

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE MICROBIOLOGIA**

**Análisis de la secuencia del gen *rdxA* en cepas de *Helicobacter pylori* sensibles y resistentes a metronidazole aisladas en
Costa Rica**

**Esteban Méndez Soto
Helen Rodríguez Arias**

Tutor: Dr. Fernando García Santamaría

**Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
Costa Rica, 2003.**

A nuestros padres.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Fernando García por su colaboración, compañerismo y valiosa amistad que nos brindó durante la realización de este trabajo, así como en los años de nuestra formación como profesionales.

Al personal del laboratorio de Bacteriología Médica de la Facultad de Microbiología por la ayuda que nos brindaron todo este tiempo.

Al personal del Centro de Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica por el aporte tan importante que realizaron para que este trabajo se llevara a cabo.



**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORIA DE DOCENCIA**

**FACULTAD DE MICROBIOLOGIA
CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO**

Acta de presentación de Requisito Final de Graduación

*Sesión del Tribunal Examinador celebrada el primero de julio del 2003, con el objeto de recibir el informe oral de los estudiantes **ESTEBAN MENDEZ SOTO** carné **961914** y **HELEN RODRIGUEZ ARIAS** carné **972855** quienes se acogen al Reglamento de Trabajos Finales de Graduación bajo la modalidad de **PRACTICA DE GRADUACION**, para optar al grado de **LICENCIADO EN MICROBIOLOGIA Y QUIMICA CLINICA**.*

Están presentes los siguientes miembros del Tribunal:

*Dr. Manuel Jiménez **Presidente**
Dr. Fernando García Santamaría
Dr. Esteban Chaves Olarte
Dr. Norman Rojas Campos
Dr. Karl Schosinsky Nevermann*

ARTICULO 1

*El presidente informa que el expediente de **ESTEBAN MENDEZ SOTO** y **HELEN RODRIGUEZ ARIAS**, contienen todos los documentos de rigor, incluyendo el recibo de pago de los derechos de graduación. Declara que los Postulantes cumplieron con todos los demás requisitos del plan de estudios correspondientes y, por lo tanto, se solicita que procedan a hacer la exposición.*

ARTICULO 2

*Los Postulantes **ESTEBAN MENDEZ SOTO** y **HELEN RODRIGUEZ ARIAS** hacen la exposición oral de su trabajo de graduación titulado "**Análisis de secuencia del gen rdx A en cepas Helicobacter pylori sensibles y resistentes a Metronidasol aisladas en Costa Rica**"*

ARTICULO 3

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan a los Postulantes durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

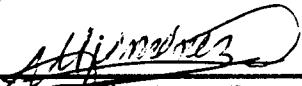
ARTICULO 4

El Tribunal considera el trabajo final de graduación satisfactorio y le confiere la calificación de: 10 (diez)


ARTICULO 5

El Presidente del Tribunal comunica a los Postulantes el resultado de la deliberación y los declara acreedores al grado de **Licenciado en Microbiología y Química Clínica** y grado profesional de **Doctor en Microbiología y Química Clínica**.

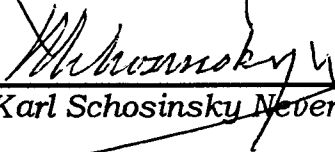
Se le indica la obligación de presentarse al acto público de juramentación, al que serán oportunamente convocados. Se da lectura al acta que firman los Miembros del Tribunal Examinador y los Postulantes, a las 3:30 p.m. horas.



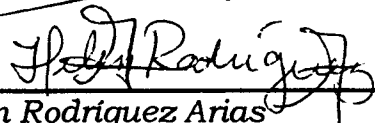
Dr. Manuel Jiménez Díaz
Presidente



Dr. Esteban Chaves Olarte




Dr. Karl Schosinsky Nevermann



Hellen Rodriguez Arias
Postulante



Dr. Fernando García Santamaria



Dr. Norman Rojas Campos



Esteban Méndez Soto
Postulante

c: Decano
Oficina de Registro
Postulante

ÍNDICE

	Página
Portada	<i>i</i>
Dedicatoria.....	<i>ii</i>
Agradecimientos.....	<i>iii</i>
Hoja de aprobación.....	<i>iv</i>
Índice.....	<i>vi</i>
Resumen.....	<i>vii</i>
Lista de cuadros.....	<i>ix</i>
Lista de figuras.....	<i>x</i>
Lista de abreviaturas.....	<i>xi</i>
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. JUSTIFICACIÓN.....	10
III. OBJETIVOS.....	11
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
V. RESULTADOS.....	14
VI. DISCUSIÓN.....	18
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	20

RESUMEN

Méndez, E., Rodríguez, H.

Análisis de la secuencia del gen *rdxA* en cepas de *Helicobacter pylori* sensibles y resistentes a metronidazole aisladas en Costa Rica.

Tesis Microbiología.- San José, C.R.:

E. Méndez, H. Rodríguez, 2003.

22 h.: 3 il. – 19 refs.

Helicobacter pylori ha sido reconocida como el principal agente causal de úlceras pépticas y gastritis crónicas, así mismo, como el mayor factor de riesgo para el desarrollo de cánceres gástricos. La erradicación de esta bacteria es difícil, sin embargo, se han realizado combinaciones de drogas que alcanzan niveles aceptables de erradicación. Una de estas drogas es el metronidazole para el cual se han reportado altos niveles de resistencia en los últimos años.

Como objetivo principal de este trabajo se planteó analizar la secuencia del gen *rdxA*, involucrado en la reducción del metronidazole, en cepas de *H. pylori* sensibles y resistentes aisladas en Costa Rica, con el fin de determinar los tipos de mutaciones que presentan y relacionarla con su concentración mínima inhibitoria (CIM).

El gen *rdxA* se amplificó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), posteriormente se secuenció y se realizó la comparación de las secuencias de las cepas en estudio con la de la cepa control. Además, las secuencias obtenidas se compararon con la de dos cepas sensibles y dos resistentes reportadas en la literatura.

Los resultados obtenidos muestran que las cepas de *H. pylori* presentan regiones en la secuencia del gen *rdxA* muy conservadas, en las cuales las mutaciones puntuales observadas son comunes tanto para las cepas resistentes como para las sensibles. Por otra parte, las cepas resistentes estudiadas presentan tres regiones en su secuencia donde las mutaciones observadas provocan cambios en la estructura secundaria de la proteína RdxA, lo que podría conducir a la pérdida de su capacidad de reducción del metronidazole. Sin embargo, estos cambios no tienen una relación directa con las CIMs de las diferentes cepas estudiadas.

Palabras claves: HELICOBACTER PYLORI; METRONIDAZOLE; RESISTENCIA;
SECUENCIA.

Director de la Investigación: Dr. Fernando García Santamaría

Unidad Académica: Facultad de Microbiología

LISTA DE CUADROS

	Página
CUADRO 1.....	12
CUADRO 2.....	16
CUADRO 3.....	16

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1.....	14
FIGURA 2.....	15
FIGURA 3.....	17

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Mtz	Metronidazole
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
CIM	Concentración mínima inhibitoria
µg	microgramos
ml	mililitros
PBP	Proteínas que unen penicilinas (penicillin binding protein)
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal.
ATP	Adenosina trifosfato
dNTPs	deoxinucleotidos trifosfato
pb	pares de bases
Arg	Arginina
Cys	Cisteina
His	Histidina
Val	Valina
Glu	Glutamato
Thr	Treonina
Gly	Glicina
Lys	Lisina
Leu	Leucina
Asp	Aspartato
Ala	Alanina
Ser	Serina
Asn	Asparagina
Tyr	Tirosina

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa, flagelada que mide entre 0.3 y 1.0 μm de ancho y entre 1.5 y 5.0 μm de largo, presentando forma variada; es microaerofílica y está presente en la mucosa gástrica de los seres humanos (Wang et al, 1998). Esta bacteria ha sido reconocida como el principal agente causal de úlceras pépticas, gastritis crónicas (tipo B), donde también se encuentran asociados el estrés y los agentes químicos. Así mismo, se considera como el mayor factor de riesgo para el desarrollo de cánceres gástricos dentro de los cuales están el MALToma (del inglés mucosa-associated lymphoid tissue) y el adenocarcinoma gástrico, que es el estado final de una inflamación crónica asociada a esta bacteria (Blaser 1998, Bayerdörfer et al 1995).

La prevalencia de esta bacteria se ve influenciada por el estado socioeconómico y la residencia en países en vías de desarrollo, en donde entre el 70% y el 90% de la población son portadores y casi todas estas personas adquieren la bacteria antes de los 10 años de edad. En países desarrollados se han descrito prevalencias entre 25% y 50%, siendo mayor en personas de edad avanzada. En general, la prevalencia aumenta conforme baja el nivel socioeconómico tanto en países en vías de desarrollo como en países desarrollados, siendo el hacinamiento y las condiciones sanitarias pobres los principales factores de riesgo (Gonzaga et al., 2000).

Costa Rica es uno de los países con mayores tasas de incidencia de cáncer gástrico en el mundo, donde *H. pylori* ha sido aislada de biopsias gástricas de pacientes dispépticos y en estudios serológicos, tanto de personas sanas como de personas con problemas gástricos, se han encontrado títulos de anticuerpos elevados que aumentan gradualmente con la edad de los pacientes (Sierra et al., 1998).

La erradicación de esta bacteria es difícil y ninguno de los tratamientos actualmente utilizados ha podido alcanzar una eliminación en el 100% de los casos. Sin embargo, se han realizado combinaciones de drogas que alcanzan niveles aceptables de erradicación, siendo los de al menos un 90% los que se utilizan en la práctica en estos momentos (de Boer et al., 1995). Estos antibióticos al erradicar la bacteria conducen a una regresión completa en las lesiones en la mucosa gástrica. Dentro de los esquemas terapéuticos utilizados se encuentran

aquellos en los que se utilizan dos o tres antibióticos junto con un inhibidor de la bomba de protones, como es el omeprazole (Gonzaga et al., 2000).

2

H. pylori es una bacteria que muestra una gran variabilidad genética y fenotípica, incluyendo su susceptibilidad a los antibióticos, lo cual constituye un factor esencial en la definición de un tratamiento que pretenda erradicar a la bacteria de la mucosa gástrica. El conocimiento a la susceptibilidad a los antibióticos de los aislamientos de *H. pylori* en una región geográfica determinada permitirá definir cuales antibióticos tendrían una mayor eficacia en un esquema terapéutico de erradicación (Ávalos-Giugliarelli et al, en prensa).

Dentro de los antibióticos utilizados están el metronidazole, la claritromicina y la amoxicilina, los cuales tiene diferentes mecanismos de acción contra dicha bacteria. Actualmente, muchas de estas bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia contra estos antibióticos, causando fallos en los esquemas de tratamiento. Los diferentes mecanismos por medio de los cuales *H. pylori* ha desarrollado resistencia contra estos antibióticos se estudió en el presente trabajo, correlacionando los resultados obtenidos en las cepas costarricenses con las cepas ya estudiadas en otros países.

Mecanismos de resistencia a antibióticos en *Helicobacter pylori*.

El hecho de que *H. pylori* está muy asociada con la aparición de úlceras pépticas y cáncer gástrico ha llevado a la búsqueda de diferentes tratamientos para eliminarla. Muchas terapias han sido probadas, llegando a la conclusión de que la combinación de diferentes drogas es la que ha dado los mejores resultados.

Una de las drogas que se ha usado constantemente en los diferentes tratamientos son las 5-nitroimidazoles, principalmente el tinidazole y el metronidazole. Estas mismas han sido utilizadas en el tratamiento de bacterias anaerobias e infecciones por protozoarios. Otras dos drogas que han sido utilizadas con éxito en estos años han sido los macrólidos (claritromicina) y los β -lactámicos (amoxicilina).

Últimamente el uso de una bomba inhibidora de protones junto con la claritromicina, metronidazole y amoxicilina ha representado la mejor combinación de drogas para el tratamiento de infecciones por *H. pylori*. El fallo en este tratamiento se ha debido a la

aparición de mecanismos de resistencia a estos antibióticos por parte de la bacteria (Mégraud et al, 2001).

3

Actividad del 5-nitroimidazole y sus mecanismos de resistencia.

Los 5-nitroimidazoles son prodrogas que necesitan ser activadas dentro de la célula blanco. Estas prodrogas tienen un potencial de reducción muy bajo y son activadas por un proceso de reducción de un electrón. La reducción del grupo nitro lleva a la generación de productos reactivos, principalmente radicales libres, que dañan estructuras subcelulares, causando daño y mutaciones en el ADN.

Algunos de los productos de reducción son mutagénicos y su formación puede llevar a la generación de radicales libres secundarios, los cuales también son dañinos. Con la reducción de la droga, se forma un gradiente de concentración el cual facilita la difusión de más 5-nitroimidazole dentro de la célula (Mégraud et al, 2001).

La base para la toxicidad selectiva de esta droga se relaciona con el potencial redox del ambiente intracelular. Las bacterias anaerobias tienen la capacidad reductora para activar estas drogas mientras que las bacterias aerobias y las células de mamíferos no. El hecho de que *H. pylori*, una bacteria microaerofílica, sea susceptible al 5-nitroimidazole fue la primera indicación de que el metabolismo de esta bacteria era atípico. Se sugirió que el mecanismo de susceptibilidad y resistencia a esta droga era único, incluyendo procesos tales como el ciclo futil, los cuales generaban aniones superóxido que llevaban a la muerte celular. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que esta hipótesis no era correcta (Mégraud et al, 2001).

H. pylori posee enzimas con diferentes características anaerobias. Una de estas enzimas es la piruvato-flavodoxina oxidoreductasa (*porGDAB*), la cual en bacterias anaerobias es esencial en la activación de este tipo de drogas. Sin embargo, en *H. pylori* ha sido difícil determinar la contribución exacta en la activación de la droga y su resistencia (Mégraud et al, 2001).

Además de esta enzima existen otras como la 2-oxoglutarato:aceptor oxidoreductasa (*oorDABC*) y la flavodoxina (*fldA*) que trabaja sólo en condiciones anaerobias. Ciertos

estudios asociaron la actividad de NADH oxidasa con resistencia a metronidazole (Smith et al., 1995). Las NADH oxidasas son enzimas que reducen el oxígeno molecular a peróxido de hidrógeno o agua sin un aceptor de electrones intermediario. El genoma de *H. pylori* no ha revelado ningún gen homólogo al típico de NADH oxidasa, sin embargo, la actividad de NADPH oxidasa puede estar asociada con enzimas que no son primariamente NADPH oxidasas, por ejemplo flavoproteínas como alkyl hidroperóxido reductasa, tioredoxina reductasa, glutatión reductasa, mercurio reductasa y dihidrolipoamida deshidrogenasa (Mégraud et al, 2001).

Un avance importante en el entendimiento de la resistencia a 5-nitroimidazole, basados en sustanciales evidencias moleculares, se dio cuando se demostró que mutaciones en el gen que codifica por una nitroreductasa oxígeno-insensible (*rdxA*) lleva a un incremento en la resistencia hacia este antibiótico debido a la inactivación de la nitroreductasa (Hoffman et al., 1996). Este gen fue identificado de diferentes maneras: 1) transformación de cepas Mtz susceptibles (Mtz^S) con cósmidos de cepas Mtz resistentes (Mtz^R), las cuales fueron evaluadas subclonando y por PCR con secuenciación del ADN. 2) se encontró que *Escherichia coli*, normalmente Mtz^R, se transformaba en Mtz^S por medio de un gen *rdxA* de *H. pylori*; 3) la introducción del *rdxA* en un plásmido, el cual se introduce en una cepa de *Helicobacter pylori* Mtz^R y la convierte en Mtz^S; 4) el reemplazo del *rdxA* en cepas Mtz^S por un alelo de inserción nulo *rdxA::camR* que las transforma en Mtz^R (Goodwin et al, 1998).

En otro estudio realizado, se estableció que la resistencia era debida a una secuencia de inserción (una mini-IS605) y a depleciones en el gen *rdxA*. Así mismo no se observó ninguna mutación en ningún otro posible gen de resistencia (catalasa, superóxido dismutasa, flavodoxina, ferredoxina, piruvato: flavodoxina oxidorreductasa y *recA*) Entonces se propone los siguientes mecanismos de inactivación del gen *rdxA*: mutaciones de cambio en el marco de lectura, incluyendo delección de bases y la presencia de una secuencia de inserción (mini-IS605) y mutaciones con sentido equivocado (Mégraud et al, 2001).

Sin embargo, se ha visto que las mutaciones en el gen *rdxA* no es el único problema, ya que se han encontrado cepas resistentes a metronidazole sin mutaciones aparentes en este gen, reforzando la idea de que existen mecanismos adicionales de resistencia en otros aislamientos de esta bacteria (Jenks et al, 1999). Por ejemplo, en un estudio se inactivaron diferentes genes

de la bacteria como *fdxB*, *frxB* y *rdxA* observándose diferentes niveles de resistencia, consistentes con observaciones clínicas (Mégraud et al, 2001).

La resistencia a 5-nitroimidazole está ampliamente distribuida. En los países desarrollados varía entre el 10% y el 50%, mientras que en los países en vías de desarrollo podría pensarse en un 100%. Parece ser debido al uso de ese antibiótico en infecciones ginecológicas y dentales, así como en infecciones parasitarias. Sin embargo, los resultados pueden estar ampliamente influenciados por el método de prueba de susceptibilidad utilizada. (Mégraud et al, 2001).

Resistencia a metronidazole en *Helicobacter pylori*

Los genes *rdxA* de las cepas Mtz^S y las cepas Mtz^R difieren el uno del otro por una a tres sustituciones de pares de bases. Normalmente los genes *rdxA* típicos de aislamientos separados, difieren en aproximadamente 5% en su secuencia de ADN. La aparición de cepas Mtz^R se debe más que todo a nuevas mutaciones (mutaciones novo) más que a transferencia horizontal de los genes, por lo tanto la actividad del gen *rdxA* es sumamente importante en la actividad de este antibiótico (Goodwin et al, 1998).

El *rdxA* es un homólogo de las nitroreductasas clásicas de las bacterias entéricas, pero difieren en el contenido de cisteína (6 vrs 1) y en el punto isoeléctrico. Se cree que muchas de las mutaciones en *rdxA* han sido seleccionadas debido al uso del metronidazole en otras infecciones (Goodwin et al, 1998).

La toxicidad del metronidazole en *H. pylori* puede depender de la reducción de su grupo nitro y de otros compuestos incluyendo la hidroxilamina. Esta última es particularmente dañina para macromoléculas tales como el ADN y las proteínas. Bajo condiciones aeróbicas o microaerofílicas, el oxígeno molecular puede convertir el Mtz reducido a su compuesto original por medio de un proceso llamado ciclo futil, que esencialmente genera aniones superóxido en lugar de hidroxilamina. Se ha demostrado que la eliminación de la cepa silvestre de *H. pylori* es debida a la reducción del Mtz a hidroxilamina por parte del *rdxA* (Hoffman et al, 1996).

La amoxicilina es el único β -lactámico usado para tratar infecciones por *H. pylori* y está incluido en la mayoría de los regímenes terapéuticos. Esto se debe a su muy baja concentración mínima inhibitoria (CIM) contra esta bacteria, usualmente $< 0.03 \mu\text{g/ml}$. Hasta hace poco tiempo, nadie pensaba que existían cepas de esta bacteria resistentes a amoxicilina, pero poco a poco han venido apareciendo cada vez más (Mégraud et al, 2001).

Este mecanismo de resistencia puede ser transferido de la cepa resistente a la cepa susceptible por transformación natural del ADN a una frecuencia de 10^{-5} , esto lleva a la producción de cepas resistentes estables para las cuales las CIMs fueron 400 veces mayores que para las susceptibles (Mégraud et al, 2001).

Grados variables de resistencia cruzada con otras penicilinas se han observado en cepas resistentes a amoxicilina. Se ha observado que cepas con CIMs de amoxicilina $>32 \mu\text{g/ml}$ también son resistentes a otros β -lactámicos, mientras que las que tienen CIMs de apenas $2\mu\text{g/ml}$ no (Mégraud et al, 2001).

Las bacterias Gram negativas son resistentes a estos antibióticos porque producen una β -lactamasa, ya sea cromosómicamente codificada o mediada por plásmidos. En *H. pylori* la resistencia a amoxicilina no puede ser atribuida a la adquisición o expresión de una β -lactamasa, debido a que ningún gen para β -lactamasa fue encontrado en las dos cepas secuenciadas (Mégraud et al, 2001).

Otros mecanismos de resistencia para este tipo de antibióticos incluyen la alteración de las PBPs (penicillin binding proteins), la disminución de la permeabilidad de los antibióticos en la pared celular de la bacteria o una combinación de los dos. Estudios en *H. pylori* sugieren la existencia de tres principales PBPs (PBP1, 2 y 3) con pesos moleculares de aproximadamente 60 kDa. En un estudio se encontró que la resistencia a amoxicilina era dependiente de una PBP indetectable (PBP-D) con una masa molecular de 32 kDa y una muy baja afinidad a amoxicilina (Dore et al, 1999). Posteriormente, se demostró que una mutación puntual en el gen *pbp1a* estaba asociado con la resistencia estable a amoxicilina. Sin embargo, la

prevalencia de la resistencia a amoxicilina todavía se mantiene extremadamente baja en la mayoría de los países (Kusters et al, 1999).

Actividad de los macrólidos y los mecanismos de resistencia.

Los macrólidos son frecuentemente usados en combinación con otros antimicrobianos para el tratamiento de infecciones con *H. pylori* (Mégraud et al, 2001).

La actividad de un macrólido depende de que este pueda penetrar la célula bacteriana y se una al ribosoma. El sitio blanco es un dominio del ARNr 23S, la peptidil transferasa en el dominio V. El macrólido traba el dominio V conduciéndolo a una interrupción en la elongación proteica, causando que la bacteria no pueda sintetizar proteínas (Mégraud et al, 2001).

El mecanismo que está involucrado en la resistencia de macrólidos de *H. pylori* es un punto de mutación (adenina-guanina) en dos posiciones, 2142 (A2142G) y 2143 (A2143G). Otras mutaciones han sido descritas in vitro como A2142C, A2143C, A2142T y A2143T. Sin embargo, estas cepas mutantes presentan inestabilidad y tienen una tasa de crecimiento disminuida. Además la cepa con la mutación A2143T presenta una CIM de sólo 0.5 µg /ml, esto puede deberse a que el cambio en la secuencia de nucleótidos en este caso induce un cambio de energía libre y de conformación mayor en el ribosoma que el que genera la mutación A2142G y A2143G, el cual tiene un impacto en la adaptación de la bacteria (Mégraud et al, 2001).

H. pylori presenta dos operones ARNr 23S, con mutaciones resistentes que se presentan usualmente en ambos. Esto indica que la mutación ocurre espontáneamente y es seleccionada después de la exposición a la droga (Mégraud et al, 2001).

La mayoría de mutaciones se presentan en un único punto, ya sea A2143G, A2142G o A2142C. En las cepas resistentes a eritromicina, la mutación más frecuentemente encontrada es la A2143G, seguida por A2142G y en menor frecuencia A2142C (Wang y Taylor, 1998).

La CIM de claritromicina para mutantes heterólogos A2142C/T es intermedia entre los mutantes homólogos A2142C y A2142T (Wang y Taylor, 1998).

La prevalencia de mutantes homólogos sobre los heterólogos en *H. pylori* puede reflejar la alta eficiencia de la recombinación del ADN en estos organismos. La mutación en una copia del gen ARNr 23S puede ser fácilmente copiado por el otro gen por una eficiente recombinación de ADN homólogos que bajo la presión selectiva produce una mutación diploide que puede conferir alto nivel de resistencia (Wang y Taylor, 1998).

El impacto de las mutaciones específicas en las CIMs ha sido estudiado, siendo la mutación A2142G la más probable de encontrar en aislamientos para los cuales la CIM es mayor que 64 µg/ml (Debets-Ossenkopp et al., 1998).

La CIM de las cepas con una mutación de A2142 a G o C es alta, mientras que las cepas con mutación de 2143 tiene un efecto menor en la CIM. El menor incremento de la CIM fue observado de A a T en la posición 2143 (Debets-Ossenkopp et al., 1998).

Las mutaciones de A2142 a G o C y A2143 a G son estables. Las cepas que contienen la mutación de A2142 a C o de A2143 a C o T presenta una marcada reducción en la tasa de crecimiento. Esta reducción fue más pronunciada en las mutantes con la mutación de A2142 o A2143 a T (Debets-Ossenkopp et al., 1998).

Las CIMs para claritromicina de las cepas con la mutación A2143G exhiben un rango desde <0.016 a > 256 µg/ml (García-Arata et al., 1999).

Las cepas con la mutación A2143G que presentan un amplio rango de CIM, podría sugerir la presencia de mutaciones que envuelvan uno o ambos operones ARNr 23S. Otra posibilidad es la asociación con otros mecanismos de resistencia como bombas ATP y genes de canales multidroga resistentes (García-Arata et al., 1999).

Además, se han reportado cepas mutantes con un bajo nivel de resistencia a claritromicina y un ARNr 23S silvestre, lo que sugiere que *H. pylori* probablemente emplea un mecanismo adicional desarrollado para la resistencia a claritromicina (Debets-Ossenkopp et al, 1998).

La mutación A2142G es ligada con alto nivel de resistencia cruzada a macrólidos, lincosamina y estreptogramina y la A2143G presenta un nivel intermedio de resistencia a claritromicina y clindamicina pero no a estreptogramina B (Wang y Taylor, 1998). 9

Actualmente Costa Rica es uno de los países con una de las mayores tasas de incidencia de cáncer gástrico a nivel mundial. *H. pylori* se ha encontrado en muchas de las biopsias gástricas de pacientes con esta enfermedad, además estudios serológicos han mostrado títulos de anticuerpos elevados tanto en personas con problemas gastrointestinales como en personas sanas.

El tratamiento que se administra para la erradicación de esta bacteria consta de una combinación de diferentes drogas dentro de las cuales están el metronidazole, la claritromicina, la tetraciclina y una bomba inhibidora de protones. El fallo en este tratamiento se ha debido en parte a la aparición de mecanismos de resistencia a estos antibióticos por parte de esta bacteria.

Estudios realizados en otros países han demostrado que dicha resistencia se debe a mutaciones puntuales en diferentes genes de *H. pylori*.

El presente trabajo pretende analizar las cepas costarricenses de *H. pylori* para determinar las mutaciones que presentan con respecto a las cepas de otros países, debido a que en nuestro país no se han realizado estudios semejantes.

➤ **Objetivo General**

Analizar la secuencia del gen *rdxA* en cepas de *Helicobacter pylori* sensibles y resistentes al Metronidazol aisladas en Costa Rica.

➤ **Objetivos Específicos**

1. Estandarizar las condiciones para la amplificación del gen *rdxA* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
2. Amplificar el gen *rdxA* a partir de cepas de *H. pylori* sensibles y resistentes al Metronidazol.
3. Secuenciar los productos de PCR obtenidos.
4. Comparar las secuencias de las cepas en estudio con la secuencia de la cepa de referencia *H. pylori* J99.
5. Establecer la relación entre las mutaciones encontradas y la CIM que presenta cada cepa respectivamente.

1. ADN

Cuadro 1. Cepas de *H. pylori* sensibles y resistentes al metronidazole en estudio y su patología asociada.

Cepa	Origen	Patología	CIM Mtz($\mu\text{g/ml}$)	Cepa	CIM Mtz($\mu\text{g/ml}$)
J99	-	-	control	98-0518 E	16
CCUG38770	-	-	> 256	228-06 A	> 256
119-02 A	Antro	G.C.	16	98-521 H	> 256
221-02 A	Antro	G.C.	< 0.016	229-04 A	> 256
327-06 A	Antro	U.D.	48	316-06 A	> 256
98-0309 G	Antro	U.D.	64	228-10 A	> 256
131-02 A	Antro	U.D.	> 256	327-11 A	96
202-04 A	Antro	G.C.	32	316-08 A	24
98-0604 H	Antro	U.D.	64	327-12 A	> 256
98-0521 G	Antro	U.D.	> 256	98-1023	16

G.C.: Gastritis crónica; U.D.: Úlcera duodenal.

Nota: Las cepas J99 y CCUG38770 corresponden a los controles sensible y resistente respectivamente.

2. PCR:

El fragmento *rdxA* fue obtenido mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los primers *rdxA-F* (5'AATTTGAGCATGGGGCAGA3') y *rdxA-R* (5'GAAACGCTTGAAAACACCCCT3') de acuerdo a la metodología descrita (Debets-Ossenkopp, 1999). Se utilizó 2 μL de ADN en 50 μL de la mezcla de reacción conteniendo 20 mM Tris HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.5 μM de MgCl_2 , 0.01% (p/v) Tween 20, 400 μM de cada deoxinucleotido trifosfato (dNTPs), 0.5 μM de cada primer y 1.5 U de Taq ADN polimerasa recombinante (Ampli Taq, Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, New Jersey). La amplificación fue realizada en un termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400, programado con una desnaturalización previa de 2 minutos a 94° C, seguido de 35 ciclos, cada uno con 94° C por 30 segundos, 55° C por 30 segundos y 72° C por 30 segundos. Al concluir los ciclos se realizaba un post PCR de 72° C por 5 minutos.

3. Electroforesis

13

Los productos de PCR fueron visualizados mediante una electroforesis en un gel de 1.5% de agarosa con bromuro de etidio (0.5 µg/ml).

4. Secuenciación de ADN

Los productos de amplificación seleccionados se purificaron y secuenciaron directamente mediante secuenciación cíclica empleando el conjunto de reactivos BigDye Terminators Kit (Applied Biosystems, California, Estados Unidos), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias de nucleótidos fueron determinadas en un secuenciador ABI PRISM 388 (Applied Biosystems) disponible en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica, y analizadas con el programa Bio Edit (Hall,T.,1999). Las secuencias fueron comparadas contra la secuencia de la cepa J99 en www.tigr.org.

Se realizó la amplificación del gen *rdxA* siguiendo la técnica de PCR descrita anteriormente y utilizando como control la cepa *H. pylori* J99 (ver figura 1). Se obtuvo un producto de aproximadamente 850 pares de bases, cuya identidad fue confirmada mediante secuenciación. No se obtuvo producto de PCR de las cepas 202-04 A, 980604 H, 980518 E, 228-06 A y la 229-04 A.

Posteriormente se realizó la secuenciación de los productos obtenidos del PCR para determinar los cambios que podrían estar relacionados con la resistencia a metronidazole de las cepas de *H. pylori* en estudio. Las secuencias de las cepas 327-06 A y la 981023 F no pudieron ser obtenidas. Se comparó las secuencias de dos cepas sensibles al Mtz (NCTC11638 y 26695), dos cepas resistentes (NCTC11637 y ATCC43504) descritas en la literatura y las cepas en estudio con la secuencia de la cepa control. Posteriormente se verificó cuales cambios en la secuencia de nucleótidos conducen a cambios en la secuencia de aminoácidos que constituyen RdxA (ver figura 2).

En las cepas en estudio se presentaron cambios en aminoácidos de la secuencia de 210 aminoácidos que constituyen la proteína RdxA; como se muestran en el cuadro 2, en comparación con la secuencia de la cepa J99.

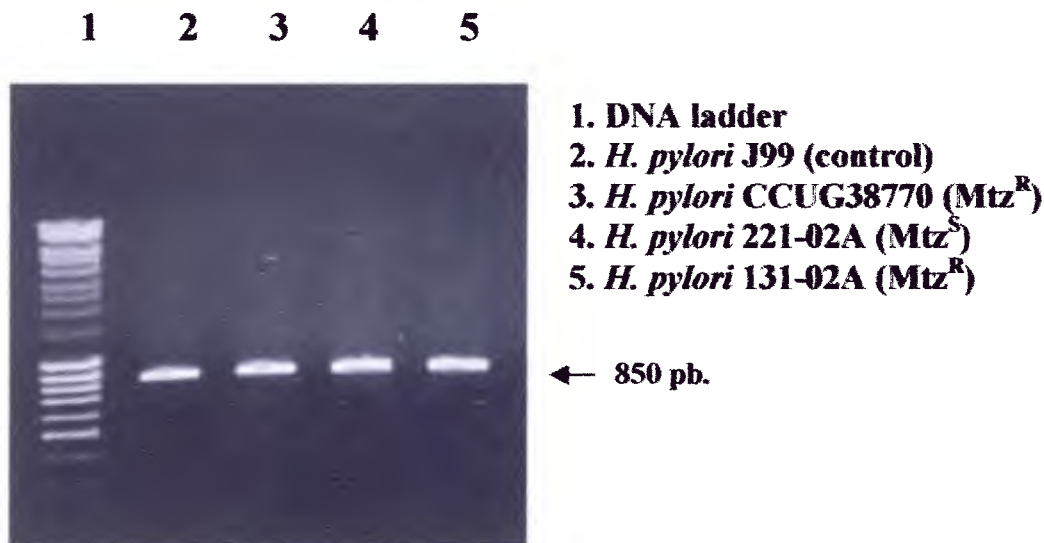


Figura 1. Amplificación del gen *rdxA* en cepas de *Helicobacter pylori* aisladas en Costa Rica

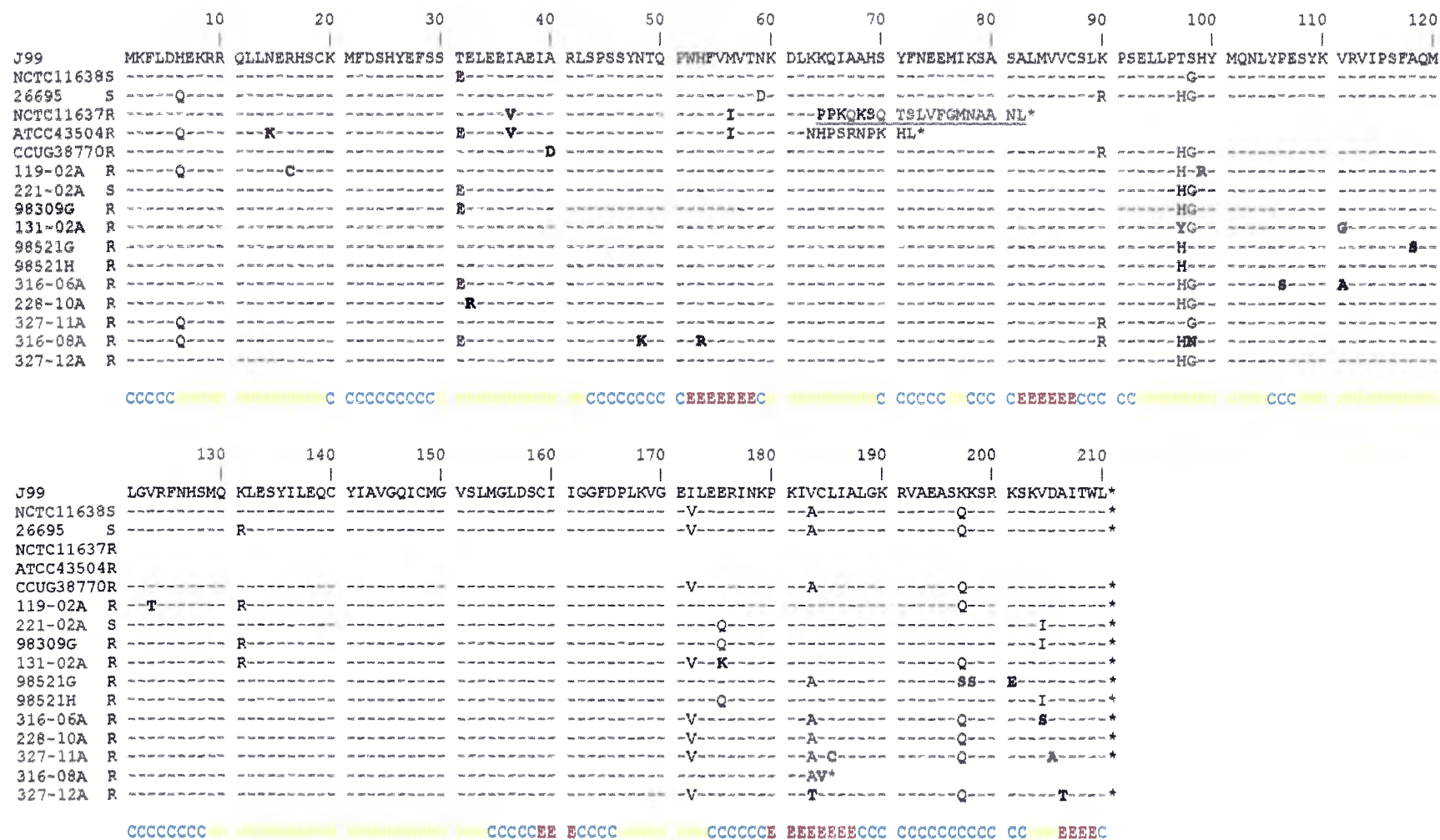


FIG 2. Alineación de la proteína RdxA de cepas de *Helicobacter pylori* sensibles y resistentes a metronidazole. Las cepas NCTC11638 (Debets-Ossenkopp et al., 1999), 26695 (Paul et al., 2001) y 221-02A son sensibles, las cepas NCTC11637 (Debets-Ossenkopp et al., 1999) y la ATCC 43504 (Paul et al., 2001) son resistentes a este antibiótico; las restantes cepas en estudio también son resistentes. Las líneas (-) indican que la secuencia se conserva sin cambios con respecto a la cepa J99 (control), los asteriscos indican el codón de terminación. La porción subrayada de la cepa NCT11637 corresponde a una mini secuencia de inserción (Mini-IS605). En la parte inferior se muestra la estructura secundaria de la proteína de la cepa control (H: hélice; E: hoja; C: cola).

Cuadro 2. Cambios presentados en la secuencia de aminoácidos de las cepas resistentes que no están presentes en las cepas sensibles estudiadas

Cepa	Posición	Cambio	Cepa	Posición	Cambio	
119-02A	16	Arg-Cys	228-10A	32	Glu-Arg	
	99	His-Val				
	123	Val-Thr				
131-02A	97	Thr-His	327-11A	185	Leu-Cys	
	111	Val-Gly		205	Asp-Ala	
	175	Glu-Lys				
98521G	118	Ala-Ser	316-08A	48	Asn-Lys	
	197	Lys-Ser		53	His-Arg	
	198	Lys-Ser		98	Ser-Asn	
	201	Lys-Glu		184	Cys-Val	
			185	STOP		
316-06A	105	Tyr-Ser	327-12A	183	Val-Thr	
	111	Val-Ala		206	Ala-Thr	
	204	Val-Ser				

Cuadro 3. Regiones donde se presentan los cambios de aminoácidos en las cepas resistentes y la relación con sus respectivas CIMs.

Cepa	CIM (µg/ml)	Región I	Región II	Región III
CCUG38770	>256	X	-	-
119-02A	16	X	X	-
98309-G	64	-	-	-
131-02A	>256	-	X	X
98521G	>256	-	X	-
98521H	>256	-	-	X
316-06A	>256	-	X	X
228-10A	>256	X	-	-
327-11A	96	-	-	X
316-08A	24	X	X	X
327-12A	>256	-	-	X

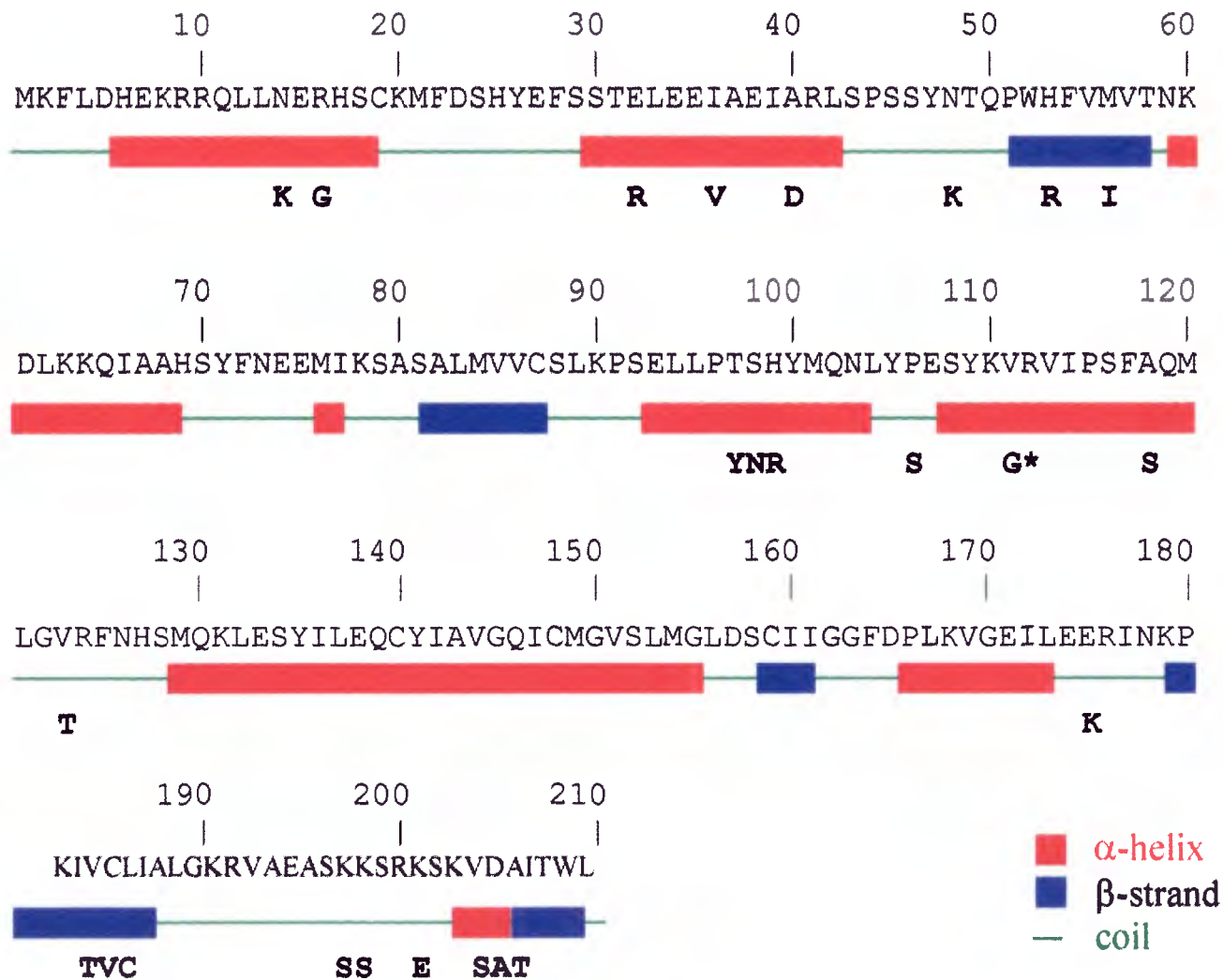


FIG. 3. Estructura secundaria de la proteína RdxA de *Helicobacter pylori*. Las letras destacadas en la parte inferior corresponden a las mutaciones observadas en las cepas metronidazole resistentes estudiadas. El asterisco indica que en la posición 111 la valina puede cambiar por glicina (G) o por alanina (A).

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el gen *rdxA* de *Helicobacter pylori* presenta regiones muy conservadas como las que se encuentran entre los aminoácidos 1-10, 21-30, 61-95 y 124-174, en las cuales se observan regiones de la secuencia donde las mutaciones puntuales son comunes en todas las cepas, por tanto, no se puede concluir que sean mutaciones que generen algún grado de resistencia por parte de estas bacterias a dicho antibiótico.

La mini inserción que presenta la cepa NCTC11637, y el cambio observado en una de las regiones más conservadas de la cepa ATCC43504, que les confiere resistencia al Mtz, no se observaron en ninguna de las secuencias estudiadas. Sin embargo, se encontraron cambios de aminoácidos en otras regiones que no son comunes a todas las cepas resistentes, que podrían ser como las encontradas en otros estudios, en los que se describen pequeñas mutaciones debidas a sustituciones de bases en cepas Mtz^R como único mecanismo de resistencia a este antibiótico (Goodwin et al, 1998).

En la cepa 316-08A se observa un punto de corte o codón de terminación en la posición 185, sin embargo, debido a que la última sección del marco de lectura del gen no es totalmente confiable y no se puede corroborar con la cadena complementaria porque su secuenciación fue defectuosa, no es posible comprobar que realmente esté presente en la secuencia de esa cepa, por lo tanto tampoco se puede afirmar que sea la mutación causante de la resistencia.

Se observó que cepas que no presentaban mutaciones aparentes en el gen *rdxA* eran Mtz^R, por lo que propuso que podrían existir otros mecanismos de resistencia relacionados con otros genes como el *fld A*, el *rec A*, el *oorDABC*, el *fdx B*, el *frx B*, entre otros (Jenks et al, 1999). Éste no es el caso de las cepas resistentes estudiadas en el presente trabajo, debido a las mutaciones puntuales observadas en tres regiones diferentes de la secuencia, la primera región es la comprendida entre los aminoácidos 11-20 y 31-60, donde se ven afectadas dos α -hélices y una hoja β , en el extremo amino terminal. La segunda se encuentra entre los aminoácidos

96-123, donde se afectan algunas α -hélices y una última región entre los aminoácidos 175-206 donde las estructuras modificadas son dos hojas β y una α -hélice (ver figura 2 y 3).

Las α -hélices y las hojas β se ven afectadas debido a los cambios en la carga de la proteína generados por la sustitución de los aminoácidos. La variación de cargas provoca que se desestabilicen dichas estructuras generando una conformación diferente de la proteína, lo que puede conducir a la pérdida de su capacidad de reducción de los 5-nitroimidazoles.

Sin embargo, las mutaciones que provocan los cambios en esas tres regiones no tienen ningún tipo de relación con las CIMs de las cepas estudiadas (ver cuadro 3), por lo que no es posible relacionar un cambio específico en una o varias regiones con la aparición de una CIM alta o intermedia, como si se ha podido hacer en el caso de la resistencia de *H.pylori* a los macrólidos (Mégraud et al, 2001).

La cepa 98-309 G cuya CIM es de 64 $\mu\text{g/ml}$, no presenta cambios en ninguna de las regiones anteriormente mencionadas por lo que en este caso en particular sí podría pensarse en la participación de otras enzimas como las causantes de su resistencia.

1. **Ávalos-Guigliarelli A., Avendaño-Alvarado G., Barahona-García R., Paéz-Saéñz R., Salas-Aguilar R., Lang L., Ramírez V., Sierra R., García F.** Erradicación de *Helicobacter pylori* mediante triple terapia (amoxicilina, claritromicina y omeprazole) en pacientes del Hospital Rafael Ángel Calderón Guardia. *Revista Médica Costarricense*, en prensa.
2. **Bayerdörfer E., Neubauer A., Rudolph B., Thiede C., Lehn N., Edit S. et al.** 1995. Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. *Lancet*. 1591-1594.
3. **Blaser MJ.** 1998. *Helicobacter pylori* and gastric disease. *Brit Med J*. 1507-1510.
4. **Debets-Ossenkopp Y., Brinkman A., Kuipers E., Vanderbrouke-Grauls C., Kusters J.** 1998. Explaining the bias in the 23S rRNA gene mutations associated with clarithromycin resistance in clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 2749-2751.
5. **Debets-Ossenkopp Y., Pot R., van Westerloo D., Goodwin A., Vanderbroucke-Grauls C., Berg D., Hoffman P., Kusters J.** 1999. Insertion of mini-IS605 and deletion of adjacent sequences in the nitroreductase (*rdxA*) gene cause metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* NCT11637. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2657-2662.
6. **de Boer WA., Tytgat GNJ.** 1995. Ninety percent cure: which anti-*Helicobacter* therapy can achieve this treatment goal?. *Am J Gastroenterol.* **90**: 1381-1382.

7. **Dore M. P., M. S. Osato, G. Realdi, I. Mura, D. Y. Graham, A.R. Sepulveda.** 1999. Amoxicillin tolerance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob. Chemoter.* **43**: 47-54.
8. **Garcia-Arata M., Barquero F., DeRafael L., DeArgila C., Gisbert J., Bermejo F., Boixeda D., Cantón R.** 1999. Mutation in 23S rRNA in *Helicobacter pylori* conferring resistance to Erytromycin do not always confer resistance to Clarithromycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:374-376.
9. **Gonzaga Vaz Cohelo L., León Barúa R., Quigley EMM. and representatives of the Inter-American Association of Gastroenterology (AIGE).** 2000. Latin-American Concensus Conference on *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol.* **95**:2688-2691.
10. **Goodwing A., Kersulyte D., Sisson G., Veldhuyzen van Zanten S., Berg D., Hoffman P.** 1998. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in gene (*rdxA*) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. *Molecular Microbiology.* **28**:383-393.
11. **Hall, T.A.** 1999. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for WINDOWS 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**: 95-98.
12. **Hoffman, P. S., Goodwin, J. Johnsen, K. S. J. Veldhaygen van Zanten.** 1996. Metabolic activities of metronidazole-sensitive and resistant strains of *Helicobacter pylori*: repression of pyruvate oxydoreductase and expression of isocitrate lyase activity correlate with resistance. *J. Bacteriol.* **178**: 4822-4829.

13. **Jenks P. J., Ferrero R. L., Labigne A.** 1999. The role of the *rdxA* gene in the evolution of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J. Antimicrob Chemother.* **41**: 67-75.
14. **Kusters J. G., Schuijffel D. F., Gerrits M. M., van Zwet A., Vandenbroucke-Grauls J. E.** 1999. A PBP-1A homologue involved in stable amoxicillin resistance of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* **116**: A226.
15. **Mégraud F., Hazell S., Glupczynski.** 2001. Antibiotic susceptibility and resistance, p511-529. En A.L.T Mobley, G.L. Mendz, S.L. Hazell (eds), *Helicobacter pylori: physiology and genetics*. American Society for Microbiology Press, Washington D.C.
16. **Paul R., Postius S., Melchers K., Schäfer K.** 2001. Mutations of the *Helicobacter pylori* genes *rdxA* and *pbp1* cause resistance against metronidazole and amoxicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 962-965.
17. **Sierra R., Salas P., Mora-Zúñiga F., Sanabria M., Chinnock A., Peña S., et al.** 1998. Erradicación de *Helicobacter pylori* en una población de alto riesgo de cáncer gástrico. *Acta Méd Costarric.* **40**: 30-35.
18. **Smith, M. A., D.I. Edwards.** 1995. Redox potencial and oxygen concentrations as factors in the susceptibility of *Helicobacter pylori* to nitroheterocyclic drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* **35**: 751-764.
19. **Wang G. Y Taylor D.** 1998. Site-specific mutation in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* confer two types of resistance to Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B antibiotics. *J. Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 1952-1958.