



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE MEDICINA
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN GASTROENTEROLOGÍA
SERVICIO ONCOLÓGICO HOSPITALARIO DEL INSTITUTO VENEZOLANO DE LOS
SEGUROS SOCIALES

**GENOTIPOS *cagE* Y *virB11* DE *HELICOBACTER PYLORI* ASOCIADOS A
PATOLOGIAS GASTRODUODENALES**

Trabajo Especial de Grado que se presenta para optar al título de especialista en
Gastroenterología

Roscelys Margarita Cumana Betancourt

Mailyn Thais Soto Grazzina

Tutor: Manuel Bronstein

Caracas, diciembre 2012

Dr. Manuel Bronstein

Tutor

Dra. Judith Salazar B

Jefe del Servicio de Gastroenterología

Servicio Oncológico Hospitalario del Instituto Venezolano de los Seguros Sociales

Dr. José Roberto Soto

Coordinador de Postgrado

Servicio Oncológico Hospitalario del Instituto Venezolano de los Seguros Sociales

DEDICATORIA

Gracias a Hashem por
Todo lo que me has dado,
La familia y amigos que me rodean.
Raquel eres mi inspiración

Mailyn Soto de Bendahan

Ante todo, Gracias a Dios.
Mi familia, mis amigos y a todas
las personas que me permiten cumplir
todos los días mis sueños y metas.

Roscelys M. Cumana Betancourt

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
MÉTODOS	15
RESULTADOS	19
DISCUSIÓN	21
REFERENCIAS	27
ANEXOS	32

GENOTIPOS *cagE* y *virB11* DE *HELICOBACTER PYLORI* ASOCIADOS A PATOLOGIAS GASTRODUODENALES

Cumana Betancourt, Roscelys Margarita C.I. 14.420.887 Sexo: Femenino, E-mail: roscelyscumana@hotmail.com . Telf: 0414-0906890/0212-2399846. Dirección: Servicio Oncológico Hospitalario del Instituto Venezolano de los Seguros Sociales (IVSS). Curso de Especialización en Gastroenterología. Caracas, Venezuela.

Soto Grazzina, Mailyn Thais C.I. 15.062.352. Sexo: Femenino, E-mail: grazzina2002@hotmail.com . Telf: 0414-2422716/0212-7931109. Dirección: Servicio Oncológico Hospitalario del IVSS. Curso de Especialización en Gastroenterología. Caracas, Venezuela

Tutor: Bronstein C, Manuel C.I: 2.838.665. Sexo: Masculino. E-mail: menahenmendelb@hotmail.com Dirección: Servicio Oncológico Hospitalario del IVSS. Curso de Especialización en Gastroenterología. Caracas, Venezuela

RESUMEN

Objetivo general: Estudiar genotipos de la isla de patogenicidad (*cag*-PAI) de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) a través de la detección de los genes *cagA*, *cagE* y *virB11* por PCR, en pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma gástrico (n:20), linfoma gástrico (n:5) y compararlos con pacientes sin neoplasia gástrica (n:44). **Método:** se evaluaron 3 grupos para el estudio: 26 pacientes con adenocarcinoma gástrico, 5 pacientes con linfoma y 44 pacientes sin patología maligna (grupo control), se realizó pruebas para el diagnóstico histológico del *H. pylori*, extracción de ADN y análisis de PCR determinándose el porcentaje en cada grupo de la presencia de los genes antes mencionados. **Discusión:** Los datos referentes a los pacientes con neoplasia gástrica, en forma aislada son muy similares a los artículos publicados a nivel mundial donde establecen una fuerte relación entre los genes *cagA*, *cagE*, *virB11* y cáncer gástrico sin embargo al relacionarlos con el grupo control la hipótesis pierde validez por el resultado observado. **Conclusiones:** No hubo relación estadísticamente significativa en los pacientes sin patología gastrointestinal maligna y la presencia de cepas de *H.pylori* con los genes *cagA*, *cag E* y *virB11*.

Palabras clave: *H.pylori*, *cagA*, *cagE*, *virB11*, Cáncer gástrico, MALToma, linfoma de células grandes.

ABSTRACT

GENOTYPES *cagE* y *virB11* OF HELICOBACTER PYLORI ASSOCIATED GASTRODUODENAL DISEASES

General objective: study island pathogenicity (*cag*-PAI) genotypes of *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) through the detection of genes *cagA*, *cagE* and *virB11* by PCR in patients with diagnosis of gastric adenocarcinoma (n:20), gastric Lymphoma (n:5) and compared with patients without gastric neoplasm (n:44). **Method:** we assessed 3 groups for study, including follows: 26 patients with gastric adenocarcinoma, 5 patients with lymphoma and 44 patients without malignant pathology as a control group, was carried out tests for the histological diagnosis of *H. pylori*, as well as DNA extraction and PCR analysis determining the percentage in each group of the presence of the mentioned genes. **Discussion:** Data concerning patients with gastric neoplasm in isolation are very similar to the articles published around the world where established a strong relationship between genes *cagA*, *cagE*, *virB11* and gastric cancer however to relate them with the control group the hypothesis null and void by the observed result. **Conclusions:** There was no statistically significant relationship in patients without malignant gastrointestinal pathology and the presence of strains of *H. pylori* with genes *cagA*, *cagE* and *virB11*.

Key words: *H.pylori*, *cagA*, *cagE*, *virB11*, gastric cancer, MALToma, large cell lymphoma.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (*H. pylori*), es una de las bacterias más controvertidas a nivel mundial, estando relacionada directamente con la aparición de cáncer gástrico; por su parte la Organización Mundial de la Salud (OMS), la considera un carcinógeno tipo I. Los mecanismos por los cuales se desarrolla el cáncer gástrico, linfoma o úlceras gástricas está determinado por la genética bacteriana, sin embargo, no está completamente claro cuales genes están involucrados, por lo que ha sido el motivo de diversos estudios a nivel local o mundial.

Planteamiento del problema:

Una de las bacterias patógenas más comunes en humanos es *Helicobacter pylori*, se estima que más de la mitad de la población mundial está infectada con esta bacteria, países como Japón y Colombia muestran alta incidencia. ⁽¹⁻⁴⁾ Del total de personas infectadas, 15-20 % son asintomáticos. ⁽⁵⁾ En Venezuela, la tasa de infección se estima por encima del 90 %, entre la población asintomática y sintomática, estadísticamente se asocia el *H. pylori* solo en un 2 % al cáncer gástrico, los estados con mayor índice de morbi-mortalidad por esta patología son: Táchira, Mérida, Trujillo, Sucre, Distrito Capital y Delta Amacuro. En el estado Táchira existe una de las más altas prevalencias de infección (90 % a 96 %) y es allí donde también se reporta alta incidencia de carcinoma gástrico que se ha asociado a la presencia de *H. pylori* en numerosos estudios. ⁽⁶⁾ Hace más de dos décadas se estableció claramente que la infección por Hp y la aparición de gastritis y úlcera péptica estaban asociadas. En la actualidad la infección por Hp ha sido reconocida como carcinógeno humano por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (International Agency for research on cáncer), asociándolo con un fuerte nexo a una serie de procesos oncogénicos que finalmente pueden conllevar a la aparición primaria de gastritis aguda, seguida de gastritis crónica, atrófica, metaplasia intestinal y, finalmente, del cáncer gástrico. ⁽⁷⁾ La citotoxina *cagA* y *vacA* han sido relacionadas ampliamente como factor de virulencia responsable de la aparición del cáncer gástrico. Se ha establecido una relación de 93 % -95 % entre infección por Hp y cáncer gástrico en múltiples estudios; sin embargo, llama la atención que a pesar de la alta tasa de

aparición del Hp, en países como China y Japón, donde la presencia de las citotoxinas *cagA* y *vacA* en las cepas infectantes es casi universal, no se registren complicaciones de la enfermedad gastroduodenal en los individuos positivos para la infección, lo que conlleva a la investigación de nuevos factores de virulencia bacterianos involucrados en la carcinogénesis gástrica⁽⁸⁾ surgiendo la siguiente interrogante: ¿Cuál será la relación entre la neoplasia gástrica y la expresión de los genotipos *cagA*, *cagE* y *virB11* de *H. pylori*?

Justificación e importancia:

Se han encontrado diversos factores, tanto de la bacteria como del huésped, que influyen en el desarrollo de la oncogénesis; tales como la presencia de *cagA* (cytotoxin associated gen), *vacA* (A de la citoxina vacuolizante), ureasa, BabA2, hemolisinas, b-catenina, gastrina, mucinasa, catalasa, proteínas de shock térmico, lipasa, y factor activador de plaquetas, por parte de la bacteria,⁽⁹⁾ y factores extrínsecos a ella y propios del hospedero como los antecedentes genéticos, respuesta inmune, reinfección, dieta, ingesta de alcohol y hábitos tabáquicos; sin embargo no existen datos suficientes que expliquen la variedad de síntomas y enfermedades relacionadas a la infección por la bacteria. Uno de los más importantes factores de virulencia es el islote de patogenicidad *cagA*, el cual contiene 31 genes, incluyendo el *cagA*, estos codifican 6 proteínas que actúan en un complejo sistema de secreción (tipo IV), encargado de la translocación proteica de la bacteria dentro de la célula huésped, actividad dependiente de la enzima ATPasa.⁽¹⁰⁾ Otro de los genes incluido en el islote de patogenicidad, es el *cagE*, ubicado en el brazo derecho y el *virB11*, ubicado en el brazo izquierdo, recientemente relacionados con la carcinogénesis gástrica⁽¹¹⁾.

La integridad del islote de patogenicidad juega un papel importante en la virulencia de la bacteria, se ha observado en un mismo huésped y hasta en una misma muestra de biopsia, diferentes cepas infectantes de Hp; se ha creado mucha controversia en cuanto a la relación de los factores de virulencia y la patogenia de la infección por Hp, anteriormente se pensaba que el gen *cagA* estaba claramente relacionado con la aparición de cáncer gástrico, sin embargo resultados posteriores ponen esta relación en duda: existe evidencia de que niños infectados con cepas *cagA* positivo, no desarrollan enfermedad ulcero péptica, ni cáncer⁽¹⁰⁾. Estudios

recientes han demostrado la relación de nuevos genes como el *cagE* y *virB11* en la aparición de cáncer gástrico.

A pesar de la elevada prevalencia de infección por *H. pylori* en nuestro país, aún son pocos los trabajos en genotipificación de cepas incluyendo los genes *cagA* y *cagE*, y no se encuentran trabajos con respecto al gen *virB11*; de allí la importancia de este trabajo de investigación cuya finalidad es ampliar conocimientos en materia de carcinogénesis gástrica y lograr en un futuro prevenir el desarrollo de neoplasia gástrica en pacientes infectados por *H. pylori*.

Antecedentes:

En la literatura se encontraron estudios en los cuales se relaciona la genética de *H. pylori* y diferentes patologías gastrointestinales, en nuestro país destaca el estudio realizado en el Hospital Antonio María Pineda, en Barquisimeto (Lara) en el año 2009, por Armanie et al,⁽¹²⁾ el cual estudia la asociación entre los factores bacterianos y del huésped en la infección por *Helicobacter pylori* y lesiones pre-malignas de cáncer gástrico, obteniendo como resultado que el 98,5 % de la población estudiada estaba infectada por *H. pylori*, y el *cagA* era el gen más frecuentemente involucrado. Otro estudio importante fue el de genotipos *vacA* de *Helicobacter pylori* por Perrone et al.⁽¹³⁾ El análisis de la región media de *vacA* reveló que 42 (51 %) fueron *vacA* m1, 26 (32 %) m2 y 14 (17 %) no tipificaron para m1 o m2. Los resultados evidenciaron una alta frecuencia de infección por *H. pylori* genotipo *vacA* variante alélica s1/ m1. No se encontraron trabajos en Venezuela donde se estudie la relación del *cagE* y *virB11* y la patología gastrointestinal.

A nivel mundial destaca el estudio realizado en Colombia por Quiroga et al,⁽¹⁴⁾ en el que analizan la frecuencia de los genotipos *babA2*, *oipA* y *cagE* de *Helicobacter pylori* en pacientes colombianos con enfermedades gastroduodenales, obteniendo como resultado que la frecuencia de los genotipos *cagA*, *cagE*, *babA2* y fueron de 73 %, 75 %, 48 % y 74 %, respectivamente. Se observó una mayor frecuencia de cepas citotóxicas en pacientes con cáncer (84 %), metaplasia (91 %) y úlcera (81 %) en comparación con pacientes con gastritis no atrófica (50 %).

Estudios más recientes encontrados en la literatura corresponden al realizado por Portela et al,⁽¹¹⁾ en Brasil, publicado en febrero de 2010 en el cual se analiza la relación entre los genes *cagE* y *virB11* de Hp y el cáncer gástrico, encontrando que el Hp fue detectado en 94 de los 101 muestras estudiadas, fueron agrupados en 4 categorías *cagE+/virB11+*, *cagE+/virB11-*, *cagE-/virB11+*, y *cagE-/virB11-*, obteniendo una frecuencia de 50 % (47/94) *cagE+/virB11+*, 3,2 % (3/94) *cagE+/virB11-*, 10,6 % (10/94) *cagE-/virB11+* y 36,2 % (34/94) *cagE-/virB11-*⁽¹¹⁾.

Estos mismo autores publicaron nuevamente en 2011, cuando realizan el protocolo del estudio anterior pero ahora relacionándolo con los alelos *VacA*, *CagA*, concluyen básicamente que el islote de patogenicidad *vacAs1m1* y *Cag-PAI*, *CagE*, *VirB11* son marcadores importantes en el desarrollo de cáncer gástrico.⁽¹⁵⁾

Marco teórico

Helicobacter pylori (*Hp*) fue descrito en 1983 por Warren y Marshal⁽¹⁶⁾, dos investigadores australianos que lo describieron como un bacilo gram negativo, curvado, móvil, no fermentador y no oxidante (metabólicamente inerte), que precisa de una atmósfera microaerófila para su crecimiento, cuya característica bioquímica más importante es la producción de abundante ureasa. En el hombre es posible su aislamiento en el estómago en todas las edades, desde la infancia hasta la edad adulta, lo que ha planteado la duda de si *H. pylori* se trata de un patógeno gástrico.⁽⁷⁾

Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*: en individuos sanos la infección puede observarse en países en vías de desarrollo desde antes de los 10 años de edad, mientras que en los desarrollados se observa un incremento de la prevalencia de acuerdo con la edad.^(17,18) De igual manera se ha realizado una asociación entre virus del herpes simple tipo 1 (VHS-1) y la infección por *Helicobacter pylori*,⁽¹⁹⁾ así como parásitos como *Giardia lamblia*, no encontrándose en otros agentes parasitarios.⁽²⁰⁾ Los estudios sugieren que la vía de transmisión más probable es la fecal oral⁽²¹⁾. Existe una mayor prevalencia de seropositividad

de IgG en 87 pacientes de Indonesia quienes adquirieron infección por *Salmonella tify*, que en 232 pacientes controles (67 % vs 50 %, p= 0.008).⁽²²⁾

El factor ambiental quizás es el más importante debido al factor socioeconómico de la familia desde la infancia, que se refleja en la cantidad de personas que comparten una vivienda, una cama y ausencia de red de agua potable, y es probable que todos ellos sean marcadores del nivel de saneamiento e higiene de la vivienda.⁽⁷⁾ Junto con la mejora del estado socioeconómico de los individuos y los países, disminuyó la prevalencia en generaciones más jóvenes.⁽²³⁾

Factores genéticos: por medio de reacción de cadena de polimerasa se puede determinar el ADN del *Helicobacter pylori* y determinar ciertos genotipos denominados factores de virulencia, entre ellos tenemos:

***Factores de colonización** son los atributos del *H.pylori* para que persista a pesar de los intentos del individuo de deshacerse de la infección. Esto lo puede hacer mediante la **motilidad de los flagelos**, los cuales son unipolares recubiertos que, con su forma espiralada permite que los microorganismos se muevan con rapidez en la luz del estómago, donde el pH es casi neutro para permitir un crecimiento óptimo.⁽⁷⁾

***Ureasa**, el *H. pylori*, es un productor potente de ureasa, que permite ser fuente de nitrógeno esencial para la síntesis de proteínas (por medio de la hidrólisis de la urea en dióxido de carbono y amoníaco) y así mantener un medio ideal.⁽²⁴⁾

***Factores de adherencia**, la capacidad de unirse al epitelio de tipo gástrico en forma específica se denomina tropismo tisular, una propiedad que evita que el microorganismo se desprenda durante el recambio celular y mucoso.⁽²⁵⁾ La adherencia también puede ser importante para dirigir toxinas y reclutar leucocitos en el epitelio del huésped.^(26,27) Se describe una hemaglutinina fibrilar ligadora de N-acetilneuraminilactosa para Hp, con un receptor glicerolipoide gástrico específico en las células mucosas del estómago^(28,29). La unión firme de la adhesina fibrilar sobre la bacteria al receptor del carbohidrato en la célula mucosa desencadena la formación de una lesión adherente-destructora (pedestal de adherencia) que, en definitiva, genera polimerización de la actina y es posible que la ruptura de la célula epitelial

^(30,31). La falla de la adherencia genera menor lesión de la célula epitelial. Como en la mayoría de los patógenos, hay varias adhesinas y la redundancia del sistema hace inútil la estrategia de emplear antiadhesinas para lograr un tratamiento exitoso. Se sugirió que las diferencias en la disponibilidad de receptores específicos es un medio para explicar variabilidades genéticas en la susceptibilidad a la infección por Hp. ⁽⁷⁾

Factores que median la lesión tisular.

Lipopolisacáridos: son una familia de glucolípidos que aparecen en la envoltura celular de las bacterias gram negativas, inclusive Hp. Como están unidos a bacterias también se denominan endotoxinas. Los lipopolisacáridos, en mayor medida por medio del componente lipídico A, estimulan la liberación de citotoxinas y poseen propiedades endotóxicas. Además los lipopolisacáridos, interfieren con la interacción entre la célula epitelial gástrica y la laminina, que puede desencadenar la pérdida de la integridad de la mucosa; inhiben la síntesis de mucina y estimulan la secreción de pepsinógeno. A pesar de la toxicidad general de las endotoxinas, el lípido A del Hp es bastante menos potente que el lípido A de la *Escherichia coli*, lo que puede ser responsable de la adaptación del microorganismo a la permanencia a largo plazo en el estómago. ⁽⁷⁾

Reclutamiento adicional de leucocitos y factores activantes:

Helicobacter pylori fabrica una cantidad de proteínas superficiales solubles independiente de los lipopolisacáridos, con propiedades quimiotácticas para reclutar monocitos y neutrófilos hacia la lámina propia y activar estas células inflamatorias. Estas proteínas son la proteína activadora de neutrófilo de *H. pylori*, codificadas por el gen *napA*, y las porinas inmunológicamente activas. El gen *cagA*, que codifica un antígeno inmunodominante, no se presenta en todas las cepas de *H. pylori* pero forma parte del islote de patogenicidad (*cagPAI*), que contiene 31 genes. ⁽³²⁾ Por lo tanto, su detección molecular indica la presencia del PAI en el cromosoma del microorganismo. ⁽³³⁾ Las cepas *cag* + (cepas tipo I) se asocian a mayor virulencia, al inducir daño gástrico visible mientras que las cepas *cag* - (cepas tipo II), ⁽³⁴⁾ se asocian a menor virulencia y se comportan como bacterias comensales más que

patógenas. La citotoxina vacuolizante *VacA* es secretada por alrededor de 50 % de las cepas de *H. pylori* y causa degeneración vacuolar de las células gástricas epiteliales y ulceración de la mucosa gástrica ^(35,36).

La citotoxina está codificada por el gen *vacA*, que puede presentar mosaico genético en base a variaciones alélicas en las regiones media (alelos *m1* o *m2* y subtipos) y de señal (alelos *s1* o *s2* y subtipos) del gen. Específicamente, se ha demostrado que cepas *vacA s1/m1* poseen una elevada actividad citotóxica en comparación con cepas *s1/m2* y que cepas *s2/m2* no tendrían actividad citotóxica. ⁽³⁵⁾

Recientemente, se ha demostrado que factores de adherencia bacteriana contribuyen a la patogenicidad de *H. pylori*. Así, la adhesina, codificada por el gen *babA2*, favorece una unión persistente entre el microorganismo y la célula epitelial gástrica por unión de la célula bacteriana a través de su proteína *babA2* con antígeno de grupo Lewis B (LeB), presente en la mucosa gástrica. ⁽³⁷⁾ Por lo tanto, cepas de *H. pylori babA2* positivas presentan mayor capacidad de adherencia, en cambio, las cepas *babA2* negativas se adhieren débilmente. Esta adherencia se ha asociado con altos niveles de infiltración linfocitaria, atrofia glandular, metaplasia intestinal e incremento de la proliferación epitelial, reportándose una asociación significativa con úlcera duodenal y cáncer gástrico. El gen *babA2* podría ser un marcador molecular útil para identificar pacientes con mayor riesgo de presentar patologías severas asociadas a infecciones por *H. pylori*. En un estudio en Brasil, informaron una fuerte asociación entre *babA2* y la presencia de úlcera péptica o carcinoma gástrico. Es importante considerar que la frecuencia de determinantes de virulencia y su asociación con patologías gastrointestinales varía considerablemente en diferentes regiones geográficas. La presencia de más de uno de estos genes de virulencia se asociaría con mayor severidad de la lesión gástrica. Se ha informado que cepas *cagA+*, *vacAs1m1* estarían asociadas a la presentación de úlceras y cepas triple positivas *cagA+*, *vacAs1*, *babA2+*, además de úlcera, se asociarían con metaplasia y adenocarcinoma gástrico. ⁽³⁷⁾

Otros de los genes incluidos en el islote de patogenicidad es el *cagE*, ubicado en el brazo derecho y el *virB11*, ubicado en el brazo izquierdo, recientemente relacionados con la carcinogénesis gástrica. La integridad del islote de patogenicidad juega un papel importante en la virulencia de la bacteria.

El *cagE* se encuentra codificando una proteína compleja en el proceso de expresión de la Interleukin-8 en el epitelio gástrico y el gen *virB11*, forman genes tipo IV, para el sistema de secreción que permite la entrega de la proteína *cagA* en las células del epitelio gástrico, ⁽¹⁵⁾ todo esto se puede corroborar mediante reacción de cadena de polimerasa (Tabla 2).

Infección aguda

Algunos individuos presentan infección aguda por *H. pylori*. Se describen dos casos de investigadores que ingirieron intencionalmente cultivo de *H. pylori*, después de realizarse biopsia endoscópica que confirmaba la ausencia de infección preexistente. Ambos sujetos desarrollaron gastritis neutrofílica y, en un caso, el pH gástrico en ayunas estuvo por encima de 7 entre los días 8 y 39 después de la ingestión. Un investigador clínico que trabajaba con jugo gástrico, desarrollo una enfermedad caracterizada por dolor epigástrico y náuseas. Hacia el quinto día de la enfermedad una biopsia por vía endoscópica reveló una gastritis neutrofílica y en el cultivo se desarrollo *H. pylori*. Aunque este individuo no tenía estudio endoscópico previo, la seroconversión se produjo entre los días 14 y 74. El pH gástrico en ayunas se mantuvo por encima de 7 durante los días 14 y 37, pero cayó a 2 el día 74. El efecto más temprano de la infección parece ser un incremento de la secreción basal de ácido, a la que le sigue una reducción de la secreción de ácido. Parece probable que la caída de la secreción de ácido se correlacione mejor con el grado de inflamación en el cuerpo del estómago. ⁽⁷⁾

Una vez que el huésped y el microorganismo alcanzan el estado de equilibrio, la intensidad de inflamación disminuye y retorna la secreción. ⁽⁷⁾

Infección crónica

No se conoce con qué frecuencia la infección aguda por *H. pylori* se cura de forma espontánea. Los estudios en niños sugieren que puede ser común la pérdida espontánea de la infección. La infección en adultos usualmente parecería durar toda la vida. La mayoría de los individuos infectados presentan gastritis crónica activa superficial no atrófica. Esta forma histológica suele ser asintomática, pero se puede asociar con enfermedad ulcerosa

específicamente duodenal, de igual manera se ha asociado gastritis crónica atrófica, el adenocarcinoma de estómago o el linfoma gástrico.⁽⁷⁾

Gastritis crónica no atrófica: el *H. pylori* estimula la liberación de una variedad de mediadores inflamatorios tanto por vía directa mediante productos bacterianos, como citotoxinas vacuolizantes, lipopolisacáridos, factor activador de neutrófilos y porinas, como por vía indirecta, como consecuencia de la interacción con células gástricas epiteliales. En general la respuesta inflamatoria requiere la adherencia de la bacteria al epitelio del huésped. La mayor parte está asociada la liberación de la interleucina 8 (IL 8) y en el reclutamiento y la activación.⁽³²⁾

Gastritis crónica atrófica: en algunos pacientes todos estos factores de inflamación en la gastritis crónica superficial progresa a gastritis crónica atrófica, con incremento anual de la prevalencia del 1 al 3 % en individuos por otra parte sanos. Este tipo de progresión genera tres patrones de gastritis atrófica: corporal, antral y multifocal. El patrón de desarrollo de la gastritis atrófica se correlaciona bien con la gastritis superficial (esto es, la gastritis superficial antral predominantemente desarrolla gastritis atrófica antral). A medida que avanza el grado de atrofia, la presencia de infección activa por *H. pylori* parece disminuir, quizás en función de la cubierta gástrica de células epiteliales superficiales normales susceptibles a *H. pylori* en una metaplasia intestinal que rara vez aparece *H. pylori*.⁽⁷⁾

***Helicobacter pylori* y MALToma:** el tejido linfoide del tubo digestivo se denomina tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT). El MALT está organizado de modo muy similar a los ganglios linfáticos y sirve para la misma función. Una vez que ocurre cualquier transformación maligna de cualquiera de las células inmunes en un ganglio linfático, se desarrolla el linfoma, la transformación maligna de cualquiera de los tipos de células inmunes del tejido gastrointestinal provoca el desarrollo del linfoma en ese tejido. El término MALT ha pasado a ser sinónimo de un linfoma específico, linfoma de células B de la zona marginal, el cual tiende a seguir un curso lento, y se asocia en el estómago con la infección por *Helicobacter pylori*.

***Helicobacter pylori* y cáncer gástrico:** la relación entre inflamación crónica y cáncer se remonta ya al año 1863, en que Virchow planteó que el cáncer se originaba en sitios de

inflamación crónica. Mientras una injuria aguda se asocia a inflamación y curación siendo un fenómeno autolimitado, la inflamación en la injuria crónica conduce a largo plazo a una expansión sostenida de zonas de tejido proliferativo predisponiendo a la progresión hacia una neoplasia. La proliferación sostenida de por sí, con o sin inflamación crónica, se ha considerado como factor de riesgo, o al menos como un marcador biológico precoz, de cáncer. Aproximadamente un 15 % de las neoplasias malignas a nivel mundial se atribuyen a infecciones crónicas. Otros tumores son iniciados por inflamación crónica de origen no infeccioso. Si bien la relación entre inflamación y cáncer está establecida, los mecanismos involucrados en cada patología no están bien esclarecidos.⁽³⁷⁾

El polimorfismo de genes asociados a esta bacteria y la respuesta inmunológica del huésped han demostrado que una combinación de IL-1 β , el antagonista del receptor de IL-1 β (IL-1RN), de TNF- α e IL-10, que potencialmente resultan en elevados niveles de IL-1 β y TNF- α y bajos niveles de IL-10, confieren al huésped con *H. pylori* un riesgo muy elevado de cáncer gástrico (27 veces), mientras que aparentemente no existe un mayor riesgo en ausencia de infección. El polimorfismo genético de IL-8 en pacientes infectados también está asociado a un mayor riesgo oncogénico. Se ha planteado que la potente inhibición de la secreción ácida asociada a estos genotipos proinflamatorios favorece el desarrollo de gastritis predominantemente corporal con atrofia de la mucosa e hipoclorhidria. Así por ejemplo, la combinación del alelo del huésped IL-1 β -511*T y del alelo bacteriano gen *vacAs1* confieren un riesgo altísimo (87 veces) de cáncer gástrico.

Por otra parte, *H. pylori* induce la formación de anticuerpos contra estructuras canaliculares y epítomos de la H+/K+-ATPasa de las células parietales, contribuyendo a la hipoclorhidria y a la gastritis atrófica a través de una reacción autoinmune. En presencia de *H. pylori* aumenta la expresión de complejos de histocompatibilidad mayor (MHC clase II) en las células epiteliales gástricas mediado por IFN- γ , permitiendo una presentación continua de los antígenos bacterianos a los linfocitos T CD4 y regulando así en parte el tipo de respuesta inmune.⁽³⁸⁾

Tabla 1. Clasificación de Borrmann

Se emplea exclusivamente para el cáncer avanzado que excede los 3-4 cm de tamaño e invade la muscular como mínimo.

1. Tipo I o polipoide: cánceres circunscritos, solitarios y sin ulceración, de localización preferente en fundus o curvatura mayor. Son los de mejor pronóstico. Son la forma de presentación menos frecuente.
2. Tipo II o ulcerado: con elevación marginal de tipo parietal y con contornos bien definidos. Es la forma más frecuente. Son poco infiltrantes, de crecimiento lento y metástasis tardías.
3. Tipo III o crateriforme: corresponden a cánceres ulcerados; en parte con elevación marginal y diseminación difusa parcial. Se localizan con frecuencia en antro y curvatura menor.
4. Tipo IV o difuso: infiltrante a linitis plástica. Son tumores de gran crecimiento por la submucosa y subserosa. Se distinguen dos tipos:
 - Escirro: crecimiento infiltrante muy rico en tejido conectivo.
 - Linitis plástica de Brinton

Objetivo General

Evaluar la presencia de genotipos de *cagA*, *cagE* y *virB11* de *H. pylori* en pacientes con neoplasia gástrica (linfoma gástrico y adenocarcinoma).

Objetivos Específicos

- 1- Calcular la frecuencia de cepas de *H. pylori* que contienen los genes, *cagE* y *virB11* en pacientes con adenocarcinoma gástrico.
- 2- Establecer la relación que contienen los genes, *cagE* y *virB11* del *H. pylori* en pacientes con adenocarcinoma gástrico.

- 3- Medir la frecuencia de cepas de *H. pylori* que contienen los genes, *cagE* y *virB11* en pacientes sin neoplasia gástrica.
- 4- Determinar la frecuencia de cepas de *H. pylori* que contienen los genes *cagA*, *cagE* y *virB11* en pacientes con las patologías de linfoma gástrico (MALTOMA)
- 5- Comparar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con otros métodos diagnósticos (cultivo, test de ureasa rápida e histopatología) para la detección de aislados de *H. pylori* en muestras de biopsia gástrica (antro y cuerpo).
- 6- Describir los resultados de la PCR, test de ureasa e histopatología en las diferentes lesiones estudiadas.

Hipótesis:

Los pacientes con neoplasia gástrica tiene la expresión de los genes del *cagA*, *cagE* y *virB11* en la cepas infectantes de *Helicobacter pylori*.

MÉTODOS

Tipo de Estudio

Estudio prospectivo, transversal, aleatorio.

Población y Muestra

En el presente estudio los pacientes referidos a el Servicio Oncológico Hospitalario de los Seguros Sociales (Hospital Oncológico Padre Machado) entre el lapso comprendido entre enero y diciembre del 2010 con diagnóstico de cáncer gástrico y/o sospecha del mismo, tanto de sexo femenino como masculino y con edades comprendidas entre 30 y 90 años, con diagnóstico de cáncer gástrico mediante el análisis de estudios endoscópicos, histológicos e imagenológicos, de igual manera se procedió a tener una muestra de pacientes que fueron referidos al Servicio Oncológico Hospitalario de los Seguros Sociales (Hospital Oncológico Padre Machado) entre el lapso comprendido entre enero y diciembre del 2010 con diagnóstico de MALToma y/o sospecha del mismo, de los cuales se obtuvo y se proceso 4 pacientes con diagnóstico de MALToma y 1 paciente con diagnóstico de Linfoma difuso de células B grandes, constituyendo así, la muestra del estudio.

Con el fin de tener un grupo control se procedió a tener una muestra de pacientes que fueron referidos a Servicio Oncológico Hospitalario de los Seguros Sociales (Hospital Oncológico Padre Machado) entre el lapso comprendido entre enero y diciembre del 2010 con diagnóstico de infección por *Helicobacter pylori* y/o sospecha del mismo, procesándose 106 pacientes de los cuales se seleccionaron 43 pacientes de forma aleatoria para determinar las variables del presente estudio y tener un grupo control para comparar.

En todos los pacientes, tanto del grupo de los pacientes con Adenocarcinoma, Linfoma, y el grupo control, se determino la infección por *H. pylori* mediante PCR, test de ureasa y biopsia.

Todos los pacientes cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión

- Diagnóstico endoscópico altamente sugestivo de cáncer gástrico avanzado
- Evidencia analítica (histología) de Linfoma Gástrico y Adenocarcinoma gástrico en sus variedades difusa o intestinal.
- No haber recibido antibioticoterapia previa a los 6 meses del diagnóstico ni terapia neoadyuvante.
- Un grupo control: pacientes sin evidencia endoscópica ni histológica de neoplasia gástrica.
- La aceptación mediante consentimiento informado.

Criterios de exclusión

- Lesiones endoscópicas dudosas o coexistencia endoscópica de otras lesiones.
- Histología diferente a tumores de origen epitelial (Linfoma y Adenocarcinoma).

Procedimientos

Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron sometidos a un protocolo diagnóstico que incluyó:

Entrevista clínica: se les realizó una entrevista personal a todos los pacientes en los que se recolectaron los siguientes datos (anexo 1):

- Antecedentes personales y medicación actual.
- Valoración de la sintomatología asociada al cáncer gástrico, con recogida de datos referentes a síntomas gastrointestinal.

Gastroscopia (diagnóstica): a todos los pacientes se les indicó una preparación intestinal consistente en un ayuno de por lo menos 6 horas previos al estudio. Se realizó gastroscopia completa hasta segunda porción de duodeno para descartar otras lesiones, usando un Videoendoscopio Olympus EXERA II GIF 180. Se clasificó el cáncer gástrico avanzado según la clasificación de Borrmann (**Tabla 1**). Se tomaron 6 biopsias, con pinza de biopsia gástrica, por cada paciente de acuerdo a la clasificación de Sydney: 1 biopsia fue colocada en

el test rápido de ureasa, 2 biopsias fueron utilizadas para cultivo. Posteriormente, el ADN extraído del cultivo fue usado para los ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), y 3 biopsias fueron colocadas en formalina (10 %) para los análisis de histopatológicos.

Consentimiento Informado: todos los pacientes incluidos en el estudio dieron su consentimiento por escrito para la realización del estudio de gastroscopia y toma de muestra para biopsia previa información detallada del mismo. Además de dar su consentimiento ante cada nueva exploración (anexo 2).

Cultivo: las biopsias fueron homogenizadas en solución salina, agitando vigorosamente en un amalgamador (beadbeater). Se cultivaron en placas de petri con medio de cultivo con antibióticos (medio agar sangre-chocolate) y se incubaron a 37 °C durante 3-5 días en una atmósfera húmeda microaerófila (BBL CampyPak™ Microaerophilic System Envelopes with Palladium Catalyst, código 271045, Becton, Dickinson and Company, MD 21152 USA). Se identificaron colonias según morfología y ureasa rápida (Ureivic®). Se repicó el cultivo aislado de cada sujeto o paciente y se congeló a -70 °C en medio Brucella con 15 % glicerol.

Extracción del ADN: el ADN genómico de las muestras de cultivo fue extraído usando el kit de purificación de ADN (QIAamp DNA Mini Kit, código 51306, QIAGEN Inc., Valencia, CA 91355, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante para tejido y se determinó la concentración de ADN obtenido antes de realizar las amplificaciones por PCR.

Determinación de la infección y genotipos de *H. pylori* por PCR

1.- La infección por *H. pylori* fue determinada por PCR, amplificando los genes 16S ARN ribosomal y *glmM*. Una PCR para determinar el género *Helicobacter*, utilizando cebadores que amplificaron una región específica del gen 16S ARNr⁽³⁹⁾ y otra PCR para detectar la especie, *H. pylori*, con cebadores para el gen conservado *glmM*, codificando para la proteína fosfoglucoamina mutasa de *H. pylori*⁽⁴⁰⁾ (**Anexo 3**).

2.- Se determinó los genotipos de genes de virulencia *cagA*, *cagE* y *virB11* por PCR usando cebadores específicos (**Anexo 3**) según la metodología descrita por Rugge et al. ⁽⁴¹⁾ y Sozzi et al.,⁽⁴²⁾ . Entre los genes incluidos en la isla de patogenicidad se encuentran el gen *cagA*, codificando para la proteína inmunodominante *cagA*, el cual afecta la fisiología celular del hospedador luego de ser incorporado dentro de las células epiteliales gástricas; el gen *cagE* codifica para una proteína implicada en el proceso de expresión de interleukina-8 en las células epiteliales gástricas y el gen *virB11*, codificando junto con otros genes a un sistema de secreción tipo IV que permite la entrada de la proteína *cagA* a las células epiteliales gástricas.

Las reacciones de PCR fueron realizadas mediante el kit “Ready-To-Go PCR beads” (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ USA) en un termociclador “GeneAMP PCR System 9700” (Applied Biosystems, USA). Cada reacción de PCR contiene todos los componentes de PCR, más 3 a 6 µl de ADN extraído, 3 µl de la mezcla de cebadores (forward/reverse, para una concentración final de 5 µM) y agua destilada estéril para completar un volumen final de 25 µl. El control negativo de la reacción fue realizado sin ADN, mientras que, el control positivo correspondió al ADN de un aislado clínico de *H. pylori* o ADN de la cepa de referencia HP26695. Los productos de PCR se visualizaron colocando 15 µl de cada reacción sobre un gel de agarosa al 2 % TBE.

Tratamiento Estadístico adecuado:

Se calculó la media y la desviación estándar de las variables continuas; en el caso de las variables nominales se calculó sus frecuencias y porcentajes.

El contraste de los genotipos *cagE* y *virB11* respecto a las variables: diagnóstico endoscópico, diagnóstico histológico, clasificación de Lauren y prueba ureasa se determinó mediante la prueba chi-cuadrado de Pearson.

Por otro lado, los valores diagnósticos se calcularon a partir de la tabla tetracórica asumiendo como patrón de oro el grupo de pacientes con y sin cáncer gástrico, el análisis de dichos valores se calculó con Epidat 3.1.

Se consideró un valor significativo de contraste si $p < 0,05$. Los datos fueron analizados con JMP-SAS.

RESULTADOS

Tabla 1. La muestra estuvo constituida por 31 pacientes. Del total de la muestra estudiada, 19 (61,3%) pacientes fueron del sexo masculino y 12 (38,7%) correspondieron al sexo femenino. Según la clasificación de Borrmann, el tipo prevalente fue el III 22 (84,6%), tomada en cuenta solo en el caso de los tumores epiteliales (ADC). Los tumores se ubicaron mayormente en el cuerpo gástrico 23 (88,5%). En cuanto a la histología, de los tumores epiteliales, el más prevalente fue el Adenocarcinoma (ADC) moderadamente diferenciado 13 (50%), de los linfomas, el MALToma fue el más frecuente 4 (15,4%). La clasificación de Lauren predominante en los ADC fue la Intestinal con un número de 14 (53,8%).

Tabla 2. Compara la expresión del gen *cagA* entre el grupo de los pacientes con adenocarcinoma, linfoma y el grupo control. Aunque el gen estuvo presente mayoritariamente en los pacientes con adenocarcinoma 20 (76,9%), no hubo diferencias significativas ($p = 0,071$).

Tabla 3. Compara la expresión del gen *cagE* según el grupo de los pacientes con adenocarcinoma, linfoma y el grupo control; en la cual no hubo diferencias significativas ($p=0,752$). Observándose que de los pacientes con Adenocarcinoma, el gen estuvo presente en 18 (69,2%), en los de linfoma 3 (60%) y en el grupo control 32 (74,4%).

Tabla 4. La expresión del gen *virB11* entre el grupo de los pacientes con adenocarcinoma, linfoma y el grupo control no tuvo diferencias significativas ($p = 0,636$). El gen estuvo presente en la mayoría de los grupos estudiados, con 65,4%, 60% y 74,4% para los grupos de adenocarcinoma, linfoma y control respectivamente.

Tabla 5. Compara la efectividad de la prueba ureasa que fue fabricada en el laboratorio del IVIC para la detección de *H. pylori*, evidenciándose que este método empleado no es adecuado, ya que tanto en linfoma y adenocarcinoma en más de un 80% dio negativo, mientras que por otros métodos si se confirmó la presencia del bacilo. En vista de observar tantos falso no se utilizó más esta prueba y no se aplicó a los controles.

Tabla 6. En cuanto a la detección de *H. pylori* por el método de PCR se evidenció que es una prueba efectiva y se obtuvo una $p < 0,05$.

Tabla 7. La biopsia gástrica demostró que en los 3 grupos estudiados (linfoma, adenocarcinoma, controles) es un método confiable para la detención de *H. pylori*.

Tabla 8. Compara la expresión de los genes *cagE* y *virB11* entre los pacientes con cáncer en general y los pacientes control. La expresión *cagE*+ / *virB11*+ fue la más frecuente, con 18 pacientes (58,1%) y 31 pacientes (72,1%) en cada grupo, respectivamente; la diferencia no fue significativa ($p = 0,370$).

Tabla 9. Comparando la expresión de los genes *cagE* y *virB11* según los pacientes con Adenocarcinoma y linfoma y el grupo control. En los 3 grupos la expresión la expresión *cagE*+ / *virB11*+ fue la mas frecuente, con 16 pacientes (61,5%), 2 pacientes (40%) y 31 (72,1%) en cada grupo, respectivamente; aún así la diferencia no fue significativa ($p = 0,370$) entre los grupos estudiados.

DISCUSIÓN

Diversos estudios han reportado la importancia de la virulencia de los genes *cagA* y *vacA* de *H. pylori* en los resultados clínicos obtenidos, sin embargo la relevancia clínica aún sigue siendo una controversia. Al momento de realizar este estudio, solo tres artículos se encontraron en la literatura, Sozzi et al ⁽⁴²⁾, Lima et al ⁽¹⁵⁾ y Tomasini et al ⁽⁴³⁾. Sozzi et al, ⁽⁴²⁾ estudiaron la heterogeneidad de los genotipos *cag* (*cagA*, *cagE* y *virB11*) en pacientes italianos con úlcera duodenal, gastritis atrófica y gastritis no atrófica, mientras que Lima et al, ⁽¹⁵⁾ estudiaron la heterogeneidad de los genotipos *cagE* y *virB11* en pacientes con cáncer gástrico sin compararlos con un grupo control.

En cuanto a la distribución por sexo de los 25 pacientes con cáncer gástrico, 19 pacientes son de sexo masculino (61,3 %) y 12 de sexo femenino (38,7 %), con edades comprendidas entre 33 años y 84 años, con un promedio de 59 años. En el estudio de Lima et al, ⁽¹⁵⁾, se analizaron un total de 101 casos, de los cuales el 67,3 % correspondió al sexo masculino y 32,7 % al sexo femenino, con un promedio de edad de 62,7 años. En Venezuela, esto está relacionado directamente con la tasa de mortalidad por cáncer gástrico publicado por el Ministerio para el Poder Popular de la Salud en el anuario de mortalidad para el año 2008, ⁽⁴⁴⁾ donde es más frecuente en pacientes de sexo masculino (61,3 %) con edades comprendidas entre los 65 y 69 años, con respecto al sexo femenino (38,7 %) con edades comprendidas entre 70 y 74 años. En cuanto a la localización del tumor, la más frecuente fue cuerpo y antro en 23 pacientes (92 %) mientras que 2 pacientes (8 %) el tumor fue localizado en cardias, similar al estudio de Lima et al ⁽¹⁵⁾ en el cual el 75,2% de los tumores no estaban localizados en el cardias, en relación al 24,8% de los casos en los que el tumor si lo estaba.

En relación a la clasificación histológica la distribución fue la siguiente: Adenocarcinoma poco diferenciado 11 pacientes (42,3 %), Adenocarcinoma moderadamente diferenciado 13 pacientes (50 %), Adenocarcinoma bien diferenciado 2 pacientes (7,7 %), Linfoma difuso de células B grandes 1 paciente (3,8 %) y los Maltoma 4 pacientes (15,4 %). En la clasificación correspondiente a Lauren en la cual se tomaron en cuenta solo los adenocarcinoma, los tipos intestinal y difuso tuvieron una distribución similar: difuso 12 pacientes (46,2 %) e intestinal 14 pacientes (53,8 %).

La expresión del gen *cagA* fue encontrada en 23 de los 31 pacientes estudiados con cáncer gástrico (adenocarcinoma y linfoma), en comparación 21 de los 43 pacientes control. En el grupo de los pacientes con adenocarcinoma, el gen estaba presente en el 76,9 % de los casos, y en el 60 % de los casos de los pacientes con linfoma, mientras que en el grupo control estuvo presente solo en el 48,8 % de los casos. En un estudio realizado en el Hospital Antonio María Pineda, en Barquisimeto (Lara) en el año 2009, por Armanie et al,⁽¹²⁾ el cual estudió la asociación entre los factores bacterianos y del huésped en la infección por *Helicobacter pylori* y lesiones pre-malignas de cáncer gástrico, obtuvieron como resultado que el 98,5 % de la población estudiada estaba infectada por Hp, y el *cagA* era el gen más frecuentemente involucrado. En el estudio realizado por Sozzi et al⁽⁴²⁾ encontraron que el gen *cagA* estuvo presente en el 63 % de los pacientes, mientras que el resto de los pacientes negativos para el gen, también tuvieron 1 o más genes *cag* negativos sugiriendo que todos los 3 genes son esenciales para la secreción de la proteína *cagA*. De los 8 pacientes con cáncer gástrico negativos para el gen *cagA*, se encontró que 7 fueron negativos para otros genes; planteándose que si algunos de los componentes del sistema de secreción tipo IV están ausentes, la proteína *cagA* no puede ser entregada dentro de la célula huésped y el anticuerpo responsable no puede ser detectado.⁽³⁶⁾ Adicionalmente, en los estadios tempranos de la infección, una cepa con un genotipo *cag* diferente, puede perder o adquirir más genes *cag*, o puede producirse la expansión clonal de subtipos de *H. pylori* con diferentes composición de la isla de patogenicidad.

La expresión del gen *cagE* en los adenocarcinoma se encontró en 18/25 pacientes lo que corresponde al 69,2 %, en lo referente a los linfomas la expresión del gen *cagE* se encontró en 3/5 pacientes (60 %). En un estudio realizado en Colombia (2005) por Quirroga et al,⁽¹⁴⁾ en el que analizan la frecuencia de los genotipos *babA2*, *oipA* y *cagE* de *Helicobacter pylori* en pacientes colombianos con enfermedades gastroduodenales, obtuvieron como resultado que la frecuencia de los genotipos *cagA*, *cagE*, *babA2* y *oipA* fue de 73 %, 75 %, 48 % y 74 %, respectivamente, Se observó una mayor frecuencia de cepas citotóxicas en pacientes con cáncer (84 %), metaplasia (91 %) y úlcera (81 %) en comparación con pacientes con gastritis no atrófica (50%)⁽¹⁴⁾. En el estudio de Portela et al,⁽⁸⁾ la frecuencia del gen *cagE* encontrada fue de 53,2%, esta baja frecuencia puede estar relacionada al pequeño número de casos

analizados y variaciones regionales en las cepas de *H. pylori*. Estos estudios sugieren que el gen es más frecuente en patologías severas, tales como úlcera y cáncer gástrico, que en gastritis como tal, recalcando la importancia de estos genes en la progresión y severidad de la enfermedad gástrica (tabla 3).

En los estudios de Sozzi et al,⁽⁴²⁾ y Tomasini et al,⁽⁴³⁾ se encontró que el gen *virB11* estaba presente en el 90 % y 94,7 % de los casos respectivamente, sin embargo, en nuestro estudio el gen estuvo presente en el 65,4 % en el grupo de los pacientes con Adenocarcinoma, 60 % de los casos para Maltoma y 74,4 % en el grupo control. Particularmente en el estudio de Lima et al,⁽¹⁵⁾ se encontró que el gen estaba presente en el 60,6 % de los pacientes. Aunque existe una frecuencia significativa alta del gen *virB11* encontrada en estos estudios, no existe aún una clara relación entre este gen y la presencia de cáncer gástrico. De hecho, la proteína *virB11* está estratégicamente localizada en el sistema de secreción tipo IV, asociado con actividad ATPasa⁽¹⁵⁾, pero su responsabilidad como tal en el desarrollo de cáncer gástrico no ha sido claramente establecida.

La infección de *Helicobacter pylori* en pacientes con cáncer gástrico fue reportada en 25/31 (80,7 %) de los pacientes evaluados tanto en los pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma, como en los maltomas y linfoma difuso de células B grandes. En el grupo control el *Helicobacter pylori* estuvo presente en el 100 % de los casos. Se determinó la presencia mediante biopsia, PCR y test de ureasa rápido. Mediante biopsia, en el grupo de los pacientes con adenocarcinoma, el *H. pylori* estuvo presente en 21/26 pacientes (80,8 %), 4/5 de los pacientes con linfoma (80 %) y en el 100 % del grupo control; con una relación estadísticamente significativa $p=0,011$. Por PCR la prueba fue positiva en 16/26 pacientes con adenocarcinoma (61,5 %), 2/5 con maltoma (40 %) y en 42/43 pacientes control (97,7 %); con una relación estadísticamente significativa $p=0,001$. Mientras que el test de ureasa fue positivo solo en 2/26 pacientes con adenocarcinoma, 1/5 con maltoma y en 3/43 pacientes control lo que indica la baja sensibilidad de la marca de test utilizada.

Para investigar la relación entre la infección de *Helicobacter pylori* y la presencia de *cagE* y *virB11* como genes responsables del desarrollo de cáncer gástrico, las 31 muestras estudiadas, fueron agrupados en 4 categorías *cagE+/virB11+*, *cagE+/virB11-*, *cagE-/virB11+*, y *cagE-*

/virB11-, obteniendo una frecuencia de 58,1 % (18/31) *cagE*+/*virB11*+, 6,5 % (2/31) *cagE*+/*virB11*-, 9,7 % (3/25) *cagE*-/*virB11*+, y 25,8 % (8/25) *cagE*-/*virB11*-⁽¹¹⁾. En el trabajo publicado por Lima et al⁽¹⁵⁾, el grupo *cagE*+/*virB11*+, fue el más significativo con una frecuencia del 46,5 %, con una relación estadísticamente significativa; sin embargo en nuestro caso, aunque el grupo *cagE*+/*virB11*+, fue el más frecuente, al compararlo con el grupo control, el cual obtuvo un porcentaje de frecuencia mayor, la relación no es estadísticamente significativa (p=0,370) lo cual sugiere que estos genes, los cuales son parte de la isla de patogenicidad son factores de virulencia importantes en la patogénesis del *H. pylori*, pero no tienen relación directa con la aparición de cáncer gástrico. En la tabla 9 se cruzan las variables de los 4 grupos con el tipo de cáncer específicamente adenocarcinoma y linfoma evidenciándose una p de 0,429 lo cual tampoco es significativo.

Se comparan el tipo histológico de cáncer ya sea adenocarcinoma o linfoma con el grupo control evaluado y la p es de 0,286 lo cual indica que no hay relación entre estos genes y la presencia de cáncer gástrico (tabla 9).

Finalmente, este es el primer estudio en nuestro país en determinar la presencia de los genes *cagA*, *cagE* y *virB11* en pacientes con cáncer gástrico y compararlo con un grupo control, no solo reportando la presencia de esos genes sino también enfocados en el aspecto histológico.

Conclusiones

1.- Pacientes con infección por Hp cepas *CagE* y *virB11* positiva, no parece ser un factor de riesgo para desarrollar neoplasia gástrica ya que en nuestro estudio no hubo diferencia significativa entre pacientes con neoplasia y el grupo control.

5.- Se consideró que no es un factor pronóstico que si el paciente está infectado con *Helicobacter pylori* y al realizar la extracción del genoma; el hecho de tener los genes estudiados como *CagE* y *VirB11* en su ADN, no hay una relación directa entre ellos y la posibilidad de desarrollar adenocarcinoma gástrico.

8.- De igual forma se pudo evidenciar que tampoco es un factor pronóstico que si el paciente está infectado con *Helicobacter pylori* y al realizar la extracción del genoma; el hecho de tener

los genes estudiados como *cagE* y *virB11* en su ADN, no hay una relación directa entre ellos y la posibilidad de tener linfoma MALT.

9.- Las dos afirmaciones anteriores las podemos deducir por luego de comparar un grupo control de pacientes con las mismas características que los grupo de adenocarcinoma gástrico y linfomas MALT.

10.- Con respecto a los métodos para detectar *Helicobacter pylori* en nuestro estudio los más sensibles fueron la biopsia gástrica, seguida de la extracción del PCR siendo estadísticamente significativas por ende confiables.

Recomendaciones

Se necesitan futuras investigaciones para determinar la relación de cepas de *H. pylori* que contienen los genes, *cagE* y *virB11* con la aparición de neoplasia gástrica.

AGRADECIMIENTOS

Al **Servicio Oncológico Hospitalario de los Seguros Sociales (Oncológico Padre Machado)** y a la **Universidad Central de Venezuela (UCV)**, por ser la casa de estudios que nos brindó la infraestructura y los equipos endoscópicos para el desarrollo de este proyecto y por seguir siendo la casa que vence las sombras.

Al **Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC)**, especialmente a la PhD Mónica Contreras y al Licenciado Nelson Reyes del Centro de Biofísica y Bioquímica, al Laboratorio de Fisiología Gastrointestinal por ser el personal encargado del estudio de las muestras desde el punto de vista genético y haber financiado en su totalidad el procesamiento de las mismas.

A nuestro tutor, Dr. Manuel Bronstein, por sus acertadas correcciones desde el inicio de nuestras ideas hasta lograr cristalizar nuestra investigación.

A nuestro asesor estadístico; Licenciado Douglas Angulo, de la Comisión de Estudios de Post Grado de la UCV, por su paciencia, dedicación, empeño y cariño.

A todos los pacientes que de manera desinteresada aceptaron ser partícipes de esta investigación, no cabe duda que sin ellos no hubiese sido posible.

A todo el personal del **Servicio Oncológico Hospitalario de los Seguros Sociales (Oncológico Padre Machado)**, tanto del área de enfermería como de nuestros adjuntos y compañeros que compartieron con nosotras, estos dos años de formación académica.

REFERENCIAS

- (1) Martínez MT, González M, Ferreira R, Mas JA. Genotipo cag A+ en cepas de *Helicobacter pylori* asociadas a úlcera péptica, gastritis crónica y cáncer gástrico. Rev. cuba. med; 47(2). Abr 2008.
- (2) Garza E, Pérez GI, Tijerina R, Maldonado HJ, Bosques FJ. Genotipos de *H.pylori* y su asociación con la respuesta inmune del hospedero Rev Gastroenterol Mex 2002; 67(3): 155-160 [serie en Internet]. [citado 23 de noviembre de 2001]. Disponible en: http://www.imbiomed.com/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=325&id_seccion=50&id_ejemplar=55&id_revista=10
- (3) Citty DM, Huertas MG, Martínez JD, Oliveros R, Posso H, Bravo MM et al. Los genotipos de *H.pylori* en gastritis no atrófica difieren de los encontrados en úlcera péptica, lesiones premalignas y cáncer gástrico. Colombia. Rev. méd. Chile v.130 n.2 Feb. 2002
- (4) Martínez A, González C, Kawaguchi F, Montoya R, Corvalán A, Madariaga J et al. *H.pylori*: análisis de cagA y genotipificación de vacA en Chile. Detección de una cepa s2/m1. Rev. méd. Chile v.129 n.10 Oct. 2001
- (5) Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. *H.pylori* Virulence and Genetic Geography. Science. May 1999. Vol 284
- (6) Restrepo A, Robledo J. Fundamentos de Medicina: Enfermedades Infecciosas. 5ta ed. p. 418
- (7) Feldman M., Friedman L., Sleissenger M, editors. Enfermedades gastrointestinales y hepáticas 7ma Ed. Buenos aires. Editorial Médica panamericana: 2004: p. 638 -62
- (8) Maeda S, Yoshida H, Ikenoue T, Ogura K, Kanai F, Kato N et al. Structure of cag pathogenicity island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates. Gut 1999;44:336-341 doi:10.1136/gut.44.3.336

- (9) Atherton JC, Blaser MJ. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *J. Clin. Invest.* 119:2475–2487 (2009).
- (10) Sozzi M, Tomasini ML, Vindigni C, Zanussi S, Tedeschi R, Basaglia G, et al. Heterogeneity of *cag* genotypes and clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection. *J Lab Clin Med.* Jun 2005. Vol 146, Num 5
- (11) Portela V, Pereira de Lima Ma, Pitombeira MV, Pessoa MA, Barem SH, Barros MA. The relationship between *Helicobacter pylori* genes *cagE* and *virB11* and gastric cancer. *Int J Infect Dis.* 2010 Jan 25. doi:10.1016/j.ijid.2009.09.006
- (12) Armanie EA. Hallazgos clínicos, endoscópicos e histológicos de la infección por los genotipos CAG A y VAC A del *Helicobacter Pylori* en pacientes con dispepsia. Servicio de Gastroenterología. [Tesis]. Hospital Central Universitario " Antonio María Pineda" Barquisimeto Estado Lara. 2009
- (13) Perrone M, González-Valencia G, Camorlinga M, Correnti M, Cavazza ME, Torres Javier. Genotipos *vacA* de *Helicobacter pylori* en una población venezolana. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2009; 29:39-43
- (14) Quiroga AJ, Cittelly DM, Bravo MM. Frecuencia de los genotipos *babA2*, *oipA* y *cagE* de *Helicobacter pylori* en pacientes colombianos con enfermedades gastroduodenales. *Biomédica* 2005;25:325-34.
- (15) Lima VP, Silva-Fernandes IJ, Alves MK, Rabenhorst SH. Prevalence of *Helicobacter pylori* genotypes (*vacA*, *cagA*, *cagE* and *virB11*) in gastric cancer in Brazilian's patients: an association with histopathological parameters. *Cancer Epidemiol.* 2011 Oct;35(5):e32-7. Epub 2011 Apr 5.
- (16) Marshall BJ, Warren JR (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration *Lancet* i: 1311-15.
- (17) Graham D, Evans D, et al: Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. *Gastroenterology* 100: 1495-1501, 1991.

- (18) Megraud F: Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterol Clin North Am 22:73-88, 1993.
- (19) Baccaglini L, Schoenbach VJ, Poole C, McKaig RG, Ibrahim J, Baric RS, Wiesen C. Association between herpes simplex virus type 1 and *Helicobacter pylori* in US adolescents. Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2006; 101:63-9
- (20) Moreira ED Jr, Nassri VB, Santos RS, Matos JF, Carvalho WA, Silvani CS, Sant'Ana CS. Association of *Helicobacter pylori* infection and giardiasis: results from a study of surrogate markers for fecal exposure among children. World J Gastroenterol 2005; 11:2759-63.
- (21) Correa, P. 2003. Bacterial infections as a cause of cancer. J. Natl. Cancer Inst. 95: E3.13. Holcombe C. *Helicobacter pylori*: the African enigma. Gut 1992;33:429-31.
- (22) Vollaard AM, Verspaget HW, Ali S, Visser LG, Veenendaal RA, Van Asten HA, Widjaja S, Surjadi CH, Van Dissel JT. *Helicobacter pylori* infection and typhoid fever in Jakarta, Indonesia. Epidemiol Infect 2006; 134: 163-70.
- (23) Kuipers EJ, Pena AS, Van Kamp, et al: seroconversion for *Helicobacter pylori* infection. Lancet 342:328-331, 1993.
- (24) Scott DR, Marcus EA, Weeks DL, et al. Expression of the *Helicobacter pylori* Ure gene is required for acidic pH activation of cytoplasmic urease. Infect Immun 66:4517-4521, 1998.
- (25) Isenberg JI, Selling JA, Hogan DL, Goss MA: Impaired proximal duodenal mucosal bicarbonate secretion in patients with duodenal ulcer. N Engl J Med 316: 374-379, 1987
- (26) Logan RPH: Adherence and *Helicobacter pylori*. Aliment Pharmacol Ther 10:3-15, 1996.
- (27) Crowe SE, Alvarez L, Dytoc M, et al: Expression of interleukin 8 and CD54 by human gastric epithelium after *Helicobacter pylori* infection in vitro. Gastroenterology 108: 65-74, 1995.

- (28) Evans DG, Evans DJ, Moulds JJ, Graham DY: N-acetylneuraminylactose-binding fibrillar hemagglutinin of *Campilobacter pylori*: A putative colonization factor antigen. *Infect Immun* 56: 2896-2906. 1998.
- (29) Gold BD, Dytoc M, Huesca M, et al: Comparison of *Helicobacter mustelae* and *Helicobacter pylori* adhesion to eukaryotic cells in vitro. *Gastroenterology* 109:692-700,1995.
- (30) El Shoura SM: *Helicobacter pylori*: I. Ultrastructural sequences of adherence, attachment, and penetration into the gastric mucosa. *Ultrastruct Pathol* 19:323-333,1995.
- (31) Dytoc M, Gold BD, Louie M, et al: Comparison of *Helicobacter pylori* and attaching-effacing *Escherichia coli* adhesion to eukaryotic cells. *Infect Immun* 61:448-456,1993.
- (32) Covacci A, Censini S, Bugnoli M. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl AcadSci USA*; 90: 5791-5. 1993
- (33) Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest* 113: 321-33. 2004.
- (34). Censinni S, Lange C, Xiang Z, Crabtree J, Ghiara P, Et al. *Cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encoded type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93: 14648-53. 1996
- (35). Covacci A, Telford JL, DEL Giudice G, et al. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*; 284: 1328-33. 1999
- (36). Guindi M. Role of *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of gastric carcinoma and progression of lymphoid nodules to lymphoma. (1999). *Can. J. Gastroenterol.* 13: 224-227.

- (37) YU J, Leung WK, ET al. Relationship between *Helicobacter pylori babA2* status with gastric epithelial cell turnover and premalignant gastric lesions. *Gut* 2002; 51: 480-4.
- (38) Aravena E: *Helicobacter pylori* y Cáncer gástrico. *Gastr Latinoam*; Vol 18, Nº 2: 129-132. 2007.
- (39) Germani Y, Dauga C, Duval P, Huerre M, Levy M, Pialoux G, Sansonetti P, Grimont PA (Strategy for the detection of *Helicobacter* species by amplification of 16S rRNA genes and identification of *H. felis* in a human gastric biopsy.1997). *Res Microbiol*. 1997 May;148(4):315-26.
- (40) Kansau I, Raymond J, Bingen E, Courcoux P, Kalach N, Bergeret M, Braimi N, Dupont C, Labigne A Genotyping of *Helicobacter pylori* isolates by sequencing of PCR products and comparison with the RAPD technique..*Res Microbiol*. 1996 Oct ;147(8):661-9.
- (41) Rugge M, Busatto G, Cassaro M, Shiao YH, Russo V, Leandro G, Avellini C, Fabiano A, Sidoni A, Covacci A Patients younger than 40 years with gastric carcinoma: *Helicobacter pylori* genotype and associated gastritis phenotype. *Cancer*. 1999 Jun 15;85(12):2506-11.
- (42) Sozzi M, Tomasini ML, Vindigni C, Zanussi S, Tedeschi R, Basaglia G, Figura N, De Paoli P. Heterogeneity of *cag* genotypes and clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection *J Lab Clin Med*. 2005 Nov;146(5):262-70.
- (43) Tomasini ML, Zanussi S, Sozzi M, Tedeschi R, Basaglia G, De Paoli P. Heterogeneity of *cag* genotypes in *Helicobacter pylori* isolates from human biopsy specimens. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 976-80.
- (44) Ministerio del Poder Popular para la Salud. Anuario de Mortalidad 2008. [serie en Internet]. [citado Mayo, 2010]. Disponible en: http://www.bvs.org.ve/anuario/anuario_2008.pdf

ANEXOS

Resultados

Tabla 1.

Características clínicas de los pacientes con cáncer gástrico.

Variables	n	%
Sexo		
Masculino	19	61,3
Femenino	12	38,7
Clasificación de Borrmann		
I	3	11,5
II	1	3,8
III	22	84,6
Ubicación de la lesión		
Antro	6	23,1
Cardias	2	7,7
Cuerpo	23	88,5
Histología		
ADC poco diferenciado	11	42,3
ADC moderadamente diferenciado	13	50,0
ADC bien diferenciado	2	7,7
Linfoma difuso de células B grandes	1	3,8
Maltoma	4	15,4
Clasificación de Lauren		
Difuso	12	46,2
Intestinal	14	53,8

Tabla 2.

Expresión de *cagA* según grupos.

	Adenocarcinoma		Linfoma		Control	
Expresión de <i>cagA</i>	N	%	N	%	n	%
Positivo	20	76,9	3	60,0	21	48,8
Negativo	6	23,1	2	40,0	22	51,2
Total	26	100,0	5	100,0	43	100,0

$\chi^2 = 5,303$ (p = 0,071)

Tabla 3.

Expresión de *cagE* según grupos.

	Adenocarcinoma		Linfoma		Control	
cagE	N	%	n	%	N	%
Positivo	18	69,2	3	60,0	32	74,4
Negativo	8	30,8	2	40,0	11	25,6
Total	26	100,0	5	100,0	43	100,0

$\chi^2 = 0,571$ ($p = 0,752$)

Tabla 4.

Expresión de *virB11* según grupos.

	Adenocarcinoma		Linfoma		Control	
virB11	N	%	n	%	n	%
Positivo	17	65,4	3	60,0	32	74,4
Negativo	9	34,6	2	40,0	11	25,6
Total	26	100,0	5	100,0	43	100,0

$\chi^2 = 0,904$ (p = 0,636)

Tabla 5.

Relación de la prueba ureasa y grupo.

Prueba ureasa	Linfoma		Adenocarcinoma	
	N	%	N	%
Positiva	1	20,0	2	7,7
Negativa	4	80,0	24	92,3
Total	5	100,0	26	100,0

$\chi^2 = 0,001$ (p = 0,979)

Tabla 6.

Relación del resultado del PCR y grupo.

	Linfomas		Adenocarcinoma		Controles	
PCR	n	%	N	%	N	%
Positiva	2	40,0	16	61,5	42	97,7
Negativa	3	60,0	10	38,5	1	2,3
Total	5	100,0	26	100,0	43	100,0

$\chi^2 = 19,692$ (p = 0,001)

Tabla 7.

Relación del resultado de la biopsia y grupo.

Linfoma		Adenocarcinoma		Controles	
n	%	N	%	n	%
4	80,0	21	80,8	43	100,0
1	20,0	5	19,2	0	0,0
5	100,0	26	100,0	43	100,0

$\chi^2 = 9,060$ (p = 0,011)

Tabla 8.

Relación de la expresión de *cagE* y *virB11* según grupo.

Expresiones	Cáncer		Control	
	N	%	n	%
cagE+ / virB11+	18	58,1	31	72,1
cagE+ / virB11-	2	6,5	1	2,3
cagE- / virB11+	3	9,7	1	2,3
cagE- / virB11-	8	25,8	10	23,3
Total	31	100,0	43	100,0

$\chi^2 = 3,141$ ($p = 0,370$)

Tabla 9.

Relación de la expresión de *cagE* y *virB11* y tipo de cáncer.

Expresiones	Adenocarcinoma		Linfoma	
	N	%	n	%
cagE+ / virB11+	16	61,5	2	40,0
cagE+ / virB11-	1	3,8	1	20,0
cagE- / virB11+	2	7,7	1	20,0
cagE- / virB11-	7	26,9	1	20,0
Total	26	100,0	5	100,0

$\chi^2 = 2,765$ (p = 0,429)

Instrumento de Recolección de Datos

Paciente N° _____

Fecha: _____

Nombre: _____ **Edad:** _____ **Sexo:** F ___ M ___

CI. _____, Dirección: _____

_____ Telefono: _____

Antecedentes Personales:

Co-Morbilidad: _____

Antecedente Enfermedad Gastrointestinal:

Patología Oncológica: NO: _____ SI: _____ (ESPECIFIQUE) :

Quimioterapia: _____ Ultima dosis: _____

Radioterapia: _____ Gy Ultima dosis: _____

Hipersensibilidad a medicamentos: Sí ___ No ___ ¿Cuál? _____

Hábitos Psico-Biológicos:

Medicamentos: Sí ___ No ___ ¿Cuál? _____

Consumo de Alcohol: Sí ___ No ___

Habitos tabáquicos: Si ___ No ___

Examen Funcional

Perdida de Peso: Sí___ No___ Dolor Abdominal: Sí___No___ Vómitos: Sí___No___ Llenura
Precoz: Sí___No___

Examen Físico:

Peso: _____ Talla: _____ IMC: _____

Signos vitales: TA: ___/___ FC: _____ FR: _____

Anomalías encontradas: _____

Tacto Rectal: Sangre Sí___ No___

Paraclínicos:

EXAMEN	VALOR
Hb	
Hcto	
TPT	
TP	
Glicemia	
Creat	
Urea	

Clasificación endoscópica Borrmann

I	
II	
III	
IV	

Ubicación: _____

Clasificación Histológica de Lauren:

República Bolivariana de Venezuela
Instituto Venezolano de Los Seguros Sociales
Servicio Oncológico Hospitalario de los Seguros Sociales
Departamento de Vías Digestivas
Servicio de Gastroenterología

Consentimiento Escrito de Aceptación del Protocolo de Estudio

Estimado paciente:

La presente es con la finalidad de solicitar su colaboración para la realización del Trabajo Especial de Investigación titulado: **“GENOTIPOS *cagE* Y *virB11* DE HELICOBACTER PYLORI ASOCIADOS A PATOLOGIAS GASTRODUODENALES”**, realizado por Roscelys Margarita Cumana Betancourt y Mailyn Thais Soto Grazzina, Médicos Residente del Curso de Especialización en Gastroenterología del Servicio Oncológico Hospitalario “Padre Machado”.

El propósito de nuestro trabajo es determinar la relación entre la infección por *Helicobacter Pylori* genes *cagE* y *virB11* y la aparición de neoplasia gástrica en aquellos pacientes con histología previa de Adenocarcinoma gástrico y linfoma; que acudan a la consulta de gastroenterología referidos de centros foráneos a nuestro hospital, comparándolo con el grupo control sin neoplasia gástrica.

Para lograr este objetivo, se incluirán 50 personas, con edades comprendidas entre 30 y 90 años que acudan a la consulta de gastroenterología con diagnóstico Adenocarcinoma Gástrico, linfoma; así como también se incluirán 44 pacientes con gastroscopia negativa para neoplasia, los cuales serán escogidos de forma aleatoria.

Un grupo de expertos en ética aprobó este estudio al considerarlo seguro para usted, según las leyes venezolanas.

Su participación es completamente voluntaria y en cualquier momento podrá solicitar mayor información si lo requiere. Al participar, estará usted colaborando con nuestro aprendizaje y con la investigación en esta importante área. Aún después de haber aceptado en un principio, es usted libre de abandonar el estudio en cualquier momento.

Toda la información obtenida durante el estudio es confidencial, únicamente accesible a su médico y a las autoridades sanitarias que se encargan de inspeccionar estudios clínicos.

Agradecemos su valiosa colaboración.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo (paciente), _____, C.I. _____, venezolano, mayor de edad y de este domicilio, hago constar que deseo participar de forma libre y voluntaria en la realización del Trabajo Especial de Investigación titulado: **“GENOTIPOS *cagE* Y *virB11* DE *HELICOBACTER PYLORI* ASOCIADOS A PATOLOGIAS GASTRODUODENALES”**. Comprendo la naturaleza de este estudio así como sus riesgos. Igualmente aseguro que se me ha informado de los basamentos de la investigación y estoy consciente de las consecuencias del mismo. Aceptando por tanto la administración de los medicamentos en caso que sea necesario.

Fecha: _____

Firma: _____

Yo (investigador), _____, declaro que explique los procedimientos, objetivos y riesgos del presente estudio; otorgue al paciente tiempo suficiente para decidir su participación y aclaré las dudas que surgieron.

Testigo:

Nombre: _____ C.I. _____

Anexo 3

Pares de cebadores para las ampliaciones de PCR de los genes de *H. pylori*

Nombre	Gen	Secuencia	Referencia
HeliF	<i>16S ARNr</i>	5'- AACGATGAAGCTTCTAGCTTGCTAG -3'	(Germani, et al., 1997)
HeliR	<i>16S ARNr</i>	5'- GTGCTTATTCSTNAGATACCGTCAT -3'	(Germani, et al., 1997)
GlmMF	<i>glmM</i>	5'- GGATAAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGG - 3'	(Kansau, et al., 1996)
GLmMR	<i>glmM</i>	5'- GCTTACTTTCTAACACTAACGCGC -3'	(Kansau, et al., 1996)
cagAF	<i>cagA</i>	5'-ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAG-3'	Rugge <i>et al.</i> , 1999
cagAR	<i>cagA</i>	5'-AGAAACAAAAGCAATACGATCATTC-3'	Rugge <i>et al.</i> , 1999
cagEF	<i>cagE</i>	5'- TTGAAAACCTTCAAGGATAGGATAGAGC -3'	(Sozzi et al., 2005)
cagER	<i>cagE</i>	5'- GCCTAGCGTAATATCACCATTACCC -3'	(Sozzi et al., 2005)
virB11F	<i>virB11</i>	5'- TTAAATCCTCTAAGGCATGCTAC -3'	(Sozzi et al., 2005)
virB11R	<i>virB11</i>	5'- GATATAAGTCGTTTTACCGCTTC -3'	(Sozzi et al., 2005)