



CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

TESIS

**IDENTIFICACIÓN DE *HELICOBACTER PYLORI* EN AMÍGDALAS DE
PACIENTES CON FARINGOAMIGDALITIS RECURRENTE DEL CENTENARIO
HOSPITAL MIGUEL HIDALGO DE AGUASCALIENTES DURANTE EL 2012**

PRESENTA

Samuel Valdés Durán

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

TUTOR

Dr. Rodolfo González Segovia

COMITÉ TUTORAL

Dr. Rafael Gutiérrez Campos

Dr. Alejandro Rosas Cabral

Aguascalientes, Ags., 9 de diciembre del 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES



ANIVERSARIO
UAA

SAMUEL VALDÉS DURÁN
MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
P R E S E N T E

Por medio de la presente se le informa que en cumplimiento de lo establecido en el Reglamento General de Docencia en el Capítulo XVI y una vez que ha cumplido con los siguientes requisitos; a) Participación como ponente en un congreso, b) Asistente a dos congresos de su área de formación, c) La aceptación o publicación de un artículo. d) Su trabajo de tesis, titulado:

“IDENTIFICACIÓN DE *HELICOBACTER PYLORI* EN AMÍGDALAS DE PACIENTES CON FARINGOAMIGDALITIS RECURRENTE DEL CENTENARIO HOSPITAL MIGUEL HIDALGO DE AGUASCALIENTES DURANTE EL 2012”

Los requisitos para su titulación han sido revisados y aprobados por su tutor y el consejo académico, se autoriza continuar con los trámites para obtener el grado de **Maestría en Investigación Biomédica**.

Sin otro particular por el momento me despido enviando a usted un cordial saludo

ATENTAMENTE
“SE LUMEN PROFERRE”

Aguascalientes, Ags., 13 de Diciembre del 2013.


DR. RAÚL FRANCO DÍAZ DE LEÓN
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD

ccp. C.P. Ma. Esther Rangel Jiménez / Jefe de Departamento de Control Escolar.
ccp. Mtra. Guadalupe Valdés Reyes / Jefa de Departamento de Apoyo al Posgrado.
ccp. Archivo.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

DR. RAÚL FRANCO DÍAZ DE LEÓN
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **SAMUEL VALDÉS DURÁN** con ID **58847** quien realizó la tesis titulada: **IDENTIFICACIÓN DE HELICOBACTER PYLORI EN AMÍGDALAS DE PACIENTES CON FARINGOAMIGDALITIS RECURRENTE DEL CENTENARIO HOSPITAL MIGUEL HIDALGO DE AGUASCALIENTES DURANTE EL 2012**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 19 de Noviembre de 2013.



DR. RODOLFO GONZÁLEZ SEGOVIA
TUTOR DE TESIS



DR. RAFAEL GUTIÉRREZ CAMPOS
COTUTOR DE TESIS



DR. ALEJANDRO ROSAS CABRAL
ASESOR DE TESIS

c.c.p. Interesado
c.c.p. Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p. Jefatura del Dpto. de Medicina
c.c.p. Consejero Académico
c.c.p. Minuta Secretario Técnico



Índice general

Índice general	1
Índice de figuras	2
Resumen	3
Abstract	4
Introducción	5
Capítulos	
I. Marco teórico	11
II. Planteamiento del problema	14
III. Objetivos	15
IV. Hipótesis	16
V. Material y métodos	17
VI. Resultados	19
VII. Discusión	23
Conclusiones	26
Glosario	27
Bibliografía	28
Anexos	31

Índice de figuras

Figura 1. Prueba rápida de ureasa.	19
Figura 2. Cultivo de <i>H. pylori</i> .	20
Figura 3. Amplificación del gen <i>hsp60</i> por PCR.	21
Figura 4. Amplificación del gen <i>ureC</i> por PCR.	21
Figura 5. Amplificación del gen <i>Nod1</i> por PCR.	22



Resumen

Introducción: La bacteria *Helicobacter pylori* se ha detectado en regiones extragástricas como cavidad bucal y oído medio. Algunos autores muestran evidencias que pudiera presentarse también en tejido amigdalino, pero existen datos contradictorios sobre su presencia en este sitio. La presencia de la bacteria en tejido adenoamigdalino pudiera ser un reservorio extragástrico para su transmisión y/o reinfección.

Material y métodos: Se consideraron 50 pacientes (7.4 ± 2.9 años) programados para amigdalectomía por faringoamigdalitis recurrente del Hospital Miguel Hidalgo de Aguascalientes durante el 2012. La RUT se realizó a partir de tejido amigdalino en buffer urea. Se realizó cultivo por siembra de tejido amigdalino en base agar sangre e incubación a 37 °C en condiciones microaerofílicas. En la PCR se utilizó ADN genómico obtenido de tejido amigdalino para la amplificación de segmentos correspondientes a los genes *ureC* y *hsp60* específicos de la bacteria.

Resultados: Todas las muestras fueron negativas por RUT. El cultivo a la bacteria fue negativo en todas las muestras de tejido amigdalino. La amplificación por PCR de *ureC* y *hsp60* no se identificó en ninguna de las muestras provenientes de los pacientes.

Conclusión: No se demostró la presencia de *H. pylori* en amígdalas de pacientes con faringoamigdalitis recurrente utilizando 3 distintas metodologías.

Abstract

Introduction: *Helicobacter pylori* bacterium has been detected in extragastric regions like oral cavity and middle ear. Some authors have shown evidence that it could also be present in tonsillar tissue, but there are contradictory data about its presence in this site. Bacterial presence in adenotonsillar tissue could be an extragastric reservoir for its transmission and/or reinfection.

Material and methods: We considered 50 patients (7.4 ± 2.9 years) scheduled for tonsillectomy for recurrent pharyngotonsillitis at the Hospital Miguel Hidalgo of Aguascalientes in 2012. RUT was performed from tonsillar tissue in urea buffer. Tonsillar tissue was seeded in blood agar base and incubated at 37 °C in microaerophilic conditions. Genomic DNA was used in PCR obtained from tonsillar tissue for amplification of the segments corresponding to *ureC* and *hsp60* specific bacterial genes.

Results: All samples were negative to RUT. Bacterial culture was negative in all tonsillar tissue samples. PCR amplification of *ureC* and *hsp60* was not identified in any of the patient samples.

Conclusion: The presence of *H. pylori* was not demonstrated in tonsils of recurrent pharyngotonsillitis patients using 3 different methodologies.

Introducción

El *Helicobacter pylori* es una bacteria Gram-negativa, espiral y microaerofílica que coloniza el estómago humano.

Se encuentra en la mucosa gástrica de aproximadamente el 50% de la población mundial. La infección ocurre en todo el mundo, pero su prevalencia es significativamente diferente en cada país. Los estudios de factores de riesgo han asociado su prevalencia a indicadores socioeconómicos, con una mayor prevalencia en las regiones en desarrollo y menor en las desarrolladas. Generalmente es adquirido en la infancia y puede persistir durante toda la vida del paciente.

El mecanismo exacto de transmisión aún no está completamente claro. Los modos posibles de transmisión son oral-oral, fecal-oral y gastrointestinal-oral. El curso típico de la enfermedad inicia con una gastritis superficial crónica que eventualmente progresa a gastritis atrófica, la cual inicia una cascada de acontecimientos que termina en el desarrollo de carcinoma gástrico. Sin embargo, cerca del 80% de los humanos infectados son asintomáticos.

Varios factores han sido asociados con el daño epitelial y la agresividad de *H. pylori*, incluyendo la citotoxina vacuolizante (VacA), el gen A citotoxina-asociado (*cagA*), el lipopolisacárido de superficie (LPS), la ureasa bacteriana, el flagelo y las adhesinas de superficie. *H. pylori* necesita un ambiente microaerofílico (5% de CO₂) para reproducirse. De hecho, para la bacteria es imposible vivir y reproducirse en el ambiente ácido de la mucosa gástrica. La enzima ureasa producida por la bacteria neutraliza el microambiente para facilitar su colonización.

Una vez que se produce la colonización de la mucosa gástrica, *H. pylori* induce una reacción inflamatoria sistémica por procesos inmunogénicos, la cual progresivamente produce las manifestaciones clínicas de la infección. Los factores del huésped, incluyendo

el interferón gamma; el factor de necrosis tumoral $\alpha 5$; las interleucinas 1, 2, 6, 8 y 12; los linfocitos T y B; y las células fagocíticas juegan un papel importante en este proceso. Al incrementar la concentración de reactantes de fase aguda, tales como ácido siálico, fibrinógeno, lipoproteínas y proteína C reactiva, la infección crónica por *H. pylori* puede causar efectos sistémicos. Está también demostrado que *H. pylori* incrementa la velocidad de la muerte programada de las células mucosas, conocida como apoptosis.

Desde que Marshall y Warren describieron por primera vez en 1982 al *H. pylori* en la patogénesis de la enfermedad ulcerosa gástrica y duodenal, ha sido sujeto de muchas investigaciones.

El *H. pylori* está considerado como un importante agente responsable de enfermedades gastroduodenales. Es la principal causa de gastritis crónica, enfermedad ulcerosa péptica, linfoma de bajo grado de la mucosa gástrica asociada al tejido linfoide y el más importante factor de riesgo para adenocarcinoma gástrico.

Las amígdalas son órganos que tienen tres orígenes histológicos diferentes:

- a. Epitelial, que nace del revestimiento de la cavidad buconasal primitiva.
- b. Estroma mesenquimatoso.
- c. Células linfoides.

Inician su desarrollo al principio del tercer mes gestacional, a partir de la penetración de 8 a 12 cordones epiteliales sólidos provenientes del endodermo de la porción ventral de las segundas bolsas faríngeas en el mesénquima de las paredes laterales faríngeas.

El revestimiento epitelial crece penetrando en el tejido mesenquimatoso; las células de las porciones centrales de estas cuñas de epitelio mueren y sus restos se esfacelan y desaparecen. De esta forma se constituye la canalización de las criptas amigdalinas. El epitelio se diferencia ulteriormente en tipo escamoso estratificado no queratinizado. Las criptas pueden ser relativamente complejas dependiendo de si tiene lugar la formación de yemas secundarias de células epiteliales provenientes del crecimiento interno inicial. En el

cuarto mes de gestación ocurre la infiltración de células linfoides, el 50% linfocitos T y el 50% linfocitos B, con la formación de folículos que ya se encuentran bien constituidos al final del séptimo mes gestacional. Después del nacimiento, las amígdalas continúan su crecimiento y hacen prominencia hacia fuera de la hendidura original hacia la cavidad bucal y a la faringe.

Una amígdala promedio contiene entre 16 y 20 criptas, que son túbulos ciegos recubiertos con epitelio escamoso estratificado originados en la superficie de las amígdalas que se extienden hasta su parte profunda lo cual permite una mayor área de exposición antigénica desde la superficie y contacto con los linfocitos de los folículos linfoides localizados interiormente.

La luz de las criptas suele estar ocupada por células epiteliales descamadas, linfocitos, microorganismos y materiales secretados. Una acumulación excesiva de tales materiales se conoce como *caseum*, que puede dar lugar a halitosis y a molestias locales, y con el tiempo se pueden calcificar. Las amígdalas palatinas se localizan en la pared lateral de la orofaringe, en la fosa amigdalina; su lecho es el músculo constrictor superior de la faringe y se ubican entre el pilar anterior formado por el músculo palatogloso y el pilar posterior formado por el músculo palatofaríngeo. La cápsula que limita la pared lateral de las amígdalas es una continuación delgada de la aponeurosis faringobasilar, conformada por tejido conectivo laxo fibroso.

La irrigación arterial se encuentra dada por cuatro ramas de la carótida externa (arterias facial, lingual, faríngea ascendente y maxilar interna): en el polo superior, la faríngea ascendente posteriormente y ciertas ramas de la arteria palatina inferior anteriormente; en el polo inferior, la dorsal lingual anteriormente, la palatina ascendente rama de la arteria facial posteriormente y el tronco amigdalino de la arteria facial. La arteria carótida interna, que no origina ramas en el cuello, ni aporta irrigación a la amígdala, se localiza a 2.5 cm por detrás y afuera en el espacio parafaríngeo.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

El drenaje venoso está dado a través del plexo venoso por las venas faríngeas y linguales hacia la yugular interna. Sus linfáticos eferentes drenan hacia los ganglios yugulodigástricos; carecen de linfáticos aferentes, por lo que las metástasis son inusuales.

El suplemento nervioso tiene lugar a través de ramas amigdalinas provenientes del glossofaríngeo en el polo inferior y posterior de la amígdala y a través de ramas descendentes del nervio palatino menor, provenientes del ganglio pterigopalatino. El nervio glossofaríngeo resulta frecuentemente irritado después de una amigdalectomía y produce una pérdida transitoria del gusto en el tercio posterior de la lengua, así como otalgia referida por irritación de su rama timpánica. El tejido amigdalino está inervado además por las divisiones adrenérgicas y colinérgicas del sistema nervioso autónomo.

Los linfocitos del tejido linfoide de las amígdalas forman una primera línea de defensa de la vía aerodigestiva superior contra microorganismos patógenos, estimulando las reacciones inmunitarias locales y generales del organismo. Las células que las conforman son linfocitos T, linfocitos B y células plasmáticas productoras de anticuerpos. Sus funciones inmunológicas principales son la producción de anticuerpos contra antígenos específicos, especialmente inmunoglobulina A contra antígenos virales; además, se produce inmunoglobulina E, la cual media la reacción de hipersensibilidad.

Existen células membranosas que transportan activamente el antígeno hacia los linfocitos T cooperadores (a diferencia de los ganglios linfáticos, que dependen del aporte del antígeno por medio de los vasos linfáticos), permitiendo el contacto del antígeno a través de las células presentadoras de antígeno como macrófagos, células dendríticas, células endoteliales HLA-DR-positivas y células epiteliales, con las células de los folículos linfáticos; la interacción de los linfocitos T cooperadores con las células de los folículos resulta en el aumento de la producción de anticuerpos.

La función esencial de los centros germinativos de las amígdalas es la generación de células B. La regulación de la proliferación de células B y de anticuerpos está determinada por los linfocitos T extrafoliculares, a través de la función cooperadora y supresora (Ts). Este

equilibrio puede verse alterado con la infección por el virus de Epstein-Barr, que produce una gran cantidad de células T, permitiendo la infección y persistencia de gérmenes. Además se registra producción local de células plasmáticas y linfocitos que pueden migrar hacia otros sitios.

Otra función importante de las células T es la memoria inmunológica, que se almacena en la parte externa de su membrana, lo cual le permite combinarse con los antígenos ya procesados. Este reconocimiento forma parte de la hipersensibilidad tardía que protege contra infecciones de virus y hongos. Estas células T producen interferón gamma y linfocinas, que se piensa ayudan para el control de tumores e infecciones crónicas por virus.

En presencia de inflamación crónica de amígdalas, se observa una alteración en el transporte de oxígeno por un escape de células M que son sustituidas por epitelio escamoso estratificado, por lo que se registra una disminución de células B, de su actividad y de la producción de anticuerpos.

La función inmunológica del sistema linfoide varía con la edad. En niños hasta los 5-6 años predomina la inflamación de las adenoides, en niños entre 3 y hasta 12 años tienen particular importancia las amígdalas, cuando son frecuentes las infecciones de las vías respiratorias superiores, creciendo estas estructuras en relación con su actividad inmunológica, para más tarde sufrir una lenta involución a partir de los 12-15 años de edad. El tejido linfoide lingual persiste activo durante más tiempo, hasta la edad adulta, etapa en la que es más común la amigdalitis lingual.

La agammaglobulinemia de Bruton indica un papel vital de estas estructuras en el balance inmunológico; sin embargo, no se ha demostrado inmunodeficiencia en los pacientes operados de adenoidectomía y amigdalectomía.

Existe flora normal desde las primeras 12-24 horas de vida extrauterina en la cavidad oral, orofaringe y nasofaringe. Los *Staphylococcus* son los primeros gérmenes en aparecer. La región se encuentra colonizada en pacientes sanos por bacterias anaerobias (*Bacteroides*,

Lactobacillus y *Actinomyces*) y aerobias (*Streptococcus*) en proporción de 10:1; existen tanto bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus*) como Gram-negativas (*Haemophilus*). La flora normal parece proporcionar al individuo una barrera resistente y eficaz contra algunos gérmenes.

La amigdalitis es la inflamación de las amígdalas palatinas en respuesta a una infección; puede resultar afectado simultáneamente el resto del tejido linfoide del anillo de Waldeyer, la mucosa faríngea o existir predominio clínico de las amígdalas palatinas.

Existe una alta prevalencia de infecciones respiratorias altas en todas las edades, especialmente frecuentes en el grupo de preescolares y escolares. Las guarderías y el hacinamiento son causa de infecciones frecuentes y recurrentes de las vías respiratorias.

La presentación clínica incluye dolor faríngeo a la deglución, fiebre y puede acompañarse de otalgia refleja y malestar general. Las amígdalas se encuentran eritematosas, aumentadas de volumen y puede haber exudado amigdalino, purulento y petequias periamigdalinas; es común la linfadenopatía cervical a nivel yugulodigástrico. Habitualmente el proceso se autolimita en un período de 5-7 días. El cuadro clínico no distingue si es causa viral o bacteriana.

Capítulos

I. Marco teórico

Helicobacter pylori es una bacteria Gram-negativa, espiral y microaerofílica que coloniza el estómago humano.¹ Se encuentra en la mucosa gástrica de aproximadamente el 50% de la población mundial. Es la principal causa de gastritis crónica, enfermedad ulcerosa péptica, linfoma de bajo grado de la mucosa gástrica asociada al tejido linfoide y el más importante factor de riesgo para adenocarcinoma gástrico.²

En la actualidad *H. pylori* no sólo es considerado como un agente causal de enfermedades gastroduodenales sino también como un microorganismo que se puede presentar en sitios extragástricos, pues se ha detectado en cavidad bucal, en oído medio, en senos paranasales y en laringe.³ Existen algunos autores que muestran evidencias que pudiera presentarse también en amígdalas y adenoides,¹ indicando la posibilidad que este tipo de tejidos pudieran constituir un reservorio extragástrico para *H. pylori*, aunque algunos de sus resultados presentan datos contradictorios en relación a la presencia de la bacteria en tejido amigdalino.⁴

Los estudios para la identificación de *H. pylori* en amígdalas han sido realizados mediante distintas metodologías. Mediante la prueba rápida de ureasa (RUT) a partir de tejido amigdalino Lin y cols. determinaron en una población de individuos adultos con amigdalitis recurrente un alto porcentaje de positividad a la bacteria, siendo este cercano al 50%.⁵ Sin embargo otros estudios muestran porcentajes de positividad a la actividad ureasa considerablemente menores, Eyigor y cols. encontraron esta en sólo el 5.5% de las muestras de tejido amigdalino analizadas en individuos con amigdalitis crónica⁶ y en un estudio de Skinner y cols. no se identificó positividad a la ureasa en un análisis de 50 individuos.⁷

El cultivo de *H. pylori* a partir de biopsias gástricas está considerado como una prueba diagnóstica de referencia para determinar colonización gástrica. Wibawa y cols. determinaron a través de cultivo amigdalino la presencia de la bacteria en 3 individuos (15.7%) de un total de 19 pacientes con amigdalitis crónica¹ y Kusano y cols. no encontraron su presencia en las amígdalas de 41 pacientes con faringoamigdalitis recurrente por el mismo método.⁸

Los estudios por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son los más sensibles y específicos para la identificación de *H. pylori*. Trabajos realizados mediante análisis de PCR para el gen *ureC* han detectado la bacteria en amígdalas de pacientes con amigdalitis crónica o recurrente.⁹ Por el contrario, Eyigor y cols. estudiando una población de 55 pacientes con amigdalitis recurrente no identificaron la bacteria realizando también un análisis de PCR para el gen *ureC*.⁶

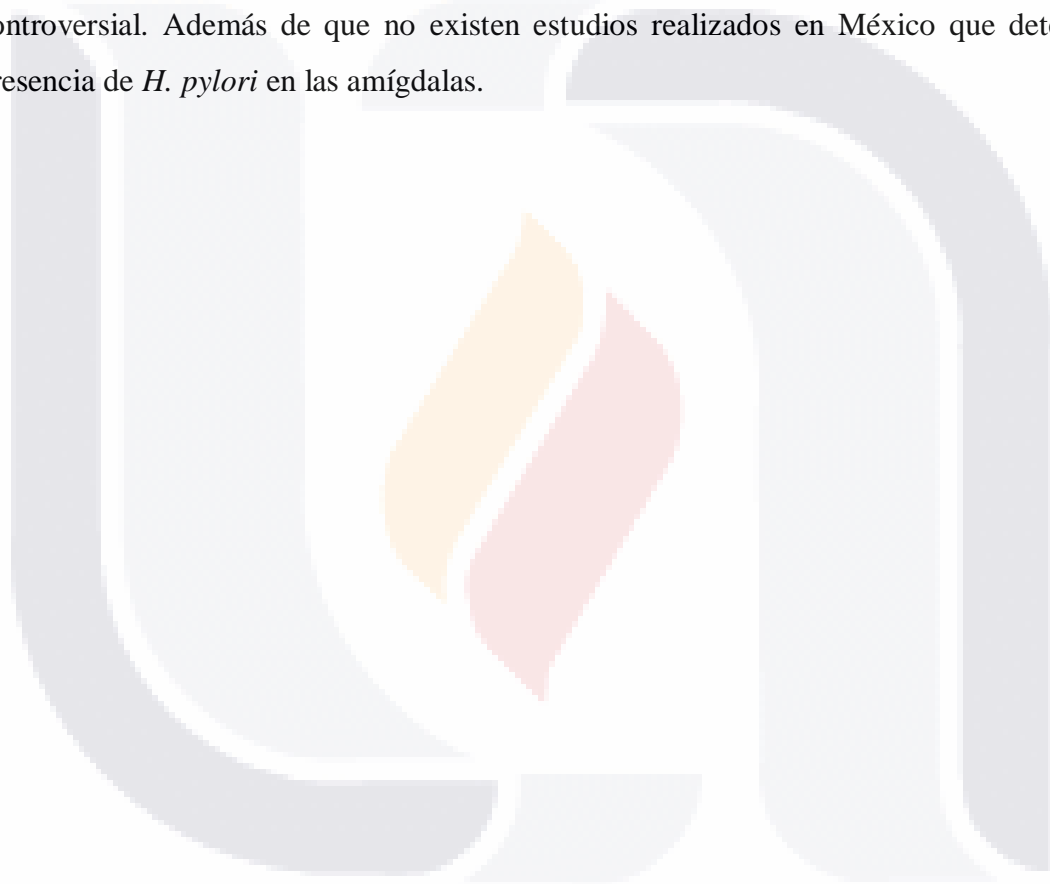
El mecanismo exacto en que la bacteria se transmite de un individuo a otro aún no está completamente claro. Los modos posibles de transmisión que se han propuesto son oral-oral, fecal-oral y gastrointestinal-oral.³ Por esta última vía la secreción gástrica contaminada por *H. pylori*, pudiera entrar a la cavidad nasofaríngea mediante reflujo gastroesofágico y colonizar las placas dentales y el tejido adenoamigdalino. La retención de la bacteria en amígdalas mediante este proceso pudiera estar relacionada con la unión de la bacteria a tejido linfoide asociado a mucosas (MALT). Este tipo de tejido está presente en la cavidad oral y áreas que conforman el anillo de Waldeyer del cuál las amígdalas y adenoides forman parte. La presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica se encuentra ligada a MALT. Este tipo de tejido linfoide es semejante al adenoamigdalino.⁹ La interacción entre *H. pylori* y MALT está fuertemente sostenida por reportes de regresión de linfomas MALT del estómago, recto y glándulas salivales después de su erradicación. El efecto inflamatorio de *H. pylori* en MALT se podría extender a los sitios extragástricos en los cuales el MALT juega un papel importante en la protección tisular, por ejemplo las amígdalas.⁷

La amigdalectomía es uno de los procedimientos quirúrgicos más comunes en el campo de la otorrinolaringología. La inflamación recurrente que causa amigdalitis crónica es una de las indicaciones más comunes de amigdalectomía.⁵ Según Paradise y cols. la faringoamigdalitis es recurrente cuando se presentan 7 o más episodios de faringoamigdalitis aguda en el último año, 5 por año en los últimos 2 años, ó 3 por año en los últimos 3 años.¹⁰



II. Planteamiento del problema

Se ha sugerido que los tejidos adenoamigdalinos pueden constituir un reservorio extragástrico para *H. pylori*⁴ y ser fuente de autoinfección o de transmisión a nuevos hospederos. Además puede causar un efecto inflamatorio.⁷ Decidimos realizar este estudio debido a que los reportes existentes muestran diferencias con respecto a la presencia de *H. pylori* en las amígdalas, siendo la hipótesis de que *H. pylori* puede colonizarlas un asunto controversial. Además de que no existen estudios realizados en México que detecten la presencia de *H. pylori* en las amígdalas.



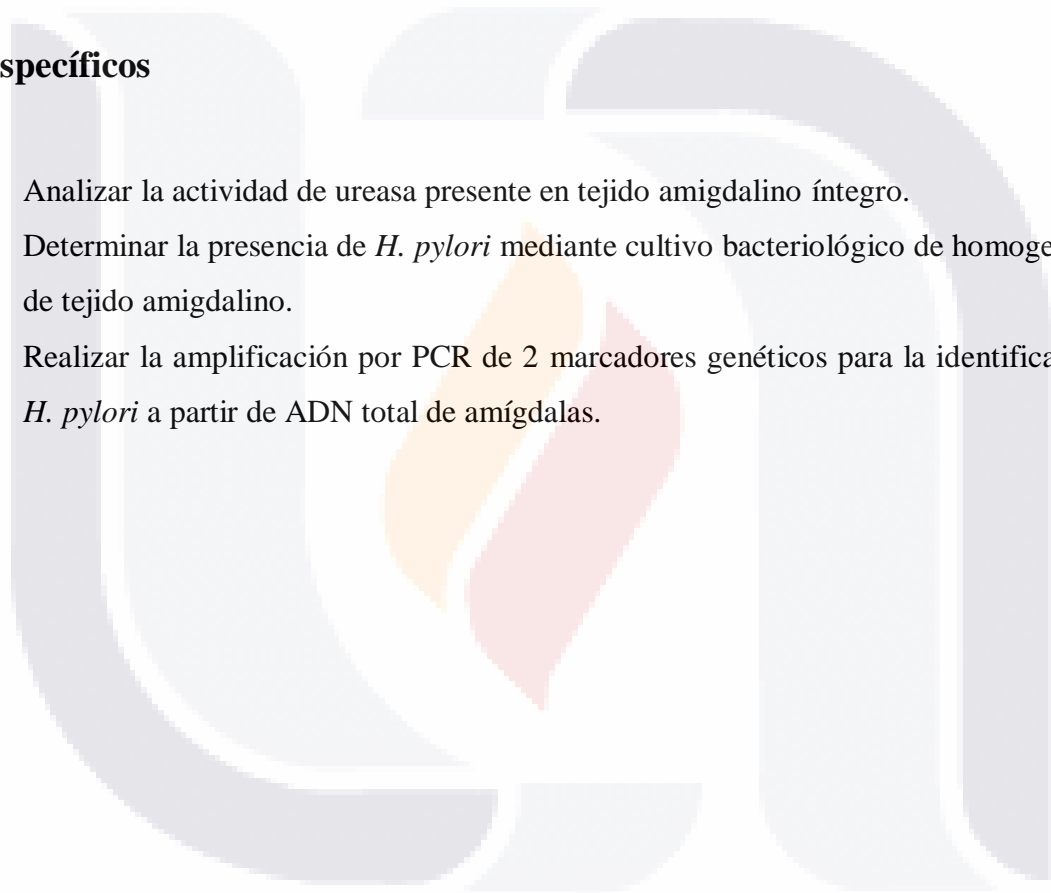
III. Objetivos

General

Identificar la presencia de *H. pylori* en amígdalas de pacientes con faringoamigdalitis recurrente del Centenario Hospital Miguel Hidalgo de Aguascalientes durante el 2012.

Específicos

1. Analizar la actividad de ureasa presente en tejido amigdalino íntegro.
2. Determinar la presencia de *H. pylori* mediante cultivo bacteriológico de homogenizados de tejido amigdalino.
3. Realizar la amplificación por PCR de 2 marcadores genéticos para la identificación de *H. pylori* a partir de ADN total de amígdalas.



IV. Hipótesis

Hi: La bacteria *H. pylori* está presente en tejido amigdalino.

Ho: La bacteria *H. pylori* no está presente en tejido amigdalino.



V. Material y métodos

Se realizó un estudio observacional, transversal y prospectivo con los pacientes programados para amigdalectomía en el Centenario Hospital Miguel Hidalgo de Aguascalientes durante el 2012 que tenían la indicación de faringoamigdalitis recurrente y que no habían usado antiácidos, bloqueadores H2 o antibióticos durante el mes previo a la cirugía.

Las amígdalas se resecaron bajo anestesia general con la técnica clásica de disección y electrocauterización. Inmediatamente después de la resección quirúrgica de la primera amígdala (amígdala izquierda) se tomaron muestras de su tejido para RUT, PCR y cultivo. Las muestras para PCR se conservaron en etanol a -20 °C hasta su procesamiento. El tejido utilizado para cultivo se transportó en caldo tioglicolato a 4 °C y el procesamiento fue efectuado en las siguientes 12 horas.

Prueba rápida de ureasa (RUT). Se realizó a partir de la incubación de la biopsia de tejido amigdalino recién resecado en 0.5 ml de buffer de urea (10% urea, 0.1% rojo fenol, pH 5.5). La prueba se consideró positiva cuando se presentó un viraje de color de amarillo a rosa dentro de los primeros 30 minutos de incubación.¹¹

Cultivo de *H. pylori*. El cultivo de la bacteria se realizó a partir tejido amigdalino homogenizado inoculado en placas de base de agar (Bioxon) al 10% de sangre desfibrinada de borrego suplementado con los antibióticos vancomicina trimetoprim, amfotericina B y cefsulodina para la selección de *H. pylori* (SR0147 Dent, Oxoid). Las placas fueron incubadas a 37 °C en condiciones microaerofílicas.¹² La identificación de la bacteria se realizó mediante morfología colonial (colonias brillantes y transparentes de 1 a 2 mm de diámetro), positividad a la prueba de la ureasa y catalasa así como observación de bacilos curvos Gram-negativos. Para la identificación de la bacteria se realizó un seguimiento durante 7 días de incubación.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Oligonucleótidos para análisis de PCR. Para el gen *ureC* se utilizaron los siguientes cebadores: glmM1, 5'-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3' y glmM2, 5'-AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3', para obtener un producto de 294 pb (Anexo A).¹³ Mientras que para el gen *hsp60* los cebadores utilizados fueron: HSP1, 5'-AAGGCATGCAATTTGATAGAGGCT-3' y HSP2, 5'-CTTTTTTCTCTTTCATTTCCACTT-3', cuyo producto es de 590 pb (Anexo B).¹⁴ Para la amplificación del gen humano *Nod1* usado como control de integridad de ADN se utilizaron los cebadores: FNOD1, 5'-GTGTTCCCTTCCTAGTCTTGCGTCC-3' y RNOD1, 5'-TGGACGACAAAGCAAGACCCTATCA-3', para la obtención de un producto 164 pb, estos oligonucleótidos fueron diseñados en base a la secuencia reportada en GenBank para este gen (NM_006092.2).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ADN genómico usado en los análisis de PCR se obtuvo a partir de tejido amigdalino mediante la técnica de fenol-cloroformo.¹⁵ Las reacciones de PCR se prepararon con la siguiente mezcla: 1.25 µl de Buffer PCR (10X), 0.32 µl de dNTPs (10 mM), 0.25 µl de MgCl₂ (50 mM), 0.5 µl de primers sentido (30 pmoles/µl), 0.5 µl de primers antisentido (30 pmoles/µl), 0.5 µl de ADNg (300 ng/µl), Taq DNA pol (5 U/µl; invitrogen) y completado con H₂O en un volumen final de 12.5 µl. La amplificación se llevó a cabo mediante una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min seguida de 40 ciclos de 30 s a 95 °C, 1 min a 50 °C y 1 min a 72 °C y una elongación final de 2 min a 72 °C. Los productos de amplificación fueron teñidos con bromuro de etidio y separados por electroforesis en gel de agarosa al 3% en Buffer TBE. Para la reamplificación se utilizó como ADN molde 0.5 µl de la reacción de PCR, utilizando los mismos cebadores y condiciones de la primera amplificación.

Se utilizó estadística descriptiva.

VI. Resultados

El estudio consideró una población de 50 pacientes con indicación de faringoamigdalitis recurrente para la realización de amigdalectomía. Dentro de esta población el 62% correspondió a pacientes del sexo masculino (n=31) y un 38% al sexo femenino (n=19). Los individuos del estudio presentaron un rango de edad de entre 1 y 42 años con una media de 7.4 ± 2.9 años.

Para identificar actividad ureasa en el tejido amigdalino de la población de estudio se realizó una prueba rápida a partir de muestras de cada uno de los individuos. Este análisis se presentó negativo en todos los casos, indicando la ausencia de actividad ureasa en el tejido amigdalino de nuestra población, siendo sólo positivo en la muestra gástrica con *H. pylori* usada como control positivo (Figura 1).



Figura 1. Prueba rápida de ureasa. La prueba se considera positiva cuando se presenta un viraje de color de amarillo a rosa dentro de los primeros 30 minutos de incubación.

En ninguno de los cultivos de tejido amigdalino realizados en los individuos de estudio se observó el desarrollo de colonias con características típicas de la bacteria, sólo en el cultivo del control positivo de tejido gástrico con *H. pylori* (Figura 2).

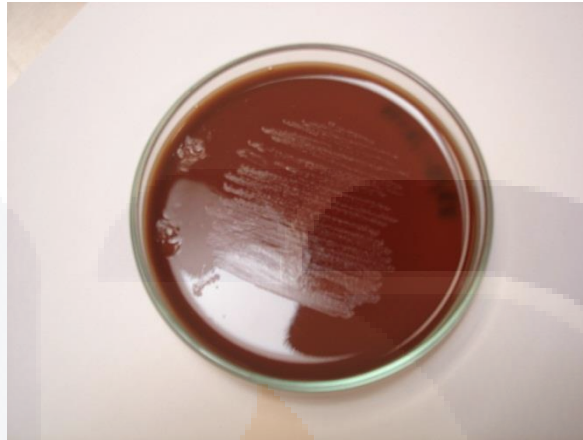


Figura 2. Cultivo de *H. pylori*. La identificación de la bacteria se realiza mediante morfología colonial (colonias brillantes y transparentes de 1 a 2 mm de diámetro) durante 7 días de incubación.

La presencia de la bacteria en las muestras amigdalinas se evaluó también mediante un análisis de PCR en el que se consideró la amplificación de segmentos de los genes *ureC* (294 pb) y *hsp60* (590 pb) de *H. pylori*. Al realizar este análisis para el gen *hsp60*, el producto de 590 pb fue amplificado claramente a partir del ADN de *H. pylori* utilizado como control positivo (Figura 3, carril 31), más sin embargo en ninguna de las muestras de ADN de la población de pacientes se generó la amplificación correspondiente (Figura 3).

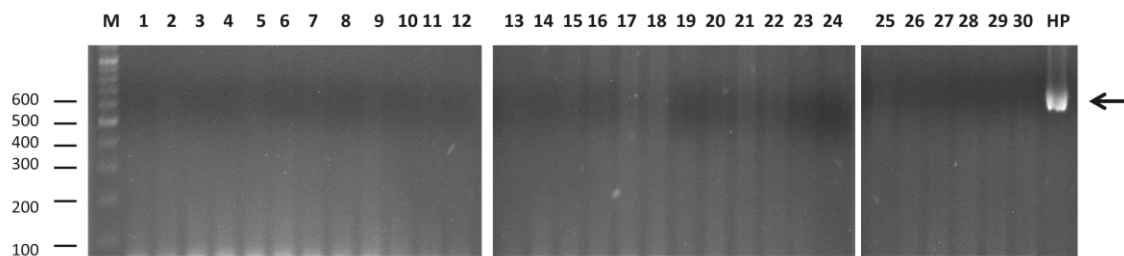


Figura 3. Amplificación del gen *hsp60* por PCR a partir de ADN genómico de tejido amigdalino. Se presenta la migración electroforética de 30 pacientes (carriles 1 - 30) de un total de 50 pacientes analizados, amplificación con ADN de *H. pylori* control positivo (HP) y marcador de peso (M). Se indica con la flecha el producto de amplificación específico de *hsp60* (590 pb).

La amplificación del gen *ureC* generó un producto de 294 pb sólo en el control positivo de *H. pylori* (Figura 4, carril 31), pero en ninguna de las muestras de los pacientes (Figura 4).

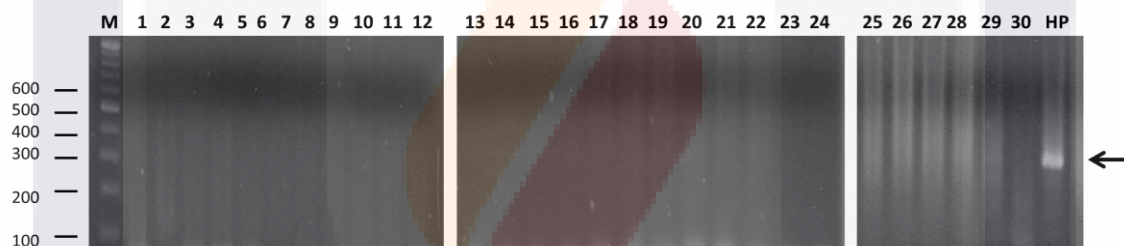


Figura 4. Amplificación del gen *ureC* por PCR a partir de ADN genómico de tejido amigdalino. Se presenta la migración electroforética de 30 pacientes (carriles 1 - 30) de un total de 50 pacientes analizados, amplificación con ADN de *H. pylori* control positivo (HP) y marcador de peso (M). Se indica con la flecha el producto de amplificación específico de *ureC* (294 pb).

Considerando la posibilidad de que la bacteria no hubiera sido detectada en la primera amplificación porque se encontrara en una densidad muy baja en el tejido, se realizó la reamplificación de los genes *ureC* y *hsp60* en todas las muestras resultantes del primer análisis de amplificación. Tampoco fue identificado en ninguna de ellas el producto correspondiente a los dos genes analizados.

Debido a la posibilidad que la ausencia de los productos de amplificación para los genes *ureC* y *hsp60* específicos de la bacteria pudiera ser consecuencia de muestras de ADN

genómico de una calidad inadecuada para la amplificación por PCR, se realizó la amplificación del gen humano *Nod1* a partir de las muestras de ADN utilizadas en el estudio. Mediante este análisis se identificó el producto de PCR de 164 pb específico del gen *Nod1* en todas las muestras de ADN de tejido amigdalino (Figura 5), comprobando así que la calidad del ADN de las muestras utilizadas es adecuada para un análisis de PCR.

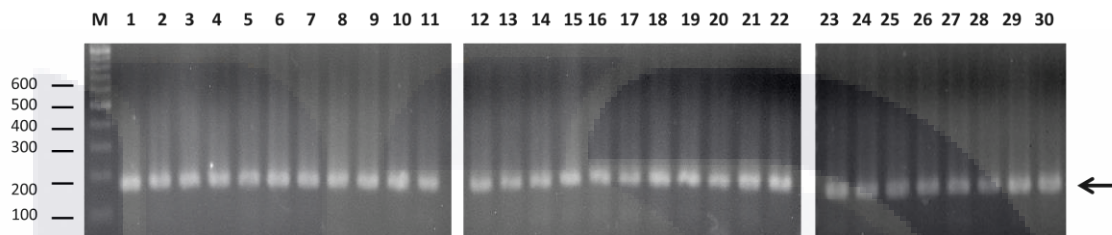


Figura 5. Amplificación del gen *Nod1* por PCR a partir de ADN genómico de tejido amigdalino. Se presenta la migración electroforética de 30 pacientes (carriles 1 - 30) de un total de 50 pacientes analizados y marcador de peso (M). Se indica con la flecha el producto de amplificación específico de *Nod1* (164 pb).

VII. Discusión

Diferentes autores han llegado a conclusiones radicalmente opuestas en relación a la presencia de la bacteria en las amígdalas. Esta disparidad de resultados bien pudiera ser consecuencia de las características particulares de la selección de la población de estudio, ya sea infantil, adulta o mixta, pues la prevalencia de infección gástrica en población general se incrementa con la edad.^{16,17} En nuestro estudio se trabajó con una población mixta en la que no se identificó la bacteria. Otros estudios con poblaciones mixtas equivalentes a nuestro trabajo, han llegado a resultados semejantes. Resultando interesante que algunos de estos estudios han demostrado mediante estudios serológicos la prevalencia de la bacteria pero su ausencia en tejido amigdalino.⁷

Otro aspecto que de manera importante puede generar disparidad en la identificación de *H. pylori* es la aplicación de metodologías validadas para su diagnóstico gástrico, mas no para diagnóstico en regiones extragástricas como lo es el caso de la cavidad bucal y otros tejidos como adenoides y amígdalas. La RUT no es una prueba específica para *H. pylori*, sino para microorganismos productores de ureasa, por lo que en sitios con mayor diversificación de especies bacterianas que la mucosa gástrica, como es el caso del tejido amigdalino, la positividad pudiera ser resultado de una reacción cruzada con otras especies productoras de ureasa.⁴ Siendo esta una posible explicación de que en algunos estudios se presenten datos de positividad a ureasa en tejido amigdalino sin una correlación con otros métodos diagnósticos.⁹

En ninguna de las muestras amigdalinas de los 50 pacientes incluidos en nuestro estudio identificamos la presencia de *H. pylori* mediante cultivo de tejido amigdalino. La mayor parte de los trabajos que han intentado identificar la bacteria en amígdalas mediante esta metodología han llegado a conclusiones semejantes a las mostradas en nuestro trabajo.^{8,18} Por lo que llama la atención el trabajo de Wibawa y cols., que mediante cultivo de tejido amigdalino, realizan el aislamiento de *H. pylori* viable a partir de individuos de una población de pacientes con amigdalitis crónica.¹ Este tipo de resultados controversiales

además de que pudieran estar relacionados con factores particulares de la población analizada (ej. edad y consumo de antibióticos) pudieran estar vinculados con características de cultivo de *H. pylori*. Como ocurre con otros bacilos Gram-negativos, *H. pylori* puede pasar a una forma cocoide y a un estado viable pero no cultivable, cuando se enfrenta con ambientes desfavorables, como pudiera ser el caso del tejido amigdalino. Esta situación puede reducir drásticamente la probabilidad de identificar la bacteria mediante cultivo de tejido amigdalino.⁸

La PCR es una metodología que permite la identificación de agentes patógenos con una alta sensibilidad pero también puede ser altamente específica si el gen estudiado y los cebadores son elegidos adecuadamente.⁴ La identificación de *H. pylori* en tejido amigdalino ha sido mostrada por algunos autores mediante la amplificación por PCR de genes altamente conservados a nivel especie tales como *RNA ribosomal 16S*.¹⁹ Pero también han sido identificados marcadores genéticos de patogenicidad de *H. pylori* tales como *CagA* a partir de ADN proveniente de amígdalas.²⁰ Sin embargo en nuestro estudio que incluyó un análisis de PCR para la identificación de los genes *hsp60* y *ureC* que son marcadores especie-específicos altamente conservados, no se identificó la presencia de ADN de *H. pylori* en los especímenes de tejido amigdalino de nuestra población. Este resultado es congruente con varios trabajos en los que no logran identificar a la bacteria en amígdalas mediante esta metodología.^{4,6}

Si bien este tipo de datos generan en una primera instancia un panorama complicado de interpretar, la identificación de *H. pylori* en amígdalas parece correlacionar con el incremento en la edad de la población analizada. Los estudios en poblaciones adultas o en poblaciones mixtas con edades promedio mayores a los 10 años presentan una mayor probabilidad de identificar la bacteria en amígdalas,^{19,20} mientras que algunos estudios en población infantil muestran una reducción de esta probabilidad.²¹ Nuestro estudio incluyó una población mixta pero con una preponderancia de individuos menores a los 10 años (7.4 ± 2.9 años). La mayor probabilidad de identificación de la bacteria en amígdalas pudiera también asociarse a poblaciones con mayores tasas de prevalencia de la bacteria y aunado a

esto otros factores como la presencia de reflujo gastroesofágico pudieran tener un papel importante.



Conclusiones

La presencia de *H. pylori* en amígdalas de pacientes con faringoamigdalitis recurrente no fue identificada utilizando 3 distintas estrategias metodológicas. Mediante los análisis de RUT y cultivo no se encontraron bacterias viables, así mismo no hubo amplificación por PCR de los genes *ureC* y *hsp60* de *H. pylori* a partir de tejido amigdalino.



Glosario

Amígdalas: Extensiones de tejido linfoide situados en la orofaringe que ayudan a proteger la entrada de las vías respiratorias de los microorganismos.

Amigdalectomía: Procedimiento quirúrgico por medio del cual se extirpan las amígdalas.

Cultivo: Método para la multiplicación de microorganismos, tales como bacterias, hongos y parásitos, en el que se prepara un medio óptimo para favorecer el proceso deseado.

Faringoamigdalitis: Inflamación de la faringe y de las amígdalas.

Faringoamigdalitis recurrente: Es cuando se presentan 7 o más episodios de faringoamigdalitis aguda en el último año, 5 por año en los últimos 2 años, ó 3 por año en los últimos 3 años.

Helicobacter pylori: Bacteria Gram-negativa, espiral y microaerofílica que generalmente coloniza el estómago humano.

Prueba rápida de ureasa: Método sencillo y económico de comprobar la presencia de microorganismos productores de ureasa, como la bacteria *Helicobacter pylori*, en un tejido.

Reacción en cadena de la polimerasa: Técnica de biología molecular que tiene como objetivo la amplificación directa de un gen (o fragmento de ADN) o indirecta de un ARN, presente en mezclas de muy diversas fuentes.

Bibliografía

1. Wibawa T, Surono A, Widodo I. Isolation of viable *Helicobacter pylori* in the tonsillar tissues of chronic tonsillitis patients. *J Infect Dev Ctries* 2011; 5:561-4.
2. Malfertheiner MV, Kandulski A, Schreiber J, Malfertheiner P. *Helicobacter pylori* infection and the respiratory system: a systematic review of the literature. *Digestion* 2011; 84:212-220.
3. Kurtaran H, Uyar ME, Kasapoglu B, et al. Role of *Helicobacter pylori* in pathogenesis of upper respiratory system diseases. *J Natl Med Assoc* 2008; 100:1224-1230.
4. Vilarinho S, Guimarães NM, Ferreira RM, et al. *Helicobacter pylori* colonization of the adenotonsillar tissue: fact or fiction? *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2010; 74:807-811.
5. Lin HC, Wu PY, Friedman M, Chang HW, Wilson M. Difference of *Helicobacter pylori* colonization in recurrent inflammatory and simple hyperplastic tonsil tissues. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2010; 136:468-470.
6. Eyigor M, Eyigor H, Gultekin B, Aydin N. Detection of *Helicobacter pylori* in adenotonsillar tissue specimens by rapid urease test and polymerase chain reaction. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2009; 266:1611-3.
7. Skinner LJ, Winter DC, Curran AJ, et al. *Helicobacter pylori* and tonsillectomy. *Clin Otolaryngol* 2001; 26:505-9.
8. Kusano K, Inokuchi A, Fujimoto K, et al. Coccoid *Helicobacter pylori* exists in the palatine tonsils of patients with IgA nephropathy. *J Gastroenterol* 2010; 45:406-412.

9. Abdel-Monem MH, Magd EA, Nour YA, Harfoush RA, Ibreak A. Detection of *Helicobacter pylori* in adenotonsillar tissue of children with chronic adenotonsillitis using rapid urease test, PCR and blood serology: a prospective study. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2011; 75:568-572.
10. Paradise JL, Bluestone CD, Bachman RZ, et al. Efficacy of tonsillectomy for recurrent throat infection in severely affected children. Results of parallel randomized and nonrandomized clinical trials. *N Engl J Med* 1984; 310(11):674-83.
11. Pande PR, Karki BB, Pande R, Khatri R. Evaluation of locally made rapid urease test for diagnosis of *Helicobacter pylori*. *PMJN* 2009; 9(2):50-3.
12. Muñoz L, González-Valencia G, Pérez-Pérez GI, Giono-Cerezo S, Muñoz O, Torres J. A comparison of Lewis x and Lewis y expression in *Helicobacter pylori* obtained from children and adults. *J Infect Dis* 2001; 183(7):1147-51.
13. Bickley J, Owen RJ, Fraser AG, Pounder RE. Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the *urease C* gene of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque. *J Med Microbiol* 1993; 39:338–344.
14. Singh V, Mishra S, Rao GRK, et al. Evaluation of nested PCR in detection of *Helicobacter pylori* targeting a highly conserved gene: *hsp60*. *Helicobacter* 2008; 13(1):30–4.
15. Falsafi T, Favaedi R, Mahjoub F, Najafi M. Application of stool-PCR test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. *World J Gastroenterol* 2009; 15(4):484-8.
16. Calvet X, Ramírez Lázaro MJ, Lehours P, Mégraud F. Diagnosis and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2013; 18(1):5-11.

17. Goh KL, Chan WK, Shiota S, Yamaoka Y. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and public health implications. *Helicobacter* 2011; 16(1):1-9.
18. Di Bonaventura G, Catamo G, Neri M, Neri G, Piccolomini R. Absence of *Helicobacter pylori* in tonsillar swabs from dyspeptic patients. *New Microbiol* 2000; 23(4):445-8.
19. Cirak MY, Ozdek A, Yilmaz D, Bayiz U, Samim E, Turet S. Detection of *Helicobacter pylori* and its *CagA* gene in tonsil and adenoid tissues by PCR. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 129(11):1225-9.
20. Nártová E, Kraus J, Pavlík E, et al. Presence of different genotypes of *Helicobacter pylori* in patients with chronic tonsillitis and sleep apnoea syndrome. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2013; Jul 18.
21. Yilmaz M, Kara CO, Kaleli I, et al. Are tonsils a reservoir for *Helicobacter pylori* infection in children? *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2004; 68:307-310.

Anexos

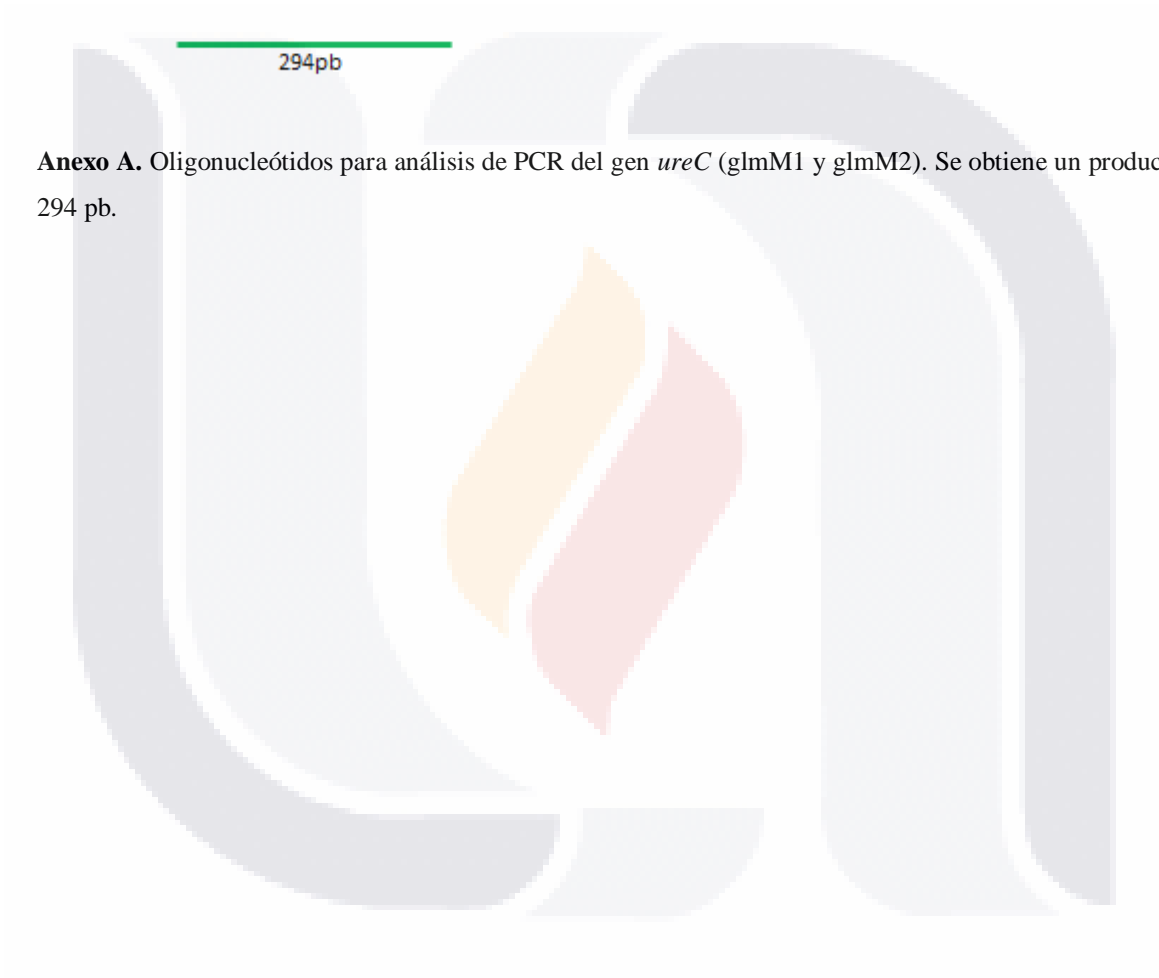
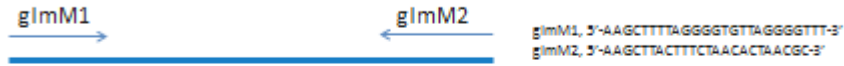
Anexo A. Oligonucleótidos para análisis de PCR del gen *ureC* (glmM1 y glmM2).

Anexo B. Oligonucleótidos para análisis de PCR del gen *hsp60* (HSP1 y HSP2).



Anexo A

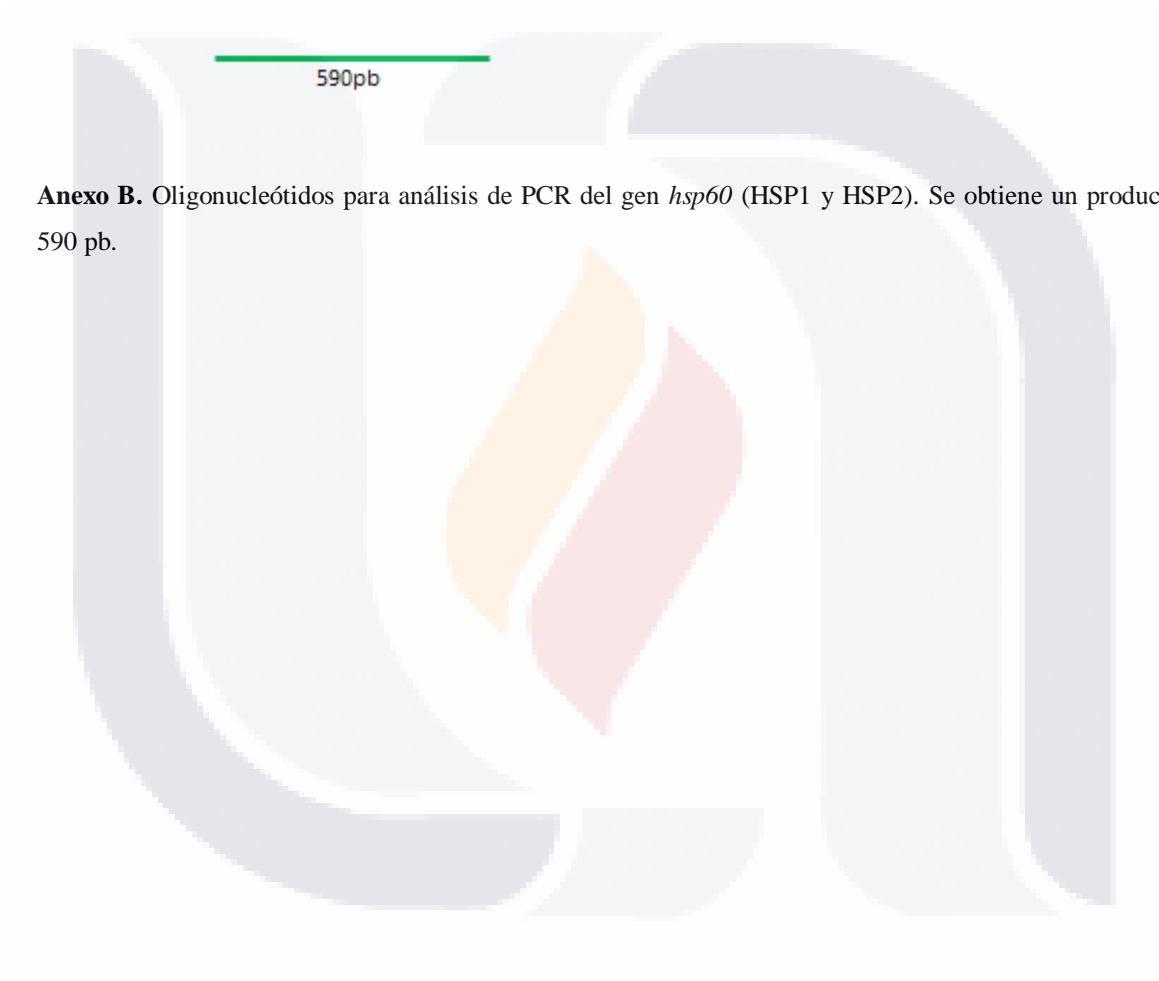
- *ureC*



Anexo A. Oligonucleótidos para análisis de PCR del gen *ureC* (glmM1 y glmM2). Se obtiene un producto de 294 pb.

Anexo B

• *hsp60*



Anexo B. Oligonucleótidos para análisis de PCR del gen *hsp60* (HSP1 y HSP2). Se obtiene un producto de 590 pb.