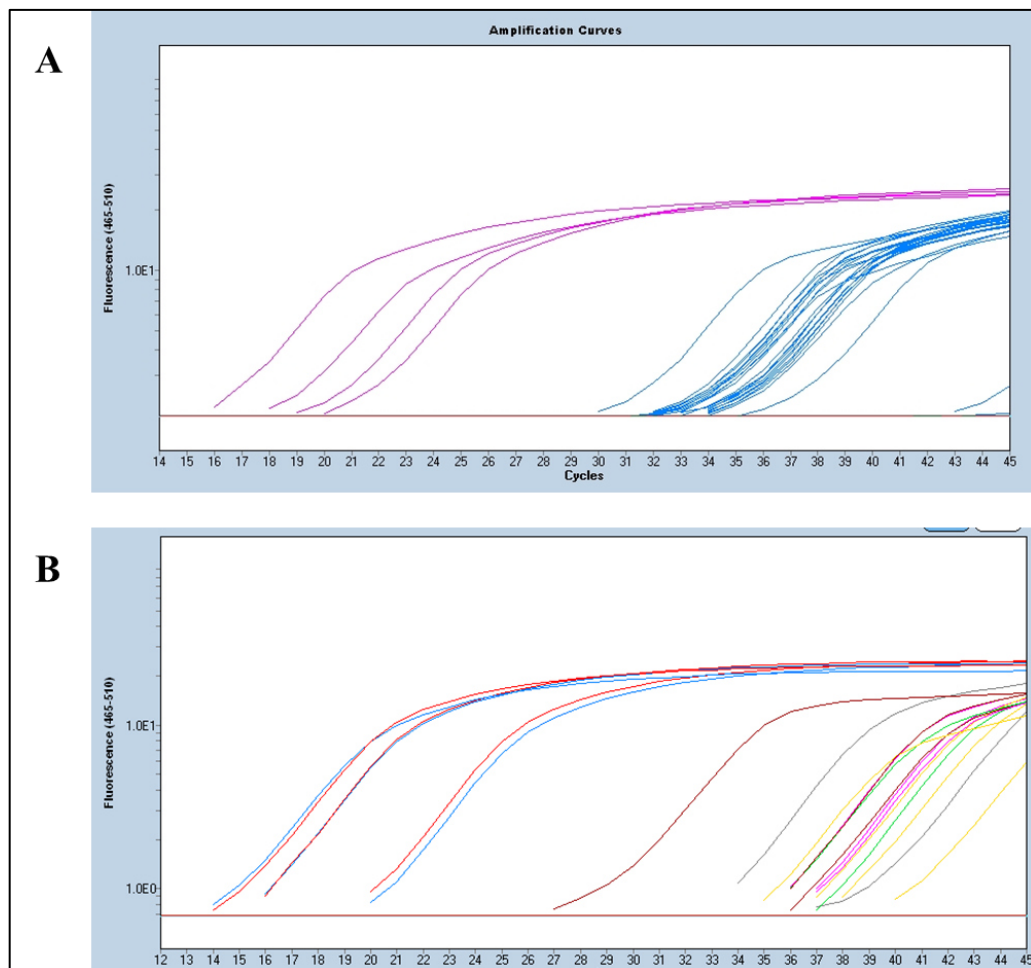


Figura 5. Determinación de *H. pylori*. PCR tiempo real (qPCR) con SYBER Green que muestra la curva de amplificaciones obtenidas para: **A)** *gen 16SRNAr* **B)** *gen vacA*..

Asimismo, se detectó que el 20 % (n = 5), con respecto a los positivos, contaban con el gen perteneciente a la isla de patogenicidad *cag A*, característico de las cepas de *H. pylori* (Figura 6). Todas las curvas presentaron una eficiencia entre 90 y 110 (Anexo 7).

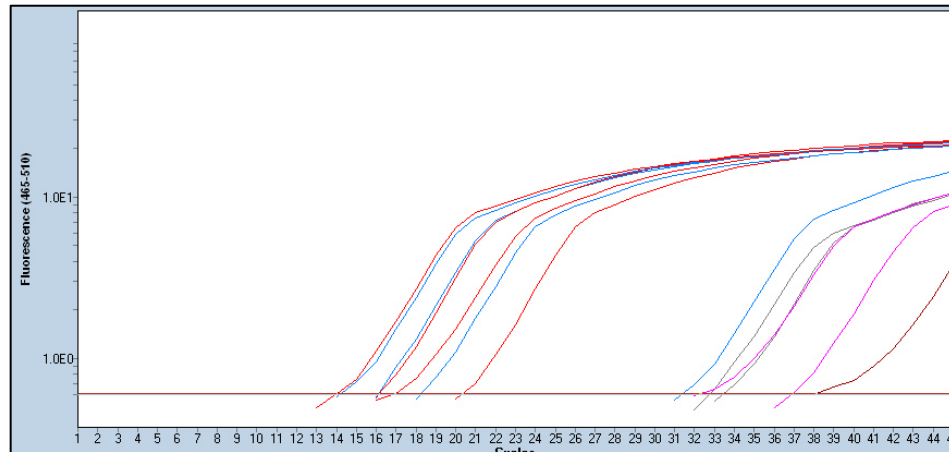


Figura 6. Determinación de *Cag A*. PCR tiempo real (qPCR) con SYBER Green que muestra la curva de amplificaciones obtenidas para el gen *Cag A*.

De los pacientes positivos se realizó una comparación para medir la presencia y la frecuencia entre los genes de virulencia *vac A* y *cag A* de *H. pylori* (Figura 7).

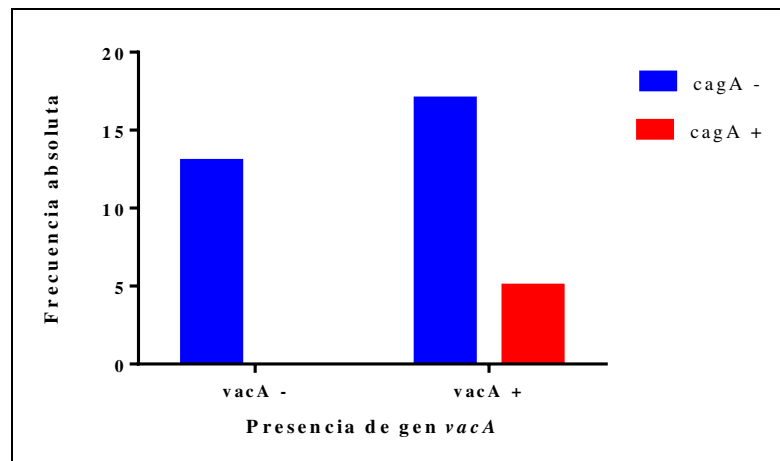


Figura 7. Presencia y frecuencia de *vac A* y *cag A*. Se observa mayor prevalencia del gen de virulencia *vac A*, en las muestras obtenidas de los pacientes de Esquipulas, Chiapas.

Además utilizando la curva estándar, se obtuvieron los valores de Ct (cycle threshold) para cada muestra positiva, la cual posteriormente, fueron relacionados con características de los pacientes (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de Cp. Se observan valores de los Ctpen donde se llevó a cabo la amplificación de muestras adicionales para los genes *16SRNAr*, *vacA* y *cagA*.

Paciente	Cp <i>16SRNAr</i>	Cp <i>vacA</i>	Cp <i>cagA</i>
P1	32.68	34.68	
P3	33.36	36.44	
P4	33.86	34.48	
P5	33.6	35.66	
P8	33.52	35.65	
P9	31.69	35.55	
P10	33.36	33.69	33.51
P11	35.03	34.65	36.91
P12	42.37	32.57	
P14	32.23	37.07	32.84
P17	31.41	35.52	38.03
P18	41.09	37.05	
P19	29.41	25.63	
P21	31.89	35.5	
P22	31.52	37.03	
P25	30.85	33.55	
P26	31.82	34.67	
P27	32.89	34.47	
P28	31.12	36.01	32.63
P30	32.89	34.52	
P32	33.65	32.5	
P33	32.67	35.5	
P35	33.5	32.67	
P36	31.67	35.35	

7.2.2 Comparación de detección de *H. pylori* contra estándar de oro y electroforesis

Las muestras que fueron positivas a la detección por qPCR fueron tomadas, y se cultivaron en medio selectivo, como estándar de oro. Todas ellas presentaron colonias (circulares de apariencia convexa con una apariencia traslúcida, presentando un diámetro de 1- 2 mm

aproximadamente y en la mayoría de los casos con una zona ligera de hemólisis). Además, se confirmó la morfología de *H. pylori* por tinción de Gram observada en microscopio óptico (**Figura 8**).

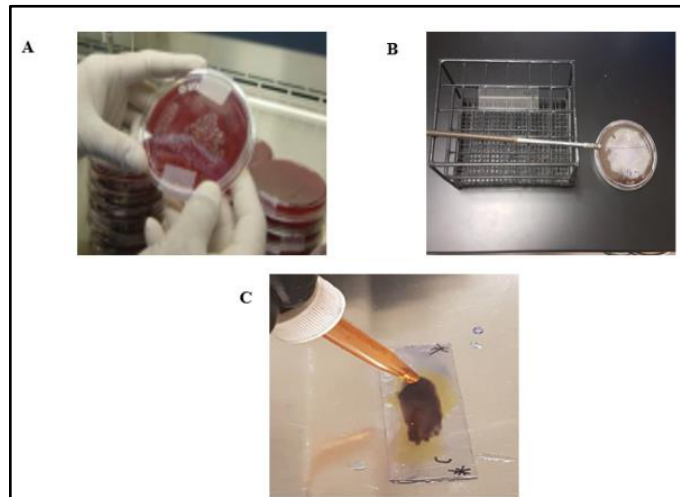


Figura 8 .Confirmación de *Helicobacter pylori* por tinción de Gram. A) Agar sangre modificado para *H.pylori*, mostrando el crecimiento de colonias B) Preparación de material para realización de tinción de Gram C) Tinción de Gram.

Por otro lado, las muestras amplificadas fueron observadas a través de electroforesis en gel de agarosa al 2%; se observó la presencia de las bandas específicas esperadas para el gen (*16S RNA*) y (*Cag A*) (**Figura 9 y 10**).

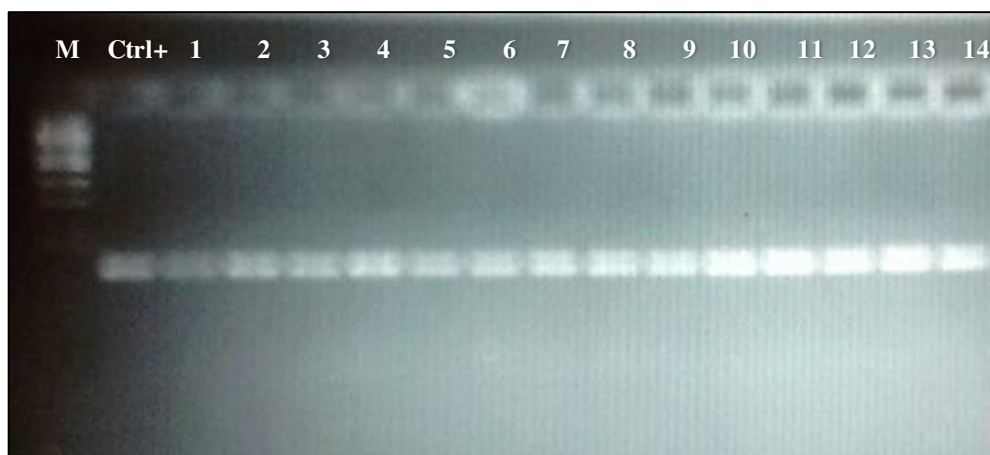


Figura 9. Confirmación de la presencia de *H. pylori* por el gen *16SRNA* en electroforesis de gel de agarosa. Resultados de la PCR, positivos al *gen 16SRNA* en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, en el carril 1- 14 se observa la banda esperada para *gen 16SRNA* confirmando la presencia de *H.pylori* el carril M representa el marcador de pares de bases (pb).

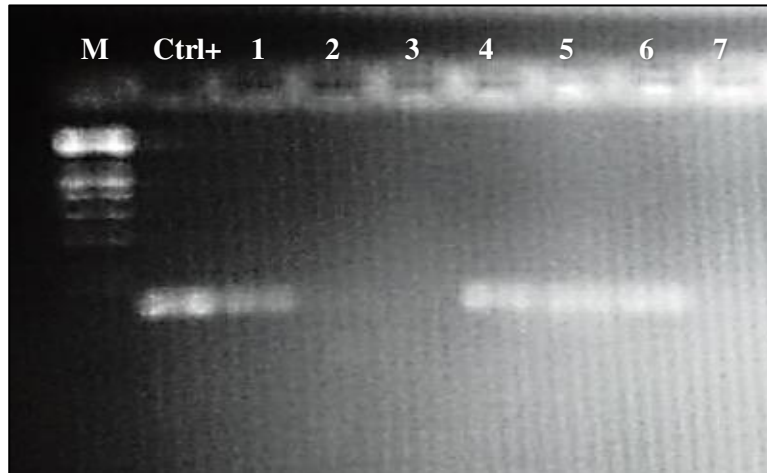


Figura 10 .Confirmación de la presencia de *H. pylori* por el gen *cagA* en electroforesis de gel de agarosa. Resultados de la PCR, positivos al gen *cag A* en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, carril 1,4,5 y 6 se observa la banda esperada para el gen *cag A* confirmando así la presencia dicho gen el carril M representa el marcador de pares de bases (bp).

7.3 Descripción de participantes del estudio

La población observada en Esquípuilas, Chiapas., fue altamente heterogénea. Pacientes del género femenino representaron el 89.5% de los analizados y el masculino el 10.5 % restante; la media de edad de 47.11 (± 12.48) (**Figura 11**).

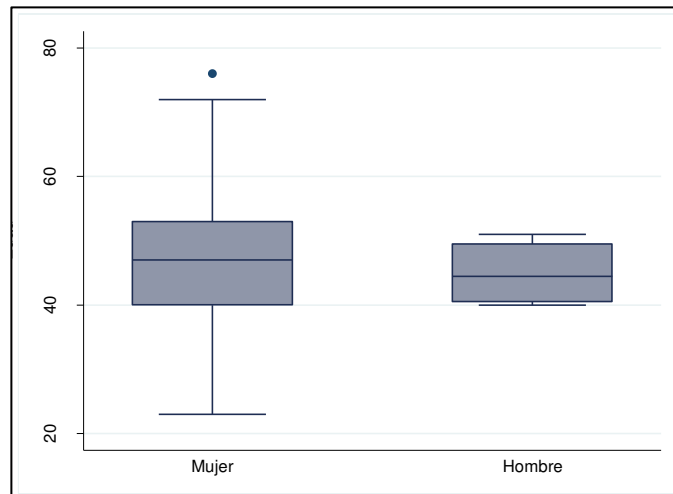


Figura 11. Relación de género y edad de los pacientes de Esquípuilas, Chiapas.

En el examen y registro periodontal (PSR) realizado se determinaron las probabilidades de cada paciente que tiene una enfermedad periodontal determinada dado el puntaje PSR más alto encontrado durante el examen completo este mostró que la mayoría de los pacientes fue diagnosticado con periodontitis moderada (39.5%) seguida de una periodontitis nivel inicial (26.3 %) (**Tabla 3**). Además, se clasificaron tomando en cuenta el índice PSR; el género masculino únicamente presentó la clasificación 3 (**Figura 12**).

Tabla 3. Porcentaje de examen y registro periodontal (PSR)

Patología	Porcentaje %
Gingivitis	2.6
Periodontitis inicial	26.3
Periodontitis moderada	39.5
Periodontitis severa	7.9
Prótesis dental	7.9
Sin información	15.8
Total	100.0

Así mismo, en dicha tabla podemos observar el diagnóstico que presenta cada paciente utilizando el método de PSR.

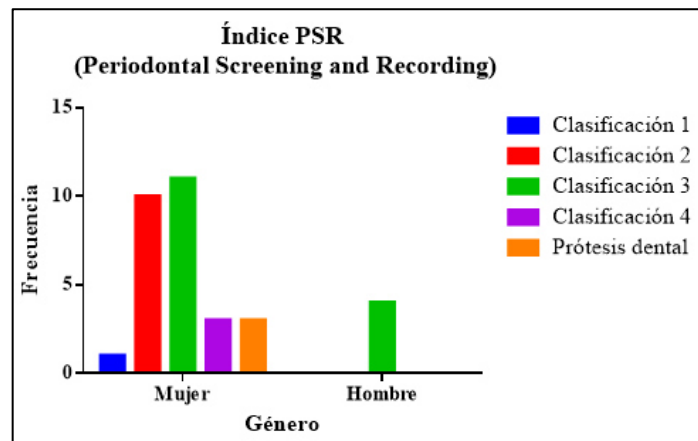


Figura 12. Índice de PSR, en relación al género de los pacientes de Esquímulas, Chiapas. Podemos observar las diferencias de género en los parámetros periodontales y comportamiento de salud oral, mostrando para hombres una periodontitis moderada.

7.4 Relación entre salud odontológica y presencia de *H. pylori*

Se observó la relación que presenta clasificación PSR y la presencia de la bacteria de estudio. Para el *gen vac A* y para el *gen cag A*. Presentando un porcentaje de positividad para el *gen vac A* (63.2%) pudiendo observar que se localiza en mayor porcentaje en la clasificación 2 y clasificación 3 las cuales según el análisis de PSR se pueden describir como periodontitis inicial y periodontitis moderada (**Figura 13**).

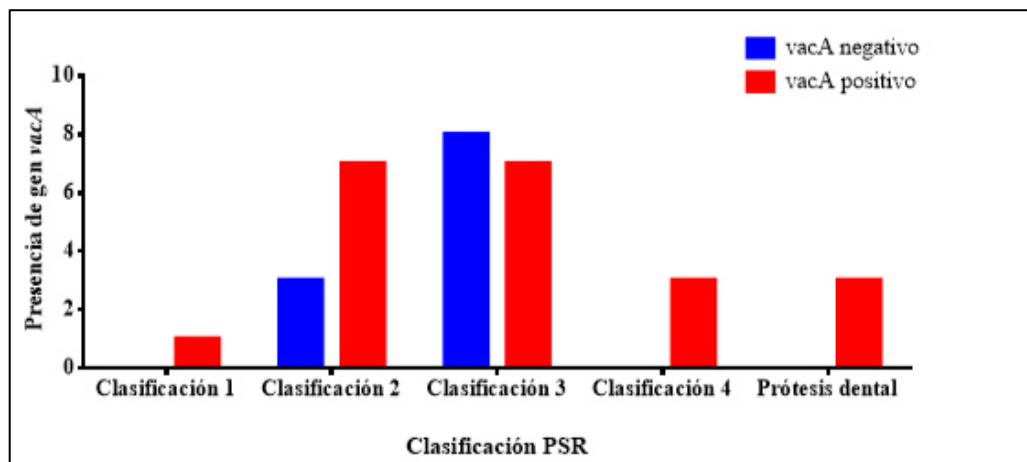


Figura 13. Relación PSR y *gen vac A*. Relación de la clasificación de PSR y presencia de la bacteria de estudio para el *gen vacA*, Mostrando mayor frecuencia en Calificación 2 y 3.

En cuanto a la relación con la bacteria de estudio para el *gen cag A* se observó que presenta un porcentaje de positividad (13%), localizado en la clasificación 2, 3 y 9 (periodontitis inicial, periodontitis moderada y prótesis dental) según el estudio de PSR (**Figura 14**).

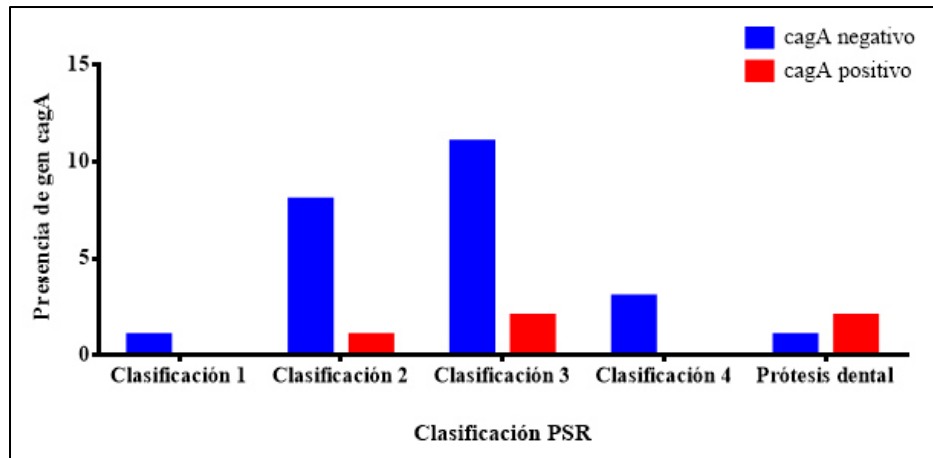


Figura 14. Relación PSR y *gen cag A*. Relación de la clasificación de PSR y presencia de la bacteria de estudio para el *gen cagA*, Mostrando mayor frecuencia en Calificación 2, 3 y 9.

8. DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta que en México, la seroprevalencia de *H.pylori* encontrada es de 20% de los niños al año de edad desarrollando de esta manera anticuerpos IgG contra este microorganismo, 50% es positivo a los 10 años de edad, y la mayor prevalencia se logra alcanzar entre los 25 y 30 años de edad, de esta manera las patologías gastrointestinales relacionadas con esta infección, son demasiado frecuentes, la mayoría de las personas infectadas pueden desarrollar alguna patología gastrointestinal clínica como gastritis, úlcera péptica o cáncer gástrico (Calva *et al.*, 2006). Por ello se hace de suma importancia el estudio de la cavidad bucal ya que se ha propuesto como un reservorio nativo para *H. pylori* y con esto podría explicarse las reinfecciones de las patologías gastrointestinales, posteriores al tratamiento de erradicación de *H. pylori*, proponiendo como principal reservorio la placa dentobacteriana (De La Garza *et al.*, 2003).

Se ha planteado, que la colonización en placa dentobacteriana no logra trascender a algún tipo de enfermedad local, no obstante, en los últimos años se ha encontrado una alta prevalencia de *H. pylori* en la placa dentobacteriana de pacientes con enfermedades periodontales (Kignel *et al.*, 2005).

Diversos estudios basados en técnicas moleculares se han realizado para detectar el ADN de *H. pylori*, mostrando una alta sensibilidad y especificidad (Valdez *et al.*, 2014). En el presente estudio, se diseñó un método de PCR cuantitativo (qPCR) en tiempo real que permite la cuantificación, tiempos de diagnóstico más cortos, mayor sensibilidad para el diagnóstico de *H. pylori* utilizando como referencia el gen *16SRNAr* para la identificación de *H.pylori* y posteriormente se detectó sus genes de virulencia *vac A* y *cag A*.

De los 38 pacientes de este estudio, 89.5% pertenece al género femenino y el 10.5 % al género masculino; a los cuales se les tomo una muestra de placa dentobacteriana donde se encontró que en n=24 (63%) de la población de que participo es positiva a *H.pylori* y al gen de virulencia *vac A*, teniendo una prevalencia similar en otros estudios (Valdez *et al.*, 2014). Para el gen *cag A* se encontró n = 5 (20 %), con respecto a los positivos. Además,

se excluyó la posibilidad de obtener falsos positivos ya que se repitió la prueba varias veces, alcanzando en cada una de ellas la amplificación en el mismo umbral de ciclo.

En cuanto al examen y registro periodontal (PSR) realizado mostró que la mayoría de los pacientes presentan periodontitis moderada (39.5%) seguida de una a de periodontitis en fase inicial (26.3%) similar a lo mostrado en los estudios de (Landry y Jean., 2002). En cuanto a la relación entre salud y oral y la presencia del *gen vac A* presentan una positividad de (63.2%) y para el *gen cag A* presenta un porcentaje de positividad de (13%), contrastando con lo encontrado en estudios previos de (Fernández *et al.*, 2011) y mostrando una similitud a los estudios realizados por (De la Garza *et al.*, 2013).

De esta manera coincidimos con lo publicado por (Kignel *et al.*, 2005), cuando se afirma que en estudios anteriores se ha logrado el uso de la placa dentobacteriana como posible muestra no invasiva para el diagnóstico de *H. pylori*. Así mismo con los resultados obtenidos en esta investigación entramos en concordancia con los estudios publicados (Gebara *et al.*, 2004; De la Garza *et al.*, 2013; Valdez *et al.*, 2014) ya que insinúan que el *H.pylori* se encuentra como reservorio en la cavidad bucal sobre todo en placa dentobacteriana, y que la técnica de PCR tiempo real (qPCR) es la más adecuada por su alta sensibilidad y especificidad para lograr detectar bajo número de bacteria de *H.pylori* y sus genes de virulencia en muestras no invasivas.

9. CONCLUSIONES

En conclusión, nuestros resultados nos permiten confirmar la hipótesis planteada para esta investigación. Es posible detectar la presencia y el genotipo circulante de *Helicobacter pylori* mediante la amplificación del gen *16s* y sus genes de virulencia *cag A* y *vac A* utilizando PCR cuantitativa (qPCR) en placa dentobacteriana en pacientes originarios de la región de Esquipulas, Chiapas, ya que esta ha sido una técnica que muestra resultados satisfactorios en términos de sensibilidad, especificidad, bajo costo y fácil de procesamiento, aunque por supuesto, los estudios complementarios con un mayor número de muestras proporcionaría datos con mayor contundencia. Los buenos resultados obtenidos en este estudio, hacen que esta técnica sea útil tanto para laboratorios de microbiología grandes como pequeños.

En el presente estudio en cuanto a relación de la edad, y la presencia de *H.pylori* no se encontraron diferencias significativas.

En cuanto al gen de virulencia *vac A* de *H.pylori* presenta un porcentaje de positividad de (63.2%) se encontrado en la clasificación 2 y clasificación 3 que corresponden a periodontitis inicial y periodontitis moderada.

Para el gen de virulencia *cag A* presenta un porcentaje de positividad de (13%), localizado en la clasificación 2, 3 y 9 que corresponden a periodontitis inicial, periodontitis moderada y prótesis dental

El análisis de la placa dentobacteriana como método no invasivo para el estudio de *H.pylori* y sus genes de virulencia, mediante la técnica de PCR tiempo real (qPCR) presenta grandes ventajas para aquellos estudios de tipo epidemiológicos en los cuales se pretenda estudiar la prevalencia de infección en la población y su relación con las diferentes patologías gastrointestinales. Este tipo de procedimientos permitirá ampliar el diagnóstico en aquellas personas asintomáticas o con principios de síntomas de alguna patología gastrointestinal.

10. PERSPECTIVAS

Una de las limitaciones de este estudio fue la muestra, debido a que el número de participantes era muy pequeño, por esta razón una mayor cantidad de pacientes, sería ideal para realizar un estudio de tipo casos y control, que permita comparar los datos obtenidos y dar resultados estadísticamente más significativos y confiables.

Se recomienda estudiar las diferentes variantes alélicas del *gen vac A* de *H.pylori* con el fin de predecir las posibles patologías gastrointestinales.

Por lo anterior, se sugiere continuar con estudios que nos permitan conocer la prevalencia de infección por *H.pylori* en nuestra región, en pacientes asintomáticos, como con pacientes con antecedentes de gastritis o dolor abdominal y la posible correlación con los índices de higiene oral.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aceti A, Celestino D, Caferro M, Casale V, Citarda F, Contó E. F, Grassi A, Grilli A, Pennica A, Sciarreta F, Leri O, Ameglio F, Sebastián A. 1991. Basophile-bound and serum immunoglobulin E directed against *Helicobacter pylori* in patients with chronic gastritis. *Gastroenterology*. 101:131-137.
- Amieva M. R, Omar E. E. 2008. Host Bacterial Interactions in *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterology*. 134:306-329.
- Atherton J. C. 1998. *H. pylori* virulence factors. *British Medical Bulletin*. 54:105-120.
- Audibert C, Burucoa C, Janvier B, Fauchere J. L. 2000. Implication of the Structure of the *Helicobacter pylori* cag Pathogenicity Island in Induction of Interleukin-8 Secretion. *Infection and Immunity*. 85:1625-1629.
- Backert S, Selbach M. 2008. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cellular Microbiology*. 10:1573-1581.
- Best L. M, Veldhuyzen van Zanten S. J. O, Sherman P. M, Bezanson G. S. 1994. Serological detection of *Helicobacter pylori* antibodies in children and their parents. *Journal Clinic Microbiology*. 32:1193-1196.
- Brown L. M. 2000. *Helicobacter pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiologic reviews*. 22:283-297.
- Bürgers R, Schneider-Brachert W, Reischl U, Behr A, Hiller K. A, Lehn N, Schmalz G, Ruhl S. 2008. *Helicobacter pylori* in human oral cavity and stomach. *European journal of oral sciences*. 116:297-304.
- Calva R, Luna J. J, Lagunes B, Rivera M. E, Calva D, Santos E. 2006. Prevalence and Risk Factors of *Helicobacter Pylori* Infection in Three Populations of Children in Puebla, Mexico. *Gastroenterología de México*. 71:440-445.
- Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree J. E, Ghiara P, Borodovsky M, Rappuoli R, Covacci A. 1996. *Cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type-I specific and disease-associated virulence factors. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93:14648-14653.

- Cohen H, Laine L. 1997. Endoscopic methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Alimentary Pharmacology Therapeutic*. 11:3-9.
- Cover T. L, Tummuru M. K. R, Cao P, Thompson S. A, Blaser, M. J. 1994. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *The Journal of Biological Chemistry*. 269:10566-10573.
- Czinn S J. 2005. *Helicobacter pylori* infection: Detection, investigation and management. *Journal Pediatric*. 146:21-26.
- Bernard M, Arico B, Papini E, Rizzuto R, Grandi G, Rappuoli R, Montecucco C. 1997. *Helicobacter pylori* toxin *vac A* induces vacuole formation by acting in the cell cytosol. *Molecular Microbiology*. 26:665–674.
- De La Garza M. A, Valdez J, Elizondo R, Pereyra B, Caffesse R, González F. 2013. Prevalence of *Helicobacter pylori* in saliva and dental plaque related to periodontal disease and gastritis. *African Journals*. 7:2505-2509.
- Dueber E. C, Costa A, Corn J. E, Bell S. D, Berger J. M. 2011. Molecular determinants of origin discrimination by *Orc1* initiators in archaea. *Nucleic Acids Research*. 39:3621–3631.
- Dunn B. E, Phadnis S. H. 1999. Structure, Function and Localization of *Helicobacter pylori* Urease. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 71:63-73.
- Fennerty M. B. 2005. *Helicobacter pylori*: Why it still matters in 2005. *Cleveland Clinic journal of Medicine*. 72:1-7.
- Fernández G, Axinecuilteco J, Silvia Giono S, Martínez D, Illades B, A Román A. 2011. *vac A* genotypes in oral cavity and *Helicobacter pylori* seropositivity among adults without dyspepsia. *Oral Medicine and Pathology*. 16: 175-180.
- Gebara E. G, Pannutic, Faria C. M, Chehter L, Mayer M. P, Lime L. A. 2004. Prevalence of *Helicobacter pylori* detected by Polymerase chain reaction in the oral cavity of periodontitis patients. *Oral microbiology and Immunology*. 19:277–280.
- Giono S, Camorlinga M, Aguilar G. 2006. Diagnóstico microbiológico, serológico, genotipificación de *Helicobacter pylori* aislado de biopsias de niños y adultos. Detección molecular de la isla de patogenicidad *cag* de *Helicobacter pylori*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48:99–104.

- Go M. F. 2002. Natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Alimentary Pharmacology and Therapeutic*. 16:3-15.
- Goodwin C. S, Worsley B. W. 1993. Microbiólogo of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clínica of North*. 22:5-19.
- Hatakeyama M, Higashi H. 2005. *Helicobacter pylori cag A*: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Science*. 96:835-843.
- Ihan A, Pinchuk I. V, Beswick E. J. 2012. Inflammation, Immunity and Vaccines for *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 17:16-21.
- Justin T, Schwartz and Lee-Ann H, Allen. 2006. Role of urease in megasome formation and *Helicobacter pylori* survival in macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 79:1214-1225.
- Kignel S, De Almeida F, André E. A, Alves M. P, Birman E. G. 2005. Occurrence of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva of dyspeptic patients. *Oral Disease*. 11:17-21.
- Kusters J. G, Vliet A. M. A. M, Kuipers E. J. 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 19:449-490.
- Kutter S, Buhrdorf R, Haas J, Schneider-Brachert W, Haas R, Fischer W. 2008. Protein Subassemblies of the *Helicobacter pylori cag* Type IV Secretion System Revealed by Localization and Interaction Studies. *Journal of Bacteriology*. 190:2161-2171.
- Landry R. G, Jean M. 2002. Periodontal Screening and Recording (PSR) Index: precursors, utility and limitations in a clinical setting. *International dental journal*. 52:35-40.
- Leunk R. D, Johnson P. T, David B. C, Kraft W. G, Morgan D. R. 1988. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *Journal Medical Microbiology*. 26:93-99.
- Logan P. R. H. 1996. Adherence of *Helicobacter pylori*. *Alimentary Pharmacology Therapeutics*. 10: 3-15.
- Lu Y, Redlinger T. E, Avitia R, Galindo A, Goodman K. 2002. Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated Municipal wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:1436-1439.

- Maeda S, Yoshida H, Ikenoue T, Ogura K, Kanai F. 1999. Structure of *cag* Pathogenicity Island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates. *Gut*. 44:336-341.
- Magalhaes D. M, Luzzi F. 2006. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*. 11:1-5.
- Mapstone N. P, Lynch D. A. F, Lewis F. A, Axon A. T. R, Tompkins D. S, Dixon M. F. 1993. Identification of *Helicobacter pylori* ADN in the mouths and stomachs of patients with gastritis using PCR. *Journal Clinical Pathology*. 46:540-543.
- Marshall B. J, Armstrong J. A, Mcgechie D. B, Glancy R. J. 1985. Attempt to fulfil Koch's postulates for *Campylobacter pylori*. *Medical Journal of Australia*. 142:436-439.
- Miehle S, Kirsch C, Agha-Amiri K, Günther T, Lehn N, Malfertheiner P, Stolte M, Ehninger G, Bayerdorffer E. 2000. The *Helicobacter pylori vacA s1, m1* genotype and *cagA* are associated with gastric carcinoma in Germany. *International Journal of Cancer*. 87:322-327.
- Mierzejewska J, Jagura-Burdzy G. 2012. Prokaryotic *ParA–ParB–parS* system links bacterial chromosome segregation with the cell cycle. *Plasmid*. 67:1–14.
- Montecucco C, Rappuoli R. 2001. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2:457-466.
- Neri M, Susi D, Bovani I, Laterza F, Mezzetti A, Cuccurullo F. 1994. Bacterial mucosal infiltration in *Helicobacter pylori*-associated gastritis: histological and clinical consequences. *American Journal of Gastroenterology*. 89:1801-1805.
- O'Keefe J, Moran A. P. 2008. Conventional, Regulatory, and Unconventional T Cells in the Immunologic Response to *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 13:1–19.
- Ogiwara H, Graham D, Yamaoka Y. 2008. *vacA* i Region subtyping. Correspondence. *Gastroenterology*. 134:1267–1276.
- Phadnis S. H, Ilver D, Jazon L, Normark S, Westblom T. U. 1994. Pathological significance and molecular characterization of vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*. 62:1557-1565.
- Rathbone B. J, Wyatt J. I, Worsley B. W, Shires S. E, Trejdosiewicz L. K, Heatley R. V, Lowosky M. S. 1986. Systemic and local antibody responses to gastric *Campylobacter pyloridi* in non-ulcer dyspepsia. *Gut*. 27:642-647.

- Reyrat J. M, Pelicic V, Papini E, Montecucco C, Rappuoli R, Telford J. L. 1999. Towards deciphering the *Helicobacter pylori* cytotoxin. *Molecular Microbiology*. 34 :197–204.
- Rhead J. L, Letley D. P, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi M. A, Eshagh Hosseini M, Atherton J. C. 2007. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology*. 133:926–36.
- Saadat I, Higashi H, Obuse C, Umeda M, Murata-Kamiya N, Sait Y, Lu H, Ohnishi N, Azuma T, Suzuk A, Ohno S, Hatakeyama M. 2007. *Helicobacter pylori* *cag A* targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature*. 447:330-333.
- Sepúlveda T. E, Briceño C, Spencer M, Quilodrán S, Brethauer U, Moreno J, y Garcia A. 2008. Detección de *Helicobacter pylori* en mucosa gástrica y cavidad oral. *Gastroenterol. Latinoamericana*. 19:73-79.
- Sewald X, Gebert-Vogl B, Prassl S, Barwig I, Weiss E, Fabbri M, Osicka R, Schiemann M, Busch D. H, Semmrich M, Holzmann B, Sebo P, Haas R. 2008. Integrin subunit CD18 Is the T-lymphocyte receptor for the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cell host microbe*. 3:20–29.
- Sicinski L, Correa P, Bravo L and Schneider B. 2003. A positive assay for identification of *cag A* negative strains of *Helicobacter pylori*. *J Microbiol Meth*.55: 625–633.
- Suerbaum S, Smith J. M, Bapumia K, Morelli G, Smith N. H, Kuntsmann E, Dyrek I, Achtman M. 1999. Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academic of Science of USA*. 95:12619-12624.
- Thomas J. E, Gibson G. R, Darboe M. K, Dale A, Weaver L. T. 1992. Isolation of *H. pylori* from human faeces. *Lancet*. 340:1194-1195.
- Tomb J. F, White O, Kerlavage A. R, Clayton R. A, Sutton G. G, Fleischmann R. D, Ketchum K. A, Klenk H. P, Gill S, Dougherty B. A, Nelson K, Quackenbush J. 1997. The Complete Genoma Secuence of Pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 338:539-547.

- Tummuru M. K, Cover T. L, Blaser M. J. 1993. Cloning and expression of a highmolecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of a linkage to cytotoxin production. *Infection and Immunity*. 61:1799-1809.
- Valdez J. A, Mares C. M. J, Kowolik M. J, Vargas J, González F, De la Garza M. A. 2014. Detección of *helicobacter pylori* in dental plaque of mexican children by real-time PCR. *Health*. 6:231-235.
- Valnes K, Brandtzaeg P. 1989. Subclass distribution of mucosal IgG producing cells in gastritis. *Gut*. 30:322-326.
- Wen S, Moss S. F. 2009. *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Letters*. 282:1-8.
- Wilson K. T, Crabtree J. E. 2007. Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. *Gastroenterology*. 133:288-308.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Carlos Eduardo Flores Treviño

Candidato para el Grado de

Maestría en Ciencias con Orientación en Immunobiología

**Tesis: DETECCIÓN MOLECULAR DE *Helicobacter pylori* Y GENOTIPIFICACIÓN
CON BASE EN SUS GENES DE VIRULENCIA *cag A* Y *vac A* EN PLACA
DENTOBACTERIANA EN PACIENTES DE LA REGION DE
ESQUIPULAS CHIAPAS**

Campo de estudio: Ciencias Biológicas

Datos personales: Nacido en San Pedro Garza García, Monterrey N.L el 5 de Agosto de 1988, hijo de Carlos José Flores González y Ofelia Treviño Casillas.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Cirujano Dentista en el año 2011

Experiencia profesional: Maestro de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde el 2015. Asistente de investigación en la Unidad De Odontología Integral y Especialidades en el C.I.D.I.C.S.

ANEXOS

ANEXO 1

Glosario

Ácido nucleico: Nombre genérico que se aplica indistintamente al ADN o ARN de las dos moléculas informacionales de los seres vivos.

ADN (ácido desoxirribonucleico): molécula que almacena la información genética.

Gen: Unidad física y funcional del material hereditario que determina un carácter del individuo y que se transmite de generación en generación. Su base material la constituye una porción de cromosoma (locus) que codifica la información mediante secuencias de ADN.

Genoma: Término que denota a todo el material genético de un organismo vivo

Microorganismo: Organismos microscópicos pertenecientes por regla general a virus, bacterias, algas, hongos o protozoos.

Nucleótido: Unidad fundamental de los ácidos nucleicos. Constituida por una base, un azúcar y un fosfato.

Oligonucleotido (primer): Secuencia lineal de nucleótidos unidos por enlaces

fosfodiéster, habitualmente no mayor de 50 nucleótidos.

Protocolo: Documento de normalización que establece su justificación, los objetivos, el diseño, la metodología y el análisis previsto de los resultados así como las condiciones bajo las que se realizará y desarrollará.

Reacción en cadena de polimerasa (PCR): Técnica de análisis del genoma mediante la amplificación ilimitada de porciones específicas del ADN, aunque sean minúsculas. Es un método revolucionario de amplificación exponencial del ADN por la intervención de una enzima termoestable (*Taq* polimerasa), inventado por el americano Kary Mullis en 1985.

Secuencia de ADN: Orden de encadenamiento de las bases nitrogenadas de los nucleótidos que constituyen el ADN y que cifra toda la información genética.

Temperatura de disociación (T_m): Temperatura media de disociación en el que la se separa la doble cadena de ADN en cadenas sencillas por medio de calor o utilizando agentes químicos.

ANEXO 2

PROTOCOLOS

Electroforesis en gel de agarosa al 2%

Gel de 100 ml

1. Pesar 2 g de agarosa para electroforesis.
2. Medir en probeta 100 ml de buffer de corrimiento TAE o TBE 1x
3. Mezclar ambos compuestos en un matraz suavemente y colocarlo en el horno de microondas y calentarlo en máxima potencia por un minuto o hasta que este completamente transparente. Dejar enfriar un poco
4. Una vez enfriado el gel aun sin solidificar, agregar 1 µl de bromuro de etidio (EtBr) y homogenizarlo en la solución.
5. Vaciar la mezcla en la caja de electroforesis y colocar el peine para que se formen los pozos. Dejar solidificar.
6. En lo que se solidifica el gel, se alistan las muestras, las cuales se preparan mezclándolas con buffer de carga al 6x, aproximadamente de 8 a 10 µl de muestra, dependiendo del volumen que se tenga de PCR.
7. Cuando se solidifica el gel, agregar a la cámara buffer de corrimiento hasta que sobrepase el gel.
8. Colocar las muestras en los pozos formados, cerrar la cámara y aplicar voltaje.
9. Dejar correr por el tiempo necesario, aproximadamente por 1 hora.

ANEXO 3

REACTIVOS Y SOLUCIONES

1. 10x TBE (Tris-Bortato-EDTA) pH = 8.0 (1 L)

108 g Trisma base

55 g Ácido bórico

40 ml 0.5 M EDTA (pH=8.0)

Aforar a 1000 ml y proceder a esterilizar en autoclave a 15 lb por 20 min. Almacenar a temperatura ambiente.

2. 10x TE (Tris-EDTA) pH= 8.0 (1 L)

100 ml 1M Tris Cl

20 ml 0.5 M EDTA (pH=8.0)

Aforar a 1000 ml y proceder a esterilizar en autoclave a 15 lb por 20 min. Almacenar a temperatura ambiente.

ANEXO 4

Transmisión de *H.pylori*

Tipo de Transmisión		Rutas de Transmisión	
Transmisión Directa	Oral-Oral	Fecal-Oral	Gastro-oral
Transmisión Indirecta	Factores ambientales	agua contaminada y biofilm de <i>H.pylori</i> que se forma en la superficie de las tuberías de aguas	Los niños pequeños en grupo o las familias con muchos niños. Exposición profesional de enfermeras y gastroenterólogos realizando procedimientos endoscópicos a través de la superficie del endoscopio contaminado

ANEXO 5

Carta de Consentimiento

Fecha_____

Yo:_____

Por medio de la presente doy mi autorización y consentimiento al cd. Carlos Eduardo Flores Treviño. Para que utilice las muestras de placa dentobacteriana obtenidas en la clínica de Esquipulas Chiapas, para realizar el estudio “*Detección molecular de Helicobacter pylori y genotipificación con bases en sus genes de virulencia cag A y vac A en placa dentobacteriana*”.

Previamente se me dio una explicación de dicha investigación y estoy de acuerdo en que se utilice la muestra para los fines del estudio y no tengo objeciones con el mismo.

Nombre y Firma del Paciente

ANEXO 6

Placa de 96 pozos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10ng	P1	P5	P9	P13	P17	P21	P25	P29	P33	P37	
B	20ng	P2	P6	P10	P14	P18	P22	P26	P30	P34	P38	
C	40ng	P3	P7	P11	P15	P19	P23	P27	P31	P35	Ctrl -	
D	80ng	P4	P8	P12	P16	P20	P24	P28	P32	P36		
E												
F												
G												
H												

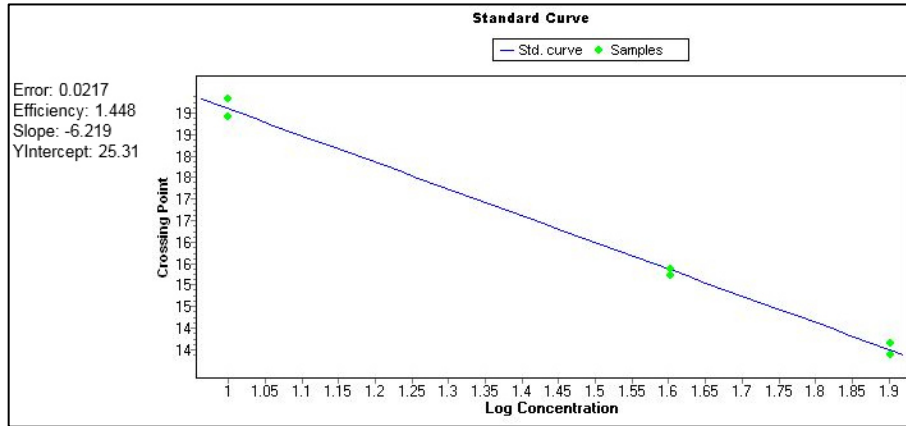
Llenado de la placa de 96 pozos. Para amplificación por qPCR para el *gen 16SRNAr*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10ng	10ng	P1	P5	P9	P13	P17	P21	Ctrl -			
B	20ng	20ng	P2	P6	P10	P14	P18	P22	Ctrl -			
C	40ng	40ng	P3	P7	P12	P15	P19	P23	P31			
D	80ng	80ng	P4	P8	P11	P16	P20	P24				
E												
F												
G												
H												

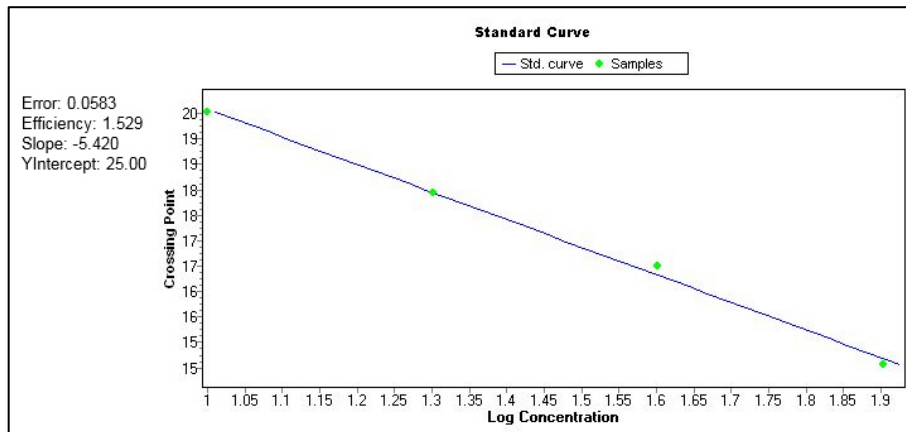
Llenado de la placa de 96 pozos. Para amplificación por qPCR para el *gen vac A y cag A*

ANEXO 7

Curva de eficiencia de amplificación en muestras con el gen *16SRNAr*



Curva de eficiencia de amplificación en muestras con el gen *vac A*



Curva de eficiencia de amplificación en muestras con el gen *cag A*

