



UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

Genotipificación de cepas de *Helicobacter pylori* CagA/CagE en mucosa
gástrica y su correlación con la severidad de la lesión gástrica

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

AUTORA

Fazio Limo, Alessandra Berenis

0000-0001-8584-5704

ASESOR

Lic. Pineda Chavarria, Roberto Christian

0000-0001-9388-1342

Lima, Perú

2023

Metadatos complementarios**Datos del autor(a)**

Autor(a): Fazio Limo, Alessandra Berenis

Tipo de documento de identidad: DNI

Numero de documento de identidad: 73520543

Datos del(a) asesor(a)

Asesor(a): Pineda Chavarria, Roberto Christian

Tipo de documento de identidad: DNI

Numero de documento de identidad: 10308965

Datos de los Miembros del Jurado

Presidente: Gonzales Figueroa, Hugo Duglas Aquiles

DNI: 06610912

ORCID: 0000-0003-0760-8812

Secretario: Cruz Neyra, Lidia Luz

DNI: 08406252

ORCID: 0000-0003-3902-4280

Vocal: Hau Camoretti, Jorge Eduardo

DNI: 08758685

ORCID: 0000-0002-5420-7811

Datos de la investigación

Campo del conocimiento OCDE: 1.06.03

Código del Programa: 511206

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo de investigación, a mis padres María Elena Limo y Rafael Fazio, quienes siempre confiaron en mí, apostando por mi crecimiento profesional como Bióloga desde el inicio de la carrera, así mismo también dedico esta investigación a mi hermana Nicole Fazio, por ser una motivación para mí para seguir luchando por mis sueños, a mi novio Anthony quien fue testigo desde el inicio y fin del presente proyecto de investigación dándome ánimos para salir adelante y todas las personas que siempre confiaron y esperaron las mejores expectativas hacia mí persona.

AGRADECIMIENTOS

Se me presentó la posibilidad de realizar la tesis de pregrado en el extranjero, en dónde tuve la gran oportunidad de desarrollarla en la universidad católica del Norte de la facultad de medicina, la cual contaba con el laboratorio “CancerLab”, totalmente equipado para el área de Biología Molecular en Chile, motivo por el cual, tengo gratos agradecimientos para todas las personas que formaron parte de este proceso. En primer lugar, agradezco a mis padres y mi hermana por apoyarme desde el primer día que decidí viajar para Chile y salir de casa para poder realizar la presente investigación, por su constante apoyo y preocupación desde lejos durante todo el desarrollo de la tesis hasta el final. También agradezco a mi novio Anthony por ser una pieza fundamental en la presente investigación, ya que fue mi apoyo directo físicamente y vivimos de esta experiencia cada día que pasaba hasta conseguir el resultado final. Agradezco al Dr. Giuliano Bernal mi profesor guía y asesor externo en todo el desarrollo de la tesis, ya que gracias a él tuve la oportunidad de realizar una investigación en el extranjero y fue mi guía durante todo el proceso, así mismo también agradezco al Dr. Zaffiri, Cathy, Gisela, Sebastián, Mirit y todo el equipo de Cáncer Lab de la facultad de Medicina de la Universidad Católica del Norte- Chile, ya que fueron piezas fundamentales para el desarrollo de la presente investigación mediante sus enseñanzas, permitiéndome adquirir diferentes habilidades y aprender diversas técnicas en el laboratorio de Biología Molecular, agradezco también a mi profesor y asesor interno Blgo. Roberto Pineda, quien me asesoró y siempre estuvo a disposición para resolver mis dudas en la presente investigación y agradezco también al profesor Hugo Samamé quien me ayudó amablemente a resolver mis dudas en la parte de bioestadística con toda la paciencia posible. Por otro lado, agradezco a la señora Rosa, mamá de mi novio, quien siempre estuvo pendiente de mi avance de la tesis y fue de gran apoyo moral. Finalmente agradezco a mis familiares y compañeros de Perú, quienes me proporcionaron gran motivación para poder realizar la presente investigación con éxito desde lejos.

ÍNDICE

RESUMEN	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUCCIÓN	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	13
OBJETIVO GENERAL.....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
MARCO TEÓRICO.....	15
Mecanismo de patogenicidad	15
Isla de patogenicidad CagPAI	15
Sistema de secreción tipo IV	16
Fosfoglucosamina mutasa (glmM).....	17
Gen asociado a Citotoxina (CagA).....	17
Gen asociado a Citotoxina E (CagE).....	18
nested q-PCR.....	18
Indicadores de la severidad de la lesión gástrica.....	19
Sistema de clasificación Sydney.....	19
Estadificación de la gastritis con el sistema OLGA	20
Gastritis crónica leve	20

Ulceras pépticas	20
Metaplasia.....	21
Adenocarcinoma	22
ANTECEDENTES	22
HIPÓTESIS.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Lugar de ejecución	25
Tipo y diseño de Investigación.....	25
Variables.....	25
Variable independiente	25
Variable dependiente	25
Operacionalización de las variables	26
Muestreo.....	26
Procedimiento.....	27
Diseño de primers internos, externos y sondas para CagE.....	28
Amplificación de los genes de interés, NESTED qPCR	29
Cualificación de la severidad de lesión en la mucosa gástrica	31
Análisis estadístico	31
Aspecto ético	32
RESULTADOS.....	33
Amplificación del gen glmM (ureC) por nested-q PCR	33

Amplificación de los marcadores de virulencia CagA y CagE por nested-q PCR	34
Genotipificación de cepas CagA/CagE	35
Correlación de los genotipos CagA/CagE sobre las lesiones de mucosa gástrica	35
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	40
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
ANEXOS	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de barras amplificación del gen glmM	33
Figura 2. Diagrama de barras frecuencia de muestras positivas para CagA y CagE	34
Figura 3. Resultados genotipos CagA y CagE.....	35
Figura 4 Resultados genotipos CagA/CagE en lesiones gástricas	36

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Marco teórico.....	46
Anexo B. Programacion del Biorad para el q-PCR.....	49
Anexo C. Curvas de amplificación	50
Anexo D. Tablas resumen.....	53

RESUMEN

La presencia de *Helicobacter pylori* en la mucosa gástrica humana es la principal causa de enfermedades gastrointestinales, según el nivel socioeconómico con una prevalencia del 50% a nivel mundial a través de diversas vías de transmisión. Se ha demostrado que la infección por cepas *H. pylori* CagA+/CagE+ se asocia al desarrollo de patologías gástricas, motivo por el cual se planteó correlacionar la severidad de la lesión gástrica en pacientes infectados con *H. pylori* que presenten los genotipos CagA+/CagE+. En el presente estudio se realizó la extracción de ADN a partir de 100 muestras de mucosa gástrica fijada en parafina, diagnosticadas por Histología con patologías gástricas y presencia de *H. pylori*, las cuales fueron corroboradas para la presencia de *H. pylori* mediante la amplificación del gen glmM por nested-qPCR, obteniendo 93 positivas para *H. pylori*. Se detectó la presencia de los marcadores de virulencia mediante la amplificación de los genes CagA y CagE por nested-qPCR, obteniendo resultados positivos y negativos similares para ambos marcadores, los cuales se correlacionaron con la severidad de la lesión gástrica. Se presentó una frecuencia alta para el genotipo CagA-/CagE- frente a gastritis leve y una frecuencia alta para el genotipo CagA+/CagE+ frente a gastritis moderada-úlceras pépticas, metaplasia y adenocarcinoma gástrico, dichos resultados indicaron una asociación perfecta entre los genotipos CagA y CagE y una asociación alta entre los genotipos CagA/CagE sobre la severidad de la lesión gástrica (V Cramer = 0.70, $p < 0.001$).

Palabras Clave: *Helicobacter pylori*, lesiones gástricas, genotipos, CagA, CagE.

ABSTRACT

The presence of *Helicobacter pylori* in the human gastric mucosa is the main cause of gastrointestinal diseases, according to socioeconomic level, with a prevalence of 50% worldwide through various transmission routes. It has been shown that infection by *H. pylori* CagA+/CagE+ strains is associated with the development of gastric pathologies, which is why it was proposed to correlate the severity of gastric injury in patients infected with *H. pylori* who present the CagA+/CagE+ genotypes. In the present study, DNA extraction was performed from 100 samples of gastric mucosa fixed in paraffin, diagnosed by histology with gastric pathologies and presence of *H. pylori*, which were corroborated for the presence of *H. pylori* by amplification of the glmM gene by nested qPCR, obtaining 93 positives for *H. pylori*. The presence of virulence markers was detected by amplification of the CagA and CagE genes by nested qPCR, obtaining similar positive and negative results for both markers, which correlated with the severity of the gastric lesion. A high frequency was presented for the CagA-/CagE- genotype against mild gastritis and a high frequency for the CagA+/CagE+ genotype against moderate gastritis-peptic ulcers, metaplasia and gastric adenocarcinoma, these results indicated a perfect association between the CagA genotypes and CagE and a association between the CagA/CagE genotypes with the severity of gastric injury (V Cramer = 0.70, $p < 0.001$).

Keywords: *Helicobacter pylori*, gastric lesions, genotypes, CagA, CagE.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori pertenece al grupo de bacterias patógenas Gram Negativas, caracterizada por desarrollar la capacidad de colonizar el epitelio gástrico en un ambiente ácido, según Chahuán et al. (2020) a través de la acción de la ureasa en el lumen gástrico, la urea se convierte en dióxido de carbono y amoníaco, produciendo la alcalinización del medio y alcanzando la superficie de las células del epitelio gástrico.

La infección por *H. pylori* es una de las más altas en el mundo, existen diversas vías de infección de la bacteria, dado es el caso, que en países sur americanos como Colombia, Brasil, Chile y Perú han reportado prevalencias de *H. pylori* entre un 50 al 90%, donde se destacan factores de riesgo de higiene, sanidad de alimentos y agua potable (Khalifa et al., 2010) y en países desarrollados es dominante la transmisión de persona a persona dentro de las familias (Bayona Rojas & Gutiérrez Escobar, 2017).

El proceso de infección induce inicialmente una gastritis leve superficial y el 15 a 20% de individuos, puede progresar hacia gastritis moderada, úlceras pépticas, diversos tipos de metaplasia y adenocarcinoma gástrico (Quiroga et al., 2005). La virulencia de las cepas de *H. pylori* se determina mediante el sistema de patogenicidad CagPAI, el cual se encuentra conformado por aproximadamente 30 genes que abarcan dos regiones que codifican proteínas que componen el sistema de secreción tipo IV (Olbermann et al., 2010).

Otras bibliografías sostienen que el gen CagA (Gen asociado a la citotoxina A) es considerado uno de los principales marcadores de CagPAI, ya que las cepas de *H. pylori* que codifican para la proteína se han clasificado como CagA positivas, las cuales tienden a producir lesiones más severas en el epitelio gástrico. (Ramis et al., 2013) y su presencia se ha

asociado estadísticamente con ulcera duodenal, atrofia de la mucosa gástrica, cáncer gástrico y aumento de la expresión de la interleucina-1 β e IL-8 (Arévalo et al., 2009)

Otro marcador asociado a la isla de patogenicidad CagPAI es el gen CagE (Gen asociado a la citotoxina E), donde se afirma que el producto de la proteína CagE induce a hipoclorhidria gástrica, Gastritis moderada y úlceras pépticas, reordenamientos en el citoesqueleto de las células gástricas, activación del factor nuclear NF-kB y secreción de la interleucina IL-8 (Boyanova et al., 2011).

Existen estudios basados en la identificación de marcadores de patogenicidad para *H. pylori*, CagA es un marcador base muy utilizado para identificar infección por cepas agresivas, sin embargo, CagE no se encuentra tan estudiado en comparación con CagA. Algunos autores han estudiado la combinación de CagA y CagE por formar parte del sistema CagPAI y han informado una asociación positiva entre las cepas de *H. pylori* con dichos marcadores de virulencia y las patologías gástricas (El Khadir et al., 2021).

Por tal razón, en el presente proyecto de investigación se buscó evaluar la relación de la severidad en la lesión gástrica con la infección por genotipos CagA/CagE de *H. pylori* en pacientes con patologías gástricas, mediante una técnica molecular que permita identificar con mayor sensibilidad la agresividad de la cepa.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La infección por *H. pylori* en Latinoamérica, principalmente en países con alta tasa de infección incluido el Perú con un 70% aproximadamente, continúa siendo un problema relevante debido a la prevalencia y el impacto médico ocasionado por las patologías gástricas asociadas (Harris et al., 2020), causante de enfermedades gastrointestinales en el hombre

como gastritis crónica, úlcera gástrica, úlcera duodenal y cáncer gástrico. (Bayona Rojas & Gutiérrez Escobar, 2017).

Asimismo, se presume que parte del efecto patogénico producido por *H. pylori* en la mucosa gástrica se puede correlacionar con la presencia de la isla de patogenicidad CagPAI presente en la bacteria, y en una región de genes patogénicos dentro de la isla se encuentran los genes CagA y CagE los cuales codifican proteínas capaces de alterar rutas celulares causando daños a nivel de la mucosa gástrica humana. Se han identificado genotipos CagA positivos en aproximadamente el 90% de pacientes infectados con el microorganismo y su presencia se ha asociado a diversas patologías gástricas. (Arévalo et al., 2009)

Por otro lado, estudios recientes han reportado que genotipos CagE positivos en pacientes infectados con *H. pylori* también están asociados al desarrollo de úlceras peptídicas y gastritis crónica (Fukuta et al., 2002), pero aún falta realizar más trabajos en donde se evalúe la virulencia entre CagA y CagE en combinación de pacientes infectados con *H. pylori* y el desarrollo de enfermedades gastrointestinales de alto grado, debido a que en la mayoría de los casos, los estudios analizados realizan combinaciones con otros genes, a pesar que todos los genes de virulencia de *H. pylori* son parte de la isla de patogenicidad CagPAI.

En Chile aproximadamente el 79% de la población está colonizada por *H.pylori* y el 39% es adquirida a través de la infancia, la cual permanece por el resto de la vida si no es detectada a tiempo, generando una mayor tasa de infección en poblaciones pobres. (Toledo et al. 2007). Por otro lado, en el Perú, la población infectada por *H.pylori* ha disminuido de un 83% a un 58,7% debido a que en el 2012 el gobierno peruano implementó el “plan esperanza” con el fin de disminuir el desarrollo del cáncer a través de la prevención temprana, diagnóstico y tratamientos en la población de menor recurso económico, ya que las zonas con un nivel

socioeconómico bajo son la que determinan la prevalencia de la infección por la bacteria.(Yoza et al., 2022).

Por esta razón, es importante evaluar la relación entre la severidad de la lesión gástrica con la infección por genotipos CagA/CagE de *H. pylori* en mucosa gástrica fijada de pacientes con patologías gástricas.

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Actualmente la infección por *H. pylori* es el principal factor de riesgo para el desarrollo de diversas patologías gástricas incluido el cáncer y Latinoamérica se encuentra clasificada como la zona con la prevalencia más alta, específicamente países sudamericanos. Por otro lado, los factores de virulencia de *H. pylori* aún no han sido totalmente descubiertos y en la mayoría de los estudios realizados todo parece iniciar con la presencia de la isla de patogenicidad CagPAI en el genoma de *H. pylori*, por lo que se estima que el proceso de una infección agresiva puede estar involucrado en el desenlace de una patología gástrica de alto grado.

Según algunos autores al menos 18 genes de la isla CagPAI codifican para iniciar un sistema de ensamblaje e infectar a la célula gástrica mediada por la traslocación de CagA y otras proteínas que conforman el sistema de secreción tipo IV (CagE), CagA actúa como un iniciador que activa múltiples vías de señalización de células huésped motivo por el cual la erradicación dirigida a *H. pylori* CagA positivo puede ser más adecuado para las estrategias actuales de tratamiento personalizado. (Yong et al., 2015 p.10).

La presencia del gen CagE es esencial para la formación del sistema de secreción tipo 4 (Fukuta et al., 2002), llegando a utilizarse como marcador biológico de riesgo para lesiones

gástricas, el cual contribuye a una mejor evaluación del potencial patógeno de *H. pylori* para el pronóstico de la infección de la mucosa gástrica (Ramis et al., 2013).

Algunos autores afirman que la prueba de ambos genes Cag puede revelar mucho mejor la virulencia de las cepas de *H. pylori*, cuya presencia requiere una erradicación más agresiva de la infección. (Boyanova et al., 2011).

Motivo por el cual mediante las variables del presente estudio se podrán obtener resultados favorables que permitan descubrir la virulencia de los genotipos CagA/CagE positivos y su relación con la severidad de la lesión gástrica mediante el uso de diversas técnicas moleculares.

OBJETIVO GENERAL

Genotipificar cepas de *Helicobacter pylori* CagA/CagE en mucosa gástrica fijada de pacientes con patologías gástricas y evaluar su correlación con la severidad de la lesión gástrica

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Determinar la presencia de *H. pylori* en mucosa gástrica fijada (FFPE).
- B) Identificar los genotipos CagA/CagE positivos presentes en las muestras infectadas con *H. pylori* en mucosa gástrica fijada.
- C) Correlacionar la severidad de la lesión gástrica con la presencia de los genotipos CagA/CagE.

MARCO TEÓRICO

Mecanismo de patogenicidad

Isla de patogenicidad CagPAI

La isla de patogenicidad CagPAI es considerada la principal zona variable en todo el genoma bacteriano de *H.pylori*, tiene un tamaño aproximado de 40 kb, se encuentra entre el gen *glr* y ORF5, descrito por Tomb et al, en 1997 como HP0519 (Arévalo et al., 2009), tanto a la izquierda como hacia el extremo derecho tiene secuencias de inserción, llamadas elementos IS605. Motivo por el cuál, cepas con muchos elementos de inserción se las ha designado cepas tipo II y se caracterizan por tener un grado de virulencia menor al de las cepas tipo I que conforman la región CagPAI. Sumado a ello, dos de estos elementos IS605 se encargan de dividir CagPAI en dos regiones, designadas como Cag I y Cag II con un contenido de guanina y citosina del 35% a diferencia de la bacteria que tiene un 39% (Liévano et al.2018).

En relación con la secuencia del genoma de la cepa 26695 y NCTC 11638 de *H. pylori* se ha reportado que 30 proteínas codificadas por los genes de CagPAI tienen secuencia de señal, las cuales tienen un tamaño aproximado de 25 aminoácidos, llegando a la conclusión de que la isla CagPAI es de origen Gram negativo. (Arévalo et al., 2009). El gen CagA y CagE son dos de varios genes pertenecientes a la isla CagPAI, los cuales codifican para la formación del sistema de secreción tipos IV, el cual funciona como la maquinaria encargada del ensamblaje entre *H. pylori* y la célula gástrica, alterando vías de señalización encargadas de la motilidad celular, división del ciclo celular y el desarrollo de patologías gástricas incluido el cáncer.

Sistema de secreción tipo IV

Según estudios realizados a lo largo de los años, se han descrito cuatro sistemas de secreción para bacterias patógenas Gram negativas hasta la actualidad, tal es el caso de la bacteria *H. pylori*, la cual posee el sistema de secreción tipo 4 el cual se encarga de trasladar el factor de virulencia a las células. En *H. pylori* se han identificado cerca de 18 genes encargados de codificar para el sistema de secreción tipo IV, los cuales están dentro de CagPAI. (Arévalo et al., 2009). La proteína CagA de *H. pylori* es translocada a las células huésped por el sistema de secreción Cag tipo IV después de la unión bacteriana. (Wroblewski et al., 2010).

El sistema de secreción tipo IV está compuesto por proteínas que se ensamblan para formar dicho sistema, a nivel de membrana interna se encuentran las proteínas (CagE y Cag β), a nivel de peptidoglucano la proteína (CagM, CagH, CagN, CagT, CagV, CagU, CagW, CagX, CagY, Cag δ) y a nivel de membrana externa se encuentran proteínas conformadoras del pili (CagC, CagL, CagH, CagI). Una vez ensamblado el sistema de secreción tipo IV, para que CagA pueda ser trascolado a la célula gástrica se necesita que el sistema de secreción tipo IV interactúe con dos receptores en la célula huésped llamadas integrinas $\alpha 5$ y $\beta 1$. Una vez que las integrinas comienzan a interactuar con las proteínas CagL, CagH y CagI causan el ensamblaje del T4SS con la célula gástrica, abriendo un poro de modo que CagA pueda ser traslocado a la célula hospedera. (E. Rodríguez, 2015).

Luego que CagA es trascolado al interior de la célula huésped y es fosforilado a través de sitios específicos conocidos como EPIYA, comienza a interactuar con diversas vías de señalización, produciendo cambios en el citoesqueleto, morfología y en la movilidad de la célula huésped. La fosforilación ocurre en los sitios Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala también denominados segmentos EPIYA los cuales se pueden repetir hasta cinco veces en la mitad del

carbono terminal de CagA, basados en estas secuencias se han denominado cuatro sitios EPIYA (A, B, C, D). La presencia de estas repeticiones que rodean los sitios EPIYA son de gran importancia ya que pueden explicar la variabilidad en el número de estos sitios en CagA, así como diferencias en la patogenicidad de las cepas de *H. pylori*. (Arévalo et al., 2009).

Fosfoglucosamina mutasa (glmM)

Dentro de los genes de *H. pylori* el gen glmM, (anteriormente llamado ureC), es uno de los más estudiados ya que es un gen constitutivo que codifica para una fosfoglucosamina mutasa bacteriana (PNGM) perteneciente a la superfamilia alfa-D- fosfohexomutasa. Esta enzima es requerida para la interconversión de la glucosamina-6-fosfato a glucosamina-1-fosfato y participa directamente en la síntesis de la pared celular, este gen ha sido utilizado para la detección molecular de la bacteria en distintos tipos de muestras (Uniprot Consortium, 2022).

Gen asociado a Citotoxina (CagA)

El producto del gen CagA es una proteína de entre 125 y 140 kd, denominada CagA, durante el proceso de ensamblaje la proteína CagA es traslocada por el sistema de secreción tipo IV, hacia el interior de la célula epitelial (Bravo et al., 2012), donde la proteína CagA es fosforilada por quinasas ocasionando cambios a morfológicos en las células epiteliales del huésped. (Arias, 2015).

CagA es una citotoxina con actividad pleiotrópica, ya que activa diferentes sistemas de señales en la célula hospedadora, provocando diversos efectos negativos: ruptura de uniones intercelulares, estimulación de linfocitos, desregulación del ciclo celular, apoptosis celular y también desencadena la producción de interleucinas inflamatorias, dando lugar a una inflamación crónica. (Heras, 2017)

Las cepas de *H. pylori* se segregan en cepas CagA positivas y CagA negativas, dependiendo de la presencia o ausencia del producto génico terminal de la isla CagPAI. (Wroblewski et al., 2010) La infección con cepas positivas para CagA se asocia a un mayor riesgo de gastritis atrófica, úlcera péptica y cáncer gástrico (Trujillo et al., 2014).

Gen asociado a Citotoxina E (CagE)

Otro miembro del CagPAI, es el gen CagE (Gen asociado a la citotoxina E), el cual codifica una de las enzimas que suministra el sistema de secreción tipo IV (Cristancho Liévano et al., 2018) y también está relacionado con una mayor producción de IL-8 en las células epiteliales gástricas. (Ramis et al., 2013).

CagE es uno de los genes marcadores en la isla de patogenicidad CagPAI, el cual cumple un papel fundamental en la translocación y fosforilación de CagA, actuando como factor energético para suministrar energía al sistema de secreción tipo IV. (Chomvarin et al., 2008). Algunos estudios afirman que la presencia de CagE se asocia a enfermedad de úlcera péptica en niños y ulceración duodenal en adultos. (Day et al., 2000)

nested q-PCR

La técnica nested q-PCR o PCR anidada es una variante del PCR convencional, la cual se caracteriza por utilizar dos pares de primers para amplificar un fragmento de interés mediante dos reacciones de amplificación por separado. Como primera reacción de amplificación se utiliza la técnica de PCR convencional la cual consta de un par de primers externos para amplificar una región más extensa del gen de interés (A. Mohamed, 2015). Un segundo par de cebadores llamados cebadores anidados se unen dentro del primer fragmento del producto de PCR para permitir una segunda amplificación de una región más acotada mediante el uso de un par de primers internos utilizando la técnica q-PCR (Green & Sambrook, 2019). La técnica nested-qPCR es una técnica específica ya que se utilizan dos

pares de marcadores diferentes, de modo que aumente la especificidad en la reacción de amplificación y disminuya la posibilidad de contaminación en el proceso, para poder amplificar las regiones de interés con mayor precisión así sean cantidades pequeñas de la muestra.

Indicadores de la severidad de la lesión gástrica

En la mayoría de los casos, la colonización por *H. pylori* no causa algún síntoma, aproximadamente el 20% de todos los pacientes infectados desarrollarán síntomas de la infección, asimismo el 10% de las personas infectadas desarrollan úlceras pépticas, 1% a 3% desarrollan adenocarcinoma gástrico, y menos 0.1% desarrollarán linfomas MALT (tejido linfóide asociado a las mucosas) (Hagymási & Tulassay, 2014).

La prevalencia de la infección por *H. pylori* se relaciona con la influencia de factores medio ambientales como el nivel higiénico sanitario y los alimentos. La vía de transmisión no está claramente definida, pero existen evidencias de que el ciclo orofecal es más importante que la vía oral-oral, aunque ambas pueden coexistir (Martinez-Echavarrria et al., 2008).

Sistema de clasificación Sydney

El protocolo de Sydney se propuso en 1990 en el 9º congreso mundial de gastroenterología en Sydney, Australia; basado en una combinación de hallazgos topográficos, morfológicos y etiológicos para evaluar las variables etiológicas graduables: densidad de *H. pylori*, infiltración de neutrófilos, infiltración de células mononucleares, y atrofia intestinal (Valdivia, 2011). Inicialmente se propuso un muestreo sistemático del antro y el cuerpo, pero en 1994, el sistema Sydney fue revisado y actualizado por expertos en Houston, Texas, en donde se agregó una muestra de la incisura angularis, ya que se creía que representaba la ubicación donde ocurrían los primeros cambios de atrofia, metaplasia y displasia. (Sánchez Londoño et al., 2022).

Estadificación de la gastritis con el sistema OLGA

En el año 2005, el grupo internacional Operative Link on Gastritis Assessment (OLGA) planteó un nuevo sistema de estadificación para describir los estadios de la gastritis, en este esquema se reconoce a la atrofia gástrica como una de las características principales para el desarrollo del carcinoma gástrico y se clasifican en etapas progresivas que llamaron "estadios" y que van del 0 al IV, de manera que ya se ha demostrado que los pacientes con estadios avanzados (III y IV) tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico (Ronquillo et al., 2021).

Gastritis crónica leve

Se denomina gastritis a toda lesión inflamatoria que afecte a la mucosa gástrica, las gastritis agudas están acompañadas por infiltrados inflamatorios de neutrófilos en la mayoría de los casos. Algunos autores han asociado la gastritis crónica principalmente a factores externos dentro de los que el más importante es *H. pylori*, modulando que las células foveolares tienen receptores para estas bacterias, las cuales tienen una proteasa que destruye las glicoproteínas del moco, exponiendo de esta manera a las células a la acción destructiva del jugo gástrico. (Valdivia Roldán, 2011). En estas formas de gastritis se observa un infiltrado leucocitario sin destrucción ni pérdida de las glándulas gástricas. (Fernández Travieso, 2014). Todos los individuos infectados por *H. pylori* desarrollan gastritis, ya sea una pangastritis o una gastritis de predominio antral, siendo una infección fundamentalmente asintomática. (Pizarro & Arnoldo, 2019)

Úlceras pépticas

La úlcera péptica, o enfermedad ulcerosa péptica, es una lesión en forma de herida más o menos profunda, en la capa más superficial (denominada mucosa) que recubre el tubo digestivo. Cuando esta lesión se localiza en el estómago se denomina úlcera gástrica y cuando lo hace en la primera porción del intestino delgado se llama úlcera duodenal. (Moreira & López, 2004).

La úlcera péptica es una pérdida circunscrita de tejidos que alcanza la mucosa, submucosa y muscular; se produce en áreas más lábiles en el estómago expuestas a la acción del jugo gástrico. La perforación es la complicación más grave; se presenta en 1 a 6% de pacientes ulcerosos, los índices de admisión por perforación de úlcera se encuentran en constante aumento, por lo que esta complicación se ha mantenido durante el paso del tiempo. (Case et al., 2015).

Hoy en día, se considera como un agente infeccioso bacteriano a *H. pylori*, quien es el principal causante de la enfermedad ulcerosa péptica. Tan sólo un 10-20% de las personas infectadas por este microorganismo desarrollarán a lo largo de su vida una úlcera péptica en el estómago y/o duodeno. (Moreira & López, 2004).

Metaplasia

En definiciones generales la metaplasia intestinal se produce una sustitución de la mucosa gástrica por epitelio que semeja la mucosa intestinal, lo cual se considera una regeneración defectuosa (Arana & Corona, 2004).

La metaplasia intestinal es el reemplazo del epitelio glandular y/o foveolar por epitelio intestinal y se caracteriza por su similitud morfológica a los enterocitos. Existen numerosas clasificaciones de la metaplasia intestinal, no existiendo una clasificación universalmente aceptada. Estudios histopatológicos e histoquímicos muestran una identificación de dos tipos de metaplasia: el tipo I o completa, que se caracteriza por la presencia de células de absorción no secretorias con bordes en cepillo bien delineados, células de Paneth, y células que secretan sialomucinas y que corresponde a un fenotipo de intestino delgado; y el tipo II o incompleta o colónica, que incluye tipo IIA y IIB, que se caracterizan por la presencia de células

columnares y células que secretan sialomucinas (tipo IIA) y sulfomucinas (tipo IIB) (Sánchez-Cuén et al., 2016)

Adenocarcinoma

Los cambios intragástricos asociados con el desarrollo de cáncer son: gastritis atrófica, metaplasia intestinal, y pólipos gástricos (Arana & Corona, 2004).

Existen diferentes tipos de tumores neoplásicos de origen gástrico; el adenocarcinoma es el más común y cuenta para el 90-95% de las neoplasias derivadas de tejido gástrico. De acuerdo con la clasificación histopatológica de Lauren, se describen dos tipos de adenocarcinoma gástrico, el difuso y el intestinal, los cuales aparentemente tienen un comportamiento biológico y presentan alteraciones moleculares diferentes. (Robles et al., 2009).

La carcinogénesis gástrica de tipo intestinal progresa de la siguiente manera: mucosa gástrica normal, gastritis no atrófica, gastritis atrófica multifocal sin metaplasia intestinal, metaplasia intestinal de tipo completo (intestino delgado), displasia de bajo grado, displasia de alto grado y adenocarcinoma invasivo (Felipe & Guillermo, 2014). Por otro lado, la proliferación celular alterada, apoptosis, modificaciones epigenéticas en los genes supresores de tumores, activación de los oncogenes y la desregulación de la reparación del ADN conducen a la inflamación asociada carcinogénesis (Hagymási & Tulassay, 2014).

ANTECEDENTES

H. pylori es un bacilo Gram negativo, microaerófilo, de gran importancia a nivel mundial, tanto por su prevalencia como por las patologías que provoca (Romo González & Coria Jiménez, 2010). Crecen a temperatura de 37C° y la bacteria da positivas las pruebas de

oxidasa, catalasa y ureasa, siendo esta última fundamental para su identificación. (Romo González & Coria Jiménez, 2010).

Según la mayoría de los autores, se estima que la presencia de *H. pylori* en el sistema gástrico, es la infección humana más frecuente en el mundo; se calcula que aproximadamente el 50% de la población está infectado por este microorganismo. Los países o áreas geográficas con un bajo desarrollo socioeconómico presentan las cifras de prevalencia más altas, el 70-80% de la población en edad adulta está infectado por *H. pylori*; en cambio, en las zonas con un alto desarrollo socioeconómico, la tasa de infección en población adulta se sitúa en torno al 40-50% y la mayoría de las personas se infecta durante la infancia. (Martín de Argila & Boixeda, 2004).

Uno de los factores de virulencia más importantes de *H. pylori* es la isla de patogenicidad CagPAI, la cual contiene 31 genes, incluido el gen CagA, y también codifica para proteínas del sistema de secreción tipo IV, el cual se especializa en la transferencia de una variedad de proteínas a través de la membrana bacteriana al espacio extracelular o en la célula huésped. (Portela et al. 2009). En un estudio con muestras de biopsias gástricas a las cuales se les realizó una extracción de DNA y amplificación del material genético, demostraron que algunas cepas de *H. pylori* presentaron una mayor expresión de genes de patogenicidad que han sido asociados con la mayor virulencia de la bacteria. (Rodríguez-Burneo et al. 2019).

La citotoxina CagA es secretada hacia el epitelio gástrico, donde estimula la producción de la IL-8 en las células epiteliales del hospedero, lo que induce el mecanismo de la inflamación. Trabajos recientes señalan el papel patogénico del gen CagA y su asociación con enfermedades gastroduodenales, como úlceras duodenales, úlceras gástricas y gastritis crónica (Martinez et al. 2008). Por otro lado, CagE es un gen ubicado dentro de la isla de

patogenicidad que induce la secreción de quimiocinas, como la interleucina (IL)-8, de infectadas células epiteliales del huésped. (Day et al. 2000)

En otro estudio se evaluó CagE positivo vs. CagE negativo, en donde obtuvieron genotipos CagE positivos con una frecuencia del 59,6% en gastritis crónica vs. genotipos CagE negativos con una frecuencia del 31,2% en gastritis no atrófica y CagA/CagE positivos vs CagA/CagE negativos, obteniendo 66,7 % en gastritis crónica frente a 38,1 % en gastritis no atrófica respectivamente, mostrando una mayor asociación con el riesgo de gastritis crónica. (Bakhti et al., 2020). Otros autores analizaron la gravedad de la enfermedad gástrica y la asociación entre los marcadores CagA/CagE, obteniendo resultados confiables al 99% de casos positivos ($P = 0,001$), demostrando que ambos genes Cag puede revelar mucho mejor las cepas de *H. pylori* más virulentas. (Boyanova et al., 2011).

En otra investigación, determinaron la virulencia de los genes CagA y CagE frente a patologías gástricas en pacientes dispépticos, mediante una extracción de DNA de muestras de biopsias gástricas, posterior a ello, amplificaron los marcadores de virulencia utilizando un PCR convencional y los productos de PCR fueron revelados mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 2%, correlacionado la presencia de los marcadores de virulencia con los diagnósticos gástrico en pacientes infectados con *H. pylori*. (Chomvarín et al. 2007).

Finalmente, algunos autores recomiendan el uso de métodos moleculares que sean más sensibles y específicos en la determinación de la presencia o ausencia de *H. pylori* y su patogenicidad frente a patologías gástricas, ya que hasta la fecha no se ha reportado otro tipo de análisis moleculares para la identificación de los genes y en la mayoría de los casos utilizan una electroforesis para la interpretación de sus resultados, así mismo el uso de otra técnica molecular con mayor agudeza puede entregar información adicional, respecto a

resistencia antibiótica, lo que puede servir de guía para la indicación de un esquema de erradicación a la medida. (Chahuán et al., 2020).

HIPÓTESIS

Existe una correlación entre los genotipos CagA/CagE de *H. pylori* y la severidad de las lesiones gástricas en mucosa gástrica fijada de pacientes procedentes del Centro Anatomopatológico de Coquimbo - Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de ejecución

Laboratorio CáncerLab, Facultad de Medicina, Universidad Católica del Norte, Coquimbo-Chile.

Tipo y diseño de Investigación

Investigación descriptiva y correlacional

Variables

Variable independiente

Genotipificación de cepas CagA/CagE.

Variable dependiente

Severidad de la lesión gástrica en mucosa gástrica fijada

Operacionalización de las variables

Objetivos específicos	Variable	Indicador	Escala de medida	Instrumento	Categorización de la variable
Determinar la presencia de <i>H. pylori</i> en mucosa gástrica fijada (FFPE).	VD: Presencia de <i>H. pylori</i> VI: Mucosa gástrica fijada	Presencia gen UreC	Nominal binaria	Nested-qPCR	Variable cualitativa
Identificar los genotipos CagA/CagE positivos presentes en las muestras infectadas con <i>H. pylori</i> en mucosa gástrica fijada.	VD: Genotipos CagA/CagE positivos VI: Muestras infectadas con <i>H. pylori</i> en mucosa gástrica fijada	Genotipos CagA/CagE positivos	Nominal binaria	Nested-qPCR	Variable cualitativa
Correlacionar la severidad de la lesión gástrica con la presencia de los genotipos CagA/CagE.	VD: Severidad de la lesión gástrica (Clasificación de Sydney y Olga) VI: Presencia genotipos CagA/CagE	Severidad de la lesión gástrica	Nominal	Pruebas estadísticas	Variable cualitativa

Muestreo

El Centro de Diagnóstico Anatómico Patológico de Coquimbo, contó con un total de 300 muestras positivas por Histología en los últimos tres años, posterior a ello, el patólogo encargado corroboró la presencia de *H. pylori* en las muestras por histología junto con las lesiones gástricas, llegando a donar un N=100 muestras positivas anonimizadas para *H. pylori* con diversos diagnósticos gástricos aleatorios.

Las 100 muestras donadas a la presente investigación, debían presentar los siguientes criterios de inclusión: Ingresadas al laboratorio dentro de los últimos tres años, positivas para *H. pylori* por histología, diagnosticadas con gastritis leve, gastritis moderada, úlceras pépticas, metaplasia y adenocarcinoma gástrico y un tamaño de 30um por cada una, luego de ser ingresadas al laboratorio presentando dichos criterios de inclusión, se realizó un Nested-qPCR para detectar presencia de *H. pylori* en las muestras de mucosa gástrica fijada y excluir aquellas que hayan presentado resultado negativo en la amplificación del marcador de *H. pylori*.

Procedimiento

Extracción del material genético

La extracción del material genético se realizó con el kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue, el primer paso constó de un proceso de desparafinado de la muestra de mucosa gástrica fijada, para ello se agregó 1ml de xileno a cada muestra contenida en un tubo de 1.5ml , se realizó un spin y se centrifugó a velocidad máxima, este paso se hizo por duplicado de tal manera que se pueda disolver gran cantidad de parafina , luego se removió el xileno contenido y se agregó 1ml de etanol al 100% , el cual también se le realizó un spin , centrifugó y se removió el etanol contenido hasta dejarlo secar al aire durante 10 minutos a 37C°. Para la lisis celular se resuspendió el sedimento en 180uL de buffer ATL y se agregó 20uL de proteinasa k, se mezcló y se dejó incubando por 1 hora a 56C° y luego otra hora más a 90°C, transcurrido el tiempo se añadió 200 uL de buffer AL y 200 uL de etanol al 100%. Para la unión de DNA a la columna se transfirió todo el lisado a la columna QIAmp MinElute en el tubo colector y se centrifugó a 8000 rpm por un minuto. Para los lavados se transfirió la columna un nuevo tubo colector y se agregó 500uL de buffer AW1 reconstituido, se centrifugó a 8000rpm por un minuto, luego se descartó el eluido y se transfirió un nuevo tubo colector, seguidamente se agregó 500 uL de buffer AW2 reconstituido y se centrifugó a 8000 rpm por otro minuto y se centrifugó la columna por 3 minutos más para secar la membrana. Finalmente, para la elución del DNA se colocó la columna en un tubo de elución de 1.5ml y se agregó 60 uL de buffer ATE en la columna, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y se centrifugó por un minuto a máxima velocidad para la elución final.

Cuantificación y evaluación de material genético extraído

Una vez extraída la muestra, se cuantificó para determinar pureza e integridad y asegurar una extracción de alto rendimiento y elevada calidad. Para ello se utilizó el espectrofotómetro EPOCH, mediante el uso de la placa Take3™ para micro volúmenes, la

cual viene incluida con el equipo para la cuantificación de ácidos nucleicos. La placa Take3™ se caracteriza por contener ubicaciones de 16 micropuntos, permitiendo la cuantificación de hasta 16 muestras en volúmenes de 2uL mediante uso del programa Gen 5, para ello se cargó 2uL de buffer ATE en todos los micropuntos de la placa Take3™ en los que se vayan a cuantificar muestras, luego se insertó la placa Take3™ en el equipo y se seleccionaron los pocillos cargados con la opción “blank” en el software Gen 5 y luego se seleccionó la opción “read”. Una vez que el equipo realizó la lectura del blanco y los pocillos seleccionados marcaron verde como resultado de medición correcta, se seleccionó la opción “approve” dejando al equipo listo para realizar la cuantificación de las muestras, para ello se cargó 2uL de material genético extraído en los pocillos y se repitió la misma metodología de la lectura del blanco. El equipo entregó la concentración de DNA en ng/uL y la razón de absorbancia 260/280, la que se encontró entre 1,6 y 2,1 indicando una buena calidad e integridad de la muestra.

Diseño de primers internos, externos y sondas para CagE

Para los genes CagA y glmM no fue necesario el diseño de primers y sondas, ya que al ser genes registrados en la patente 57150 los primers se encontraban en el stock de laboratorio, motivo por el cual solo se realizó el diseño de primers y sondas para CagE.

En NCBI se ingresaron los datos del gen de interés CagE para obtener la secuencia y realizar el blast con el genoma completo de la cepa 26695 de *H. pylori*, con los alineamientos presentando una similitud del 100% (identidad) o cercana, se procedió a utilizar la herramienta Primer blast para el diseño de los primers, para ello fue necesario seleccionar los parámetros dependiendo de la técnica a utilizar PCR o qPCR y el organismo de objeto de estudio.

La herramienta Primer blast presentó diversas opciones de secuencias de primers internos y externos, se escogieron las secuencias que presentaban las características más óptimas en cuanto a la longitud del primer, tamaño del producto, contenido de GC, temperatura de annealing, primer Tm, rangos de tamaño del producto y evitar repeticiones continuas de bases, una vez escogido los primer internos y externos se procedió a colocar la sonda la cual estaba conformada por 20 a 23 bases, la cual se ubicó en medio de la secuencia de los primers internos y con una separación de 3 a 5 bases entre alguna de las secuencias internas. Para la elaboración de los primers con sondas se procedió a enviarlo a la empresa Integrate DNA technologies, una vez llegado los primers liofilizados al laboratorio, estos fueron resuspendidos según las cantidades de agua molecular predisuestas en cada inserto adjunto por la empresa.

Amplificación de los genes de interés, NESTED qPCR

Amplificación gen glmM

Para la identificación del gen glmM primero se realizó un PCR convencional , para ello se utilizó un par de primers externos: F-5' - TTA CAC CCR TTA GGC TCA TC - 3' y R- 5'- CTA GCT ATA AAG TGG GYG AGA G -3 (Tabla D2) ,la reacción de PCR estuvo compuesta por los siguientes reactivos: 5uL de 10x Buffer-Mg , 1,5uL de MgCl₂, 1uL de dNTPs, 1uL de primer externo forward y 1uL de primer externo reverse, 0.2uL de platinum taq DNA polimerasa , 35.3uL de H₂O y 5uL de DNA , agua o control positivo en un volumen final de 50uL(Tabla D3). El programa de PCR fue el siguiente: DI 94°C por 3', D 94°C por 30'', A 51°C por 30'' y E 72°C por 31'' por 27 ciclos. (Tabla D5)

Para el qPCR se diluyeron los productos de PCR convencional a 5x, para ello se utilizó un par de primers internos: F-5' - AGC CGT ATC TAG CAC GAT C-3' y R- 5'- CGT CGG

TAG CGC TAA AGG -3' (Tabla D2), la reacción de qPCR estuvo compuesta por los siguientes reactivos: 5uL de Sybr Brilliant II, 0.3uL de Dye (1:500), 0.1uL primer interno Forward, 0,1uL primer interno Reverse, 0.5 uL de H₂O y 4uL de amplicón en un volumen final de 10uL (Tabla D4). Todas las reacciones se realizaron por duplicado en placas de 96 pocillos específicas para el equipo, el programa de qPCR fue el siguiente: DI 95°C por 10', D 95°C por 10'', A 55°C por 30'', curva de melt: 55°C por 15'', 95°C – 0.5°C por 40 ciclos. (Tabla D5). Las muestras que presentaron una temperatura de melting igual o cercano ($\pm 1^\circ\text{C}$) a 77°C fueron consideradas como positivas para *H. pylori*. (Figura C1, C2).

Amplificación de los genes CagA y CagE

A partir de las muestras positivas para el gen glmM , se realizó la identificación de los marcadores CagA y CagE , el cual constó como primer paso de un PCR convencional para cada gen , para ello se utilizaron un par de primers externos , para CagA : F- 5'- GAG CTA YAC TCT CAA AGA TTA TGG G-3' , R-5'- AGY CTT TAA GGG CTT TTA GCG -3' y para CagE : F- 5' - AGT CAG CTT TTG YTT GTC TT -3' , R- 5' -GCT CTT TTA TYA CGC TTC CT -3' (Tabla D2) , la reacción de PCR estuvo compuesta por los siguientes reactivos: 5uL de 10x Buffer-Mg, 1,5uL de MgCl₂, 1uL de dNTPs, 1uL de primer externo forward y 1uL de primer externo reverse, 0.2uL de platinum taq DNA polimerasa , 35.3uL de H₂O y 5uL de DNA , agua o control positivo en un volumen final de 50uL(Tabla D3). El programa de PCR fue el siguiente, para CagA: DI 94°C por 3' , D 94°C por 30'', A 51°C por 30'' y E 72°C por 31'' y para CagE: I 94°C por 3' , D 94°C por 30'', A 50°C por 30'' y E 72°C por 31'' por 27 ciclos para ambos marcadores. (Tabla D5)

Para el qPCR se diluyeron los productos de PCR convencional a 5x, posteriormente se utilizaron los siguientes primeros internos, para CagA: F- 5'ACG AGA GCA TTT AGA

GAA AGA A- 3', R-5' -TCC CTA CTA GCC TCT TTA TTG -3' y sonda 5' /5HEX/AAG CAA AAG /ZEN/CTC AAG CTA ACA GC/ 3IABkFQ/ -3 ; para CagE: F-5'- AAC ACY GTC TTA CCT GAA CC -3', R- 5' AAT AAC GCT TGG GGY AAT AG-3' y sonda 5'- /56-FAM/TCC TGC TGA / ZEN/ AGC TGA ACC AAA/ 3IABkFQ/ -3' (Tabla D2) , la reacción de qPCR estuvo compuesta por los siguientes reactivos: 5uL de Prime Time, 0.1uL de Sonda (FAM o HEX), 0.25 uL primer interno Forward, 0.25 uL primer interno Reverse, 0.4uL H₂O y 4uL de amplicón en un volumen final de 10 uL (Tabla D3). Todas las reacciones se realizaron por duplicado en placas de 96 pocillos específicas para el equipo, el programa de qPCR fue el siguiente para ambos genes: DI 95°C por 3', D 95°C por 15'', A 53°C por 1' (Tabla D5). Al ser evaluadas con sondas específicas para cada marcador se tomaron como positivas para CagA y CagE aquellas muestras que presentaron una curva de amplificación óptima en función a la colocación del treshold según el primer tercio de la parte lineal de la curva de amplificación del control positivo de cada marcador. (Figuras C3 y C4)

Cualificación de la severidad de lesión en la mucosa gástrica

Se determinó la severidad de la lesión de la mucosa gástrica utilizando el protocolo de Sydney (Sydney, 1994), el cual permite correlacionar el aspecto endoscópico de las distintas zonas del estómago (antro, cuerpo, incisura) y la intensidad de la atrofia gástrica, mediante el uso del sistema de estadificación para la biopsia gástrica, Operative Link on Gastritis Assessment (OLGA, 2005) que va de 0 a IV, una vez sumados los tres puntajes de las zonas del estómago se puede determinar en que etapa de la lesión gástrica se encuentra la muestra y definir un diagnóstico gástrico por el patólogo.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico mediante la prueba de chi cuadrado para variables cualitativas entre los genotipos vs los diagnósticos gástricos como primera instancia, de modo que se pueda determinar si las variables eran estadísticamente significativas (p -valor <

0.01) , y a partir del valor de Chi cuadrado obtenido se determinó el coeficiente de Cramer, el cual mide la fuerza de asociación entre los genotipos CagA/CagE+ y CagA/CagE- sobre las lesiones gástricas. Para ello se utilizó la escala de Harald Cramér (1952) la cual consiste en:

- Resultado entre 0 y 0,2 indica que no hay asociación
- Resultado de 0,2 indica una asociación débil
- Resultado entre 0,2 y 0,6 indica una asociación moderada
- Resultado entre 0,6 y 1 indica una asociación fuerte

Aspecto ético

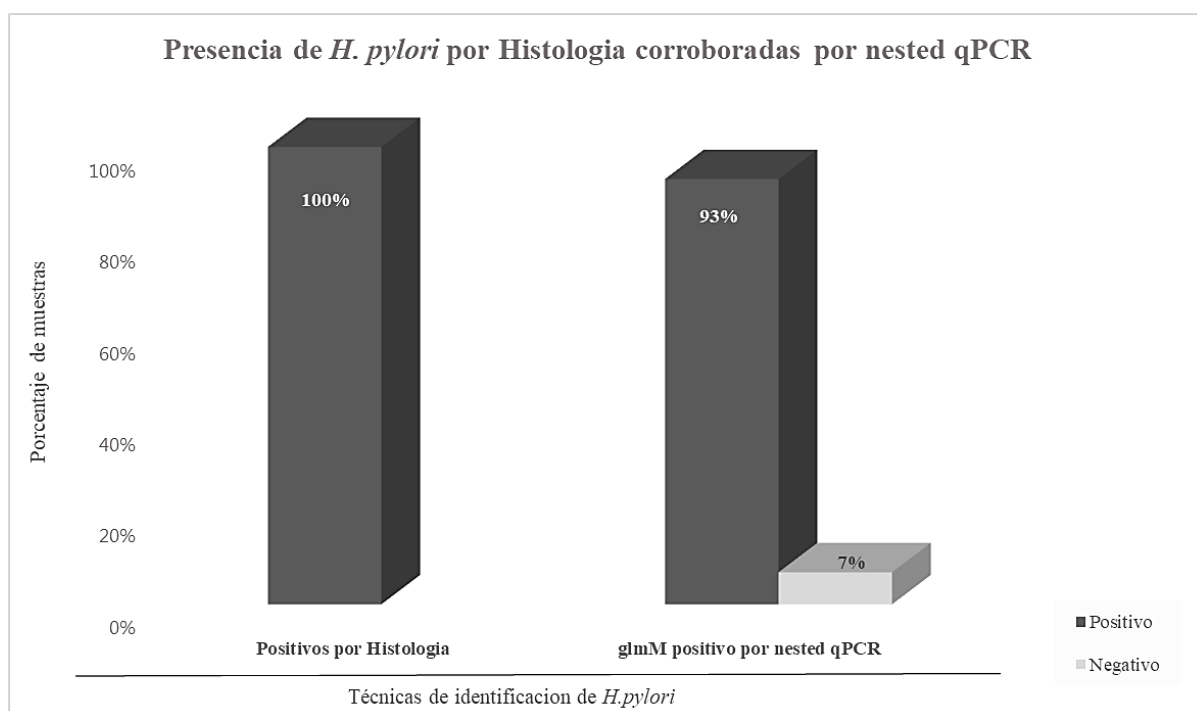
El proyecto se llevó a cabo bajo la aprobación del comité Ético Científico de la Facultad de Medicina de la Universidad Católica del Norte, y la Ley 20120 sobre la investigación científica en el ser humano, su genoma, y prohibición de la clonación humana, del Ministerio de Salud de Chile, subsecretaria de salud pública. Las muestras otorgadas por el centro Anatomopatológico de Coquimbo fueron anonimizadas por ética del laboratorio en donde no se contaron con los datos personales de la muestra proveniente, las cuales incluyeron una codificación externa y el diagnóstico gástrico que presentaba dicha muestra de manera aleatoria.

RESULTADOS

Amplificación del gen glmM (ureC) por nested-q PCR

Con el fin de corroborar la presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica fijada antes de realizar un nested-qPCR para detectar marcadores de virulencia CagA/CagE , se le realizó un primer nested-qPCR a las 100 muestras positivas por histología para *H. pylori* , para amplificar el gen glmM el cual es un marcador de presencia de la bacteria *H. pylori*, obteniendo un 93% de muestra positivas para glmM y 7% de muestras negativas para glmM, las cuales se excluyeron del estudio de investigación y se trabajó a partir de las 93 muestras positivas como total final.(Figura 1)

Figura 1

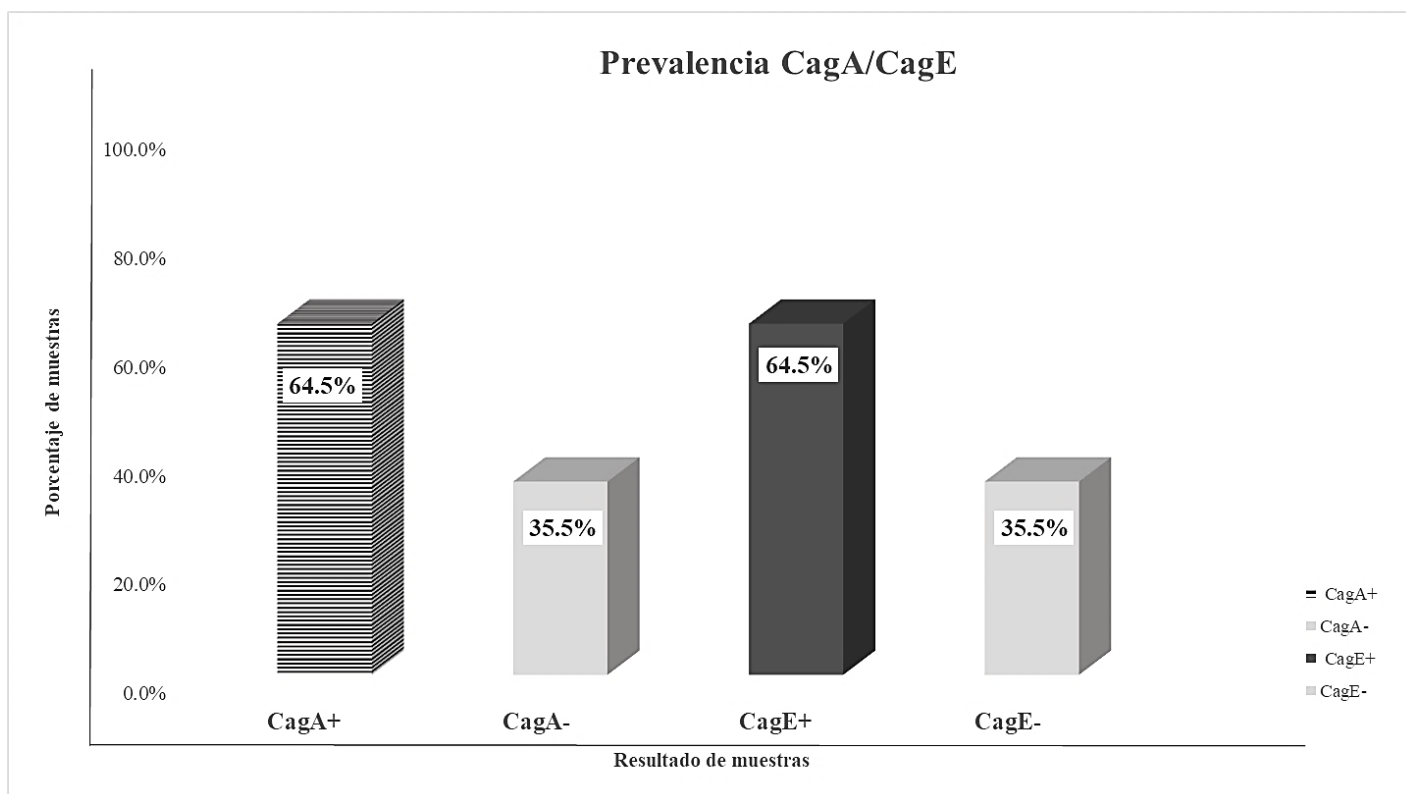


Nota. Diagrama de barras amplificación del gen glmM, Elaboración propia,2022.

Amplificación de los marcadores de virulencia CagA y CagE por nested-q PCR

Se realizó la técnica nested-qPCR para CagA y CagE por separado, las 93 muestras de mucosa gástrica fijadas fueron testeadas primero para el marcador CagA, obteniendo muestras CagA+ (64,5%) y muestras CagA- (35,5%), por otro lado, las 93 muestras de mucosa gástrica fijada fueron testeadas nuevamente para CagE, obteniendo muestras CagE+ (64,5) y muestras CagE - (35,5%), presentando la misma relación en cada una de las muestras analizadas. (Figura 2)

Figura 2

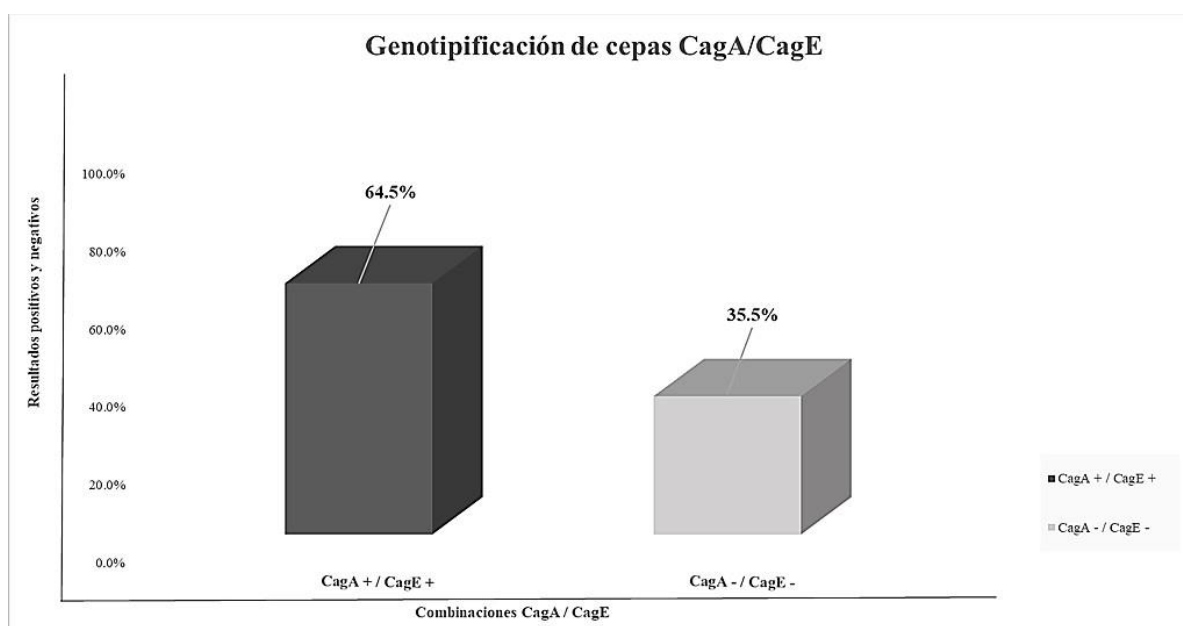


Nota. Diagrama de barras para frecuencia de muestras positivas y negativas para CagA y CagE, Elaboración propia,2022.

Genotipificación de cepas CagA/CagE

Luego de obtener los resultados de las cepas CagA y CagE, se realizó un análisis visual entre los genotipos y los resultados obtenidos en las amplificaciones, obteniendo del total de 93 muestras: CagA+/CagE+ (64,5%) y CagA- / CagE-(35,5%), encontrando una mayor frecuencia en las muestras que obtuvieron genotipos CagA+/ CagE+. (Figura 3)

Figura 3



Genotipos CagA / CagE	n = 93	
	No.	(%)
CagA + / CagE +	60 / 93	64.5%
CagA - / CagE -	33 / 93	35.5%
Total	93	100%

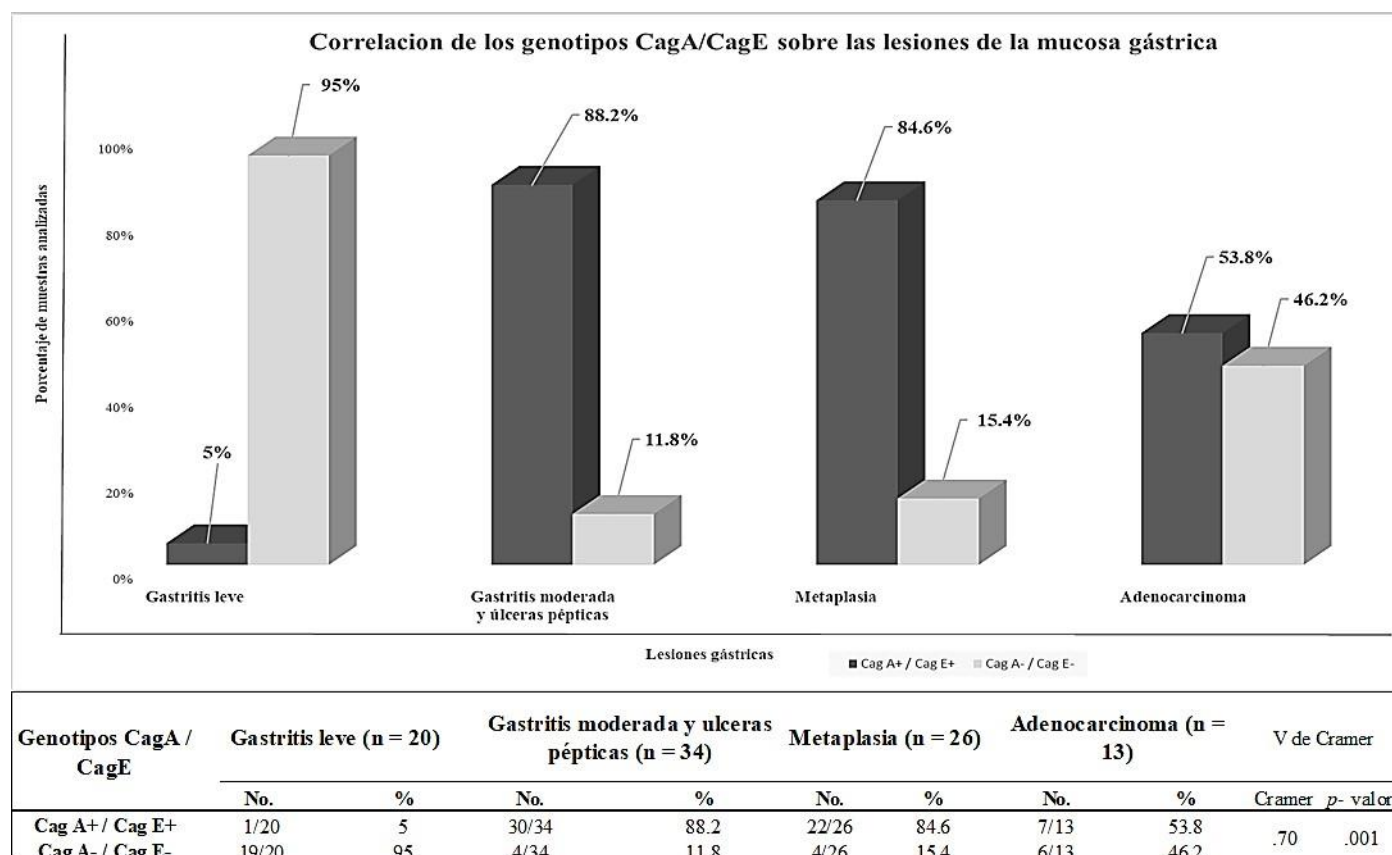
nota. Frecuencia genotipos CagA y CagE, elaboración propia,2022.

Correlación de los genotipos CagA/CagE sobre las lesiones de mucosa gástrica

Posteriormente se realizó un análisis correlacional en función a los genotipos CagA / CagE y la severidad de la lesión gástrica en las muestras de tejido gástrico fijado (V de Cramer = 0.70, p -valor < 0.001), las lesiones gástricas en las muestras diagnosticadas por el

patólogo mediante el uso del protocolo de Sydney y la numeración de OLGA fueron ordenadas de manera progresiva (bajo grado a mayor grado de lesión) y con un N diferente para cada diagnóstico ya que fueron entregadas de manera aleatoria y anonimizadas por el Centro de Diagnóstico Anatómico Patológico de Coquimbo al laboratorio, obteniendo como grupo control negativo a la población de muestras diagnosticada con gastritis leve, en donde se obtuvieron los siguientes resultados: para CagA- / CagE- (95%) y CagA+ / CagE+ (5%). La población de muestras diagnosticadas con Gastritis moderada y úlceras pépticas: CagA+ / CagE+ (88,2) y CagA- / CagE- (11,8%). Para la población de muestras con Metaplasia gástrica: se obtuvieron muestras CagA+ / CagE+ (84,6%) y CagA- / CagE- (15,4%). Finalmente, para las muestras de tejido fijado diagnosticadas con Adenocarcinoma gástrico se obtuvieron: CagA+ / CagE+ (53,8%), y CagA- / CagE- (46,2%). (Figura 4)

Figura 4



nota. Frecuencia genotipos CagA/CagE sobre las lesiones gástricas, Elaboración propia, 2022.

DISCUSIÓN

De las 100 muestras que fueron otorgadas dentro de los últimos 3 años (2020, 2021, 2022), se obtuvo un 93% de muestras positivas para el gen glmM, el cual confirma la presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica fijada, diversos autores han descrito la importancia del uso del gen glmM (ureC) para detectar la presencia de *H. pylori* en sus muestras y han obtenido un 53,3 % y 93,9 % de muestras positivas respectivamente en cada uno de los estudios (García et al. 2006; Dos Santos et al. 2019).

En contraste con dichos resultados, en otro estudio realizado por Rodríguez-Burneo et al., (2019), utilizaron el gen 16s rDNA para identificar la presencia de *H. pylori* a partir de dos poblaciones con características clínicas y demográficas distintas, obteniendo un 63,3% y 80% de DNA de *H. pylori* en las muestras estudiadas. En el presente estudio se empleó el gen glmM ya que es parte de la patente utilizada en la metodología, pero se podría agregar a futuro el gen 16s rDNA junto con glmM para identificar la presencia de *H. pylori*.

Por otro lado, en el presente estudio también se obtuvo un 7% de muestras negativas ya que al ser muestras de años anteriores existe la posibilidad de una degradación del material genético, asimismo se debe mencionar que la técnica nested-qPCR busca amplificar material genético que se encuentra en poca cantidad en la muestra biológica, estos resultados se correlacionan con el estudio de Rodríguez-Burneo et al., (2019), donde aseguran que el aislamiento de DNA a partir de muestras contenidas en parafina dificulta la obtención del mismo y altera su calidad, ya que la cantidad de DNA del tejido y el volumen de elución podrían ser uno de las limitantes de este tipo de estudios, el cual podría ser otro de los factores de los casos negativos para la discriminación del 7% en nuestro estudio al utilizar muestras de mucosa gástrica fijada en parafina (FFPE).

En el estudio de Ramis et. Al (2014), encontraron una asociación entre CagE y CagA del 92,3%, obteniendo una correlación significativa entre ambos marcadores ($p < 0,001$) en concordancia con nuestros resultados debido a que ambos genes son marcadores de virulencia pertenecientes a la isla de patogenicidad CagPAI de *H. pylori*.

En otro análisis realizado por Boyanova et al. (2011) en Bulgaria, identificaron la correlación entre cepas CagA/CagE, en donde obtuvieron genotipos CagA+/ CagE- y CagA+/CagE-, difiriendo de nuestros resultados ya que no obtuvimos combinaciones positivas y negativas entre los genotipos. Según distintas bibliografías, estos resultados son variables debido a que la frecuencia de CagA es diversa según la región y la enfermedad asociada. En los países del Este, casi todas las cepas de *H. pylori* son CagA+ y en otro estudio realizado por Tan *et al.*, (2005) con pacientes procedentes de Malasia, China e India también presentaron resultados para CagA+ con mayor frecuencia en su población, los cuales conducen a la deducción que la cantidad de muestras CagE + y CagA+ podría estar relacionada a la demografía del origen de la muestra.

Por otro lado, en otro estudio también se asocia la virulencia y demografía de las cepas, en función a los segmentos EPIYA donde es fosforilado CagA, obteniendo resultados significativos para CagA con sitios EPIYA A, B, C para poblaciones de Occidente y sitios EPIYA A, B, D para poblaciones de Oriente. (Cristancho Liévano *et al.*, 2018).

Con respecto a la severidad de las lesiones gástricas asociadas a los marcadores de virulencia CagA/CagE, en el trabajo de Chomvarin et al. (2008) obtuvieron 90% de asociación entre el genotipo CagA+ / CagE + sobre la gastritis moderada y úlceras, en concordancia con nuestros resultados para las mismas variables (88,2%). En otro estudio realizado por Quiroga et al., (2005) también encontraron una alta prevalencia entre el genotipo CagA+ /CagE + sobre la metaplasia (91%) y úlceras pépticas (81%), dichos concuerdan con los del presente estudio

para la metaplasia (84,6%) y gastritis moderada y úlceras pépticas (88,2 %). Cabe resaltar que en el estudio de Quiroga et al.,2005 potenciaron el uso de marcadores de virulencia asociando cepas con genotipo citotóxico (vacAs1m1/CagA positivas, vacAs1m1/CagE positivas) en las diferentes patologías gastroduodenales y lograr un mayor análisis del efecto de los marcadores de virulencia de *H.pylori*, a diferencia de nuestro estudio en el cual solo se utilizó CagA y CagE como marcadores de patogenicidad.

En otro estudio, se encontró concordancia entre sus resultados y los del presente estudio, con relación al porcentaje obtenido en el genotipo CagA+/CagE+, obtuvieron 96,4% para úlceras, 26,7% gastritis leve y 81,8% cáncer gástrico (Erzin et al., 2006), cabe resaltar que nuestros resultados con respecto al adenocarcinoma no son significativos, debido al bajo N utilizado en la presenta investigación.

En el trabajo realizado por El Khadir et al., (2021) concluyeron que la infección por *H. pylori* está relacionada notablemente con los marcadores de virulencia CagA/CagE sobre las enfermedades gástricas, sin embargo, también resaltan el posible alcance de otros cofactores, como polimorfismos genéticos humanos y/o factores ambientales y dietéticos en la evolución de la infección. Del mismo modo ocurre con el estudio de Cristancho Liévano et al., (2018) quienes también concluyeron que la variabilidad de casos encontrados en las patologías gástricas que contienen genes pertenecientes a la isla CagPAI podrían ser ocasionados por polimorfismos, tal es el caso de los 28 SNPs ubicados en los genes CagA, CagC, CagE, CagL, Cag γ . Por ello se sugieren realizar mayores investigaciones a nivel de polimorfismos en los genes pertenecientes a la isla CagPAI y su correlación con la severidad de las lesiones gástricas.

Los resultados obtenidos en el presente estudio proporcionaron un punto clave para determinar el factor de virulencia en infecciones por *H. pylori* y sus consecuencias,

permitiendo seguir realizando investigaciones a futuro con los demás marcadores pertenecientes a la isla CagPAI.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos podemos concluir lo siguiente:

- De las 100 muestras anonimizadas otorgadas por el Centro de Diagnóstico Anatómico Patológico de Coquimbo, 93 fueron corroboradas con la presencia de *H. pylori* mediante la amplificación del gen glmM. Respecto de las 7 muestras que resultaron negativas, debido a la degradación del DNA en función al tiempo y estado de la mucosa gástrica fijada en parafina.
- Los genotipos CagA- / CagE- presentaron una mayor frecuencia (95%) en las muestras con gastritis leve. Esto hace referencia a que la isla de patogenicidad CagPAI es necesaria para generar daño en la mucosa gástrica.
- Los genotipos CagA+ / CagE+ presentaron un mayor porcentaje en las muestras de gastritis moderada, úlceras péptica y metaplasia, obteniendo una frecuencia del 88,2 % y 84,6% de los casos positivos, respectivamente.
- Los genotipos CagA y CagE presentaron la misma relación en cada una de las 93 muestras analizadas, presentando una asociación perfecta entre ambas variables, lo que indica que ambos marcadores actúan en conjunto como un gran complejo proteico.
- Se evidenció un coeficiente de correlación de Cramer = 0.70, $p < 0.001$ entre los genotipos CagA+/CagE+ y CagA-/CagE- sobre las lesiones gástricas asociadas, esto hace referencia a que ambos marcadores de virulencia son altamente patógenos en la

infección por *H. pylori* causando diferentes daños a nivel gástrico y se encuentran estrechamente relacionados con la severidad de la lesión gástrica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, L., Ramos, M. A., Orozpe Olvera, J. A., Lobo Galo, N., Plenge Tellechea, L. F., Valero Galván, J., Álvarez Parrilla, E., Martínez Martínez, A., & Díaz Sánchez, Á. G. (2016). Aspectos estructurales y mecánicos de la enzima ureasa y sus proteínas accesorias. *Ciencia En La Frontera: Revista de Ciencia y Tecnología de La UACJ*, 14(May 2017), 19–36.
- Akopyants, N. S., Clifton, S. W., Kersulyte, D., Crabtree, J. E., Youree, B. E., Reece, C. A., Bukanov, N. O., Drazek, E. S., Roe, B. A., & Berg, D. E. (1998). Analyses of the Cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Molecular Microbiology*, 28(1), 37–53.
- Aquea, G., Bresky, G., Lancellotti, D., Madariaga, J. A., Zaffiri, V., Urzua, U., Haberle, S., & Bernal, G. (2014). Increased expression of P2RY2, CD248 and EphB1 in Gastric Cancers from Chilean patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(5), 1931–1936.
- Arana, J., & Corona, A. (2004). Gastric cancer. Co-Morbidities That Inhibit Wound Healing. *Medigraphic*, 47(5), 204–209.
- Arévalo, A., Trespalacios, A. A., & Otero, W. (2009). Importancia de la proteína CagA en infección por *Helicobacter pylori*. *Revista Colombiana de Gastroenterología* (Vol. 24, Issue 4, pp. 388–395).
- Astudillo, G. C., Jerves, T., Pesántez, L., Priscila Calle, H., Gutiérrez, Á., & Gustavo Calle, H. (2013). Utilidad de las biopsias gástricas rutinarias y de la tinción con azul de metileno en el diagnóstico de la metaplasia intestinal en mayores de 40 años. *Acta Gastroenterológica Latinoamericana*, 43(3), 189–197.

- Bakhti, S. Z., Latifi-Navid, S., Gholizade Tobnagh, S., Yazdanbod, K., & Yazdanbod, A. (2020). Which genotype of *Helicobacter pylori* CagA or CagE is better associated with gastric Cancer risk lessons from an extremely high-risk area in Iran. *Infection, Genetics and Evolution*, 85(April), 104431.
- Bayona Rojas, M. A., & Gutiérrez Escobar, J. A. (2017). *Helicobacter pylori*: vías de transmisión. *Medicina (Bogotá)*, 39(3), 210–220.
- Boyanova, L., Yordanov, D., Gergova, G., Markovska, R., & Mitov, I. (2011). Benefits of *Helicobacter pylori* CagE genotyping in addition to cagA genotyping: A Bulgarian study. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 100(4), 529–535.
- Bravo, M. M., Martínez, T., & Bravo, J. C. (2012). Relación entre la integridad del CagPAI y los polimorfismos en el gen CagA con la severidad de la gastritis en pacientes infectados con *Helicobacter pylori* CagA positivo. *Revista Colombiana de Cancerología*, 16(2), 110–118.
- Chahuán, J., Pizarro, M., Díaz, L. A., Villalón, A., & Riquelme, A. (2020). Medicina Basada en la evidencia en Gastroenterología Métodos de diagnóstico para la detección de la infección por *Helicobacter pylori*. *Gastroenterología Latinoamericana*, 31(2), 98–106.
- Chomvarin, C., Namwat, W., Chaicumpar, K., Mairiang, P., Sangchan, A., Sriipa, B., Tor-Udom, S., & Vilaichone, R. K. (2008). Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, cagE, iceA and babA2 genotypes in Thai dyspeptic patients. *International Journal of Infectious Diseases*, 12(1), 30–36.
- Cristancho Liévano, F., Trujillo Gama, E., & Bravo Hernández, M. (2018). Cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori* and its association to preneoplastic lesions and gastric cancer. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 21(2), 309–318.

- Day, A. S., Jones, N. L., Lynett, J. T., Jennings, H. A., Fallone, C. A., Beech, R., & Sherman, P. M. (2000). CagE is a virulence factor associated with *Helicobacter pylori* induced duodenal ulceration in children. *Journal of Infectious Diseases*, *181*(4), 1370–1375.
- Delgado-Ocádiz, R., Sobrino-Cossío, S., García-García, L., Marroquín-Chavira, A., Hernández-Mote, R., & Gariglio, P. (2005). Relación entre la infección por *Helicobacter pylori* y el desarrollo de metaplasia en pacientes con gastritis crónica. *Bioquímica*, *30*(1), 13–22.
- Felipe, C., & Guillermo, C. (2014). Dos décadas de *Helicobacter pylori*. Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Universidad Autónoma de Madrid.España, *1*, 1–10.
- Fukuta, K., Azuma, T., Ito, Y., Suto, H., Keida, Y., Wakabayashi, H., Watanabe, A., & Kuriyama, M. (2002). Clinical relevance of CagE gene from *Helicobacter pylori* strains in Japan. *Digestive Diseases and Sciences*, *47*(3), 667–674.
- Hagymási, K., & Tulassay, Z. (2014). *Helicobacter pylori* infection: New pathogenetic and clinical aspects. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(21), 6386–6399.
- Heras, J. M. (2017). Factores de virulencia de *Helicobacter pylori* involucrados en su persistencia, colonización y patogenicidad. Universidad Complutense de Madrid, 1–19.
- Martín de Argila, C., & Boixeda, D. (2004). *Helicobacter pylori* y enfermedades relacionadas. *GH Continuada*, *3*(6), 251–255.
- Martinez-Echavarrria, M. T., González-Torres, M., Ferreira-capote, R., & Más-Páez, J. A. (2008). Genotipo CagA+ en cepas de *Helicobacter pylori* asociadas a úlcera péptica, gastritis crónica y cáncer gástrico. *Revista Cubana de Medicina*, 1-8.
- Michael R. Green and Joseph Sambrook. (2019). Nested Polymerase Chain Reaction (PCR), *Cold Spring Harb Protoc.* 1-5.

- Olbermann, P., Josenhans, C., Moodley, Y., Uhr, M., Stamer, C., Vauterin, M., Suerbaum, S., Achtman, M., & Linz, B. (2010). A global overview of the genetic and functional diversity in the *Helicobacter pylori* Cag pathogenicity island. *PLoS Genetics*, 6(8).
- Pajares-García, J. M., & Gisbert, J. P. (2006). *Helicobacter pylori*: Su descubrimiento e importancia en la medicina. *Revista Española de Enfermedades Digestivas* (Vol. 98, Issue 10, pp. 770–785).
- Pizarro, M., & Arnoldo, R. (2019). *Clínicas según la edad*. 30.
- Portela, V., Antonio, M., Lima, P. de, Rabenhorst, B., Barros, P., & Aure, M. (2010). International Journal of Infectious Diseases The relationship between *Helicobacter pylori* genes CagE and VirB11 and Gastric Cancer. *14*, 613–617.
- Ramis, I. B., Vianna, J. S., Vieira, L., Groll, A. Von, & Eduardo, P. (2013). Major Article CagE as a biomarker of the pathogenicity of *Helicobacter pylori*. *Revista da Sociedade de Brasileira de Medicina Tropical* (Vol. 46, Issue November 2012).
- Raúl Lazarte C. (2009). La historia de los científicos involucrados en el descubrimiento del *Helicobacter pylori*. *Gastroenterología Latinoamericana*, 20(1), 53–62.
- Robles, R. G., Ramírez, P. A., & Vega, N. A. (2009). Alteración en la regulación de la apoptosis vía Fas/FasL en cáncer gástrico. *Revista Ciencias de la Salud* (Vol. 7, Issue 1, pp. 83–94).
- Rodríguez, E. (2015). Motivos Epiya en la proteína CagA en aislamientos de *Helicobacter pylori* provenientes de la ciudad de Bogotá. *Tesis*.
- Romo González, C., & Coria Jiménez, V. R. (2010). *Helicobacter pylori*, un modelo de bacteria carcinogénica. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 15(4), 242–251.
- Sánchez-Cuén, J. A., Irineo-Cabrales, A. B., Bernal-Magaña, G., & Peraza-Garay, F. D. J. (2016). Regresión de la metaplasia intestinal gástrica tras la erradicación de la infección por

Helicobacter pylori en un hospital de México. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 108(12), 770–775.

Su, J., Jin, L., Jiang, Q., Sun, W., Zhang, F., & Li, Z. (2013). Phylogenetically Diverse ureC Genes and Their Expression Suggest the Urea Utilization by Bacterial Symbionts in Marine Sponge *Xestospongia testudinaria*. *PLoS ONE*, 8(5), 1–8.

Trujillo, E., Martínez, T., & Bravo, M. M. (2014). Genotipificación de los factores de virulencia VacA y CagA de *Helicobacter pylori* en individuos de dos regiones de Colombia con riesgo opuesto de cáncer gástrico. *Biomedica*, 34(4), 567–573.

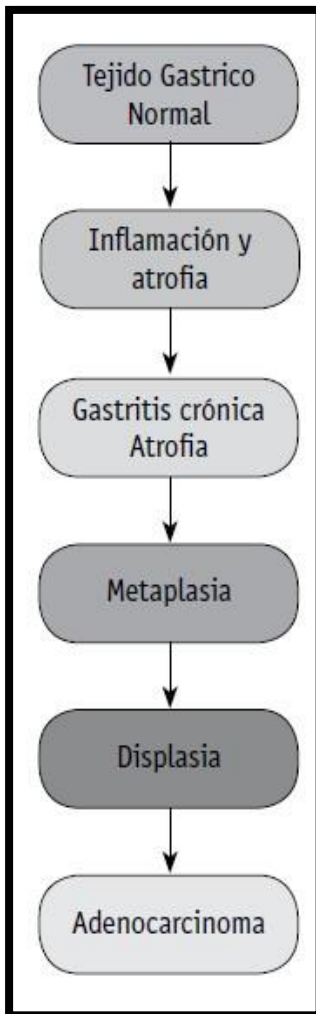
Wroblewski, L. E., Peek, R. M., & Wilson, K. T. (2010). *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Factors that modulate disease risk. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 23, Issue 4, pp. 713–739).

Yong, X., Tang, B., Li, B. S., Xie, R., Hu, C. J., Luo, G., Qin, Y., Dong, H., & Yang, S. M. (2015). *Helicobacter pylori* virulence factor CagA promotes tumorigenesis of gastric cancer via multiple signaling pathways. In *Cell Communication and Signaling* (Vol. 13, Issue 1).

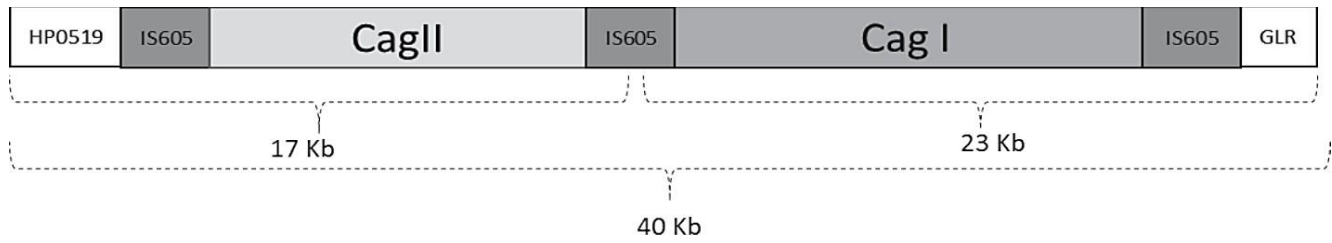
ANEXOS

Anexo A Marco teórico.

Figura A1

Evolución carcinogénesis gástrica

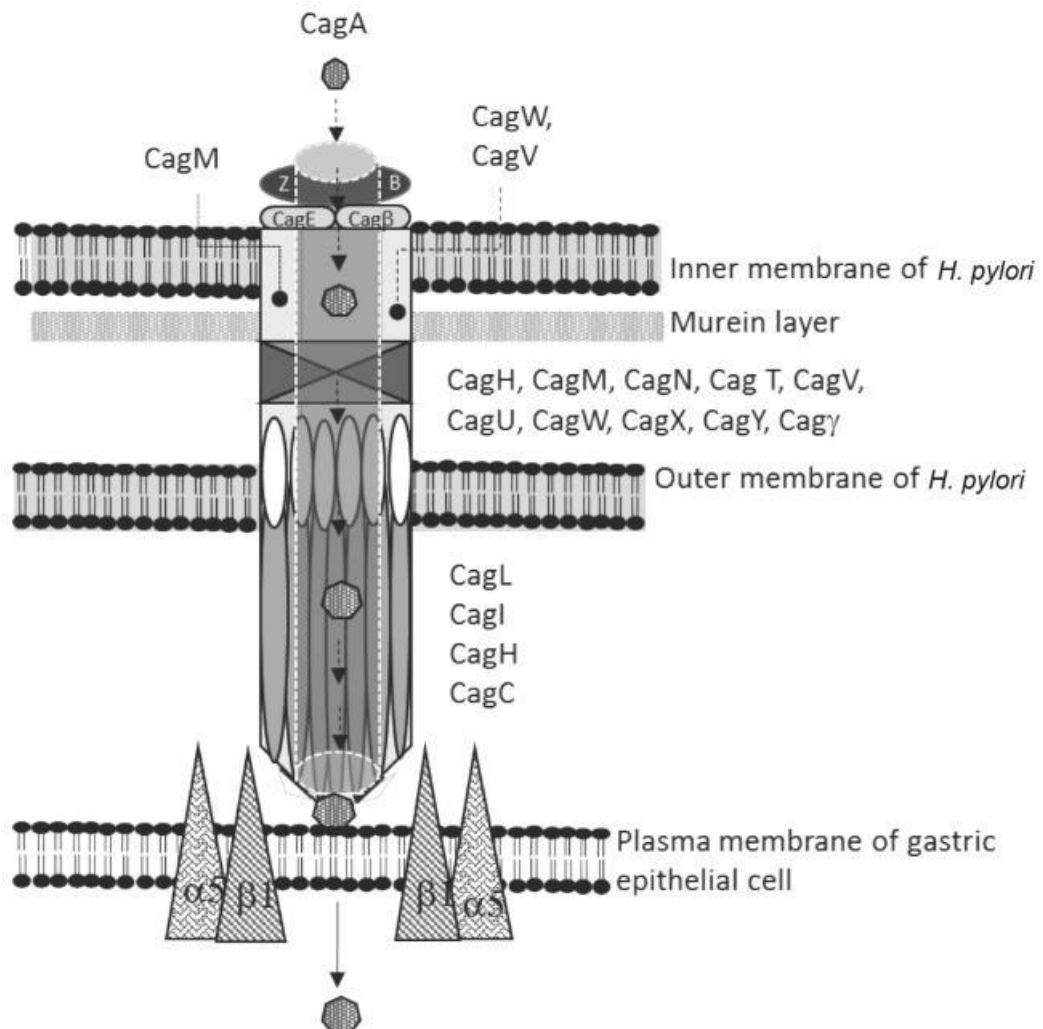
Nota. “Postulado por Pelayo Correa, modelo para la carcinogénesis gástrica.” Elaborado por Robles et al.2009.

Figura A2*Isla de patogenicidad CagPAI*

Nota. “Isla de patogenicidad CagPAI de *H. pylori*”. Elaborado por Lievano et al., (2018).

Figura A3

Complejo proteico que codifican genes contenido en CagPAI



Nota. “Modelo de estructura del sistema de secreción de *H. pylori* tipo IV”. Elaborado por Lievano et al., (2018).

Anexo B. Programacion del Biorad para el q-PCR

Figura B1

Plata con muestras y controles, fotografía Biorad.

The screenshot shows the 'Plate Editor - plate UREC ale.pitd' window. The main area is a 96-well plate grid with columns 1-12 and rows A-H. The plate contains the following contents:

Row	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	HTC SYBR 113	Unk SYBR 113	Unk SYBR 139	Unk SYBR 148	Unk SYBR 149	Unk SYBR 150	Unk SYBR 151	Unk SYBR 152	Unk SYBR 153	Unk SYBR 154	Unk SYBR 155	Unk SYBR 156
B	HTC SYBR 113	Unk SYBR 113	Unk SYBR 139	Unk SYBR 148	Unk SYBR 149	Unk SYBR 150	Unk SYBR 151	Unk SYBR 152	Unk SYBR 153	Unk SYBR 154	Unk SYBR 155	Unk SYBR 156
C	Unk SYBR 157	Unk SYBR 158	Unk SYBR 159	Unk SYBR 160	Unk SYBR 161	Unk SYBR 162	Unk SYBR 163	Unk SYBR 164	Unk SYBR 165			
D	Unk SYBR 157	Unk SYBR 158	Unk SYBR 159	Unk SYBR 160	Unk SYBR 161	Unk SYBR 162	Unk SYBR 163	Unk SYBR 164	Unk SYBR 165			
E	Neg SYBR CNE1	Neg SYBR CNE2	Neg SYBR NTC1	Neg SYBR NTC2								Pos SYBR 26695
F	Neg SYBR CNE1	Neg SYBR CNE2	Neg SYBR NTC1	Neg SYBR NTC2								Pos SYBR 26695
G												
H												

The right-hand panel contains various settings for the plate, including 'Select Fluorophores...', 'Sample Type', 'Target Names', 'Sample Names', 'Biological Group', 'Replicate #', 'Technical Replicates', 'Experiment Settings', 'Clear Replicate #', and 'Clear Wells'. The 'OK' and 'Cancel' buttons are at the bottom right.

Figura B2

Programa de temperaturas, fotografía Biorad.

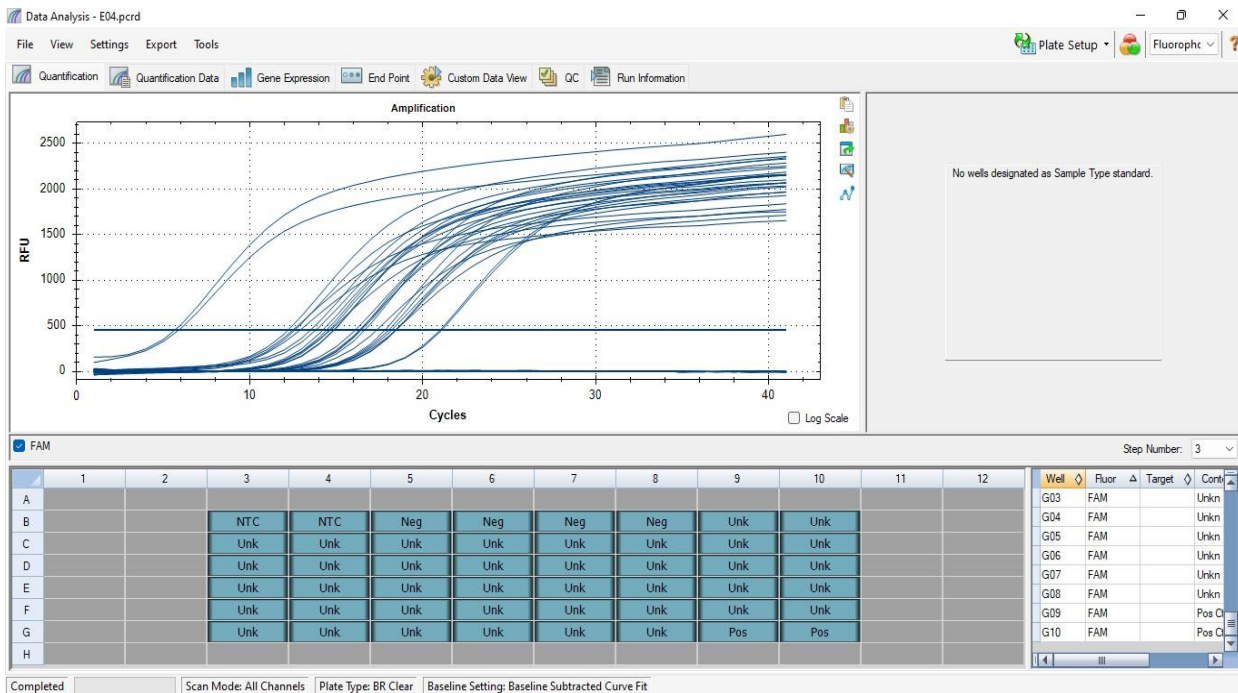
The screenshot shows the 'Protocol Editor - ureC SYBR NUEVOS PRIMERS.prl' window. The top bar shows 'Sample Volume 10 µl' and 'Est. Run Time 02:02:00'. The main area is a temperature profile graph with five steps:

- Step 1: 95.0 C for 10:00
- Step 2: 95.0 C for 0:10
- Step 3: 55.0 C for 0:30
- Step 4: GOTO 2, 40 x (more times)
- Step 5: Melt Curve 55.0 to 95.0 C, increment 0.5 C, for 0:15 + Plate Read

The graph shows a red line representing the temperature profile. The y-axis is temperature in degrees Celsius (C) and the x-axis is time. The graph ends with 'END'. Below the graph is a list of steps with icons for 'Insert Step', 'Insert Gradient', 'Insert GOTO', 'Insert Melt Curve', 'Add Plate Read to Step', 'Step Options', and 'Delete Step'. The 'OK' and 'Cancel' buttons are at the bottom right.

Figura B3

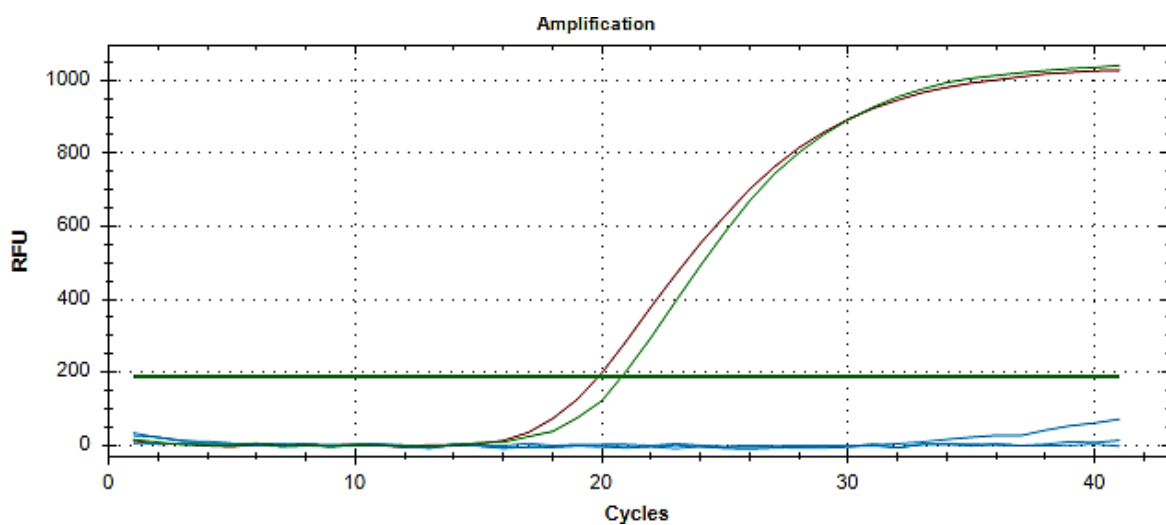
Curvas de amplificación, fotografía Biorad.



Anexo C. Curvas de amplificación

Figura C1

Curva de amplificación para glmM con SYBR Green.

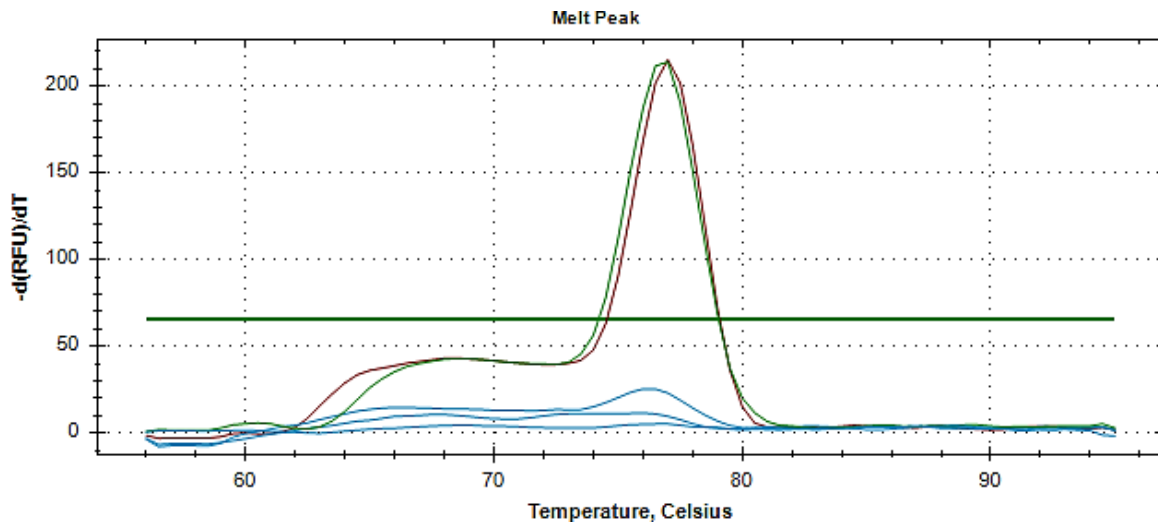


Nota. Rojo: Control positivo, Verde: Muestra positiva para glmM, Celeste: Control negativo

de extracción, control negativo pcr convencional y control negativo qpcr (NTC). Elaboración propia

Figura C2

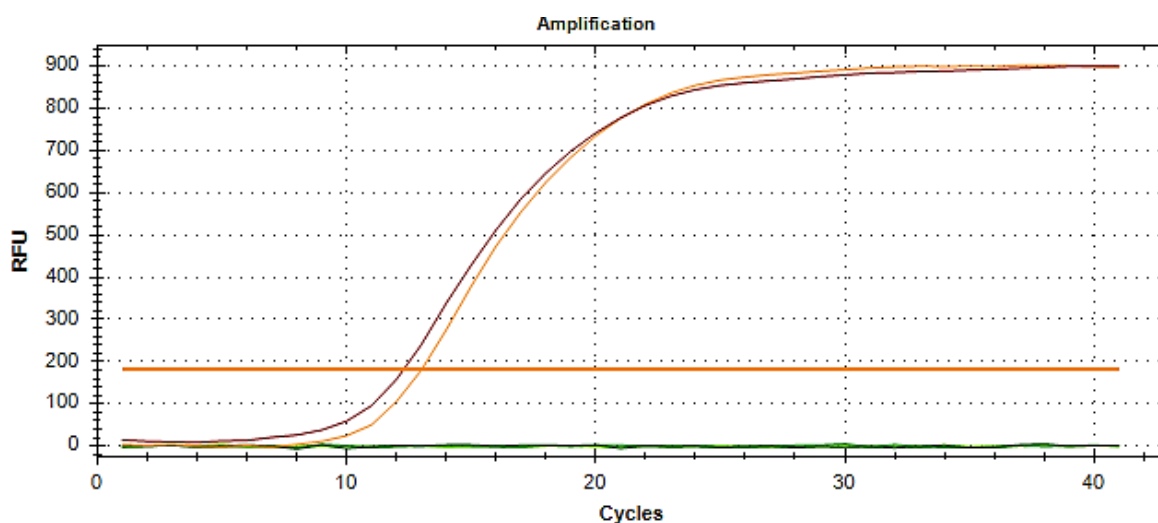
Melt peak control y muestra positiva del gen glmM.



Nota. Rojo: Control positivo, Verde: Muestra positiva para glmM, Celeste: Control negativo de extracción, control negativo pcr convencional y control negativo qpcr (NTC). Elaboración propia. Elaboración propia.

Figura C3

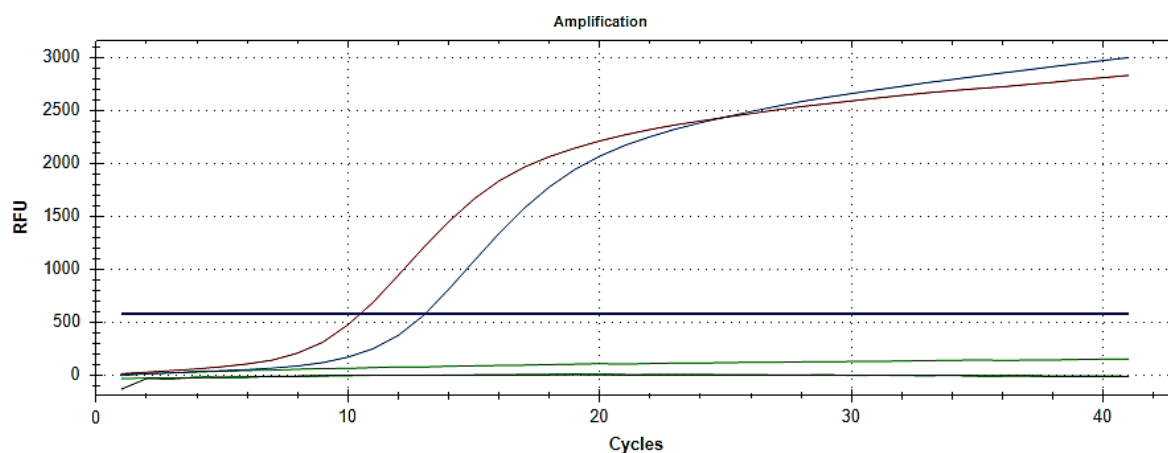
Curva de amplificación para CagA con sondas marcadas con el fluoróforo HEX.



Nota. Rojo: Control positivo, Naranja: Muestra positiva para glmM, Verde: Control negativo de extracción, control negativo pcr convencional y control negativo qpcr (NTC). Elaboración propia. Elaboración propia.

Figura C4

Curva de amplificación para CagE con sondas marcadas con el fluoróforo FAM.



Nota. Rojo: Control positivo, Azul: Muestra positiva para glmM, Verde: Control negativo de extracción, control negativo pcr convencional y control negativo qpcr (NTC). Elaboración propia. Elaboración propia. Elaboración propia.

Anexo D. Tablas resumen

Tabla D1

Tabla resumen de secuencias y sondas para glmM, CagA y CagE.

Gen		Forward	Reverse	Tamaño del producto (pb)
glmM (ureC)	Externo	5' - TTA CAC CCR TTA GGC TCA TC - 3'	5' - CTA GCT ATA AAG TGG GYG AGA G -3'	226
	Interno	5' - AGC CGT ATC TAG CAC GAT C-3'	5' - CGT CGG TAG CGC TAA AGG -3'	115
CagA	Externo	5' - GAG CTA YAC TCT CAA AGA TTA TGG G-3'	5' - AGY CTT TAA GGG CTT TTA GCG -3'	400
	Interno	5'ACG AGA GCA TTT AGA GAA AGA A- 3'	5' -TCC CTA CTA GCC TCT TTA TTG -3'	138
	Sonda	5' /5HEX/AAG CAA AAG /ZEN/CTC AAG CTA ACA GC/ 3IABkFQ/-3		
CagE	Externo	5' - AGT CAG CTT TTG YTT GTC TT -3'	5' -GCT CTT TTA TYA CGC TTC CT -3'	329
	Interno Sonda	5' - AAC ACY GTC TTA CCT GAA CC -3'	5' AAT AAC GCT TGG GGY AAT AG-3'	149
		5' /56-FAM/TCC TGC TGA / ZEN/ AGC TGA ACC AAA/ 3IABkFQ/-3'		

Nota. Elaboración propia.

Tabla D2

Tabla resumen reactivos PCR convencional.

Pcr convencional para UreC/CagA/CagE	
10x Buffer-Mg	5 uL
MgCl ₂	1,5 uL
dNTPs	1uL
Primer externo Forward	1uL
primer externo Reverse	1uL
Platinum Taq DNA polimerasa	0,2 uL
H ₂ O	35,3 uL
Mix	45 uL
DNA	5 uL
Total	50 uL

Nota. Elaboración propia.

Tabla D3*Tabla resumen reactivos qPCR.*

qPCR para UreC		qPCR para CagA / CagE	
Sybr Brilliant II	5uL	Prime Time	5uL
Dye (1:500)	0,3uL	Sonda (FAM o HEX)	0,1uL
primer interno Forward	0,1uL	primer interno Forward	0,25 uL
primer interno Reverse	0,1uL	primer interno Reverse	0,25 uL
H2O	0,5uL	H2O	0,4uL
Amplicón	4uL	Amplicón	4uL
Mix por pocillo	6uL	Mix por pocillo	6 uL
Total	10uL		10uL

Nota. Elaboración propia.**Tabla D4***Tabla resumen programa de temperaturas.*

Gen	glmM (ureC)		Cag A		Cag E	
	Tem. (C°)	tiempo	Tem. (C°)	tiempo	Tem. (C°)	tiempo
<i>Condiciones PCR convencional</i>						
Desnaturalizacion Inicial	94°C	3 min.	94°C	3 min.	94°C	3 min.
Desnaturalizacion	94°C	30 seg.	94°C	30 seg.	94°C	30 seg.
Annealing	51°C	30 seg.	51°C	30 seg.	50°C	30 seg.
Extension	72°C	31 seg.	72°C	31 seg.	72°C	31 seg.
Ciclos	27		27		27	
<i>Condiciones q PCR</i>						
Desnaturalizacion inicial	95°C	10 min.	95°C	3 min.	95°C	3 min.
Desnaturalizacion	95°C	10 seg.	95°C	15 seg.	95°C	15 seg.
Annealing	55°C	30 seg.	53°C	1 min	53°C	1 min.
Curva de melting (solo para glmM)	55°C	15 seg.				
	95°C – 0.5°C					
Ciclos	40		40		40	

Nota. Elaboración propia.

Genotipificación de cepas de Helicobacter pylori CagA/CagE en mucosa gástrica y su correlación con la severidad de la lesión gástrica

INFORME DE ORIGINALIDAD

24%

INDICE DE SIMILITUD

23%

FUENTES DE INTERNET

5%

PUBLICACIONES

8%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	4%
2	docplayer.es Fuente de Internet	3%
3	scielo.isciii.es Fuente de Internet	1%
4	repositorio.ug.edu.ec Fuente de Internet	1%
5	repository.javeriana.edu.co Fuente de Internet	1%
6	bvs.sld.cu Fuente de Internet	1%
7	Submitted to Universidad Ricardo Palma Trabajo del estudiante	1%
8	gastrolat.org Fuente de Internet	1%

9	www.coursehero.com Fuente de Internet	1%
10	www.teses.usp.br Fuente de Internet	1%
11	www.thefreelibrary.com Fuente de Internet	1%
12	www.researchgate.net Fuente de Internet	1%
13	eprints.ucm.es Fuente de Internet	< 1%
14	www.scielo.cl Fuente de Internet	< 1%
15	pt.scribd.com Fuente de Internet	< 1%
16	1library.co Fuente de Internet	< 1%
17	repositorio.ucsg.edu.ec Fuente de Internet	< 1%
18	mariafatimadossantosestadistica1.files.wordpress.com Fuente de Internet	< 1% Fuente de Internet
19	www.scielo.org.co Fuente de Internet	
20	repositorio.puce.edu.ec	

%

<

1

%

<

1

%

21	revistagastroperu.com Fuente de Internet	< 1%
22	pdfs.semanticscholar.org Fuente de Internet	< 1%
23	www.slideshare.net Fuente de Internet	< 1%
24	www.elsevier.es Fuente de Internet	< 1%
25	repositorio.upch.edu.pe Fuente de Internet	< 1%
26	rinacional.tecnm.mx Fuente de Internet	< 1%
27	www.redalyc.org Fuente de Internet	< 1%
28	core.ac.uk Fuente de Internet	< 1%
29	livrosdeamor.com.br Fuente de Internet	< 1%
30	A Fazio, M Bitrán-Ambler, S Ramírez-Rivera, V Zaffiri, G Bernal. "GENOTYPING OF Helicobacter pylori CagA/CagE STRAINS IN GASTRIC MUCOSA AND ITS ASSOCIATION WITH GASTRIC ILLNESS", Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2023 Publicación	< 1%

31	Submitted to BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA BIBLIOTECA Trabajo del estudiante	< 1%
32	biologia.ucr.ac.cr Fuente de Internet	< 1%
33	pesquisa.bvsalud.org Fuente de Internet	< 1%
34	www.monografias.ufop.br Fuente de Internet	< 1%
35	repositorio.urp.edu.pe Fuente de Internet	< 1%
36	zagan.unizar.es Fuente de Internet	< 1%
37	Submitted to Universidad Cesar Vallejo Trabajo del estudiante	< 1%
38	digibuo.uniovi.es Fuente de Internet	< 1%
39	ri.uagro.mx Fuente de Internet	< 1%
40	www.actaodontologica.com Fuente de Internet	< 1%
41	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	< 1%

Submitted to Universidad Francisco de Vitoria

42

Trabajo del estudiante

<1%

biblat.unam.mx

43

Fuente de Internet

<1%

tesis.ipn.mx

44

Fuente de Internet

<1%

Submitted to Consorcio CIXUG

45

Trabajo del estudiante

<1%

doku.pub

46

Fuente de Internet

<1%

Excluir citas

ActivoExcluir

bibliografía

ActivoExcluir coincidencias < 15 words

