



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA

“IDENTIFICACION MOLECULAR DE *Helicobacter pylori*
EN CAVIDAD ORAL”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A :
ROXANA REYES RIOS

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. ADOLFO ROMAN ROMAN

CHILPANCINGO, GRO.,.

**“IDENTIFICACION MOLECULAR DE *Helicobacter pylori* EN
CAVIDAD ORAL”**

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar a este momento de mi vida, por llenar mi vida de bendiciones y dicha

Agradezco a mis padres por su amor, comprensión y apoyo en todos los ámbitos de mi vida, siempre los llevo conmigo.

A mis Hermanas por su compañía y por toda la ayuda que me brindan. Se que puedo contar con ellas.

A mi esposo por su amor y el gran apoyo que me ha brindado, se que siempre puedo contar contigo, te Amo.

Al M en C Adolfo Román Román, Dra. Gloria Fernández Tilapa, Dra. Adakatia Armenta Solís, Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez, Dra. Natividad Castro Alarcón, y Dr. Jesús Silva Sánchez por el tiempo y dedicación prestada a este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, Dino, Temo, Paco, Dane, y en especial a Abner por su amistad, paciencia y solidaridad.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Investigación Clínica de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en la ciudad de Chilpancingo Gro.

Bajo la dirección de

M en C Adolfo Román Román

y la asesoría de

Dra. Adakatia Armenta Solís, Tutora

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez, Asesor interno

Dra. Natividad Castro Alarcón, Asesor Interno

Dr. Jesús Silva Sánchez, Asesor Externo

Con la colaboración de

Gastroenterólogo, Reyes Betancourt Linares

Unidad de Gastroenterología y Endoscopia de Chilpancingo, Gro.

La investigación se desarrolló con financiamiento otorgado por la Secretaria de Educación Pública a través el Programa Integral de Fortalecimiento Institucional del año 2005 (PIFI, 3.2)

Durante el periodo que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, la C. Roxana Reyes Ríos recibió beca del CONACYT

INDICE

	Página
Resumen	6
Abstract	7
Introducción	8
Materiales y métodos	11
Resultados	14
Discusión y conclusiones	24
Referencias	28

RESUMEN

Introducción: *Helicobacter pylori* es un organismo espiral Gram negativo que infecta la mucosa gástrica humana, es la principal causa de enfermedad ulcero péptica y es un factor de riesgo para carcinoma gástrico y linfoma; sin embargo el modo de transmisión de la infección de *Helicobacter pylori* aun es desconocida.

Objetivos: Determinar la presencia y distribución del DNA de *Helicobacter pylori* en cavidad oral, así como identificar los factores del individuo que favorecen la presencia de la bacteria en cavidad oral de pacientes con patología gástrica.

Material y Métodos: A 112 pacientes que se les realizó un estudio endoscópico y se les investigó para la presencia del DNA de *Helicobacter pylori* en placa dental, saliva y carrillos – lengua, por PCR usando primers específicos para el gen 16S rRNA. Las muestras recolectadas correspondieron a placa dental de molares, premolares, saliva y carrillos y bordes laterales de lengua antes del estudio endoscópico para evitar contaminación. La cantidad de placa se clasificó de acuerdo al índice de placa de Loe – Sillness. **Resultados:** El DNA de *Helicobacter pylori* fue identificado en muestras de placa dental de 53 pacientes (47.3%) en 72 muestras de saliva (66.7%) y en 21 de carrillos – bordes laterales de lengua (18.4%). **Conclusión** *Helicobacter pylori* estuvo presente en in 75. 9% de los individuos analizados, por lo que la cavidad oral podría servir como reservorio para esta bacteria.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, cavidad oral, saliva placa dental, carrillos, lengua

ABSTRACT

Introduction: *Helicobacter pylori* is a gramnegative spiral organism infects the human gastric mucosa, has been a major cause of peptic ulcer disease and is a risk factor for gastric carcinoma and lymphoma; however the mode of transmission of *Helicobacter pylori* infection still remain unclear. **Objectives:** To determine the presence and distribution of *Helicobacter pylori* DNA as well as to identify factors of the individual that favor the presence of the bacterium in oral cavity of patients with gastric pathology. **Materials and Methods** 112 patients undergoing gastroscopy were investigated for the presence of *Helicobacter pylori* in dental plaque, saliva, cheeks – tongue by PCR using primers specific for 16S rRNA. Samples tested comprised dental plaque from molars, premolars, saliva and cheeks – lateral edges of the tongue, before gastroscopy study to avoid contamination. The patients' gingiva and plaque were assessed by the gingival and plaque indices of Sillness and Löe. **Results** *Helicobacter pylori* DNA was identified in dental plaque samples from 53 patients (47.3%), in 72 saliva samples (66.7%) and in 21 cheeks – lateral edges of tongue (18.4%). **Conclusion** *Helicobacter pylori* was in 75. 9% of the analyzed individuals, the oral cavity could serve like reservoir for these bacteria.

Key words: *Helicobacter pylori*, oral cavity, saliva, dental plaque, cheeks, tongue

Introducción.

Helicobacter pylori (*Hp*) es una bacteria patógena que ha sido implicada como el principal agente causal en la patogénesis de gastritis crónica, úlcera péptica, y constituye un importante factor de riesgo para el desarrollo de adenocarcinoma gástrico y linfoma. La prevalencia de la infección varía notablemente en todo el mundo, con una tasa del 90% en aquellos países en vías de desarrollo. En 1994 la Organización Mundial de la Salud clasificó esta bacteria como carcinógeno tipo.^{1 2} El mecanismo específico por el cual *Helicobacter pylori* es transmitida del estómago de una persona al de otra es muy controvertido, aunque algunas evidencias sugieren que ocurre predominantemente por el contacto de persona a persona.^{3,4}

La detección de la bacteria en saliva, y placa dental, en algunos pacientes, ha hecho que la cavidad bucal reciba especial interés como un posible reservorio para el organismo, implicando la transmisión oral-oral como la principal ruta posible de transmisión.^{3,4,5}

Se ha postulado que *Helicobacter pylori* coloniza el estómago con una estadía previa en la cavidad oral.⁶ Existe evidencia de que *Helicobacter pylori* es frecuentemente identificada en muestras de placa dental de personas con o sin infección en el estómago,^{3,6} además; Las bacterias Gram negativas pueden interrelacionarse con la placa dental y competir por los nutrientes necesarios con la microflora local, además de aprovechar condiciones de menor tensión de oxígeno en las zonas dentales posteriores, colonizándolas transitoriamente a la vez que establecen un ecosistema dinámico; al mismo tiempo la placa dental provee un pH óptimo, temperatura apropiada y el ambiente microaerofílico necesario para su persistencia. Estas características proveen el ambiente necesario para la supervivencia de *Helicobacter pylori*, que abre la posibilidad de que la placa dental actúe como reservorio y por lo tanto podría ser una fuente de reinfección de la mucosa gástrica.^{3, 7,8,}

El papel de *Helicobacter pylori* en la cavidad bucal resulta controversial, estudios como el de Song y col.⁵, sugieren que *Helicobacter pylori* pertenece a la flora

normal de la cavidad oral, igualmente se ha reportado que la colonización bucal por la bacteria, podría representar un factor de riesgo para la reinfección gastrointestinal posterior a la terapia antibiótica. Todo esto, puede tener una aplicación inmediata recomendando la prevención para evitar la transmisión persona a persona en grupos familiares.⁹

Actualmente, para diagnosticar la infección gástrica por *Helicobacter pylori*, la toma de las muestras clínicas se realiza por métodos invasivos como: prueba de ureasa, cultivo, histología y PCR en biopsias. De estos, el cultivo con la recuperación de la bacteria se considera el estándar de oro, por otro lado la infección también es diagnosticada por métodos no invasivos como, la serología, prueba del aliento con urea marcada, detección de antígenos de heces, PCR en saliva y placa dental, considerados como adecuados para el seguimiento clínico, control de la erradicación^{6,8,10,11,12}

Diferentes estudios^{3,13}, demostraron que las personas positivas para *Helicobacter pylori* en placa dental tenían gastritis crónica u otras enfermedades, incluyendo displasia gástrica y metaplasia intestinal; los resultados de estos estudios confirmaron una fuerte correlación entre la presencia de infección oral por *Helicobacter pylori* y gastritis, duodenitis y otras enfermedades, lo cual sustenta la hipótesis de que la placa dental y saliva pueden ser responsables de la transmisión de la bacteria, ya que representan una posible fuente de re-infección después del tratamiento de erradicación. Sin embargo, la relación entre síntomas gástricos y la presencia de *Helicobacter pylori* en la cavidad oral no es clara. Es posible que la cavidad oral sea el sitio inicial de infección y/o que *Helicobacter pylori* pueda persistir en bajo número de microorganismos en la cavidad oral por largo tiempo y no colonizar el estómago^{3,9}

Tiwari y col., propusieron la detección de *Helicobacter pylori* en saliva como una prueba no invasiva, amplificando un fragmento del gen 16S rRNA mediante PCR; y encontraron que el 87.5 % de los pacientes sintomáticos y el 60% de los individuos asintomáticos, fueron positivos a la presencia del DNA de la bacteria. Estos resultados indican que la saliva de una persona infectada podría servir como

un medio alternativo y confiable, para detectar la presencia de la infección por *Helicobacter pylori*.¹⁴

Song y col.,⁵ demostraron variaciones en la prevalencia de *Helicobacter pylori* dependiendo de la localización de la muestra de placa supragingival, obteniendo un 59% en incisivos, 64% premolares, y 82% en molares. Esta distribución puede ser explicada por las características microaerofílicas de la bacteria, por otro lado, se encontró un alto porcentaje (55%) en muestras de saliva, lo que soportaría la hipótesis de que *Helicobacter pylori* pertenece a la flora normal de la cavidad oral.⁵ Sin embargo, no se ha encontrado un hábitat intra - oral preferente para *Helicobacter pylori*.¹⁵

Se considera que la complejidad de la flora bucal del adulto es quizás su característica principal. Puede haber cantidades variables de placa dental y el grado de enfermedad periodontal crónica estará en relación al número y tipo de microorganismos encontrados, las lesiones cariosas y las restauraciones poco satisfactorias, proporcionarán ambientes adecuados para la acumulaciones locales de bacterias.¹⁶

Se ha propuesto que *Helicobacter pylori* puede alcanzar el estómago con una residencia previa en la cavidad oral^{7,9} debido a que se ha detectado en placa dental, saliva, la región subgingival y úlceras en la mucosa oral.⁶ Por ello se propone que la vía más importante de transmisión es oral-oral para lo cual *Helicobacter pylori* debe ser capaz de colonizar y persistir en la cavidad bucal.

Otros estudios^{3,13,17,18} sugieren que la cavidad oral es un reservorio de *Helicobacter pylori* y que la secreción oral que baja al estómago, es la ruta principal de infección y reinfección, y una vez que se instala en este sitio, es capaz de persistir por décadas favoreciendo el inicio y consolidación de patologías gastroduodenales.

La elevada prevalencia de *Helicobacter pylori* en la población hace importante incrementar el conocimiento de las posibles vías de transmisión de la bacteria con la finalidad de diseñar posibles medidas de prevención, control mejorar el tratamiento de esta infección, para evitar así complicaciones futuras.

En México, no existen estudios acerca de la prevalencia de *Helicobacter pylori* en cavidad oral, además la placa dental podría ser una opción para el seguimiento en el caso de las reinfecciones gastroduodenales y para determinar su importancia en la posible transmisión oral.

En este estudio se propone la hipótesis de que las personas que padecen patologías gastroduodenales crónicas están infectadas en forma persistente por *Helicobacter pylori* en cavidad oral, y su presencia es favorecida por factores orales.

El propósito de esta investigación fue detectar el DNA de *Helicobacter pylori* en placa dental, saliva y carrillos-bordes de la lengua. en personas con enfermedad gatroduodenal atendidas en el servicio de gastroenterología en Chilpancingo, Gro. Así como, identificar factores que favorecen la presencia de *Helicobacter pylori* en cavidad oral.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio transversal, descriptivo, el cual se llevó a cabo en el laboratorio de Investigación Clínica de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la, Universidad Autónoma de Guerrero. El muestreo fue por conveniencia, y se realizó en una unidad de gastroenterología en la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, que atiende a personas con diferentes características socioeconómicas, así como de las diferentes ciudades de esta entidad. Todos los individuos participantes en este estudio, dieron su consentimiento escrito, cuando los participantes eran menores de edad el padre firmó el consentimiento.

Población estudiada

En el periodo marzo a noviembre del 2006 se captaron 112 individuos programados para endoscopia gástrica en la Unidad Especializada de Gastroenterología y Endoscopia por indicación médica. Se incluyeron en el estudio 4 pacientes con diagnóstico endoscópico de gastritis aguda, 48 con gastritis

crónica, 29 con gastritis folicular , 10 con gastritis biliar, 2 con pólipo gástrico, 11 con úlcera, 2 con metaplasma intestinal y 6 con cáncer gástrico.

A los participantes se les dio instrucciones un día antes del procedimiento endoscópico sobre las condiciones en que debería presentarse (sin realizar el aseo bucal). A todos los pacientes que asistieron a realizarse este procedimiento se les tomó muestra oral, pero solo se incluyeron aquellos que tuvieron un diagnóstico endoscópico de alguna patología gástrica.

A todos los participantes se les aplicó una encuesta para investigar diferentes hábitos, como si el participante fumaba, ingería bebidas alcohólicas, tomaba café o refresco con gas, así como los hábitos de higiene bucal del individuo, estos incluían la frecuencia de cepillado dental, uso y tipo de enjuague bucal, además de la cuantificación de la placa dental por el índice Løe - Silness.¹⁹

Los participantes fueron evaluados clínicamente en todos los casos por un solo gastroenterólogo y un odontólogo; se les explicaron los objetivos del estudio, a quienes completaron los criterios de inclusión:

a) Tener diagnóstico endoscópico reciente de úlcera péptica, gastritis; adenocarcinoma gástrico, b) No haber recibido tratamiento para alguna de las enfermedades que se mencionan durante un mes previo a la toma de las muestras c) sujeto a revisión bucal, d) obtención de toma de muestra de la cavidad oral y e) Firmar un formato de aceptación para ser participantes. Se excluyeron aquellos pacientes sin patología gástrica y aquellos individuos que hubiesen vomitado 24hr. antes y/o el día del estudio para evitar una posible contaminación gastro-oral.

Toma de Muestra

La toma de muestras se realizó previo al procedimiento endoscópico, se utilizaron curetas Gracey (Hu-friedy, USA) estériles, para recolectar placa dentobacteriana de la superficie de los molares y zona interproximal; con hisopos estériles se raspó los bordes laterales, zona inferior de la lengua y carrillos, las muestras fueron colocadas en frascos estériles con 1 ml de BHI con 10% de glicerol, mientras que la muestra de saliva, se colocó en tubos estériles con 3 ml de

caldo BHI, Todas las muestras fueron transportadas en hieleras al laboratorio, se congelaron a -20°C hasta la extracción de DNA para el posterior diagnóstico molecular mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Evaluación de la Placa dental

Se analizó la cantidad de placa de los pacientes, en el momento de la toma de muestra utilizando el índice de placa de Løe – Silness¹⁹, clasificando la presencia de placa en: no hay placa bacteriana a simple vista, hay placa bacteria a simple vista, hay placa bacteriana a simple vista y puede haber cálculo, mientras a los individuos que contaban con ninguno o un solo órgano dentario presente se les clasifico en el rubro de no aplica.

Extracción y Cuantificación DNA

La extracción de DNA se realizó por el método de fenol- cloroformo²⁰, y la cuantificación del DNA se realizó en un biofotómetro (Eppendorf Biophotometer 22331), en el que se determinó su concentración y pureza; para el efecto se coloco 1 μl de DNA más 99 μl de agua desionizada en un tubo Eppendorf, se tomo en cuenta el factor de dilución (1:100).

Detección molecular del gen del rRNA 16S de *Helicobacter pylori*.

Para detectar el DNA de *Helicobacter pylori*, se realizó la amplificación por PCR de un fragmento del gen del rRNA 16S de esta especie bacteriana.

Los iniciadores utilizados fueron: iniciador sentido : HP 16-219 (5'-GCT AAG AGA TCA GCC TAT GTC C -3')²¹ e iniciador antisentido: HPGR16SR (5'-CAA TCA GCG TCA GTA ATG TTC-3').²¹ Los cuales originan un producto de 522 pb. Los iniciadores fueron analizados con el programa vector NTI 9, y para verificar la especificidad de la alineación se empleo el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool); se utilizó la cepa ATCC43504 como control positivo de la amplificación, y agua estéril para control negativo, para determinar la integridad del DNA se utilizó el gen β - actina.

Para la detección de *Helicobacter pylori* en placa dental, la mezcla de reacción se realizó en un volumen final de reacción de 15 μl (200 ng DNA total, Buffer 1x, 2.5 mM de Mgcl (50mM), 0.2 mM de dNTP'S (Invitrogen,Brazil) 0.6 μL de oligo HP 16-

219 (5pmol/ml), 0.6 µL de oligo HPGR16SR (5pmol/ml), 1U enzima Taq DNA polimerasa recombinante (Invitrogen, Brazil)) Para la detección de *Helicobacter pylori* en placa dental, las condiciones de amplificación fueron 35 ciclos de amplificación que comprendieron; desnaturalización a 94 °C durante 30s, alineamiento a 55 °C durante 30 s, 72 °C 30s y un ciclo final de extensión a 72°C durante 7 minutos, en un Termociclador Eppendorf (Hamburg, Germany).

En muestras de saliva y carrillo la amplificación de PCR se realizó en un volumen final de reacción de 15 µl (200 ng DNA, Buffer 1x, Mgcl (50mM) 2.5 mM, 0.2 mM dNTP'S, 0.6 µM de oligo HP 16-219 (5pmol/ml), 1.2 µM de oligo HPGR16SR (5pmol/ml), y 0.2 de enzima Taq DNA polimerasa platinum (Invitrogen, Brazil), las condiciones de amplificación fueron 40 ciclos de amplificación que comprendieron; 30s de desnaturalización a 94 °C, 30s de alineamiento a 55 °C a 45s, extensión inicial a 72 °C, y 7 minutos de extensión final, en un termociclador Eppendorf (Hamburg, Germany).

A los productos de PCR se les realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, se colocó 8 µl del producto amplificado con 3 µl de loading buffer y posterior a la electroforesis el gel fue teñido con bromuro de etidio durante 15 minutos y se analizó en un transiluminador de luz U.V, tomándolo como positivas aquellas muestras que dieron una banda de 522 pb.

Análisis Estadístico

Se utilizaron los paquetes estadísticos SPSS versión 11.0 y STATA versión 8.2, para determinar la concordancia entre el diagnóstico endoscópico y el resultado de PCR en la cavidad oral. También se calculó el coeficiente de kappa, para analizar las diferencias entre frecuencias y se utilizó la prueba de ji cuadrada (X^2), se considero estadísticamente significativo cuando p fue igual o menor a 0.05.

RESULTADOS

Características de la población

Se estudiaron 112 pacientes, de éstos, 53.6% (60) fueron mujeres y 46.4% (52) hombres, el rango de edad fue de 15 a 90 años. En el grupo de estudio, el promedio de edad fue de 44.9 años, mientras que el promedio de edad para las

mujeres fue de 45.7 años con un rango de 16 a 87 años, y para hombres el promedio fue de 42.8 años con un rango de 18 a 90 años, cuadro 1.

Cuadro 1. características de la población

		n	%
Educación	Educación Básica	18	16.1
	Nivel Medio	11	9.8
	Nivel Medio Superior	15	13.4
	Nivel Superior	55	49.1
	Postgrado	7	6.3
	Ninguno	6	5.4
Ocupación	Ama de Casa	22	19.6
	Docente	24	21.4
	Estudiante	7	6.3
	Jornalero	18	16.1
	Trabajadores en el Área de Salud	8	7.1
	Empleado de Gobierno	25	22.3
	Autoempleado (a)	5	4.5
	Jubilado	2	1.8
	Sacerdote	1	.9
Ha fumado alguna vez en su vida	Si	29	25.9
	No	60	53.6
	Ocasionalmente	23	20.5

Detección molecular del DNA de *Helicobacter pylori* en muestras orales

En las muestras orales de los 112 pacientes estudiados, se detecto una prevalencia de *Helicobacter pylori* del 48.2% (54/112) de las muestras de placa dental, del 67.9% (76/112) en saliva y del 18.8% (21/112) de los especimenes de carrillos – bordes de laterales de lengua. Figuras1, 2, 3

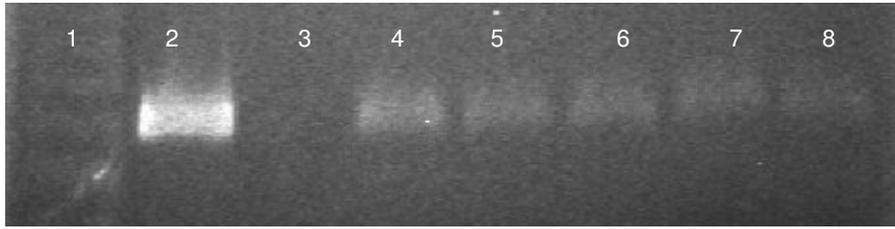


Fig. 1 Productos de PCR generados por amplificación de un fragmento del gen rRNA 16s de *Helicobacter pylori* en muestras de placa dental. Línea 1 DNA ladder de 123 pb, línea 2 control positivo cepa ATCC43504 , línea 3 control negativo, línea 4 – 8 muestras

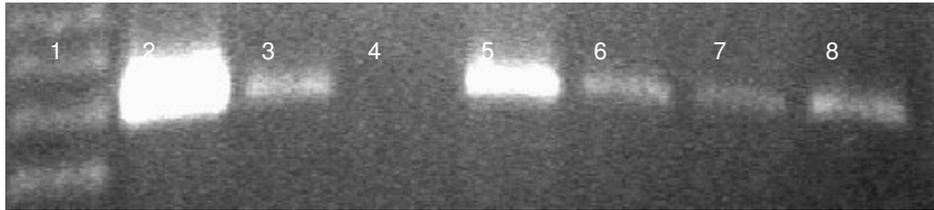


Fig. 2 Productos de PCR generados por amplificación de un fragmento del gen rRNA 16s de *Helicobacter pylori* en muestras de saliva. línea 1 DNA ladder de 123 pb, línea 2, control positivo, línea 4, control negativo, línea 3,4,5,6,7,8 muestras positivas en saliva

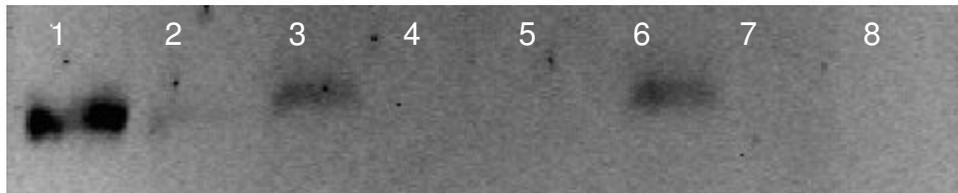


Fig. 3 Productos de PCR generados por amplificación de un fragmento del gen rRNA 16s de *Helicobacter pylori* en muestras de carrillos. línea 1, control positivo cepa ATCC43504, línea 2, 3, 4, 5, 6, 7, muestras de carrillos – lengua, línea 8, control negativo,

Correlación entre la detección molecular de *Helicobacter pylori* en muestras orales y el diagnóstico endoscópico

Los participantes estudiados cursaban con diferentes patologías gástricas por diagnóstico endoscópico, lo cual se relacionó con aquellos que fueron *Helicobacter pylori* - positivos en las muestras de placa dental, saliva y carrillos – bordes laterales de la lengua, en individuos que presentaron cáncer gástrico la detección fue del 100% en muestras de placa dental y saliva, cuadro 2;

Cuadro 2. Correlación entre la detección molecular de *Helicobacter pylori* en diferentes sitios de la cavidad oral y el diagnóstico endoscópico

Diagnóstico Endoscópico	No. De Pacientes n (%)	Placa Dental n (%)	Saliva n (%)	Carrillos – Bordes de Lengua n (%)
Gastritis Aguda	4 (3.6)	2 (50)	3 (75)	1 (25)
Gastritis Crónica	48 (42.9)	22 (45.8)	33 (68.8)	8 (16,7)
Gastritis Folicular	29 (25.9)	16 (55.2)	21 (72.4)	8 (27.6)
Gastritis Biliar	10 (8.9)	3 (30)	5 (50)	1 (10)
Pólipo Gástrico	2 (1.8)	0	2 (100)	0
Úlcera	11 (9.8)	5 (45.5)	6 (54.5)	1 (9)
Metaplasia Intestinal	2 (1.8)	0	0	0
Cáncer Gástrico	6 (5.4)	6 (100)	6 (100)	2 (33.)
Total	112 (100)	54 (48.2)	76 (67.9)	21 (18.8)

Detección molecular de *Helicobacter pylori* en muestras orales en relación con la detección del DNA de la bacteria en muestras gástricas

En el estudio Genotipos s y m del gen *vacA* de *Helicobacter pylori* en pacientes con patología gastroduodenal, realizado en el laboratorio de Investigación clínica, se analizó en biopsias gástricas por PCR a los 112 individuos que participaron en este estudio, encontrando que el 81.25% (91/112) de los pacientes examinados fueron *Helicobacter pylori* – positivo a nivel gástrico, en estos individuos la prevalencia de la bacteria en las muestras de la cavidad oral, fue de 57.1%

(52/91) positivos en placa dentobacteriana, 82.4% (75/91) positivo en saliva y el 23.1% (21/91) en carrillos. Cabe mencionar que las 21 muestras negativas a nivel gástrico también lo fueron en las muestras orales. Encontrándose para muestras de saliva y placa dental un valor de $p= 0.000$ mientras que para carrillos- lengua se encontró un valor de $p = 0.878$.

Distribución de *Helicobacter pylori* por sitio de la cavidad oral y el índice de Løe – Silness

Se examinó la cantidad de placa de los 112 pacientes en el momento de la toma de muestra, con base en los criterios de Løe-Silness para medir el índice de placa dental, cuadro 3.

Cuadro 3. PCR de *H. pylori* distribuida por sitio de la cavidad oral y por el índice de placa de Løe – Silness

Índice de Løe – Silness	No. de pacientes n (%)	Placa Dental n (%)		Saliva n (%)		Carrillos – Borde de Lengua n (%)	
		+	-	+	-	+	-
No hay placa a simple vista	36 (32.1)	16 (44.4)	20 (55.6)	25 (69.4)	11 (30.6)	8 (22.2)	28 (77.8)
Hay placa bacteria a simple vista	20 (17.9)	14 (70)	6 (30)	17 (85)	3 (15)	5 (25)	15 (75)
Hay placa bacteriana a simple vista puede haber calculo	53 (47.3)	23 (43.4)	30 (56.6)	33 (62.3)	20 (37.7)	8 (15)	45 (85)
No aplica	3 (2.7)	1 (33.3)	2 (66.7)	1 (33.3)	2 (66.7)	0	3 (100)
Total	112 (100)	54	58	76	36	21	91

+ PCR positiva
- PCR negativa

Cepillado dental y detección molecular de *Helicobacter pylori*

A pesar de la indicación dada a los participantes sobre no cepillar sus dientes el día del estudio, el 70.5% (79/112) de los individuos realizaron el cepillado dental antes de la toma de muestra, y solo un 29.5% (33/112) no lo hizo, por lo que se consideró si el cepillado afectó la presencia de *Helicobacter pylori* en las muestras orales. Al analizar si el cepillado dental antes de la toma de la muestra afectaba la identificación de *Helicobacter pylori* no se encontró una asociación estadísticamente significativa en ningún tipo de muestra, cuadro 4

Cuadro 4. PCR positiva para *H. pylori* en diferentes sitios de la cavidad oral en relación a la realización del cepillado dental antes de la toma de muestra

Sitio de cavidad oral	Realizó cepillado dental		Total	p
	Si n	No n		
Saliva	56	20	76	0.288
Placa Dental	38	16	54	0.970
Carrillo	16	5	21	0.528

También se analizó la frecuencia con la que los individuos realizaban el cepillado dental, siendo el 42.9% (48/112) quienes realizaban 3 cepillados al día, 37.5%(42/112) realizaban 2 cepillados, el 12.5%(14/112) lo realizaba solo una vez al día, el 2.7% (3/112) lo realizaba ocasionalmente, mientras que un 2.7% (3/112) llevaba a cabo el cepillado más de tres veces al día, y solo 1.7% (2) se encontró con un órgano dentario (1 solo diente) se le dio la clasificación desdentado debido a que los individuos realizaban la higiene oral como tal, en muestras de saliva se encontró un valor de $p= 0.643$, en muestras de placa dental el valor de $p= 0.238$ mientras que en carrillos se encontró un valor de $p= 0.762$.

Higiene oral en relación con la detección molecular de *Helicobacter pylori* en muestras de la cavidad oral.

Además de la realización del cepillado dental antes de la toma de muestra se analizó si el individuo realizaba un cepillado adecuado, clasificandolos, si tenía una buena higiene oral, higiene regular o mala higiene considerando la cantidad de placa presente después de realizar el cepillado. Aquellos que no realizaron ningún tipo de aseo oral antes del estudio se les colocó en el rubro de no aplica (N.A), cuadro 5.

Cuadro 5. Frecuencia de *H. pylori* distribuida por sitio de la cavidad oral en relación con la Higiene oral del individuo

Higiene Oral	No. de pacientes	PCR positiva en Cavidad Oral		
		Saliva n (%)	Placa Dental n(%)	Carrillos – Lengua n (%)
N.A	34	22 (64.7)	16 (47)	6 (17.6)
Buena higiene	10	8 (80)	3 (30)	3 (30)
Higiene	47	37 (78.7)	27 (57.4)	11 (23)
Regular	20	9 (45)	8 (40)	1(5)
Mala Higiene	p=	0.065	0.419	0.307

Detección molecular de *Helicobacter pylori* y el uso de enjuague bucal

Se analizó si el uso de enjuague bucal afecta la presencia de *H. pylori* en muestras de la cavidad oral. cuadro 6.

Cuadro 6. PCR positiva a DNA de *Helicobacter pylori* en diferentes sitios de la cavidad bucal en relación con el uso de enjuague bucal

	Enjuague Bucal				p=
	Con antibiótico n (%)	Sin antibiótico n (%)	No Usa n (%)	No recuerda n (%)	
No. de pacientes	12 (10.7)	25 (22.3)	70 (62.5)	5 (4.5)	
Placa Dental	9 (75)	8 (32)	35(50)	2 (40)	0.098
Saliva	10 (83.3)	16 (64)	47 (67)	3 (60)	0.658
Carrillos – bordes de Lengua	3 (25)	4 (16)	12 (17)	2 (40)	0.535

Relación de la frecuencia del uso de enjuague bucal y la detección del DNA de *Helicobacter pylori*

Al considerar la frecuencia con la que los participantes utilizaron el enjuague bucal, se encontró que el 49.3% de los que no utilizaban enjuagues fue positivo, mientras aquellos participantes que lo utilizaron más de tres veces fueron negativos en placa dental cuadro 7, mientras que el 65.7% (44/67) de los individuos que no utilizaron colutorios y fueron positivos a la presencia de *Helicobacter pylori* en muestras de saliva, los que utilizaban tres veces o mas el enjuague bucal, fueron negativos a la identificación de la bacteria 100%(2/2), en las muestras de carrillos, el 16.41 (11/67) fue positivo en individuos que no utilizaron ningún colutorio, mientras que el 100% (1/1) que lo utilizaban 3 veces al día fue negativo (datos no mostrados), se encontró que en las muestras de saliva el valor de $p= 0.658$, y en carrillos, placa dental $p = 0.084$ aun con el uso de colutorios con algún tipo de antiséptico.

Cuadro 7. *Helicobacter pylori* en placa dental en relación con la frecuencia del uso de enjuague bucal

Uso de Enjuague Bucal	<i>H. pylori</i> en placa dental		Total
	Negativa %(n)	Positiva %(n)	
No utiliza	50.7(34)	49.3(33)	67
1 vez al día	60(8)	40(6)	14
2 veces al día	50(5)	50(5)	10
3 veces al día	100(1)	0	1
Mas de tres veces al día	100(1)	0	1
Ocasionalmente	47.4(9)	52.6(10)	19
Total			112

Presencia de órganos dentarios y frecuencia de la detección molecular de *Helicobacter pylori* en cavidad oral

Debido a que la presencia de dientes puede ayudar a la acumulación de placa dentobacteriana; se analizó si el número de órganos dentarios afectaba la presencia de *Helicobacter pylori* en la cavidad oral, cuadro 8.

Cuadro 8. *Helicobacter pylori* en cavidad oral en relación con la presencia de órganos dentarios.

Órganos dentarios presentes	No. De pacientes n (%)	PCR Positiva en Cavidad Oral		
		Saliva n (%)	Placa Dental n (%)	Carrillos – Bordes de lengua n (%)
Desdentado	2 (1.78)	1(50)	0 (0)	0 (0)
Dentado Parcial	46 (41)	32(69.6)	19(35.2)	8 (17.39)
Dentado total	64 (57)	43(67.2)	35(64.9)	13 (20.31)
p		0.832	0.148	0.734

Tratamiento previo con antibióticos e inhibidores de la bomba de protones en relación con la detección de *Helicobacter pylori*

El 53.30% de los individuos incluidos en el estudio habían tenido un tratamiento con antibiótico, (amoxicilina, metronidazol), por lo menos 3 meses antes de la toma de muestra, y el 63.7% tuvo tratamiento previo con inhibidores de la bomba de protones 3 meses antes. Se consideró si esto afectaba la presencia de *Helicobacter pylori* en la cavidad oral. Cuadro 9

Cuadro 9. *Helicobacter pylori* en la cavidad oral en relación con el uso de antimicrobianos.

		Sitio en Cavidad Oral					
		Saliva		Placa Dental		Carrillo - Lengua	
		PCR Negativa	PCR Positiva	PCR Negativa	PCR Positiva	PCR Negativa	PCR Positiva
Tratamiento Previo con Antibiótico	Si	20	41	33	28	49	12
	No	16	35	25	26	42	9
		36	76	58	54	91	21

Al analizar a los 112 pacientes no se encontró una disminución significativa de *H. pylori* en placa dental debida al uso de antimicrobianos previos, ($p= 0.577$), mientras que en muestras de saliva el valor de $p=0.851$, y en carrillos $p= 0.790$; por otro lado se analizó la relación del uso de inhibidores de la bomba de protones y la presencia del DNA de la bacteria en las muestras recolectadas, cuadro 10

Cuadro 10. *Helicobacter pylori* en relación al uso de Inhibidores de la bomba de protones.

	Resultado PCR	Tratamiento previo con inhibidores de la bomba de protones		<i>p</i>
		Si	No	
Saliva	Negativa	26	11	0.604
	Positiva	49	27	
Placa Dental	Negativa	41	18	0.503
	Positiva	34	20	
Carrillo - Lengua	Negativa	49	42	0.655
	Positiva	12	10	

El 61.53% (32) de los individuos con tratamiento previo de inhibidores de la bomba de protones fue positivo a *Helicobacter pylori* en placa dental y el 53.3% (40) en muestras de saliva (Dato no mostrado)

Se utilizó la prueba de kappa para conocer la concordancia entre los resultados de la detección del DNA de la bacteria en muestras de saliva y placa dental; el valor encontrado fue de 0.34, lo que nos indica que no existe concordancia, Cuadro 11.

Cuadro 11. Análisis de concordancia entre muestras de placa dental y saliva

		Identificación de <i>H. pylori</i> en saliva		TOTAL
		PCR negativa	PCR positiva	
Identificación de <i>H. pylori</i> en placa dental	PCR positiva	28	30	58
	PCR negativa	8	46	54
Total		36	76	112

Discusión

En el presente estudio se observó una prevalencia de *Helicobacter pylori* en boca del 75.9% mostrando diferencias entre los tres distintos sitios muestreados, fue aislado de placa dental en el 47.30% de los individuos; la frecuencia es mayor a lo reportado por Berroteran (37.5%) en muestras de placa dental en población venezolana³, en muestras de saliva la prevalencia fue de 66.70% un porcentaje menor a lo reportado por Tiwari y col¹² mediante PCR en muestras de saliva en la India. En las muestras de carrillos – bordes de lengua la prevalencia fue de 18.4%

menor a la encontrada en las muestras de saliva y placa dental, sin embargo la identificación fue mayor a la encontrada por Namavar y col.²², los cuales reportaron solo 15% (3/20) en muestras de carrillos; por otro lado Gebara y col., encontraron 6.6% (2/30) muestras positivas del dorso de la lengua de pacientes, el hecho de que nosotros recolectáramos muestras de 2 zonas diferentes (carrillos – borde laterales de la lengua) explicaría la mayor prevalencia encontrada con respecto otros estudios.^{17,22} Sin embargo la baja prevalencia encontrada en estas zonas puede indicar que no son un nicho preferente para la bacteria si no más bien puede sugerirse que se encuentra en estos sitios por accidente debido a la acción de arrastre producido por diferentes mecanismos como es la circulación de la saliva o bien el roce de los carrillos con la placa dental durante la masticación.

Se esperaba que el uso de enjuagues afectara la presencia de *Helicobacter pylori* en la cavidad oral, sin embargo no sucedió, esto podría explicarse por diferentes factores, como es la frecuencia de uso, y el tipo de colutorio ya que el efecto de éste sobre los biofilms depende de la frecuencia y cantidad con la que se utilice; de esta manera; el efecto del colutorio será como bactericida o bacteriostático. Diferentes estudios han reportado que la efectividad de los colutorios también depende de la formulación con la que se fabricó, así como del uso del mismo, por lo que es importante conocer el efecto de los enjuagues bucales sobre las bacterias que causan la placa dental^{23, 24} por lo que se debe hacer más estudios para conocer el efecto de estos sobre *Helicobacter pylori*.

El cepillado dental es una de las prácticas más comunes e importantes para la higiene del individuo, un buen cepillado elimina la placa dentobacteriana presente tanto de los órganos dentarios como de la lengua y carrillos, lo que conlleva a la reducción o eliminación de bacterias presentes en boca. Al analizar si el cepillar la dentadura antes de la toma de muestra afectaba la identificación de *Helicobacter pylori* no se encontró una disminución significativa ($p = 0.970$), sin embargo, la higiene oral del individuo no se considero buena en la mayoría de los casos lo que podría explicar que no se afectara la detección de *Helicobacter pylori* ($p = 0.419$)

en la cavidad oral, por tal motivo debe considerarse si el individuo realiza un cepillado correcto además de conocer los productos utilizados para ello.

Debido a que más de la mitad de los individuos participantes en el estudio contaban con un tratamiento de antibióticos o de inhibidores de la bomba de protones (el 53.30 % y 63.70% respectivamente) se esperaba una disminución en la frecuencia de identificación de la bacteria, sin embargo la prevalencia fue alta, por lo que podríamos sugerir una alta resistencia o bajo efecto del tratamiento sobre la bacteria en cavidad oral, lo que coincide con lo reportado por Fat-Moon y col.⁸ y Gebara y col.¹⁷ indican que el tratamiento es más efectivo a nivel gástrico que en la cavidad bucal. Es difícil erradicar *Helicobacter pylori* de la placa dental con el tratamiento comúnmente indicado para esta bacteria, por tal razón la cavidad oral podría actuar como reservorio de *Helicobacter pylori* y reinfectar la mucosa gástrica.^{8,17}

Si bien la presencia de *Helicobacter pylori* fue diferente entre los diferentes nichos, la presencia o ausencia de órganos dentarios no fue crítica para afectar la presencia de la bacteria en la cavidad oral, este resultado concuerda con el presentado por Czeswikiewicz – Guzik y col.,²⁵ por lo que podemos sugerir que la presencia de la bacteria es independiente de la cantidad de órganos dentarios sin embargo factores como dentaduras o restauraciones mal ajustadas podrían estar jugando un papel en la acumulación de placa y por tal motivo proporcionar un nicho adecuado a *Helicobacter pylori*.

Cabe destacar que ningún paciente sin infección por *H. pylori* a nivel gástrico resultó positivo a la identificación por *Helicobacter pylori* en las diferentes muestras orales.

Con estos resultados podemos concluir que la alta prevalencia de *Helicobacter pylori* en cavidad oral podría sugerir que esta sirve de reservorio para la bacteria, la mayor prevalencia de la bacteria encontrada en saliva puede indicarnos un nicho preferencial por el microorganismo dentro de la cavidad oral, mostrando una posible alternativa no invasiva para diagnosticar la infección por *H p.* por último los

hábitos higiénicos orales propios del individuo no parecen disminuir la presencia de *Helicobacter pylori* en cavidad oral.

Los resultados de este estudio proponen que la cavidad oral presenta varios nichos posibles que pueden servir como reservorio para la bacteria, sin embargo estos podría considerarse complementarios, de tal manera que para obtener un mejor diagnóstico debería tomarse más de una muestra.

Una de las limitantes del estudio fue el poco tiempo que se tuvo para la realización de la recolección de muestra, encuesta y examen oral, debido a la ansiedad generada por el estudio endoscópico posterior. Uno de los factores que faltó estudiar en este trabajo fue considerar si el paciente usaba alguna dentadura postiza, así como el uso de restauraciones que pudieran estar sirviendo como retenedores de placa dental; otro análisis que faltó realizar fue considerar la existencia y el grado de bolsas periodontales.

REFERENCIAS

- 1 Aguilar GR, Ayala G, Fierros-Zárate G. *Helicobacter pylori*: Recent advances in the study of its pathogenicity and prevention. *Salud Pública Mex* 2001; 43:237-247
- 2 Ocadiz-Delgado R, Sobrino-Cossío S, García – García L, Marroquín-Chavira A, Hernández-Mote R, Gariglio. Relación entre la infección por *Helicobacter pylori* y el desarrollo de metaplasia en pacientes con gastritis crónica. *Bioquímica* 2005; 30:13-22
- 3 Berroteran A, Perrone M, Correnti M, Cavazza M E., Tombazzi C, Goncalvez R, Lecuna V. Detección of *Helicobacter pylori* DNA in the oral cavity and gastroduodenal system of a venezuelan population. *J. Med. Microbiol* 2002, 51 764 - 770
- 4 Musich PR, Ferguson DA., Thomas E. High prevalence of *Helicobacter pylori* in saliva demonstrated by a novel PCR assay. *J Clin Pathol* 1995; 48: 662– 666
- 5 Song Q, Lange T, Spahr A, Adler G, Bode G. Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR. *J Med Microbiol* 2000; 49:349 - 353
- 6 Dowsett SA, Kowolik MJ. Oral *Helicobacter pylori* Can We Stomach It? *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14(3):226-233
- 7 Iamaroon A, Chaimano S, Linpisarn S, Pongsirwet S., Phornphutkul K. Detection of *Helicobacter pylori* in recurrent aphthous ulceration by nested PCR. *J Oral Sci* 2003,. 45 (2):107-110
- 8 Fat-Moon S, Sheng-Hsuan Ch, Yuan-Soon H, Shiann P, Horng-Yuan L, Chun-Chao Ch, et al. It Is Difficult To Eradicate *Helicobacter Pylori* from Dental Plaque by Triple Therapy. *Chin Med J(Taipei)* 2002;65:468-473
- 9 Li C, Ha T, Ferguson DA, Chi DS, Zhao R, Patel NR, Krishnaswamy G, Thomas E. Newly developed PCR assay of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy, Saliva, and feaces. *Dig Dis Sci* 1996;41(11):2142-9.
- 10 Vaira D, Gatta I, Ricci C, Miglioli M. Review Article: invasive and non-invasive tests for *Helicobacter pylori* infection *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14 (3): 13–22.
- 11 Perdomo M, Martínez M^a José. Infección por *Helicobacter pylori* en niños. Protocolos diagnósticos y terapéuticos en pediatría. (acceso 5 de diciembre del 2007) Disponible en aeped.es/protocolos/gastroentero,
- 12 Premolí G, Hernández JG, Mora H, González A, Villarreal J. Infección por *Helicobacter pylori* en niños e importancia de la placa dental. (acceso 5 de diciembre del 2007) Disponible en Edocs/pubelectronicas/academia/vol3num6/articulo,

- 13 Chumpitaz-Conde J, Gutiérrez-Manay J, Córdova-Acosta R, Sánchez-Medina M, Vasquez-Valverde N, Rivadeira-Málaga C, et al. Isolation of *Helicobacter pylori* in dental plaque in patients with gastritis at angamos polyclinic. Rev gastroenterol Perú 2006; 26 (4): 373 - 376
- 14 Tiwari SK, Khan A, Ahmed KS, Ahmed I, Kauser F, Hussain MA, Ali SM, Alvi A, Habeeb A, Abid Z, Ahmed N, Habibullah M. Rapid diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients using salivary secretion: a non-invasive approach. Singapore Med J 2005; 46(5): 224
- 15 Mohammed S K *Helicobacter pylori*: The Unique Organism. Ann Saudi Med 2002, 22:3 -4
- 16 Karczewska E, Konturek JE., Konturek PC., Czesńnikiewicz M, Sito E, Władysław Bielan´ Ski, et al. Oral Cavity as a Potential Source of Gastric Reinfection by *Helicobacter pylori* Dig Dis Sci 2002, 47: (5), 978 - 86
- 17 Gebara ECE, Faria CM, Pannuti C, Chehter L, Mayer MPA, Persistence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity after systemic eradication therapy. J Clinl Periodontol 2006; 33 (5), 329–333.
- 18 Scarano Pereira G A, Correia de Medeiros A, Marques Soares M S, Chimenos Küstner E, Castro Barreto R, Perdomo Lovera M, Detección de *Helicobacter pylori* en placa dental y en mucosa gástrica de pacientes sometidos a endoscopia digestiva. Acta odontol venez 2005; 43 (2)
- 19 Barrancos M, Operatoria Dental 3ª ed. Buenos Aires: Panamericana; 2002, p. 286
- 20 Ausubel FM, Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith John A. Current Protocols in Molecular Biology, vol 1, 5ª ed. Wiley.
- 21 Chang Yih-Hsin, Wang Ling, Lee Ming-Shih, Cheng Chun Wen, Wu Chun-ying, Shiau Ming – Yuh. Genotypic characterization of *Helicobacter pylori* CagA and vacA from biopsy specimens of patients with gastroduodenal diseases. The Mount Slnaj J Med 2006; 73(3)
- 22 Namavar F, Roosendaal R, Kuipers E J, de Groot P, Van Der Bijl M W, Peña A S, et al. Presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity, oesophagus, stomach and faeces of patients with gastritis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1995;14:234–237.
- 23 Shapiro S. Giertsen E, Guggenheim B. An in vitro oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses. Caries Res 2002; 36(2):93-100.
- 24 Serrano J, Herrera D, La placa dental como Biofilm ¿como eliminarla? RCOE 2005, 10(4): 431 – 439

25 Czesnikiewicz - Guzik M., Brelanski W. Guzik, T. J., Loster, Konturek S.S. *Helicobacter pylori* in the oral cavity and its implications in gastric infection, periodontal health, immunology and dyspepsia. J physiol pharmacol 2005,56 (6), 77-89.