7. RESULTADOS

De las 18 cepas previamente congeladas (-70°C) se recuperaron 13 cepas. En los pacientes infectados con estas cepas, 8 (61.5%) presentaron gastritis crónica, 2 (15.38%) gastritis folicular, dos metaplasia en esófago y así mismo 2 presentaron mucosa gástrica sin alteración (ver Tabla 6.1).

7.1 CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE *H. PYLORI*

En la figura 7.1 se observa la morfología de las colonias de *H. pylori* en medio Agar Casman. Sus características principales es de que son lisas, translúcidas y débilmente β-hemolíticas. También se hicieron pruebas bioquímicas catalasa, oxidasa y ureasa y tinción gram para corroborar con la morfología de la bacteria.

Figura 7.1 Cultivo de *H. pylori* en agar Casman

7.2 EXTRACCIÓN DE DNA CROMOSOMAL DE *H. PYLORI*

La extracción del DNA cromosomal como se mencionó en material y métodos, fue el descrito por Wilson (1994), El peso molecular aproximado es de 1326 a 2360 kb sin embargo, se observa en algunas preparaciones DNA degradado como se ve en el carril

No 5 de la figura 7.2. A pesar de este inconveniente, se pudo proseguir con las amplificaciones de las secuencias correspondientes (ver más abajo).

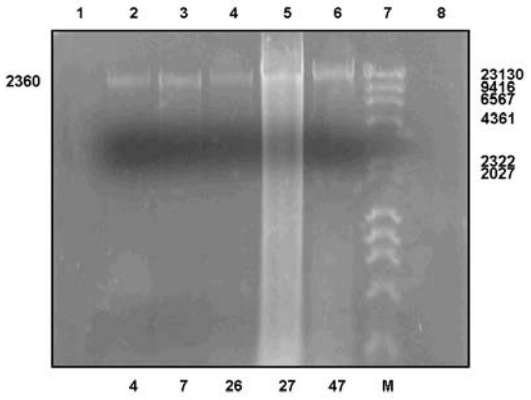

Figura 7.2 Extracción de DNA cromosomal de *H. pylori* en gel agarosa al 1%. Carriles 2 al 6 presentan DNA aislado de *H. pylori*. Carril 7 contiene el Peso Molecular (fago λ digerido con la enzima HAE III)

7.3 PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA ADN POLIMERASA)

En todas las muestras de DNA de las cepas trabajadas, se les detectó al menos un amplificado de los genes correspondientes. Estos resultados se muestran a continuación.

DETERMINACIÓN DEL GEN *VACA*

De las 13 cepas estudiadas, a todas se les amplificó el gen *vacA*. Para el alelo s1, se obtuvo un porcentaje de 69.23% (9/13), para el alelo s2 30.77% (4/13). Para la región media m1 61.53% (8/13) y para la región media m2 un 38.46% (5/13).

Productos de amplificación *vacA* m1

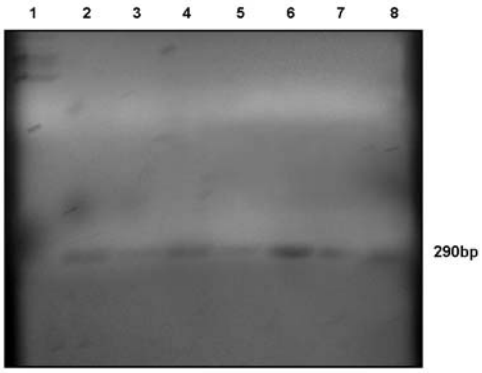

Figura 7.3. Electroforesis de los amplificados del alelo *vacA* m1 en gel agarosa al 1.5%. En los carriles de las cepas 2 al 8 se muestran los productos de amplificación con un tamaño esperado de 290 pb. Carril 1 contiene el marcador de Peso Molecular (fago ϕ X174 DNA digerido con la enzima Hae III)

Productos de amplificación *vacA* m2

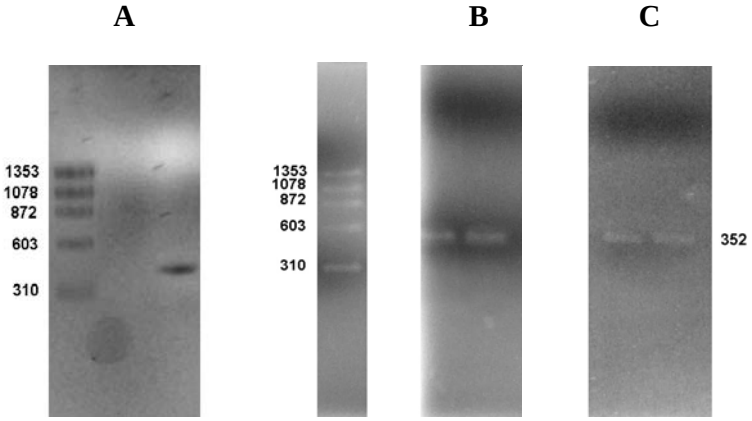

Figura 7.4. Electroforesis de los amplificados para el alelo *vacA* m2 en gel agarosa al 1.5%. Las bandas esperadas para la región media son de 352 pb, las cuales se ven en las figuras **a, b** y **c**. El primer carril contiene el marcador de Peso Molecular (fago ϕ X174 DNA digerido con la enzima *Hae* III)

Productos de Amplificación de *vacA* s1 y s2

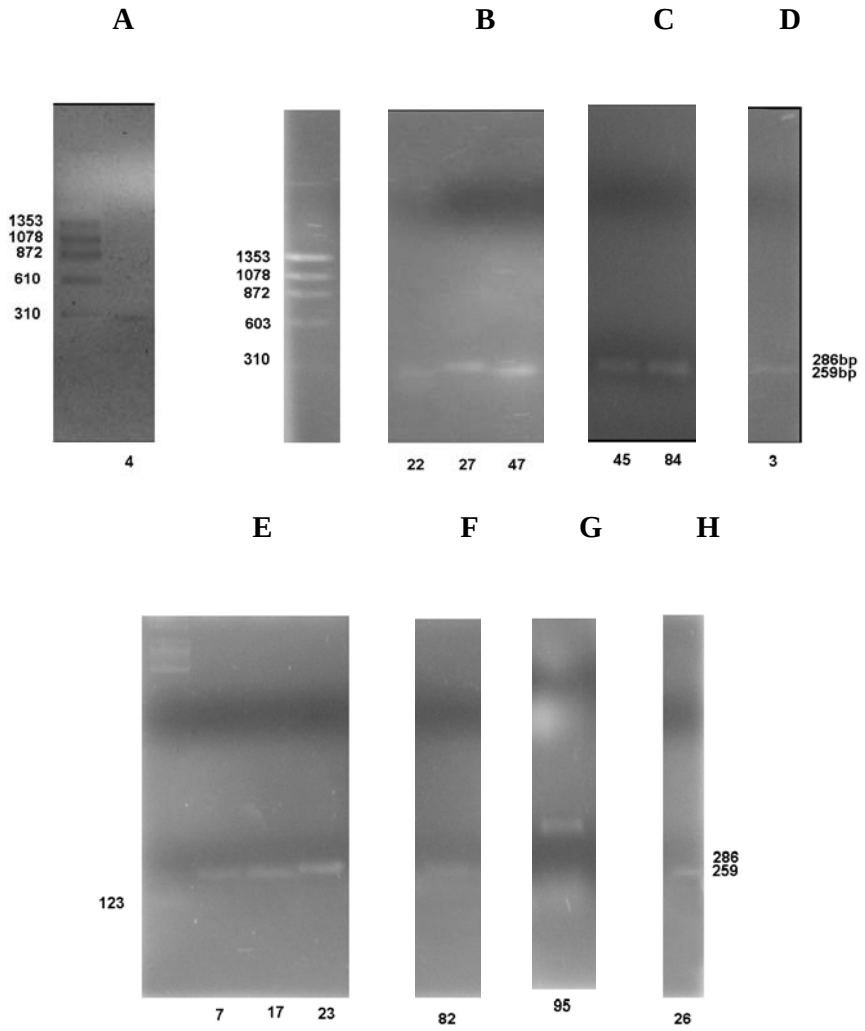

Figura 7.5 Electroforesis de los amplificados para los alelos s1 y s2 en gel agarosa al 1.5%. En las figuras de la **a** – **h,** se observan las bandas esperadas. Para las cepas 3, 4, 17, 22, 26, 47, 82, 84 y 95 expresan el alelo s1 con 259 pb y para las cepas 7, 23, 27 y 45 expresan el alelo s2 con 286 pb. Los marcadores de Peso Molecular utilizados son ϕ X174 DNA/*Hae* III y 123 pb DNA ladder**.**

En la siguiente tabla se muestran los porcentajes de los diferentes genotipos, siendo el más predominante s1m1 con 53.85%, siguiendo s2m2 con 23%, s1m2 con 15.38% y s2m1 con 7%.

Gen	No.	%
S1m1	7	53.85
S1m2	2	15.38

S2m1	1	7.69
S2m2	3	23.08

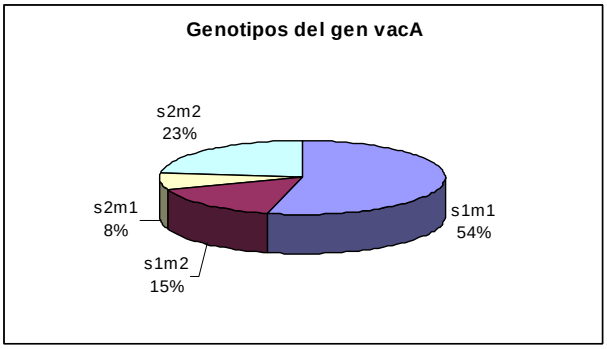

Figura 7.6 Frecuencia de genotipos *vacA*.

7.3.1 DETERMINACIÓN DEL GEN *CAGA*

Para el amplificado correspondiente al gen *cagA* sólo amplificaron dos cepas. Los pacientes con estas dos cepas presentaron gastritis crónica y gastritis crónica folicular.

Productos de amplificación del gen *cagA*

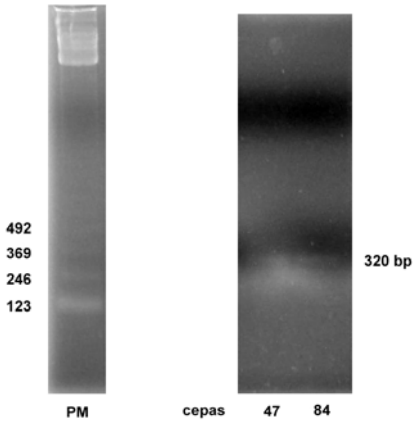

Figura 7.7 Productos de amplificación del gen *cagA* en gel agarosa al 1.5%. Los productos de amplificación se muestran en las cepas 47 y 84 con 320 pb. Se utilizó el marcador de Peso Molecular de 123 bp DNA ladder

7.3.2 DETERMINACIÓN DEL GEN *ICEA*

La detección del gen *iceA* a partir de las cepas estudiadas fue del 92.30% (12/13). Siete cepas de *H. pylori* fueron *iceA1* positivas (53.84%), mientras que cinco cepas fueron *iceA2* positivas (38.46%).

Productos de amplificación del alelo *iceA1*

A

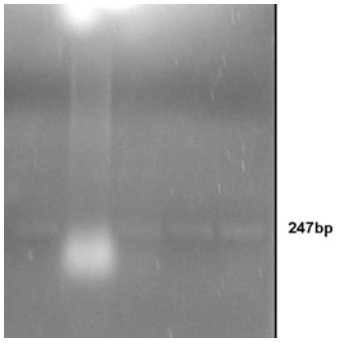

Figura 7.8 Productos de amplificación del gen *iceA1* en gel agarosa al 1.5%. En la figura a se muestran las bandas esperadas de 247 bp

Productos de amplificación del alelo *iceA2*

A

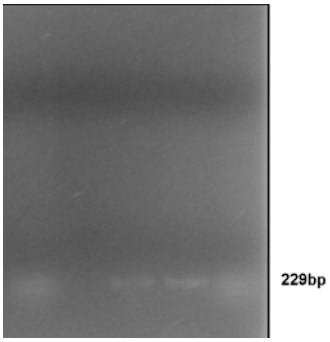

Figura 7.9 Productos de amplificación del gen *iceA2* en gel agarosa al 1.5%. En los carriles 1, 3, 4, 5 es observan las bandas del gen *iceA2* con 229 pb

En la figura 7.10 se muestra la frecuencia con la que se expresaron los alelos del gen *iceA* siendo el más predominante el alelo iceA1.

iceA	No.	%
iceA1	7	53.84
iceA2	5	38.46

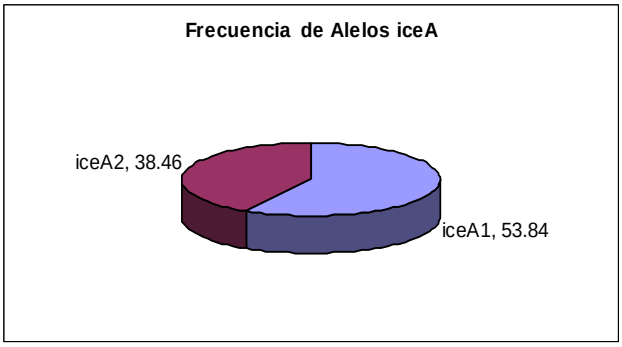

Figura 7.10 Frecuencia de la expresión del gen *iceA1* e *iceA2* en pacientes con gastritis crónica

7.3.3 RELACIÓN DE LOS GENES DE VIRULENCIA Y SUS MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El genotipo *vacA* s1m1 se presenta en casi todas las enfermedades aquí mencionadas, al igual que el genotipo *iceA1* principalmente. Los demás genotipos no se presentan en todas las enfermedades, sin embargo no son específicos para una enfermedad dada, los genotipos s2m2, s1m2 e *iceA2* sólo se presentan en pacientes con gastritis crónica y gastritis crónica superficial. Los casos aislados se presentan en los genotipos s2m1 con gastritis crónica superficial e iceA2 con Esófago de Barret como se muestra en la tabla 7.1

Tabla 7.1 Relación de los genes de virulencia con las enfermedades ulcero péptica.

Enfermedades	*vacA*	*cagA*	*iceA*
Gastritis crónica	s1m1 S2m2 s1m2	(+)	*iceA1* *iceA2*
Gastritis crónica superficial	s1m2 S2m2 s1m2 s2m1		*iceA1* *iceA2*
Gastritis folicular	s1m1	(+)	*iceA1*
Mucosa gástrica	s1m1		*iceA1*
Esófago de Barret	s1m1		*iceA2*

En la tabla 7.2 se muestra con detalle la relación que hay entre los genes de virulencia y sus manifestaciones clínicas, las cuales se presentan en forma aleatoria. Aparentemente, no tienen alguna relación significativa ya que el predominio para estos pacientes es la gastritis crónica. También se observa que el gen *vacA* e *iceA* no son dependientes y no tienen ninguna relación. Para el gen *vacA* y *cagA* no se puede determinar una relación ya que no se pudo amplificar satisfactoriamente el gen *cagA*, sólo se muestran dos cepas con gastritis crónica y gastritis folicular.

Tabla 7.2 Relación detallada con las cepas utilizadas, sus genes de virulencia y las enfermedades de los pacientes.

Número	*vacA*	*iceA*	*cagA*	Patólogo
3	S1m1	/		Gastritis crónica activa, mucosa con metaplasia en esófago
47	S1m1	*iceA1*	(+)	Gastritis crónica.

82	S1m1	*iceA2*		Gastritis crónica
26	S1m2	*iceA2*		Gastritis crónica colonizada
27	S2m2	*iceA1*		Gastritis crónica levemente activa
22	S1m2	*iceA2*		gastritis crónica superficial
23	S2m2	*iceA2*		gastritis crónica superficial
45	S2m1	*iceA1*		Gastritis crónica superficial
7	S2m2	*iceA1*		Gastritis crónica activa folicular
84	S1m1	*iceA1*	(+)	Gastritis folicular
17	S1m1	*iceA1*		Mucosa gástrica sin alteración
4	S1m1	*iceA1*		Mucosa gástrica sin alteración
95	S1m1	*iceA2*		Esófago de Barret