

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**“PRESENCIA DE HELICOBACTER PYLORI EN PLACA DENTAL DE LA
POBLACIÓN INFANTIL QUE ACUDE AL POSGRADO DE
ODONTOPEDIATRÍA DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA U.A.N.L.”**

POR:

PAULO CÉSAR MARES MORENO

Cirujano Dentista

Universidad Autónoma de Nuevo León

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS CON ESPECIALIDAD EN
ODONTOPEDIATRÍA.

2012

“Presencia de *Helicobacter pylori* en placa dental de la población infantil que acude al
Posgrado de Odontopediatría de la Facultad de Odontología de la U.A.N.L”

ASESORES

Dra. Myriam Angélica De La Garza Ramos.
Directora de tesis

Dra. Martha Elena García Martínez.
Co-Directora de Tesis

Dra. Rosalba González Meléndez.
Asesor Metodológico

Dr. Miguel Ángel Quiroga García.
Asesor Metodológico

Dr. Claudio Cabral Romero.
Asesor Metodológico

M.S.P. Gustavo Israel Martínez González.
Asesor Estadístico

APROBACIÓN DE LA TESIS

Los miembros del jurado aceptamos la investigación y aprobamos el documento que avala la misma; como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias Odontológicas con Especialidad en Odontopediatría.

HONORABLES MIEMBROS DEL JURADO

Dra. Myriam Angélica De La Garza Ramos.
Presidente

Dra. Martha Elena García Martínez.
Secretario

Dr. Jaime Adrián Mendoza Tijerina.
Vocal.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres

Bertha Moreno Ramos y Reynaldo Mares Tamayo†

A quienes les debo todo.

A Liliana

Por tu humildad como ser humano, por tu integridad como mujer, por tu apoyo incondicional, por tu amor y la fuerza que le das a mi existencia.

A mis hijas

Anapaula y Sofía por su paciencia, por sus besos, sus abrazos y sus risas y alegría, que son el motor de mi existencia.

Las amo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida.

A mis padres

Por todos sus esfuerzos y sacrificios, por su apoyo incondicional y su amor infinito.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, A la Unidad de Odontología Integral del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud y en especial a la Facultad de Odontología Subdirección de Estudios de Posgrado que me dieron la oportunidad de formar parte de ellas. Y por todo el apoyo brindado para la realización de esta investigación.

Mi agradecimiento sincero

A la Dra. Myriam Angélica de la Garza Ramos

Por confiar en mí persona. Gracias por su dirección, tiempo, esfuerzo y dedicación. Sus conocimientos, su persistencia y motivación que fueron fundamentales para el desarrollo y culminación de este trabajo.

A la Dra. Martha Elena García Martínez

Por su tiempo dedicado a la atenta lectura, sus consejos y su actitud positiva al haber guiado la redacción de este trabajo, hasta llegar a la culminación del mismo.

A la Dra. Rosalba González Meléndez

Por su colaboración en este trabajo, por su apoyo desinteresado y su trato humano, gracias.

Al Dr. Miguel Ángel Quiroga García

Por ayudarme con paciencia a guiar mis ideas para la presentación de este trabajo.

A Gustavo Israel Martínez González

Por su disponibilidad y su importante aporte en el aspecto estadístico de este trabajo.

Al Dr. Claudio Cabral Romero

Por su tiempo y orientación invaluable, para la realización de este trabajo.

A todos los pacientes, que participaron en este trabajo de investigación, ya que gracias a ellos se pudo llevar a cabo.

Y finalmente a todos los que colaboraron en la realización de esta investigación, en especial a la QBP Vilma Rosa Suarez Martínez y el CD Jesús Amadeo Valdez González.

Sinceramente PCMM

V

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	V
LISTA DE TABLAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE GRÁFICOS.....	XI
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
SEDE.....	XIV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Planteamiento del problema.....	1
2. HIPOTESIS	2
3. OBJETIVOS	2
3.1 Objetivo general.....	2
3.2 Objetivos particulares.....	2
4. CLASIFICACIÓN DEL ESTUDIO	2
5. ANTECEDENTES	3
5.1 Historia.....	3
5.2 Epidemiología de la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	5
5.3 Implicación clínica de la infección por <i>Helicobacter pylori</i> en niños.....	8
5.3.1 Gastritis.....	8
5.3.2 Úlcera duodenal.....	8
5.4 Métodos de detección y diagnóstico para <i>Helicobacter pylori</i>	9
5.4.1 Cultivo microbiológico.....	10
5.4.2 Estudio histológico.....	10
5.4.3 Test rápido de la ureasa.....	11

Sección	Página
5.4.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	11
5.4.5 Serología.....	12
5.4.6 Test del aliento.....	12
5.5 Detección de <i>Helicobacter pylori</i> en la cavidad oral.....	13
6. JUSTIFICACIÓN	15
7. MATERIALES Y MÉTODO	17
7.1 Universo de estudio.....	17
7.2 Tamaño de la muestra.....	17
7.3 Criterios de selección.....	18
7.3.1 Criterios de inclusión.....	18
7.3.2 Criterios de exclusión.....	18
7.3.3 Criterios de eliminación.....	18
7.4 Definición de variables.....	18
7.4.1 Variable dependiente.....	18
7.4.2 Variables independientes.....	18
7.5 Descripción de procedimientos.....	19
7.5.1 Explicación a los padres y obtención del consentimiento informado.....	20
7.5.2 Obtención de las muestras de placa dental.....	20
7.5.3 Aislamiento y cultivo de <i>Helicobacter pylori</i> a partir de muestras de placa dental.....	21
7.5.4 Extracción de ADN del segundo cultivo.....	21
7.5.5 Sonda y oligonucleótidos utilizados para detectar ADN de <i>Helicobacter pylori</i>	22
7.5.6 Programación del termociclador.....	23
7.5.7 Detección del ADN de <i>Helicobacter pylori</i> por PCR en tiempo real.....	23
7.6 Recursos.....	24
7.6.1 Recursos materiales.....	24
7.6.2 Recursos financieros.....	24

Sección	Página
7.7 Validación de datos.....	24
8. RESULTADOS	25
9. DISCUSIÓN	26
10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	28
10.1 Recomendaciones.....	29
11. CÓDIGOS DE ÉTICA PROFESIONAL	
DECLARACIÓN DE HELSINKI	31
LITERATURA CITADA.....	37
ANEXOS	
A.....	44
B.....	47
C.....	51
D.....	55
E.....	60
F.....	62
G.....	65

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Especies de <i>Helicobacter</i> y microorganismos relacionados	45
2. Métodos diagnósticos de la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	46
3. Sonda y oligonucleótidos utilizados para detectar <i>Helicobacter pylori</i>	56
4. Programación del equipo Light – Cycler 480.....	57
5. Condiciones de programación para la amplificación en el termociclador...58	
6. Mezcla de reacción para PCR en tiempo real.....	58
7. Llenado de la placa de 96 posos.....	59
8. Recursos materiales.....	61
9. Distribución de la edad y el género de los pacientes.....	63
10. Presencia de <i>Helicobacter pylori</i> , distribución según la edad.....	63
11. Presencia de <i>Helicobacter pylori</i> , distribución según el género.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura	página
1.....	52
2.....	52
3.....	52
4.....	52
5.....	52
6.....	52
7.....	53
8.....	53
9.....	53
10.....	53
11.....	53
12.....	53
13.....	54
14.....	54
15.....	54
15.....	54
16.....	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico	página
1. Representación gráfica del control positivo para <i>Helicobacter pylori</i>	56
2. Representación gráfica del control negativo para <i>Helicobacter pylori</i>	57
3. Universo de estudio.....	66
4. Distribución de la edad y género.....	66
5. Estadística descriptiva de la edad según la presencia de <i>Helicobacter pylori</i>	67
6. Presencia de <i>Helicobacter pylori</i> en la población de estudio.....	67
7. Representación gráfica del total de ADN amplificado por PCRtr	68
8. Presencia de <i>Helicobacter pylori</i> , distribución según el género.....	69
9. Presencia de <i>Helicobacter pylori</i> , por género.....	70

RESUMEN

Paulo César Mares Moreno.

Universidad Autónoma de Nuevo León.

Facultad de Odontología.

Maestría en Ciencias Odontológicas con Especialidad en Odontopediatría.

Título del estudio: “Presencia de *Helicobacter pylori* en placa dental de la población infantil que acude al Posgrado de Odontopediatría de la Facultad de Odontología de la U.A.N.L.”

Estudio descriptivo, abierto, prospectivo, transversal y observacional.

Realizado en el Posgrado de Odontología Infantil, el Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Odontología y Área de Biología Molecular en la Unidad de Odontología Integral del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la U.A.N.L.

Objetivo: Identificar la presencia de *Helicobacter pylori* en la placa dental de pacientes que acuden a consulta para su atención integral en el Posgrado de Odontopediatría, de la Facultad de Odontología de la U.A.N.L.

La presente investigación se realizó con pacientes pediátricos de 2 a 11 años de edad aparentemente sanos, buscando la presencia de *Helicobacter pylori* en la placa dentobacteriana. Las muestras de placa dentobacteriana fueron tomadas del espacio subgingival de la cara lingual de los molares inferiores. Las muestras se hicieron crecer en medios de cultivo específicos y posteriormente se hizo la extracción del ADN el cuál fue analizado por PCR en tiempo real. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, se encontró que el 35% de la población que participó, resulto positivo a la presencia de *Helicobacter pylori* en placa dentobacteriana, en cuanto al género y la edad, no se encontraron diferencias significativas.

La finalidad de esta investigación es destacar la importancia de la placa dental en el diagnóstico de *Helicobacter pylori* en la cavidad bucal de los niños y hacer énfasis en el rol que puede jugar, como reservorio de este microorganismo.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*; Placa dental; Niños; PCR.

ABSTRACT

Paulo César Mares Moreno.
Universidad Autónoma de Nuevo León.
Faculty of Dentistry.
Masters in Dental Sciences with Specialization in Pediatric Dentistry.

Title of the study:

"Presence of *Helicobacter pylori* in dental plaque of the child population that attends to the Pediatric Dentistry Postgraduate of the Faculty of Dentistry of the U.A.N.L."

This study was classified as descriptive, open, prospective, transversal and observational study.

This study was conducted in the graduate of Pediatric Dentistry, Department of Molecular Biology at the Faculty of Dentistry and Molecular Biology at the Center for Research and Development in Health Sciences of the U.A.N.L.

Objective: Identify the presence of *Helicobacter pylori* in dental plaque of patients who attend consultation for its comprehensive care in Pediatric Dentistry, of the Faculty of Dentistry of the U.A.N.L. Graduate.

This investigation was conducted with pediatric patients 2 to 11 years of age apparently healthy, looking for the presence of *Helicobacter pylori* in the dental plaque. Dental plaque samples were taken from the subgingival space of the lingual side of the lower molars. The samples were made to grow in media specific cultivation and subsequently became the extraction of the DNA which was analyzed by PCR in real time. According to the results obtained in this study, it was found that 35% of the population who participated, turned out positive for the presence of *Helicobacter pylori* in dental plaque samples, in terms of gender and age, no significant differences were found.

The purpose of this research was to highlight the importance of dental plaque in the diagnosis of *Helicobacter pylori* in the oral cavity of apparently healthy children and to emphasize the role that can be played as a reservoir of this microorganism.

Keywords: *Helicobacter pylori*; Dental plaque; Children; PCR.

SEDE.

Posgrado de Odontopediatría; Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Odontología y Área de Biología Molecular en la Unidad de Odontología Integral del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la U.A.N.L.

INTRODUCCIÓN

La infección por *Helicobacter pylori* tiene una distribución mundial; suele asociarse a insatisfacción de las necesidades básicas de salud y bajo nivel socioeconómico.

El conocimiento y la prevención de enfermedades son de suma importancia para la población infantil ya que a esta edad la educación preventiva y la instauración de buenos hábitos alimenticios y de higiene son de vital importancia para su desarrollo y en su vida adulta.

La finalidad de esta investigación es destacar la importancia de la placa dental en el diagnóstico de *Helicobacter pylori* en la cavidad bucal de los niños y hacer énfasis en el papel que puede jugar, como reservorio de este microorganismo.

El establecer la presencia de *Helicobacter pylori* en la población infantil, nos permitirá conocer en que género y desde que edad se presenta con mayor frecuencia y así poder desarrollar medidas preventivas, que ayuden a evitar su aparición y/o permanencia en la cavidad oral y de esta manera disminuir la incidencia de factores que predisponen al desarrollo de enfermedades en la cavidad oral, como la enfermedad periodontal o a enfermedades gástricas, como úlcera y cáncer gástrico en nuestra población adulta.

Por lo anterior se planteó el siguiente problema:

¿Cuál es la frecuencia en que se presenta *Helicobacter pylori*, en la cavidad oral de los pacientes que acuden a consulta al Posgrado de Odontopediatría de la Facultad de Odontología, de la Universidad Autónoma de Nuevo León?

Para este estudio se planteó la siguiente hipótesis:

Si el ADN de *Helicobacter pylori* se encuentra en la placa dental de un paciente pediátrico aparentemente sano, entonces la cavidad oral será un ambiente que sirva como reservorio para *Helicobacter pylori*.

Objetivo General

Identificar la presencia de *Helicobacter pylori* en la placa dental de pacientes que acuden a consulta para su atención integral en el posgrado de Odontopediatría de la Facultad de Odontología de la U.A.N.L. En el periodo del 23 al 29 de Marzo de 2012.

Objetivos Específicos

- 1.- Aislar *Helicobacter pylori* a partir de muestras de placa dental de pacientes que acuden a consulta en el posgrado de Odontopediatría de la Facultad de Odontología de la U.A.N.L.
- 2.- Identificar la presencia de *Helicobacter pylori* en los cultivos de la placa dentobacteriana mediante PCR en tiempo real.

El estudio se clasificó como:

Descriptivo; Abierto; Prospectivo; Transversal y Observacional.

En esta investigación se destaca la importancia de la placa dental en el diagnóstico de infección por *Helicobacter pylori* en niños y creemos importante conocer los factores de riesgo, para llevar a cabo el control de las posibles vías de transmisión, como medida de prevención primaria, evitando así, el desarrollo de problemas asociados en la vida adulta, como el cáncer gástrico.

5. ANTECEDENTES.

5.1 HISTORIA

Las primeras observaciones de microorganismos espirilados en la mucosa gástrica datan de finales del siglo antepasado cuando el profesor Walery Jaworski, de la Universidad Jagellónica en Cracovia, investigó sedimentos de lavados gástricos obtenidos de humanos en 1899 y fue hasta 1940, cuando Freedberg y Barron demostraron microscópicamente la presencia de este tipo de bacterias en muestras de estómago de diferentes pacientes, relacionándolo con úlcera gástrica.

El interés de estas observaciones descendió cuando, en 1954, Palmer estudió 1.000 biopsias de estómago y no encontró evidencia histológica de bacterias espirales en ninguna de ellas (*Palmer ED. ,1954*).

En 1975. *Steer et al;* estudiaron muestras de pacientes con úlcera gástrica, utilizando microscopio electrónico, y observaron la presencia de microorganismos con forma espiral, bajo la capa de moco y en la mucosa, asociados a una respuesta inflamatoria (*Steer et al., 1975*).

El verdadero descubrimiento de estas bacterias se realizó en 1983, cuando Warren y Marshall publicaron los resultados de los trabajos que estaban realizando desde el principio de esa década. Observaron bacterias curvadas en la superficie de la mucosa antral humana, en un grupo de pacientes con gastritis crónica activa. (*Warren and Marshall., 1983, 1984*). Marshall inoculó muestras de mucosa gástrica en los medios de cultivo habituales, incubó las placas durante 5 días y obtuvo por primera vez el cultivo de *Helicobacter pylori*. Este aislamiento revolucionó la gastroenterología y obligó a replantear muchos conceptos no sólo de la patología gastroduodenal, sino también de la fisiopatología gástrica. No fue hasta 1992, con la evidencia de que la triple terapia antibiótica curaba la úlcera péptica, que se

aceptó el carácter infeccioso de ésta. En 2005, Warren y Marshall fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina por sus trabajos acerca de *Helicobacter pylori* (Hellström, 2006).

Estos microorganismos, gram negativos, curvados, microaerófilos, se incluyeron dentro del género *Campylobacter* porque se parecían a los de este género, aunque Marshall y Warren no pudieron encontrar ninguna especie completamente similar a la bacteria que ellos habían aislado.

Posteriormente, se le identificó como una nueva especie, llamada de forma incorrecta: *Campylobacter pyloridis*, y poco después se le cambió el nombre por el de *Campylobacter pylori* (Marshall and Goodwin, 1987).

En 1989 se comprobó que no tenía las características del género *Campylobacter*, sino que era un nuevo género, y pasó a denominarse *Helicobacter pylori*. Es curvado en la mucosa gástrica pero puede no serlo “in vitro”, posee de 4 a 6 flagelos en uno de los polos, necesita para crecer un 5-10 % CO₂ (Goodwin et al, 1989).

En 1997, Tomb describió la secuencia completa del genoma de *Helicobacter pylori* (Tom et al., 1997). La Sociedad Americana de Microbiología reconoce más de 10 especies dentro del género *Helicobacter* y géneros relacionados (Versalovic et al., 1999). (Ver Anexo A Tabla 1)

Existen además otras especies que se van describiendo en diferentes huéspedes (M. M. Paterson et al., 2000) y probablemente se descubrirán muchas más en el futuro.

5.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR *HELICOBACTER PYLORI*.

La presencia de *Helicobacter pylori* se ha detectado en pacientes de todo el mundo, en muestras de mucosa gástrica asociada a gastritis, pero también en casos de infección asintomática. Es necesario poder definir la frecuencia de infecciones asintomáticas.

La mayoría de los estudios realizados se basan en estudios de prevalencia, ya que los estudios de incidencia son difíciles de llevar a cabo. La incidencia se refiere al número de nuevos casos de infección en un período de tiempo y en una población específica. Esto no se puede determinar en el caso de la infección por *Helicobacter pylori*, ya que los síntomas de la infección son escasos e inespecíficos y, salvo casos excepcionales, no se conoce el curso agudo de la infección. Además es necesario realizar seguimiento a largo plazo de las personas no infectadas para poder identificar la incidencia.

Se define como prevalencia el número de casos infectados, presentes en una población, en un momento determinado, y puede demostrarse fácilmente con los métodos de diagnóstico disponibles. La prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* depende preferentemente de la edad, el estado socioeconómico y los hábitos de higiene.

En países desarrollados, la prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* parece más baja en niños y aumenta gradualmente con la edad (Blecker et al., 1994). Sin embargo, en países no industrializados, es más habitual presentar una infección asintomática y los niños se encuentran frecuentemente colonizados por *Helicobacter pylori*. Entre el 40 y 75% de las personas de 19 años se encuentran infectadas, y los adultos de 50 a 59 años se encuentran infectados en un 70 a 88% (Oliveira et al., 1994).

El principal reservorio encontrado hasta el momento es el estómago del hombre, por lo que la transmisión persona a persona, vía oral-oral o fecal-oral, parece la fuente de

contagio más importante (*Best et al., 1994*). El *Helicobacter pylori* puede ser diseminado por contacto con secreciones gástricas y se ha observado contagio en personal que trabaja realizando endoscopias.

Actualmente sabemos que causa gastritis en la mitad de la población mundial (*Brown LM., 2000*) y es el agente etiológico del 95 % de las úlceras duodenales, 70-80 % de las úlceras gástricas y tiene un protagonismo relevante en el 60-70 % de los casos de cáncer gástrico, que representa una de las neoplasias más frecuentes en todo el mundo (*Parsonnet et al., 1991*). La asociación con el linfoma gástrico de la mucosa gástrica tipo MALT, fue posterior (*Bayerdörffer et al., 1995*).

La infección por *Helicobacter pylori*, contraída en los primeros años de vida es la causa más frecuente de gastritis crónica atrófica que puede ser el sustrato histológico del proceso carcinogénico (*Malaty H. et al., 2002*). La Organización Mundial de la Salud a través de su Agencia para la Investigación del Cáncer, reconoció en 1994 a *Helicobacter pylori* como un carcinógeno tipo I en su clasificación de agentes biológicos carcinogénicos. Y la presencia de *Helicobacter pylori* aumenta 6 veces la probabilidad de desarrollarlo (*Eurogast Study group, 1993*).

En México, la prevalencia de *Helicobacter pylori* ha sido reportada en un 66% de la población asintomática, y en todas las edades. En niños, la tasa de infección aumenta directamente con la edad: de 24.5% en niños menores de 4 años a 65% en adolescentes.

Se hizo un estudio en cada uno de los estados de la República Mexicana (11,605 sueros), en los que se demostró que el 20% de los niños de 1 año tenían anticuerpos para el *Helicobacter pylori*, en pacientes de 10 años de edad aumentó hasta un 50%, llegando hasta

el 80% de la población de pacientes jóvenes entre 18 y 20 años. Aumentando el 5% anual de la seropositividad por año después de los primeros 10 años de vida (*Torres et al., 1998*).

En un estudio realizado en el norte de México, la tasa de infección en población abierta de 15-19 años es de 50%, mientras que en el sur de México, donde los índices de pobreza son mayores, la prevalencia llega hasta 86.1%. Las manifestaciones clínicas en pacientes pediátricos son inespecíficas y asociadas con gastritis crónicas, dispepsia no ulcerosa, ulcera gástrica y duodenal (*Nares et al., 2007*).

En México, el cáncer gástrico ocupa el segundo lugar como causa de muerte de cáncer en general y es la primera causa de mortalidad dentro de las neoplasias del tubo digestivo. A nivel mundial existen grandes variaciones, considerándose a México como un área de bajo riesgo con una tasa de mortalidad de 5.0 por cada 100 000 habitantes. Afecta con mayor frecuencia al sexo masculino en relación de 1.5:1 a 2:1 con respecto al femenino, no es común que se presente antes de la cuarta década de la vida, teniendo un pico de incidencia llegando a los 70 años de edad. La tasa de mortalidad de 2000 a 2005 ha permanecido de 4.9 a 5.0 (*INEGI., 2010*).

La Organización Mundial de la Salud señala que el cáncer gástrico es una de las neoplasias más frecuentes en el mundo contemporáneo; constituye la segunda causa de muerte en el hombre y la tercera en las mujeres.

Se ha conseguido el cultivo de *Helicobacter pylori* a partir de placa dental (*Desai et al., 1991*) o de la saliva (*Ferguson et al., 1993*). Sugieren que el *Helicobacter pylori* se encuentra refugiado en la cavidad bucal con una atmósfera húmeda y un ambiente reducido en oxígeno, aunque la importancia de esto en la transmisión del microorganismo en la población general es incierta.

5.3 IMPLICACIÓN CLÍNICA DE LA INFECCIÓN POR *HELICOBACTER PYLORI* EN NIÑOS.

El aumento de la infección por *Helicobacter pylori* en la población general y la exposición temprana, son factores que permiten explicar la razón por la cual a este microorganismo se le encuentra en los niños de diversos grupos de edad. Si bien la infección puede ser asintomática, en los niños, en ocasiones, se le reporta asociado a dolor abdominal recurrente y síntomas de dispepsia (*Chelimsky G. 2002; Vamdemplas Y. 2001*).

El dolor abdominal recurrente se produce en un 10 a 15% de los niños en edad escolar (*Lindberg, 1994*). También está presente en niños con pérdida o no ganancia de peso, o incluso en niños con problemas de crecimiento (*Raymond et al, 1994*).

5.3.1 GASTRITIS.

La gastritis crónica en este grupo de la población es normalmente primaria, está asociada con la colonización por *Helicobacter pylori* y la erradicación del microorganismo ocasiona la curación de la misma (*Drumm et al, 1988*). La incidencia de gastritis aumenta con la edad y depende de las condiciones socioeconómicas y del nivel de desarrollo del país. La gastritis crónica asociada a *Helicobacter pylori* no se observa directamente en la endoscopia, por lo que debe obtenerse una muestra de mucosa gástrica en los niños con molestias del tracto gastrointestinal superior.

5.3.2 ULCERA DUODENAL.

Es menos frecuente en niños que en adultos y, cuando se observa, puede ser primaria o secundaria (*Drumm et al., 1988*). La úlcera duodenal secundaria está asociada con la presencia de *Helicobacter pylori* en la mucosa gástrica (*Hassall and Dimnick, 1989*).

5.4 METODOS DE DETECCION Y DIAGNÓSTICO PARA *HELICOBACTER PYLORI*.

La demostración de que el *Helicobacter pylori* era el principal agente causal de la gastritis antral asociada a la úlcera péptica y de que su erradicación conducía a la curación definitiva de la mayoría de los casos de esta enfermedad, así como su implicación en los linfomas gástricos tipo MALT y el cáncer de estómago, produjeron una auténtica eclosión de métodos diagnósticos. Cada uno de ellos ofrece ventajas adicionales sobre el resto, pero ninguno es perfecto (*Kosunen and Mégraud, 1995*). (Anexo A Tabla 2 Pág.46)

El diagnóstico de la infección puede establecerse por:

- | | |
|-------------------------------|--------------------------------|
| a) Métodos directos. | 1) Métodos invasivos |
| b) Métodos Indirectos. | 2) Métodos no invasivos |

Métodos directos.

Cuando se detecta la presencia del microorganismo en muestras obtenidas por endoscopia: cultivo, tinciones histológicas, técnicas moleculares (*Cohen and Laine, 1997*).

Métodos Indirectos.

Cuando se estudia alguna propiedad del mismo (test de la ureasa, prueba del aliento con urea-C¹³ o urea-C¹⁴) o la respuesta inmune específica (serología) (*Atherton, 1997*).

La obtención de muestras para el diagnóstico puede realizarse por:

Métodos invasivos.

Son técnicas diagnósticas disponibles, que requieren la realización de una endoscopia digestiva para la obtención de una muestra de tejido gástrico.

- El estudio histológico de biopsias gástricas.
- El aislamiento por cultivo bacteriológico de muestras gástricas.
- El test rápido de la ureasa.
- La reacción en cadena de la polimerasa de mucosa gástrica.

Métodos no invasivos.

Son pruebas diagnósticas, que no requieren endoscopia.

- El test del aliento con urea marcada.
- La serología.
- La PCR de saliva y placa dentobacteriana o de heces.

5.4.1 Cultivo microbiológico.

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

5.4.2 Estudio histológico.

El *Helicobacter pylori* se localiza en la capa de moco adherido a la superficie del epitelio y puede encontrarse en la profundidad de las criptas. La presencia de bacterias en poca cantidad dificulta su apreciación con la tinción convencional de hematoxilina y eosina, lo que hace necesario complementar el estudio histológico con otras tinciones especiales como la de Warthin-Starry o el Giemsa modificado (Genta and Graham, 1994).

5.4.3 Test rápido de la ureasa.

El rendimiento de esta técnica diagnóstica depende del inóculo presente en la mucosagástrica. En la actualidad existen medios de diagnóstico rápidos comercializados y uno de los más utilizados es el GUT *test*. Para el GUT *test* se ha reportado 100 % de especificidad y una sensibilidad del 95,3 % a los 60 min de incubación de la muestra. Básicamente, el fundamento diagnóstico de todos ellos es un cambio colorimétrico a expensas de la modificación del pH que se produce al hidrolizarse la urea en presencia de la ureasa de *Helicobacter pylori*. Alrededor del 75 % de las pruebas positivas, lo son al cabo de 10-60 minutos, lo que permite establecer el diagnóstico inmediatamente. Aunque se ha sugerido la posibilidad de errores diagnósticos por la presencia de otros colonizantes con actividad ureasa en la mucosa gástrica (*Van et al, 2006*).

5.4.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Hasta ahora la técnica de PCR de tiempo real es la más adecuada para detectar un bajo número de bacterias de *Helicobacter pylori* de la cavidad oral (*Sepúlveda et al., 2008*).

Con la PCR se ha podido detectar *H. pylori* en muestras que no son de biopsias gástricas y a través de las cuales era muy difícil obtener resultados positivos para esta bacteria mediante metodología convencional; es así como se ha podido determinar su presencia en muestras de placa dental, aftas bucales, saliva, jugos gástricos y heces ofreciendo una mejor alternativa para el diagnóstico clínico y para estudios de investigación relacionados con su modo de transmisión (*Lu Y. et al., 2002*).

Existen diferentes aspectos técnicos que pueden influir en la variabilidad y reproductibilidad de sus resultados: elección de los iniciadores o “*primers*”, preparación de muestras, extracción del material genético, densidad del inóculo bacteriano, existencia de inhibidores de la reacción. Se trata de un método altamente sensible y específico, que permite diferenciar genótipicamente las cepas entre sí (*Aston-Key et al., 1996*).

5.4.5 Serología.

La infección por *Helicobacter pylori* provoca una respuesta inmunológica local y sistémica con un incremento de la secreción de IgA, IgM e IgG. Los test serológicos desarrollados permiten el cribado de gran cantidad de muestras en estudios epidemiológicos de la población (*Perez-Perez et al., 1988*). Se trata de una prueba diagnóstica no invasiva, rápida y económica. La mayoría de test comercializados son del tipo ELISA. En ausencia de tratamiento de la infección, el nivel de anticuerpos permanece elevado de por vida. Tras la erradicación, el nivel de IgG desciende hacia la mitad de los valores iniciales en 6 meses aproximadamente por lo que éste, es un mal método de seguimiento en pacientes tratados (*Gatta et al., 2003*).

5.4.6 Test del aliento.

El fundamento de esta técnica diagnóstica es la cuantificación de CO₂ marcado espirado en la respiración, tras la administración de urea marcada con un isótopo, resultante de su hidrólisis por *Helicobacter pylori*. (*Stubbs and Marshall, 1993*). El test con urea-C¹⁴ no se recomienda para niños ni mujeres embarazadas.

5.5 DETECCIÓN DE *HELICOBACTER PYLORI* EN LA CAVIDAD ORAL

Varios estudios han evaluado la saliva y la placa dental como posibles muestras no invasivas para el diagnóstico de *Helicobacter pylori* empleando diversas técnicas. Juegos comerciales basados en la detección de anticuerpos anti- *Helicobacter pylori* en saliva se han empleado, pero los valores de sensibilidad y especificidad han sido inferiores al 90% (Ballam et al, 2000). Por otra parte, el cultivo de la bacteria a partir de la cavidad oral pocas veces ha sido positivo. Sin embargo, con la PCR se han reportado buenos resultados cuando se han empleado la saliva y la placa dental como muestras (Kignel et al., 2005).

La cavidad bucal ha sido supuesta como un reservorio de infección de *Helicobacter pylori*, y distintos estudios han arrojado resultados muy distintos. Algunos estudios han demostrado frecuentemente la presencia de *Helicobacter pylori* en muestras de la cavidad bucal, particularmente de placa dental (Gebara EG et al., 2004).

Kim et al; 2000. Reportaron un 28,6% en placa dentobacteriana, a diferencia de Krajdén et al; 1989. Que en pacientes con biopsias gástricas dio positivo para el 29 de 71 muestras y en placa dentobacteriana fue solo una positiva.

Mapstone et al; 1993. Determinaron que la presencia de esta bacteria en boca es una importante fuente potencial de reinfección después de haberlo erradicado del estómago.

Bürgers et al; 2008, no encontraron correlación de la presencia de *Helicobacter pylori* con los parámetros de salud general u oral. Su estudio demostró que la presencia del *Helicobacter pylori* puede ocurrir en la cavidad oral de forma independiente a la colonización del estómago.

La detección de *Helicobacter pylori* se ha realizado mediante variados métodos, algunos eficaces y otros con poca sensibilidad. Hasta ahora la técnica de PCR en tiempo real es la más adecuada para detectar bajo número de bacterias de *Helicobacter pylori* de la cavidad oral (Sepúlveda et al., 2008).

6. JUSTIFICACIÓN.

Al *Helicobacter pylori* se le reconoce, como el agente causal más común de la gastritis, en especial de la variedad antral, así como de la úlcera gástrica y la úlcera duodenal. Además, se destaca como un factor esencial en la patogénesis del tumor de tejido linfoide asociado a mucosa (linfoma MALT o maltoma) y el adenocarcinoma gástrico. La transmisión de esta bacteria se produce a través de las vías oral-oral y fecal-oral. Mundialmente se considera la infección bacteriana más difundida y prevalente. Se plantea que la mitad de la población se ve afectada por ella en algún momento de la vida, y se registra la mayor incidencia en los países del tercer mundo (*Brown LM, 2000*).

La infección ocurre principalmente en la infancia. Recientes investigaciones, han determinado que el máximo de adquisición del germen está dentro de los diez primeros años de vida (*Malaty HM et al, 2002*). Su principal factor de riesgo lo constituye el status socioeconómico de la familia, el hacinamiento reflejados en el consumo de agua no potable y en las malas condiciones sanitarias (*Brown LM, 2000*).

La infección por *Helicobacter pylori* se ha detectado en pacientes de todo el mundo, en muestras de mucosa gástrica asociada a gastritis, pero también en casos de infección asintomática. Los estudios donde se ha conseguido el cultivo de *Helicobacter pylori* a partir de placa dental o de la saliva. Sugieren que *Helicobacter pylori* se encuentra refugiado en la cavidad bucal con una atmósfera húmeda y un ambiente reducido en oxígeno.

Es necesario poder definir la frecuencia de infecciones asintomáticas. La detección de *Helicobacter pylori* se ha realizado mediante variados métodos, algunos eficaces y otros con poca sensibilidad, como serología y/o prueba del aliento. Hasta ahora la técnica de PCR

de tiempo real es la más adecuada para detectar bajo número de bacterias de *Helicobacter pylori* de la cavidad oral.

La finalidad de esta investigación es destacar la importancia de la placa dental en el diagnóstico de *Helicobacter pylori* en la cavidad bucal de los niños y hacer énfasis en el papel que puede jugar, como reservorio de este microorganismo.

El establecer la presencia de *Helicobacter pylori* en la población infantil, nos permitirá conocer en que género y desde que edad se presenta y así poder desarrollar medidas preventivas, que ayuden a evitar su aparición y/o permanencia en la cavidad oral y de esta manera disminuir la incidencia de factores que predisponen al desarrollo de enfermedades en la cavidad oral, como la enfermedad periodontal o a enfermedades gástricas, como úlcera y cáncer gástrico en nuestra población adulta.

7. MATERIALES Y MÉTODO.

7.1 Universo de estudio.

Pacientes que acudieron a consulta para su atención integral en la Clínica de Postgrado de Odontopediatría de la Facultad de Odontología de la U.A.N.L. durante el periodo del 23 al 29 de Marzo de 2012.

7.2 Tamaño de la muestra

Por las condiciones de la variable a evaluar del tipo cuantitativa (*Helicobacter pylori* en la placa dental) donde además, se trata de una población infinita se estimó el tamaño de la muestra con la aplicación de la siguiente fórmula general:

$$n = \frac{z^2 p(1-p)}{e^2}$$

Para el presente proyecto se determinaron los siguientes valores que serán aplicados para precisar el tamaño de la muestra:

$z = 1.96$ para 95% confiabilidad

$p = 0.75$

$q = 0.25$

$e = 0.135$

Para obtener el tamaño de la muestra se sustituyeron los valores y se obtuvo que:

$$n = \frac{(1.96)^2 (0.75)(0.25)}{(0.135)^2} \quad n = 39.52 \approx 40$$

De aquí se obtuvo que el número total de casos del estudio consistiera en la elección probabilística de 40 pacientes que acudieron a la clínica de consulta del Posgrado de Odontopediatría de la Facultad de Odontología de la U.A.N.L. durante el periodo del 23 al 29 de Marzo de 2012.

7.3 Criterios de selección:

7.3.1 Criterios de Inclusión:

- Pacientes de ambos géneros.
- Pacientes con dentición infantil.
- Pacientes con dentición mixta.

7.3.2 Criterios de exclusión:

- Pacientes que estén tomando antibióticos.
- Pacientes que hayan tomado antibióticos hasta dos meses anteriores a la toma de la muestra.
- Pacientes que presenten algún síndrome.
- Pacientes con retraso psicomotor.
- Pacientes que presenten alguna enfermedad sistémica.
- Pacientes con antecedentes de problemas gástricos.
- Pacientes que refieran dolor abdominal.

7.3.3 Criterios de eliminación:

- Muestras que tuvieran algún incidente de contaminación durante el proceso de recolección.

7.4 Definición de variables

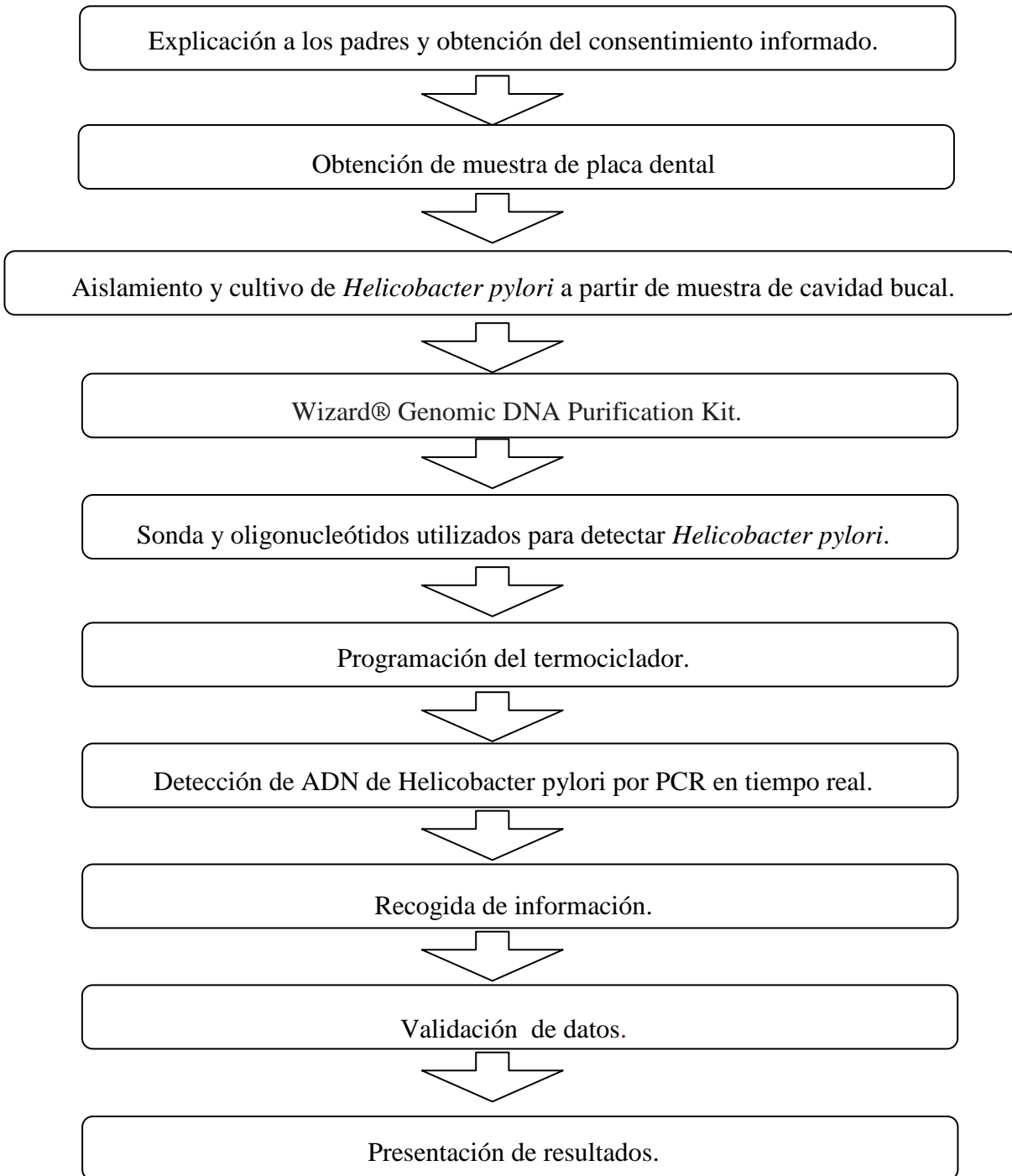
7.4.1 Variable dependiente:

Presencia de *Helicobacter pylori*.

7.4.2 Variables independientes:

Edad
Sexo

7.5 DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTOS.



7.5.1 Explicación a los padres y obtención del consentimiento informado.

Antes de realizar cualquier procedimiento se aclararon las dudas que hubiese respecto a la investigación por parte del padre o tutor del paciente, así como también se les pidió a los padres que previamente a la toma de la muestra de placa dental, firmaran el consentimiento informado donde se les explico el objetivo del estudio, y a los que accedieron se les pidió su autorización para la utilización de las muestras de placa dental así, como también se les pidió responder a un cuestionario sobre el estado general de salud de sus hijos para corroborar que cumplieran con los criterios de inclusión establecidos para la población de nuestra investigación. (Anexo B Págs. 47-50)

7.5.2 Obtención de las muestra de placa dental.

Se procedió a tomar las muestras de placa dental en condiciones de esterilidad, a los niños que cumplieron con los criterios de inclusión. Para la toma de la muestra se empleó un palillo estéril de madera de forma cilíndrica de 1mm de diámetro, el cuál fue modificado en uno de sus extremos con una hoja de bisturí para crear una parte activa en forma de pala. Y así tomar la muestra de placa dental ubicada en la cara lingual dentro del surco gingival de molares inferiores. Se escogió la zona subgingival por no estar constantemente barrida por el flujo salival y por ser un medio básicamente anaerobio en contraste con el medio supragingival. (Anexo C Figs.1, y 2 Pág. 52)

Se colocó la muestra en un tubo Eppendorff con un contenido de: 150 µl de suero de bovino y 350µl de tripticaseina de soya, para un total de 500 µl de medio de transporte. (Anexo C Fig.3 Pág. 52)

7.5.3 Aislamiento y cultivo de *Helicobacter pylori* a partir de muestras de placa dental.

Las muestras se hicieron crecer en cajas Petri con agar Campy con 10% de sangre de carnero ppm. Medio de cultivo preparado bajo la fórmula clásica:

Por 1000ml de agua destilada: Peptona de carne 10.0g, peptona de Caseína 10.0g, Dextrosa 1.0g, extracto de levadura 2.0g, Cloruro de Sodio 5.0g, Bisulfito de Sodio 0.1g, Agar 15.0g, Sangre de Carnero desfibrinada 100.0ml, suplementado con 5 antibióticos (Anfotericina B 2.0mg, Cefalotina 15.0mg, Trimetoprim 50mg, Vancomicina 10.0mg y Polimixina B 2500UI). (Anexo C Fig.4 Pág. 52)

Se homogenizó el medio de transporte con la muestra de placa dental, y en ambiente de esterilidad y se colocaron 200µl de la muestra sobre el centro de la caja, sin realizar estrías. (Anexo C Fig.5 Pág. 52) Se colocaron las cajas Petri dentro de una cámara de Brewer. (Anexo C Fig.6 Pág. 52) Se incubaron a 37°C en condiciones microaerofílicas (el porcentaje de oxígeno para cada recipiente fue del 6 al 16% y el porcentaje de dióxido de carbono para cada recipiente fue del 2 al 10% al cabo de 24 hrs de incubación). Ya transcurridos los 5 días, se sembraron con un hisopo estéril las colonias obtenidas, discriminando aquellas que no fueran características de *Helicobacter pylori*. (Anexo C Fig.7 Pág. 53)

7.5.4 Extracción de ADN del segundo cultivo.

El ADN de las colonias con características de *Helicobacter pylori* de las cajas Petri de Agar Campy del segundo cultivo, se extrajo mediante el empleo de Wizard® Genomic DNA Purification Kit. (Num cat A1120. PROMEGA, USA) siguiendo las siguientes instrucciones:

Se usó bata y guantes libre de talco, se organizó el material a utilizar como lo son; rotulador indeleble, puntas desechables estériles, micropipetas calibradas, mechero y vaso de precipitado para desechos. Limpiando con etanol el área de trabajo. Se esterilizó la superficie de la campana de flujo laminar con luz UV durante 10min. Una vez hecho lo anterior se recogieron las colonias con características de *Helicobacter pylori* de la caja Petri con un asa estéril desechable y se colocaron en 300µl de solución de lisis celular en un tubo Eppendorff de 1.5 ml rotulado. (Anexo C Fig.8 Pág. 53) Para completar la lisis celular, se incubaron a 70°C durante 3 minutos, se centrifugaron a 14000 r.p.m. durante 10 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorff estéril. Se colocó una columna en un tubo de recolección y se rotuló correctamente. (Anexo C Fig.9 Pág. 53) Se añadieron 200µl de etanol 96° al sobrenadante recuperado y se mezcló por inversión tres veces. Se aplicó la mezcla del paso anterior a la columna y se centrifugó a 8000 r.p.m. durante un minuto (Anexo C Fig.10 Pág. 53). Se descartó el sobrenadante y se añadieron 500µl del buffer de lavado. Se centrifugó a 8000 r.p.m. durante un minuto. Se descartó el sobrenadante, posteriormente se centrifugó a 14000 r.p.m. durante tres minutos para secar la membrana de la columna y eliminar los restos de etanol. Se descartó el sobrenadante con todo y tubo. Se rotuló un nuevo tubo Eppendorff estéril y se coló la columna en él. Al ADN unido a la membrana de la columna se le agregaron 50µl de agua destilada estéril, aplicándola directamente sobre el centro de la membrana. Se dejó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 r.p.m. durante un minuto. Desechó la columna y se tapó el tubo Eppendorff que en ese momento ya estaba conteniendo el ADN. (Anexo C Figs.11 y 12 Pág. 53) Se guardó a -20°C hasta su empleo para la amplificación por PCR.

7.5.5 Sonda y oligonucleótidos utilizados para detectar *Helicobacter pylori*.

El ADN previamente extraído y purificado se amplificó por PCR en tiempo real con oligonucleótidos y sonda específicos previamente diseñados en el laboratorio utilizando el programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) y dirigidos al ADN de la subunidad ribosomal 16S de *Helicobacter pylori*. (Anexo C Fig. 13 Pág. 54 y Anexo D Tabla 3 Pág. 56)

Grupo Control:

Control positivo: Muestra de ADN bacteriano puro. Cepa 43054 *Helicobacter pylori*.

Control negativo: Agua estéril para el pocillo de control negativo.

(Anexo D Gráfico 1 y 2 Págs. 56-57)

7.5.6 Programación del termociclador.

Se empleó el aparato Light-Cycler 408II de Roche. Se programó con una forma de detección HRM Dye, con tipo de bloque de 96 y un volumen de reacción de 10µl.

Los programas fueron tres: 1). Pre-incubación con 1 ciclo, 2). Amplificación con 50 ciclos y modo de análisis en cuantificación y 3). Enfriamiento con un ciclo. (Anexo C Fig. 14 Pág. 54 y Anexo D Tabla 4 Pág. 57)

La pre incubación se realizó a una temperatura de 95°C, con hold de 5 minutos y una rampa de 4 °C/S, la amplificación se llevó a cabo con tres distintas temperaturas: de 95°C con un hold de 10 segundos y una rampa de 4 °C/S, de 55°C con un hold de 15 segundos y una rampa de 2 °C/S, y por ultimo de 72°C con un hold de 10segundos, una rampa de 4°C/S y un modo de adquisición single. El programa de enfriamiento fue con una temperatura de 40°C, un hold de 30 segundos y una rampa de 2 segundos. (Anexo D Tabla 5 Pág. 58)

7.5.7 Detección del ADN de *Helicobacter pylori* por PCR en tiempo real.

Para la mezcla y condiciones de reacción se empleo el kit Universal TaqMan Master Probe I (Nro. de Cat. 12015099001, Roche, Germany). Se usaron bata y guantes libres de talco, limpiando con etanol el área de trabajo. Se descongelaron los viales sobre hielo y se centrifugaron antes de usar. Se hizo un mix base que contenía 2 µl de agua estéril grado PCR, 0.150 µl de primers-sonda stock 10x y 5µl de PCR master mix 10x para añadirse de forma secuencial a los pocillos.

Finalmente se añadieron 2.5 µl del ADN templado para los experimentales, o bien agua para los pocillos de control negativo, todo esto para completar una concentración final de 10 µl. (Anexo C Figs. 15, 16 Pág. 54 y Anexo D Tablas 6 y 7 Págs. 58-59)

7.6 Recursos.

7.6.1 Recursos materiales.

Área física e instalaciones del Posgrado de Odontopediatría; Equipo del Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Odontología y Área de Biología Molecular en la Unidad de Odontología Integral del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la U.A.N.L.

Los recursos que se requiere adquirir son: (Anexo E Tabla 8 Pág. 61)

7.6.2 Recursos financieros.

Los recursos económicos que sean necesarios para llevar a cabo la investigación serán financiados por el investigador principal.

7.7 VALIDACIÓN DE DATOS.

- a) Variable dependiente: Presencia de *Helicobacter pylori*.

- b) Variables independientes: Edad y género.

La muestra que ha sido conformada por todos aquéllos pacientes que cumplieron con los requisitos para ser incluidos en el estudio.

Captura de datos con el programa IBM Statistics 19 con el que se realizarán tablas de frecuencia de dos variables dentro de las cuales será considerada la variable principal (Presencia de *Helicobacter Pylori*) confrontada con el resto de las variables establecidas en el instrumento de observación (Edad y género). Para algunos procedimientos estadísticos de clasificación y manejo de base de datos será empleado el programa Microsoft Excel 2010.

8. RESULTADOS.

En nuestra población de estudio que consistió en 40 pacientes pediátricos que aparentemente gozan de salud general, y que acudieron a consulta al Posgrado de Odontopediatría de la U.A.N.L. De los cuales se obtuvo igual número de muestras de placa dentobacteriana (n 40), correspondiente al 100% de la muestra. Y cuyas edades fueron de los 2 a 11 años. Siendo el 32.5% de la muestra total del género femenino y el 67.5% correspondió al género masculino. (Anexo F Tabla 9 Pág. 63y Anexo G Gráfico 3 y 4 Pág.66)

Del total de la población que participó en el presente estudio, el grupo de edad que se presentó con mayor frecuencia fue el de 5 años (35%) y el segundo en frecuencia fue el de pacientes de 3 años de edad (20%).(Anexo F Tabla 9 Pág. 63 y Anexo G gráfico 5 Pág. 67)

En el presente estudio se obtuvieron 14 casos, equivalentes al 35% de nuestra población objeto de estudio, con presencia positiva para ADN de *Helicobacter pylori*, (Ver Anexo G Gráfico 6 Pág. 67) en las muestras de los cultivos de placa dentobacteriana previamente extraído y purificado el cual se amplificó por PCR en tiempo real con oligonucleótidos y sonda específicos previamente diseñados y dirigidos al ADN de la subunidad ribosomal 16S del *Helicobacter pylori*. (Anexo G Gráfico 7 Pág. 68)

De las muestras positivas para ADN de *Helicobacter pylori*, del total de nuestra población, 2 fueron obtenidas de pacientes del género femenino y correspondieron al 14% del grupo de pacientes positivos y 12 correspondieron a pacientes del género masculino que corresponden al 86% del grupo de pacientes positivos. (Anexo F Tabla 11 Pág. 64 y Anexo G Gráfico 8 y 9 Págs. 69-70)

9. DISCUSIÓN

La presente investigación se realizó con pacientes pediátricos aparentemente sanos, buscando la presencia de *Helicobacter pylori* en la placa dentobacteriana. Las muestras de placa dentobacteriana fueron tomadas del espacio subgingival de la cara lingual de los molares inferiores. Las muestras se hicieron crecer en medios de cultivo específicos y posteriormente se hizo la extracción del ADN el cuál fue analizado por PCR en tiempo real.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, se encontró que un 35% de la población infantil que participó, resulto positivo a la presencia de *Helicobacter pylori* en placa dentobacteriana, estos datos son muy similares a los reportados por *Kim et al*; quienes reportan un 28% de presencia de *Helicobacter pylori* en placa dentobacteriana y a los publicados por *Oliveira AMR et al*; quienes reportan un aumento en la prevalencia conforme aumenta la edad en niños de Belo Horizonte (Brasil) siendo la siguiente: <de 2 años, 16%; de 3-5 años, 37%, , hasta llegar al 64% el pacientes de 15 a 18 años. Así como lo reportado por *Bejarano et al*; quienes estiman que el 30% de la población infantil se encuentra infectada y que la seroconversión generalmente ocurre entre los 3 y los 5 años.

Los resultados reflejan que si existe la presencia de *Helicobacter pylori* en la placa dentobacteriana de pacientes aparentemente sanos a diferencia de lo publicado por *Martínez-Gomis et al*: donde refieren que no existe la presencia de *Helicobacter pylori* en la cavidad oral de pacientes asintomáticos. Así como lo reportado por *Jané S. M. et al*; quienes descartan la hipótesis que otorga a la placa dentobacteriana un papel relevante como reservorio de *Helicobacter pylori*.

En cuanto al uso de la PCR como método diagnóstico coincidimos con lo publicado por *Lu Y. et al*; quienes afirman que con la PCR se ha podido detectar *Helicobacter pylori* en muestras que no son de biopsias gástricas y a través de las cuales era

muy difícil obtener resultados positivos para esta bacteria mediante metodología convencional; ofreciendo una mejor alternativa para el diagnóstico clínico y para estudios de investigación. Así como con lo que *Sepúlveda et al*; afirman al decir que hasta ahora la técnica de PCR de tiempo real es la más adecuada para detectar un bajo número de bacterias de *Helicobacter pylori* en la cavidad oral.

Por lo anterior coincidimos con lo publicado por *Kignel et al*: cuando afirman que varios estudios han evaluado la placa dental como posible muestra no invasiva para el diagnóstico de *Helicobacter pylori* empleando diversas técnicas. Sin embargo, con la PCR se han reportado buenos resultados cuando se ha empleado la placa dental como muestra.

En base a los resultados obtenidos en nuestra investigación estamos de acuerdo con lo publicado por *Gebara EG et al*; *Mapstone et al*; *Desai et al*; donde la cavidad bucal ha sido supuesta como un reservorio de infección de *Helicobacter pylori* así como con *Ferguson et al*; quienes sugieren que el *Helicobacter pylori* se encuentra refugiado en la cavidad bucal ya que presenta una atmósfera húmeda y un ambiente reducido en oxígeno.

Dentro de las observaciones encontramos que no existe una diferencia significativa entre el género y la edad de la población estudiada con la presencia y distribución de *Helicobacter pylori* en la placa dentobacteriana.

10. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Después de haber analizado los resultados del presente estudio, llegamos a las siguientes conclusiones:

- Se demostró la presencia de *Helicobacter Pylori* en las muestras de placa dentobacteriana de los pacientes que acudieron a consulta para su atención integral a la Clínica de Posgrado de Odontopediatria de la U.A.N.L.
- Dentro de la población, se encontró un porcentaje alto de pacientes que presentaron resultados positivos para la presencia de *Helicobacter pylori* siendo del 35% del total de la población estudiada.
- Nuestros resultados nos permiten confirmar la hipótesis planteada para esta investigación, donde, sí el ADN de *Helicobacter pylori* se encuentra en la placa dental de un paciente pediátrico aparentemente sano, entonces la cavidad oral será un ambiente que sirva como reservorio para *Helicobacter pylori*.
- En el presente estudio en cuanto al género y la edad, no se encontraron diferencias significativas.
- Respecto al uso de la PCR como método diagnóstico coincidimos con quienes afirman que con la PCR se ha podido detectar *Helicobacter pylori* en muestras que no son de biopsias gástricas ofreciendo una mejor alternativa para el diagnóstico clínico y para estudios de investigación. Nuestros resultados nos permiten decir que hasta ahora la técnica de PCR de tiempo real es la más adecuada para detectar un bajo número de bacterias de *Helicobacter pylori* en la cavidad oral.

- Existe poca información sobre placa dentobacteriana y *Helicobacter pylori* en la población infantil asintomática. Hasta donde sabemos este es el primer estudio en México donde se investiga la presencia de *Helicobacter pylori* en la placa dentobacteriana subgingival de pacientes pediátricos aparentemente sanos.
- El análisis de la placa dental para el diagnóstico de la presencia de *Helicobacter pylori* en niños, es una alternativa con ventajas para estudios epidemiológicos que pretendan estudiar la prevalencia de infección en la población, y su relación con enfermedades asociadas con éste, considerando, además, la posibilidad de implicaciones de enfermedad periodontal. Este procedimiento permitirá coadyuvar y ampliar el diagnóstico, especialmente en niños asintomáticos o con síntomas de dispepsia.

10.1 RECOMENDACIONES

Existen numerosos trabajos de investigación respecto al *Helicobacter pylori*, pero resulta indispensable la realización de estudios en poblaciones pediátricas de nuestro medio, motivo por el cual se sugiere continuar con esta línea de investigación y así se pueda valorar la importancia de conocer la situación actual de la salud de un grupo específico de personas que habitan nuestra región, a fin de prevenir su aparición, transmisión y/o permanencia en la cavidad oral y concientizar a la población y a los profesionales de la Salud sobre el rol de esta bacteria en los niños y de esta manera disminuir la incidencia de factores que predisponen al desarrollo de enfermedades en la cavidad oral, como la enfermedad periodontal o a enfermedades gástricas, como úlcera y cáncer gástrico en nuestra población adulta.

En la actualidad ha cobrado mayor importancia el papel que juega la placa dentobacteriana ubicando a la cavidad oral como el segundo sitio en importancia, que actúa como reservorio en el ser humano, y que permite la permanencia, transmisión, resistencia y reincidencia de infección por *Helicobacter pylori*, reforzando así la hipótesis de la transmisión por la vía oral.

Por lo anterior se sugiere realizar estudios que nos permitan conocer la prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* en nuestra región, en pacientes asintomáticos, como con pacientes con antecedentes de gastritis o dolor abdominal y la posible correlación con los índices de higiene oral. Así como también estudios que contribuyan a esclarecer el rol de la placa dentobacteriana en la transmisión intrafamiliar haciendo énfasis en el estado de salud bucal de los papás.

11. CÓDIGOS DE ÉTICA PROFESIONAL DECLARACIÓN DE HELSINKI DE LA ASOCIACIÓN MEDICAL MUNDIAL

Recomendaciones para orientar a los médicos en la investigación biomédica con seres humanos Adoptadas por la 18a Asamblea Médica Mundial Helsinki, Finlandia, junio de 1964 y enmendadas por la 29a Asamblea Médica Mundial Tokio, Japón, octubre de 1975, por la 35a Asamblea Médica Mundial Venecia, Italia, octubre de 1983 y por la 41ª Asamblea Médica Mundial Hong Kong, en septiembre de 1989

11.1. INTRODUCCIÓN

Es misión del médico proteger la salud de la población. Sus conocimientos y conciencia están dedicados al cumplimiento de esa misión.

La Declaración de Ginebra de la Asociación Médica Mundial compromete al médico con las palabras "La salud de mi paciente será mi primera consideración", y el Código Internacional de Ética Médica declara que "Un médico debe actuar sólo en el interés del paciente al proporcionar atención profesional que pudiese tener el efecto de debilitar el estado físico y mental del paciente".

El propósito de la investigación médica con seres humanos debe ser mejorar los procedimientos diagnósticos, terapéuticos y profilácticos y la comprensión de la etiología y la patogénesis de la enfermedad.

En la práctica médica actual la mayor parte de los procedimientos diagnósticos, terapéuticos y profilácticos involucran riesgos. Esto se aplica especialmente a la investigación biomédica.

El progreso de la medicina se basa en la investigación, la que en último término, debe cimentarse en parte en la experimentación en seres humanos.

En el campo de la investigación biomédica debe reconocerse una distinción fundamental entre la investigación médica cuyo objetivo es esencialmente diagnóstico o terapéutico para el paciente, y la investigación médica cuyo objetivo esencial es puramente científico y no representa un beneficio diagnóstico o terapéutico directo para la persona que participa en la investigación.

Durante el proceso de investigación, deben considerarse especialmente los factores que puedan afectar al medio ambiente, y debe respetarse el bienestar de los animales utilizados con fines de investigación.

Dado que es esencial que los resultados de los experimentos de laboratorio se apliquen a seres humanos a fin de ampliar el conocimiento científico y así aliviar el sufrimiento de la humanidad, la Asociación Médica Mundial ha redactado las siguientes recomendaciones para que sirvan de guía a cada médico que realiza investigación en seres humanos. Estas deben someterse a futuras revisiones. Hay que hacer hincapié en el hecho de que las normas tal como están redactadas son sólo una forma de orientación para los médicos de todo el mundo. Ellos no están exentos de las responsabilidades criminales, civiles y éticas en virtud de las leyes de sus propios países.

I. PRINCIPIOS BÁSICOS

1. La investigación biomédica en seres humanos debe atenerse a principios científicos generalmente aceptados y debe basarse tanto en experimentos de laboratorio y con

animales, realizados en forma adecuada, como en un conocimiento profundo de la literatura científica pertinente.

2. El diseño y la ejecución de cada procedimiento experimental en seres humanos deben formularse claramente en un protocolo experimental que debe enviarse a un comité independiente debidamente designado para su consideración, observaciones y consejos. Dicho comité debe ajustarse a las leyes y regulaciones del país en que se lleva a cabo la investigación.

3. La investigación biomédica en seres humanos debe ser realizada sólo por personas científicamente calificadas y bajo la supervisión de un profesional médico competente en los aspectos clínicos. La responsabilidad por el ser humano debe siempre recaer sobre una persona médicamente calificada, nunca sobre el individuo sujeto a la investigación, aunque él haya otorgado su consentimiento.

4. La investigación biomédica en seres humanos no puede realizarse legítimamente a menos que la importancia del objetivo guarde proporción con el riesgo inherente para la persona que toma parte en ella.

5. Todo proyecto de investigación biomédica en seres humanos debe ir precedido de una minuciosa evaluación de los riesgos predecibles en comparación con los beneficios previsibles para el participante o para otros. La preocupación por el interés del individuo debe siempre prevalecer sobre los intereses de la ciencia y de la sociedad.

6. Siempre debe respetarse el derecho del participante en la investigación a proteger su integridad. Deben tomarse todas las precauciones del caso para respetar la vida privada del participante y para reducir al mínimo el impacto del estudio en la integridad física y mental del participante y en su personalidad.

7. Los médicos deben abstenerse de emprender proyectos de investigación en seres humanos a menos que tengan la certeza de que los peligros que entrañan se consideran

previsibles. Los médicos deben interrumpir toda investigación si se determina que los peligros sobrepasan los posibles beneficios.

8. Al publicar los resultados de su investigación, el médico está obligado a mantener la exactitud de los resultados. Los informes sobre investigaciones que no se ciñan a los principios descritos en esta Declaración no deben ser aceptados para su publicación.

9. En toda investigación en seres humanos, se debe dar a cada posible participante suficiente información sobre los objetivos, métodos, beneficios previstos y posibles peligros del estudio y las molestias que puede acarrear. Se le debe informar que es libre de abstenerse de participar en el estudio y que es libre de revocar en cualquier momento el consentimiento que ha otorgado para participar.

10. Al obtener el consentimiento informado para el proyecto de investigación, el médico debe ser especialmente cuidadoso para darse cuenta si en el participante se ha formado una condición de dependencia con él o si consiente bajo coacción. En ese caso el consentimiento informado debe obtenerlo un médico que no tome parte en la investigación y que tenga completa independencia de esa relación oficial.

11. En el caso de incapacidad legal, el consentimiento informado debe obtenerse del tutor legal de conformidad con la legislación nacional. Cuando la incapacidad física o mental hacen imposible obtener un consentimiento informado, o cuando el participante es menor de edad, un permiso otorgado por un pariente responsable reemplaza al del participante de conformidad con la legislación nacional.

Cuando el menor de edad está de hecho capacitado para otorgar su consentimiento, debe obtenerse además del consentimiento por parte del menor, el consentimiento otorgado por su tutor legal.

12. El protocolo de investigación debe siempre contener una declaración de las consideraciones éticas que van aparejadas y debe indicar que se cumple con los principios enunciados en la presente Declaración.

II. INVESTIGACIÓN MÉDICA COMBINADA CON ATENCION PROFESIONAL (Investigación clínica)

1. En el tratamiento de la persona enferma, el médico debe tener la libertad de usar un nuevo método diagnóstico y terapéutico, si a su juicio ofrece la esperanza de salvar una vida, restablecer la salud o aliviar el sufrimiento.
2. Los posibles beneficios, peligros y molestias de un nuevo método deben compararse con las ventajas de los mejores métodos diagnósticos y terapéuticos disponibles.
3. En cualquier investigación médica, a todos los pacientes --incluidos aquéllos de un grupo de control, si los hay--se les debe garantizar el mejor método diagnóstico y terapéutico probado.
4. La negativa del paciente a participar en un estudio no debe nunca interferir en la relación médico-paciente.
5. Si el médico considera esencial no obtener el consentimiento informado del individuo, él debe estipular las razones específicas de esta decisión en el protocolo que se enviará al comité independiente (I.2)
6. El médico puede combinar la investigación médica con la atención profesional, con el propósito de adquirir nuevos conocimientos, sólo en la medida en que la investigación médica se justifique por su posible valor diagnóstico o terapéutico para el paciente.

III. INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA NO TERAPEUTICA EN SERES HUMANOS (Investigación biomédica no clínica)

1. En la aplicación puramente científica de la investigación médica realizada en un ser humano, es el deber del médico ser el protector de la vida y de la salud de esa persona en la cual se lleva a cabo la investigación biomédica.
2. Los participantes deben ser voluntarios, ya sea personas sanas o pacientes cuyas enfermedades no se relacionen con el diseño experimental.
3. El investigador o el equipo investigador debe interrumpir la investigación si a su juicio continuar realizándola puede ser perjudicial para la persona.
4. En la investigación en seres humanos, el interés de la ciencia y de la sociedad nunca debe tener prioridad sobre las consideraciones relacionadas con el bienestar de la persona.

Fuente: Pautas éticas Internacionales para la Investigación y Experimentación Biomédica en Seres Humanos. ISBN 92 9036 056 9. Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS), 1993, Ginebra, pp.53-56.

Todos los procedimientos estarán de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

Título Segundo, Capítulo III De la investigación en **menores de edad o incapaces**, Artículos 34-39

LITERATURA CITADA

1. Ashton-Key MT, Diss TC, Isaacson PG. 1996. Detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy and resection specimens. *J Clin Pathol.* 49: 107-111.
2. Atherton JC. 1997. Non-endoscopic test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 11 (Suppl. 1): 11-20.
3. Ballam LD, Mendall MA, Asante M, Morris J, Strachan DP, Whincup PH, et al. 2000. Western blotting is useful in the salivary diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Pathol.* 53:314-7.
4. Bejarano R., Rodriguez-Ocon L, Sans J., Enfermedad gastroduodenal por *H. pylori* en niños. *Bol Med Infant Mex* 1999; 56 (5): 269 – 279.
5. Bayerdörffer E, Neubauer A, Rudolph B, Thiede C, Lehn N, Eidt S et al. 1995. Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. *Lancet.* 345: 1591-1594.
6. Best LM, Veldhuyzen van Zanten SJO, Sherman PM, Bezanson GS. 1994. Serological detection of *Helicobacter pylori* antibodies in children and their parents. *J. Clin. Microbiol.* 32:1193-1196.
7. Blecker U, Lanciers S, Hauser B, Vandenplas Y. 1994. The prevalence of *Helicobacter pylori* positivity in a symptom-free population, aged 1 to 40 years. *J. Clin. Epidemiol.* 47: 1095-1098.

8. Bürgers, R., Schneider-Brachert, W., Reischl, U., Behr, A., Hiller, K.-A., Lehn, N., Schmalz, G. and Ruhl, S. 2008. *Helicobacter pylori* in human oral cavity and stomach. *European Journal of Oral Sciences*, 116: 297–304.
9. Brown LM. *Helicobacter Pylori*: epidemiology and routes of transmission. *Epidemiology Rev* 2000; 22(2): 283-297
10. Chelimsky G, Zcinn S. Enfermedad ulceropéptica en la infancia. *Pediatr Rev* 2002; 22(10): 349-358.
11. Cohen H, Laine L. 1997. Endoscopic methods for the diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther*. 11 (Suppl. 1): 3-9.
12. Desai HG, Gill HH, Shankaran K, Mehta PR, Prabhu SR. 1991. Dental plaque: a permanent reservoir of *Helicobacter pylori*? *Scand. J. Gastroenterol*. 26: 1205.
13. Drumm B, Rhoads JM, Stringer DA, Sherman PM, Ellis LE, Durie PR. 1988. Peptic ulcer disease in children: etiology, clinical findings and clinical course. *Pediatrics*. b: 82: 410.
14. Drumm B, Sherman P, Chiasson D, Karmali M, Cutz E. 1988. Treatment of *Campylobacter pylori* associated antral gastritis in children with bismuth subsalicylate and ampicillin. *J. Pediatr*. a; 113: 908.
15. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. 1997. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Rev*. 4: 720-741.
16. Eurogast Study Group. 1993. An international association between *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Lancet*. 341: 1359-62.

17. Ferguson D, Li C, Patel N, Mayberry W, Chi 1D, Thomas J. 1993. Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2802-2804.
18. Freedberg AS, Barron LE. 1940. The presence of spirochetes in human gastric mucosa. *Am. J. Dig. Dis.* 7: 443-445.
19. Gatta L, Ricci C, Tampieri A, Vaira D. 2003. Non-invasive techniques for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Infect.* 9:489-96.
20. Gebara EG, Pannutic, Faria CM, Chehter L, Mayer MP, Lime LA. 2004 prevalence of *Helicobacter Pylori* detected by Polymerase chain reaction in the oral cavity of periodontitis patients. *Oral microbial Immunol*; 19: 277 – 280
21. Genta RM, Graham DY. 1994. Comparison of biopsy sites for the histopathologic diagnosis of *Helicobacter pylori* : a topographic study of *H. pylori* density and distribution. *Gastrointest Endosc.* 40: 342-345.
22. Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, McConnell W, Harper WES. 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Heliicobacter pylori* comb.nov. and *Helicobacter mustelae* comb.nov. respectively. *Int. J. Sist. Bact.* 39: 397.
23. Hassall E, Dimnick JE. 1989. Unique features of *Helicobacter pylori* disease in children. *Dig. Dis. Sci.* 36: 417.

24. Hellström PH. 2006. This year's Nobel Prize to gastroenterology: Robin Warren and Barry Marshall awarded for their discovery of *Helicobacter pylori* as pathogen in the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol.* May 21; 12(19): 3126-3127
25. INEGI/ Secretaría de Salud. Base de datos de defuncones 2005. Sistema Nacional de Información en Salud (Base de datos en internet). México: SINAIS; 2010. Disponible en : www.sinais.salud.gob.mx.
26. Kignel S, de Almeida Pina F, André EA, Alves Mayer MP, Birman EG. 2005. Occurrence of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva of dyspeptic patients. *Oral Dis.* 11:17-21.
27. Kim N, Lim S H, Lee K H, You J Y, Kim J M, Lee E. 2000. *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva. *Korean J Intern Med,* 15: 187-194.
28. Kosunen TU, Mégraud F. 1995. Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Curr Opin Gastroenterol.* 11 (Suppl 1): 5-10.
29. Krajden S, Fuksa M, Anderson J, Kempston J, Boccia A. Petre C, Babida C, Karmali M, Penner JL. 1989. Examination of human stomach biopsies, saliva and dental plaque for *C. pylori*. *J. Clin. Microb.* 27: 1937-38.
30. Lu, Y, Redlinger T, Avitia R, Galindo A, Goodman K. Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated Municipal wastewater. *Appl Envirom Microbiol.* 2002; 68:1436-9.
31. Lindberg T. 1994. Recurrent abdominal pain in childhood. *Act. Pediatr.* 83: 775-776.

32. Malaty H, El Kasabang A, Grahan DY, Millar C. Age at acquisition of *Helicobacter pylori* infection: a follow-up study from infancy to adulthood. *Lancet* 2002; 359: 931-935.
33. Mapstone NP, Lynch DAF, Lewis FA, Axon ATR, Tompkins DS, Dixon MF. 1993 Identification of *Helicobacter pylori* DNA in the mouths and stomachs of patients with gastritis using PCR. *J Clin Pathol.* 46:540-543.
34. Marshall BJ, Goodwin CS. 1987. Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *Inter. J. System. Bacteriol.* a; 37: 68.
35. Marshall BJ, Warren JR. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* a; i: 1311-1314.
36. Martinez- Gomis J, Diouf A, Lakhssassi N, Sixou M. 2006 Absence of *Helicobacter Pylori* in the oral cavity of 10 non-dyspeptic subjects demonstrated by real-time polymerase chain reaction. *J. Oral Microbiology and Immunology.* Vol. 21, Issue 6, Dic. 407-410.
37. M. M. Paterson, M. D. Schrenzel, Y. Feng, S. Xu, F. E. Dewhirst, B. J. Paster, S. A. Thibodeau, J. Versalovic and J. G. Fox. *Helicobacter aurati* sp. nov., a Urease-positive *Helicobacter* Species Cultured from Gastrointestinal Tissues of Syrian Hamsters. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38. 10. P.3722-3728.
38. Nares J, Jaramillo Y, Martínez V, et al. 2007. Immunochromatographic monoclonal test for detection of *Helicobacter pylori* antigen in stool is useful in children from high-prevalence developing country. *Helicobacter.* 12:354-8.

39. Oliveira AMR, Queiroz DMM, Rocha GA, Mendes EN. 1994. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in children of low socioeconomic level in Belo Horizonte. Brazil. *Am. J. Gastroenterol.* 89: 2101-2204.
40. Palmer ED. 1954. Investigation of the gastric mucosa spirochetes of the human. *Gastroenterol.* 27: 218-220.
41. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP et al. 1991. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 325: 1127-1131.
42. Perez-Perez, GI, Dworkin BM, Chodos JE, Blaser MJ. 1988. *Campylobacter pylori* antibodies in humans. *Ann Intern Med.* 109: 11-17.
43. Raymond J, Bergeret M, Benhamou PH, Mensah K, Dupont C. 1994. A 2-year study of *Helicobacter pylori* in children. *J. Clin. Microbiol.* 32: 461-463.
44. Jané S. M, Varea C. V, Muñoz A. M. C, 1999 Estudio de la placa dental en la infección por *Helicobacter pylori*. *An Esp Pediatr*; 50: 244-246.
45. Sepúlveda E., Briceño C., Spencer M., Quilodrán S, Brethauer U., Moreno J., y Garcia A. 2008. Detección de *Helicobacter pylori* en mucosa gástrica y cavidad oral. *Gastroenterol. Latinoam*, 19: 73-79
46. Steer HW, Colin-Jones DG. 1975. Mucosal changes in gastric ulceration and their response to carbenoxolone sodium. *Gut.* 16: 590-597.

ANEXO A

Microorganismo	Localización	Huésped
<i>Helicobacter pylori</i>	Estómago	Hombre, gato y monos
<i>H. felis</i>	Estómago	Perro y gato
<i>Gastrospirillum suis</i>	Estómago	Cerdo
<i>H. heilmanii</i> (<i>G. hominis</i>)	Estómago	Hombre, gato y perro
<i>H. mustelae</i>	Estómago	Hurón
<i>H. acinonyx</i>	Estómago	Leopardo
<i>H. nemestrinae</i>	Estómago	Monos
<i>H. cinaedi</i>	Intestino	Hombre y roedores
<i>H. fennelliae</i>	Intestino	Hombre
<i>H. canis</i>	Intestino	Perro
<i>H. muridarum</i>	Intestino	Roedores
<i>H. rappini</i>	Intestino Estómago Hígado	Hombre Oveja Perros
<i>H. hepaticus</i>	Hígado	Roedores

Tabla 1. Especies de *Helicobacter* y microorganismos relacionados (*Versalovic et al., 1999*).

<u>Test</u>	<u>Sensibilidad</u>	<u>Especificidad</u>	<u>Endoscopia</u>	<u>Comentario</u>
	<u>%</u>	<u>%</u>		
<u>Cultivo</u>	<u>77-95</u>	<u>100</u>	<u>Sí</u>	<u>Permite testar</u> <u>susceptibilidad</u> <u>antibiótica y genotipar</u> <u>cepas</u>
<u>Histología</u>	<u>93-98</u>	<u>95-98</u>	<u>Sí</u>	<u>Recomendable múltiples</u> <u>biopsias del antro</u>
<u>test</u> <u>rápido de</u> <u>la ureasa</u>	<u>89-98</u>	<u>93-98</u>	<u>Sí</u>	<u>Método endoscópico de</u> <u>elección</u>
<u>PCR</u>	<u>85-96</u>	<u>90-100</u>	<u>Sí (biopsia)</u> <u>No (saliva)</u>	<u>Detección ADN. No</u> <u>requiere bacterias vivas</u>
<u>Serología</u>	<u>88-95</u>	<u>86-95</u>	<u>No</u>	<u>Indicado en estudios</u> <u>epidemiológicos</u>
<u>Test del</u> <u>aliento</u>	<u>90-95</u>	<u>90-95</u>	<u>No</u>	<u>Ideal seguimiento</u> <u>respuesta tratamiento</u> <u>antibiótico</u>

Tabla 2.- Métodos diagnósticos de la infección por *Helicobacter pylori* (Dunn et al., 1997).

ANEXO B



CARTA DE CONSENTIMIENTO

Fecha _____

Yo: _____

Como padre o tutor del paciente: _____

Por medio de la presente doy mi autorización y consentimiento al Dr. Paulo César Mares Moreno. Para que tome las muestras de placa dentobacteriana necesarias en el estudio que el Dr. Realiza titulado: “Presencia de *Helicobacter pylori* en placa dental de la población infantil que acude al posgrado de odontopediatría de la facultad de odontología de la U.A.N.L.”.

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

Nombre y Firma del Paciente

Nombre y firma del Investigador

HOJA DE CAPTURA DE DATOS

Nombre _____ Sexo F M Edad _____

Estado general de salud del paciente:

Se le ha diagnosticado algún trastorno sistémico _____ Sí _____ No

Está su hijo actualmente bajo tratamiento médico _____ Sí _____ No

Ha presentado su hijo algún problema gástrico _____ Sí _____ No

Ha tomado algún antibiótico en los dos meses anteriores _____ Sí _____ No

Aparentemente sano _____ Sí _____ No

Hábitos alimenticios:

Biberón

Dulces

Pan dulce

Aguas frescas

DAA

Refrescos

Tamarindos

Chamoy

Frituras

DAHC

Frutas

Verduras

Tortilla

Agua natural

DB

Presencia de Helicobacter pylori

SI

NO

Nota: _____

HOJA DE CAPTURA DE DATOS 02.

Id	Presencia de <i>Helicobacter Pylori</i>		Edad	Género	
	SI	NO		FEM	MASC
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
40					

ANEXO C



Fig. 1 Palillo estéril de madera de forma cilíndrica de 1mm de diámetro, el cuál fue modificado en uno de sus extremos con una hoja de bisturí para crear una parte activa en forma de pala.

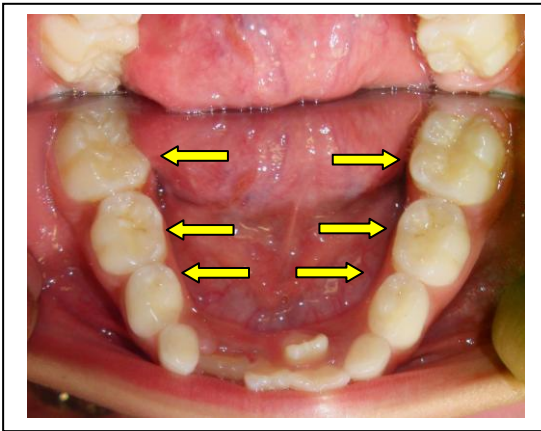


Fig. 2 Zonas de obtención de la muestra de placa dental ubicada en la cara lingual dentro del surco gingival de molares inferiores.

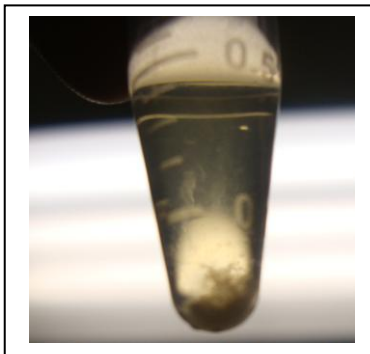


Fig. 3 Muestra en tubo eppendorf.

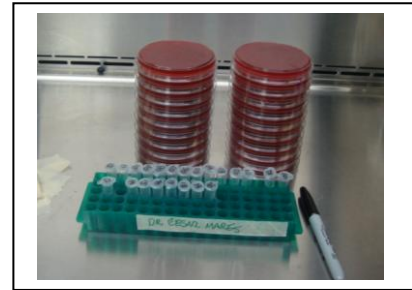


Fig. 4 Cajas Petri con agar Campy con 10% de sangre de carnero ppm. Suplementado con 5 antibióticos.



Fig. 5 Colocación de 200µl de la muestra sobre el centro de la caja, sin realizar estrías.



Fig. 6 Cajas Petri dentro de las cámaras de Brewer.



Fig. 7 Transcurrido los 5 días, se resembraron con un hisopo estéril las colonias obtenidas, discriminando aquellas que no fueran características de *Helicobacter pylori*.

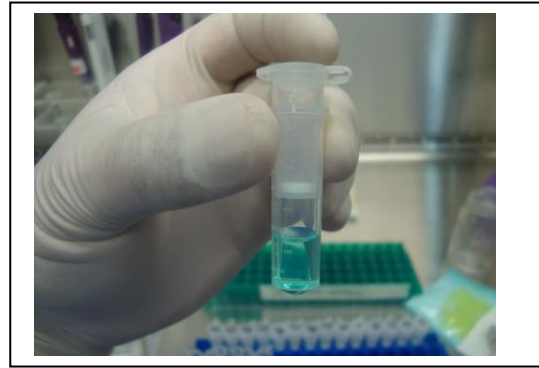


Fig. 10 Se descartó el sobrenadante y se añadieron 500µl del buffer de lavado.

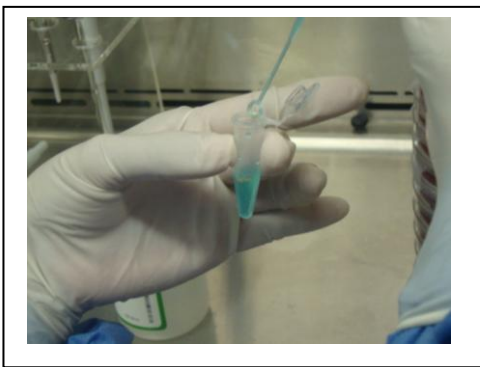


Fig. 8 Colocación de colonias con características de *Helicobacter pylori* en 300µl de solución de lisis celular.

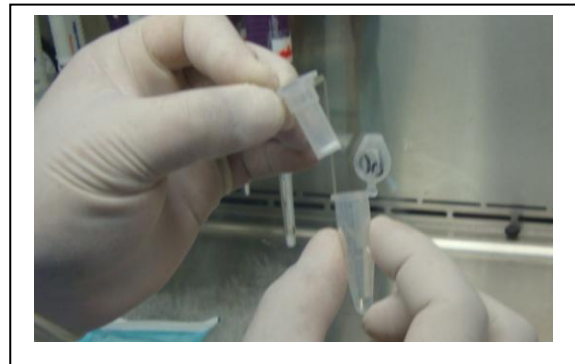


Fig. 11 Nuevo tubo Eppendorff estéril y se coló la columna en él. Al DNA unido a la membrana de la columna se le agregaron 50µl de agua estéril.

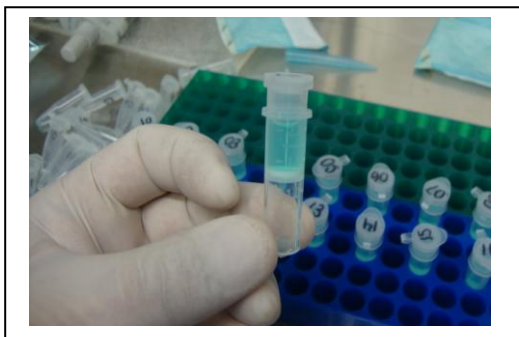


Fig. 9 Columna en un tubo de recolección.



Fig.12 Tubo Eppendorff que en ese momento ya estaba conteniendo el DNA.

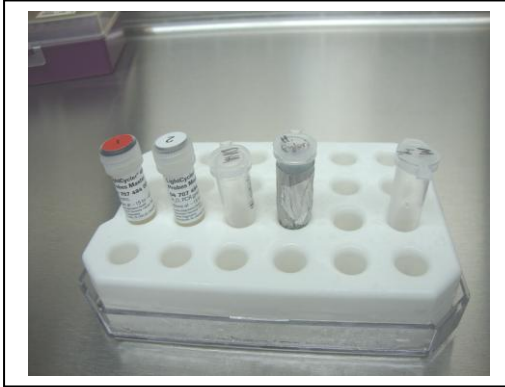


Fig. 13 ADN, Sonda y oligonucleótidos utilizados para detectar *Helicobacter pylori*.

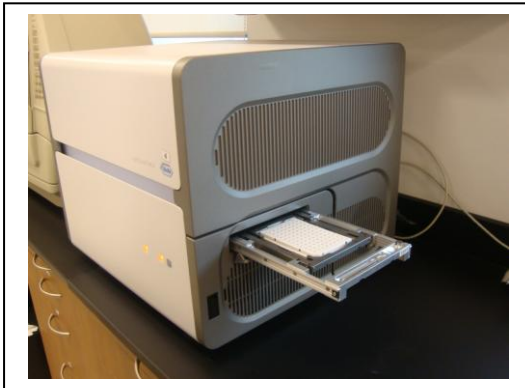


Fig. 14 Se empleó el aparato Light-Cycler 408II de Roche.

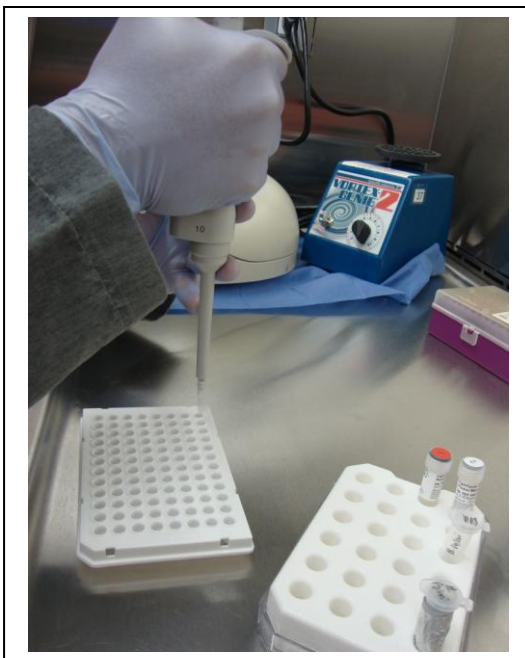


Fig. 16 Finalmente se añadieron 2.5 μ l del DNA templado para los experimentales.

Fig. 15 Se hizo un mix base que contenía 2 μ l de agua estéril grado PCR, 0.150 μ l de primers-sonda stock 10x y 5 μ l de PCR master mix 10x para añadirse de forma secuencial a los pocillos.

ANEXO D

ORF*	CLAVE	SECUENCIA 5' - 3'
Y18985	AB600174 FWD	5'- AAAACACCTCTCAGTTCGGATTG-3''
	AB600174.1 REV	5'- TTTGCGATTACTAGCGATTCCA-3'
	SONDA	5'-/56-FAM/AGGCTGCAA/ZEN/CTCGCCTGCATGA/3IABkFQ/-3'M

Tabla 3. Sonda y oligonucleótidos utilizados para detectar *Helicobacter pylori*.

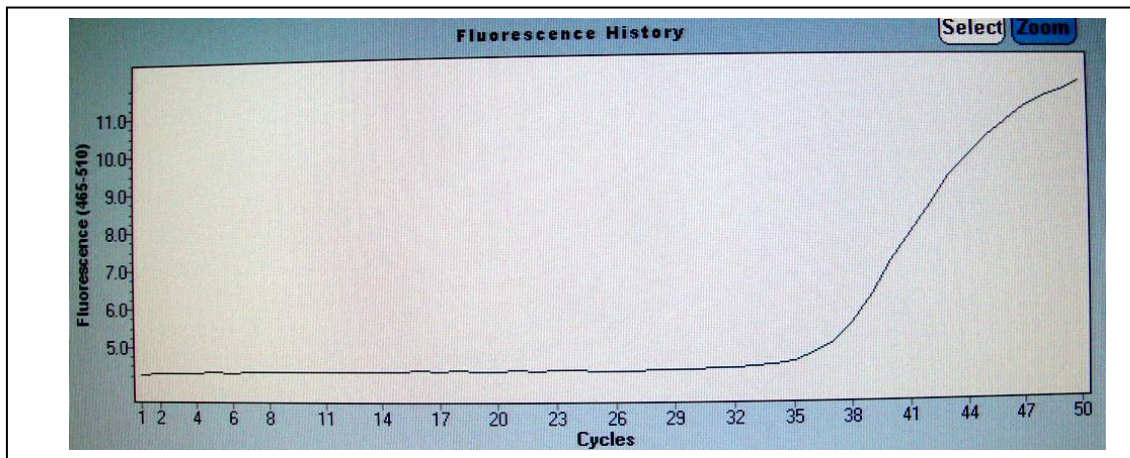


Gráfico 1 Representación gráfica del control positivo de DNA de *Helicobacter pylori* mostrando una curva de incremento gradual y uniforme que describe la fase de incremento exponencial del ADN amplificado.

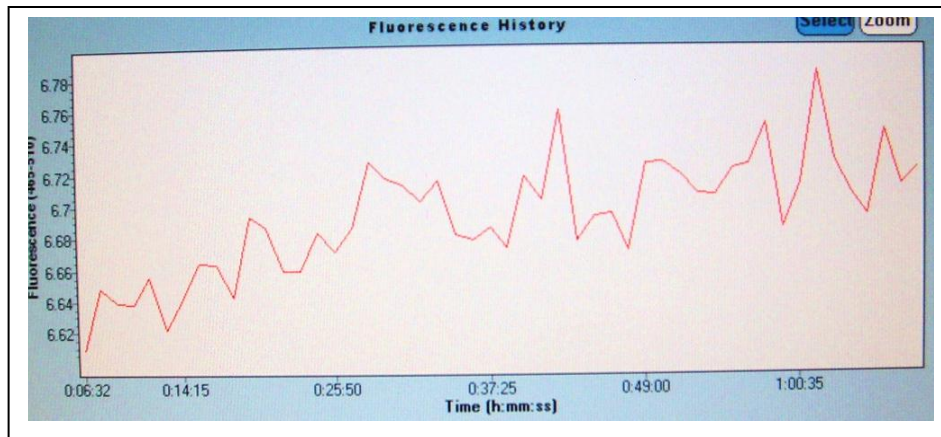


Gráfico 2 Representación característica de la gráfica del control negativo para DNA de *Helicobacter pylori* que contiene solo agua estéril, y que describe una trayectoria completamente irregular sin patrón aparente, lo cual indica definitivamente que una muestra con estas características será negativo.

Formato de detección	Tipos de bloque	Volumen de reacción
HRM Dye	96	10µl
Programas		
Tipo de programa	Ciclos	Modo de Análisis
Pre-incubación	1	-
Amplificación	50	Cuantificación
Enfriamiento	1	-

Tabla 4. Programación del equipo Light-Cycler 480II.

PROGRAMA	Hold hh:mm:ss	Rampa °C/S	Modo de Adquisición
Pre- incubación			
95°C	00:05:00	4°C/S	-
Amplificación			
95°C	00:00:10	4°C/S	-
55°C	00:00:15	2°C/S	-
72°C	00:00:10	4°C/S	Single
Enfriamiento			
40°C	00:00:30	2°C/S	-

Tabla 5. Condiciones de programación para la amplificación en el termociclador.

Mezcla de reacción			
Reactivo	1X(μl)	50 X(μl)	Con. Final
Agua miliQ estéril Grado PCR	2	100	
Primers- sonda, Stock 10X	0.125	6.25	
PCR Master Mix 10X	5	250	
DNA templado	2.5		
Total	10	356.25	

Tabla 6. Mezcla de reacción para PCR en Tiempo Real.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C+	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
B												
C	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
D												
E	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
F												
G	36	37	38	39	40	C-						
H												

Tabla 7. Llenado de la placa de 96 posos. Para amplificación por PCRtr

ANEXO E

Los recursos que se requiere adquirir son:

<i>Material</i>	<i>Marca</i>	<i>Características</i>	<i>Costo</i>
80 cajas petri	BD ^{BBL®}	Agar <i>Campylobacter</i> con 10% de sangre de carnero.	\$1500
Caja de BD GasPak EZ Campy	BD ^{BBL®}	20 sobres.	\$1622.86
Kid extracción de DNA	promega		\$6000
Tubos eppendorf	eppendorf	100 tubos	\$300
Palillos de madera		Con extremo biselado para recolección de placa.	\$50
Bolsas de esterilización	sunset	57x100mm	\$100
Computadora Laptop	toshiba	satellite	\$8,500.00
Cámara Digital	Nikon	Interpolated 5 mega pixels images PrecisiónOptical zoom10x Digital 12x zoom	\$6,500.00
Marcatextos de diferentes colores	BIC	Caja con 4	\$39.90
Memoria USB	Sandisk	Memoria USB de 4 GB	\$499.00
Escritorio	Officce max		\$2,800
Silla			
Hojas de Papel	Xerox	Papel azul T/carta c/500	\$90.00
4 Portaminas	bic		\$28
Toallas desechables	Swpe		200
Guantes	Uniseal	Hipo alérgicos sin talco	\$120.50
Mascarillas QX unimask 3	Uniseal	Hipo alérgicos	\$45.50
Campos Caja c/25	Uniseal	Hipo alérgicos	\$47.20

ANEXO F

Tabla 9						
Distribución de la edad y género de los pacientes						
Posgrado de Odontopediatría UANL, Mayo de 2012						
	Femenino		Masculino		Total	
Edad	n	%	n	%	n	%
2	1	7.69	0	0.00	1	2.50
3	3	23.08	5	18.52	8	20.00
4	4	30.77	1	3.70	5	12.50
5	4	30.77	10	37.04	14	35.00
6	1	7.69	2	7.41	3	7.50
7	0	0.00	1	3.70	1	2.50
8	0	0.00	4	14.81	4	10.00
10	0	0.00	3	11.11	3	7.50
11	0	0.00	1	3.70	1	2.50
Total	13	100	27	100	40	100

Del total de la población que se consideró para realizar el presente estudio que fue de 40 pacientes. El grupo de edad que se presentó con mayor frecuencia fue el de 5 años (35%) seguido del grupo de 3 años de edad (20%). Siendo los de 2, 7 y 11 años los que se presentaron con menor frecuencia (2.5%). Las niñas (13) representan el 32.50% mientras que los niños comprenden el 67.50% del total de la muestra.

Tabla 10										
Presencia <i>Helicobacter Pylori</i>, distribución según la edad										
Posgrado de Odontopediatría UANL, Mayo de 2012										
	n	Media	Mediana	D.E.	Mínimo	Máximo	Rango	IC: _{1-α} =0.95		Valor p
Negativo	26	5.08	5.00	2.171	2	11	9	4.20	5.95	0.1493
Positivo	14	5.86	5.00	2.349	3	10	7	4.50	7.21	
Total	40	5.35	5	2.23	2	11	9	4.36	6.14	

Tabla 10 El promedio de edad para el grupo de pacientes (14) con resultados positivos para la presencia de ADN de *Helicobacter pylori* en muestras de placa dentobacteriana fue de 5.08 años con una desviación estándar de 2.17 (IC: 4.20-5.95 años), así mismo el promedio de edad para los pacientes con valor negativo para la presencia de ADN de *Helicobacter pylori* en muestras de placa dentobacteriana fue de 5.08 con una desviación estándar de 2.34 (IC: 4.50-7.21 años). La prueba t de diferencia de medias no muestra diferencia significativa en los promedio de edad para los valores, positivos y negativos, de *Helicobacter Pylori*.

Tabla 11 Presencia <i>Helicobacter Pylori</i> , distribución según el género Posgrado de Odontopediatría UANL, Mayo de 2012						
	Negativo		Positivo		Total	
	n	%	N	%	n	%
Femenino	11	42	2	14	13	32.5
Masculino	15	58	12	86	27	67.5
Total	26	100	14	100	40	100

$X^2=3.25$, $p= 0.071$

La presencia de ADN de *Helicobacter pylori* en las muestras de placa dentobacteriana dentro del grupo del género femenino representó el 14% de los casos positivos y el 86% para el género masculino. En este mismo sentido es posible asegurar que no existe relación significativa (95% de confiabilidad) entre el género y la presencia de ADN de *Helicobacter pylori* en muestras de placa dentobacteriana.

ANEXO G

UNIVERSO DE ESTUDIO 40 PACIENTES

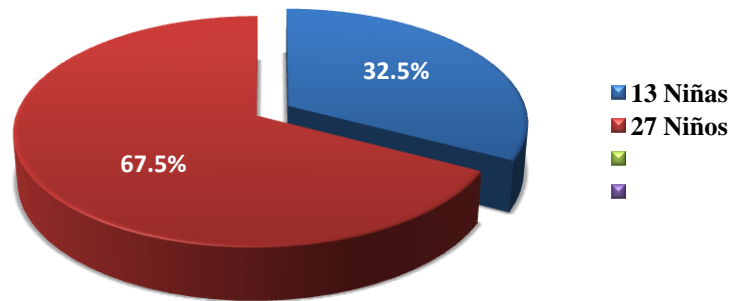


Gráfico 3 Representa la muestra del presente estudio que fue de 40 pacientes, donde: 32.5% fueron niñas y 67.5% niños.

Gráfico 4
Distribución de la edad y género de los pacientes
 Posgrado de Odontopediatría UANL, Mayo de 2012

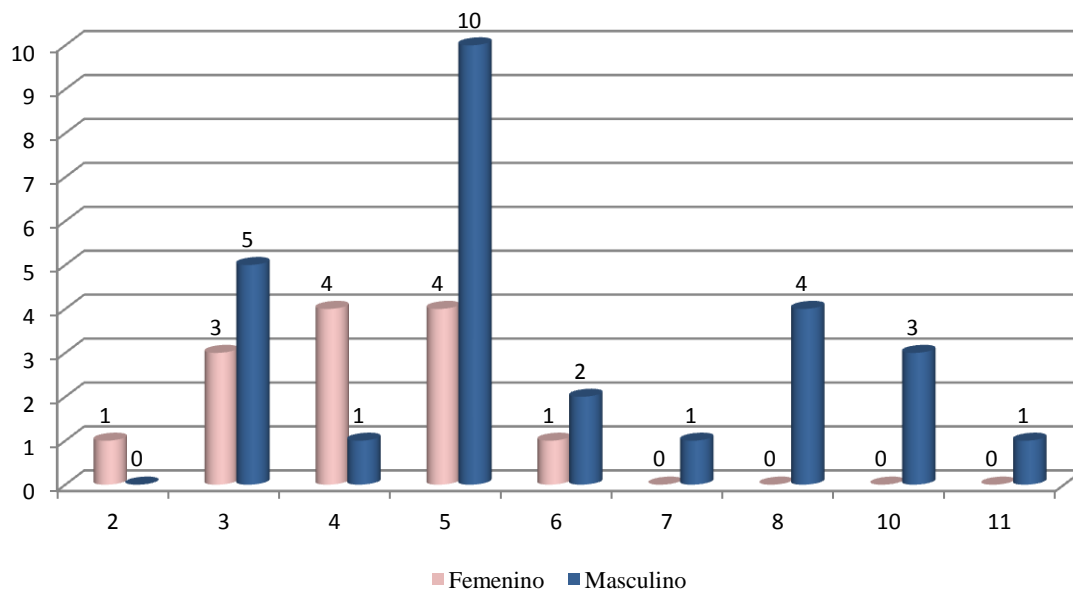


Gráfico 4 Grafico representa la distribución por edad y género del grupo de pacientes que participaron en el presente estudio.

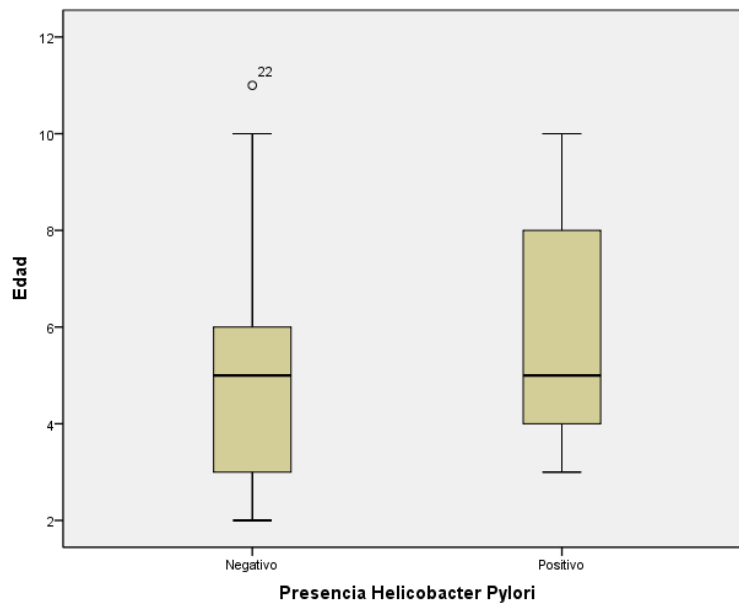


Gráfico 5 Estadística descriptiva de la edad según la presencia de *Helicobacter Pylori* Posgrado de Odontopediatría UANL, Mayo de 2012

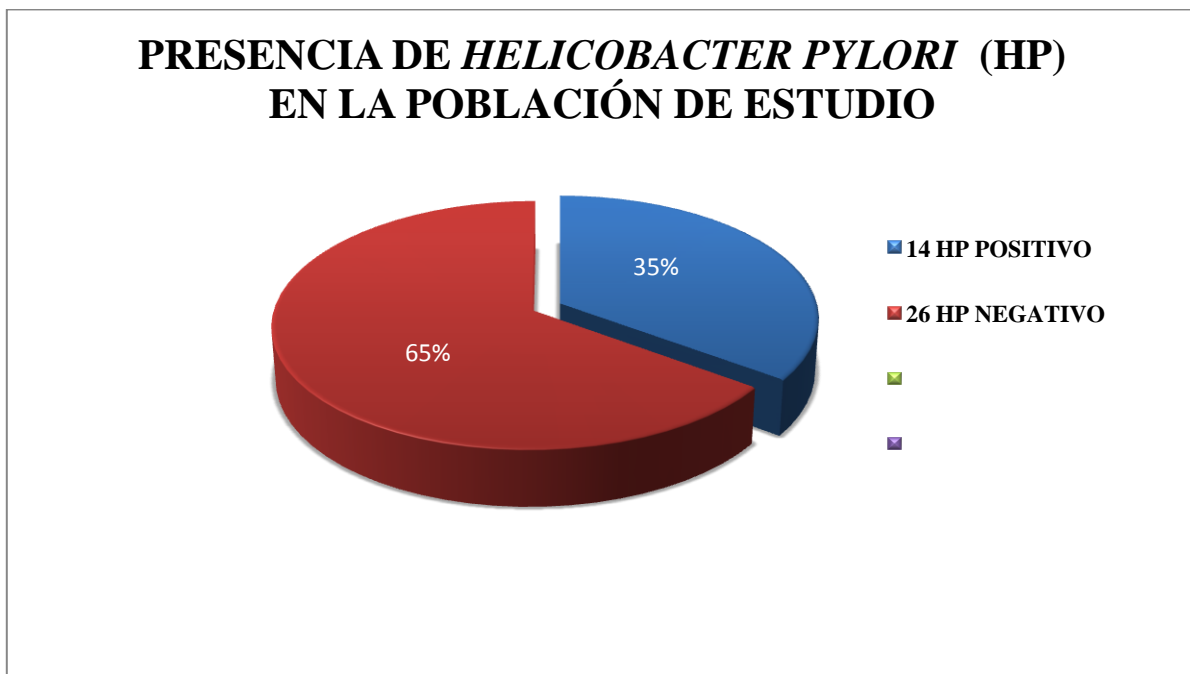


Gráfico 6 La presencia de *Helicobacter pylori* en los cultivos de placa dentobacteriana analizando el ADN por PCR en tiempo real fue positiva en 14 casos, equivalentes al 35% de la población estudiada.

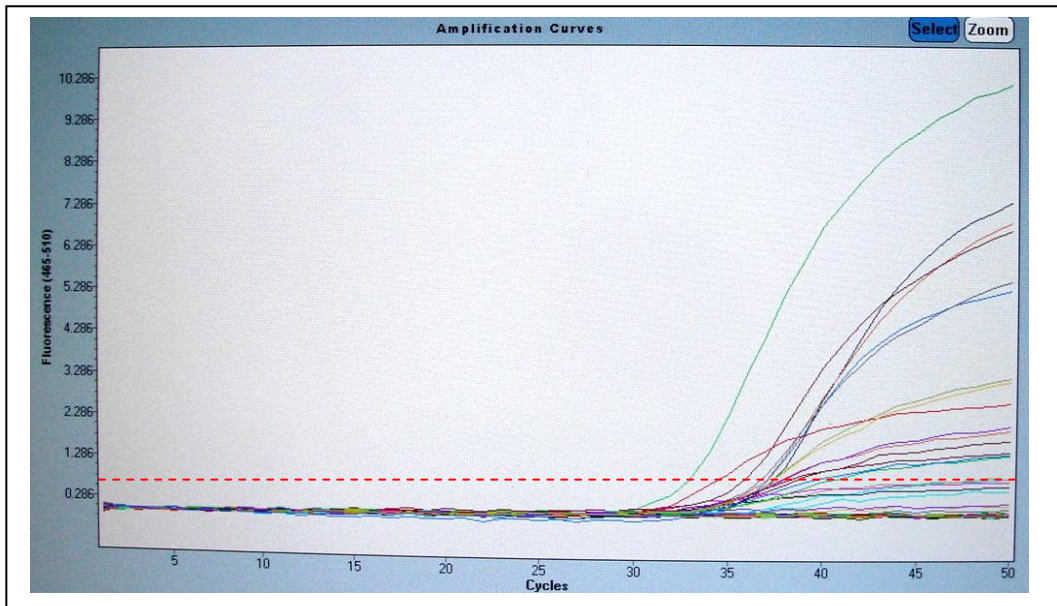


Gráfico 7 Se ven representados los 40 pacientes que participaron en el estudio y se identifican con diferentes colores a cada uno mostrando una curva de incremento gradual y uniforme para aquellos que resultaron positivos a la fase de incremento exponencial del ADN amplificado.

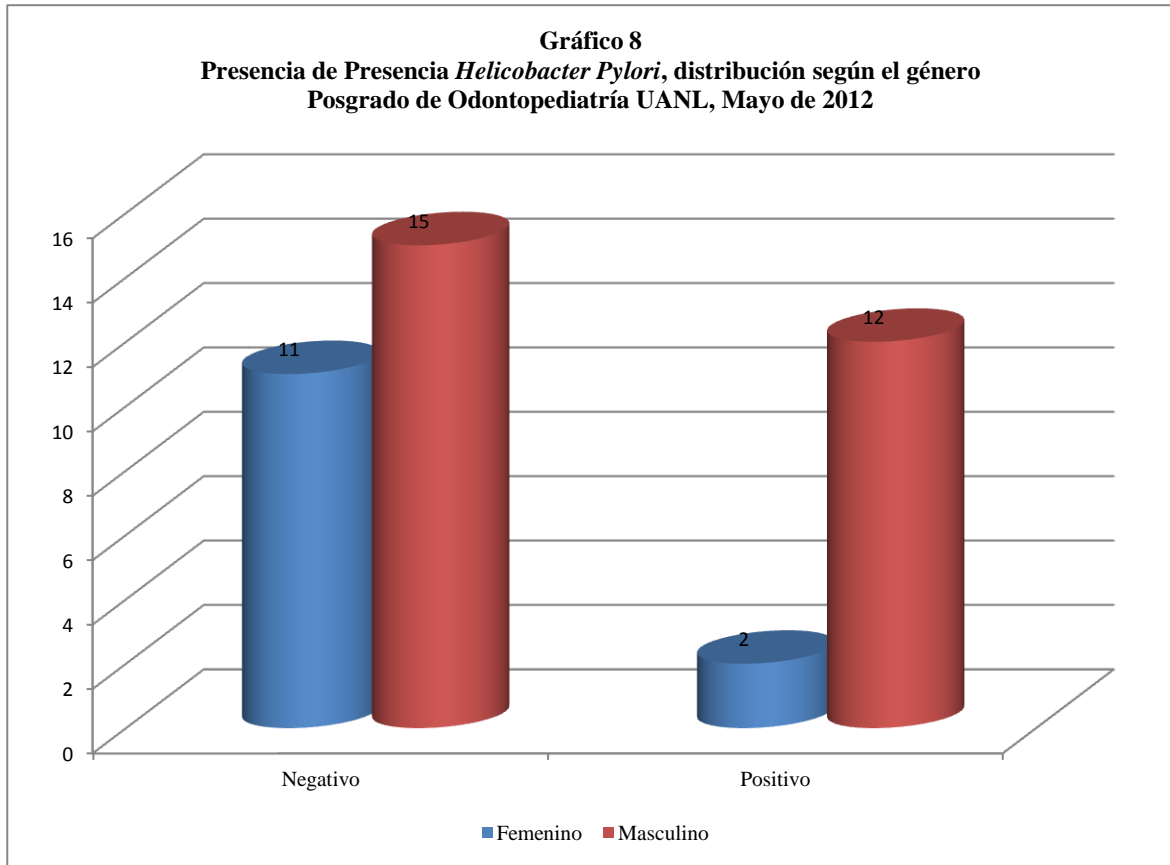


Grafico 8 De los 14 casos positivos a la presencia de ADN de *Helicobacter pylori* en los cultivos de las muestras de placa dentobacteriana 2 se presentaron en el grupo de las niñas y 12 en el grupo de los niños.

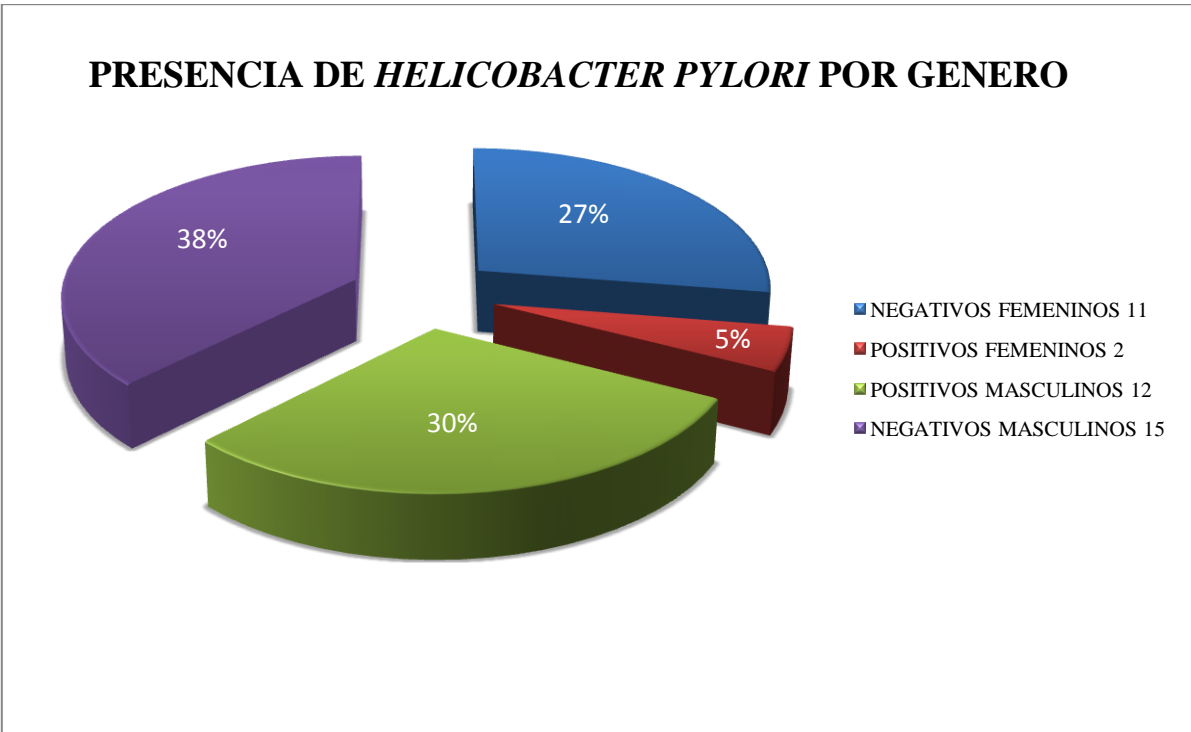


Grafico 9 Representación de la presencia de ADN de *Helicobacter pylori* en la población del presente estudio y su distribución por género donde: de los 14 casos positivos; 2 pertenecen al género femenino y 12 al género masculino.