

03072
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS
Y HUMANIDADES**



**INTERACCION DE *Helicobacter pylori* CON
MONOCAPAS DE CELULAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

PRESENTA LA

Q.F.B. VERONICA GABRIELA LUQUERO MARTINEZ

TUTORES:

**GUILLERMO RUIZ-PALACIOS Y SANTOS
EDMUNDO CALVA MERCADO
FERNANDO VALLE BAHEZA**

MEXICO, D. F.

1987.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" bajo la dirección del Dr. Guillermo Ruiz Palacios y Santos, y la asesoría del Dr. Edmundo Calva Mercado y Dr. Fernando Valle Baheza.

JURADO DE EXAMEN

Presidente	Dr. Guillermo Ruiz- Palacios y Santos
Vocal	Dr. Edmundo Calva Mercado
Secretario	M. En C. Ma. del Carmen Wachter Rodante
Suplente	Dra. Blanca Ruiz Ordaz
Suplente	Dra. Isaura Meza Gómez- Palacio

AGRADECIMIENTOS

Dr. Guillermo Ruiz Palacios, Dr. Edmundo Calva Mercado y Dr. Fernando Valle Bahaza, muchas gracias por su orientación apoyo y ayuda en la realización de este trabajo.

A los integrantes del Jurado, gracias por sus comentarios y sugerencias que ayudaron a enriquecer esta tesis.

A los miembros del Departamento de Infectología, y amigos que de alguna manera contribuyeron en la realización de este trabajo, gracias por su amistad y compañerismo

A Dios

Por darme fuerzas y salud para
alcanzar una de mis metas.

A mi madre

Porque continúas viva en mis pensamientos,
y el recuerdo de tu fortaleza me impulsa a
seguir adelante ante cualquier obstáculo

A mi padre

Por ser como eres, por su cariño, comprensión
y apoyo incondicional.

A mis hermanas Angeles y Lety

Por estar cerca de mí, y apoyarme en el momento que
más lo necesito, pero sobre todo, por ser mis hermanas.

A Toño

Por compartir tantas cosas conmigo, confiar en mí
y por apoyarme en todo momento.

A mis amigos de toda la vida Jorge, Silvia, Susana y Angélica

Por estar cerca de mí y brindarme su amistad desinteresada
e incondicional

A mis amigos de la Universidad y del Hospital

Por permitirme seguir cultivando nuestra amistad.

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	8
HIPÓTESIS	9
OBJETIVOS	9
DISEÑO EXPERIMENTAL	10
MÉTODOS	
Objetivo 1	12
Objetivo 2	17
RESULTADOS	
Objetivo 1	20
Objetivo 2	27
DISCUSIÓN	37
BIBLIOGRAFÍA	47

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Cepas seleccionadas de <i>H. pylori</i>	13
Tabla 2. Establecimiento de la técnica de adherencia de Hp a n-hexadecano	20
Tabla 3. Reproducibilidad de la técnica de adherencia de Hp a n-hexadecano	21
Figura 1. Adherencia a n-hexadecano en función del tiempo de crecimiento Hp	22
Tabla 4. Caracterización cualitativa y cuantitativa de la expresión fenotípica de Hp	24
Figura 2. Patrón de adherencia difuso de <i>H. pylori</i> en células Hep-2	25
Figura 3a. Patrón de adherencia agregativo de <i>H. pylori</i> en células Hep-2	26
Figura 3b. Patrón de adherencia agregativo de <i>H. pylori</i> sin células	26
Figura 4. Formación de monocapas de células Caco-2 polarizadas con una concentración de 2.4×10^5 células.	28
Figura 5. Formación de monocapas de células Caco-2 polarizadas con una concentración de 4.8×10^5 células.	29
Figura 6. Evaluación de la integridad de la monocapa de células Caco-2 polarizadas con <i>S. typhimurium</i> y <i>E. coli</i>	30
Figura 7. Evaluación de la integridad de la monocapa de células Caco-2 polarizadas infectadas con diferentes cepas de <i>H. pylori</i>	31

Tabla 5.	Transporte de Hp en comparación con <i>S. typhimurium</i> y <i>E. coli</i> (no invasiva) a través de monocapas de células polarizadas.	32
Figura 8.	Microscopía electrónica de transmisión de monocapas de células polarizadas fijadas 30 min después de ser infectadas con Hp	33
Figura 9.	Microscopía electrónica de transmisión de monocapas de células Caco-2 polarizadas infectadas con la cepa 88-23 de Hp	34
Figura 10.	Microscopía electrónica de transmisión que muestra los sitios de adherencia de Hp a la superficie de monocapas de células polarizadas.	35
Figura 11.	Microscopía electrónica de transmisión que muestra Hp dentro de las células Caco-2 polarizadas.	36

RESUMEN

Helicobacter pylori (Hp) es uno de los patógenos de mayor importancia en la actualidad por ocasionar una de las infecciones crónicas más comunes en el humano. Esta bacteria tiene la capacidad de adherirse a células epiteliales gástricas, permanece allí por largo tiempo y produce gastritis, caracterizada por una respuesta inflamatoria crónica que puede evolucionar a úlcera duodenal y carcinoma gástrico. Algunas características fenotípicas de la bacteria como: la hidrofobicidad superficial, la producción de ureasa y citotoxina parecen ser importantes en este proceso.

Observaciones *in vivo*, muestran que Hp se encuentra muy unido a la superficie de células gástricas, especialmente en las uniones intercelulares. Aún cuando se ha observado tropismo *in vivo*, Hp es capaz de adherirse a diferentes líneas celulares *in vitro*. Sin embargo, a pesar de los múltiples estudios de adherencia de Hp a células, son pocas las evidencias del fenómeno que sigue a esta unión.

Los sistemas tradicionales *in vitro* con monocapas de células crecidas en superficies plásticas, no permiten la polarización adecuada de las células en sus dominios apical y basal, por lo que la orientación de sus receptores es al azar. Por otro lado, los sistemas más recientes, implican el uso de membranas como un soporte que separan una doble cámara para depositar el medio, permitiendo el crecimiento y desarrollo de monocapas celulares polarizadas, con sus receptores orientados hacia la porción apical y basolateral, como ocurre en los epitelios de mucosas. Estos sistemas han sido de gran utilidad para estudiar la capacidad de algunos patógenos para atravesar monocapas de células epiteliales, su forma de invasión, y sus efectos en las células hospederas.

Los objetivos de este trabajo fueron definir la capacidad y el grado de adherencia de *H. pylori* a células epiteliales así como la relación que existe entre sus características fenotípicas; y evaluar el fenómeno de transporte en células Caco-2 polarizadas. Para cumplir con estos objetivos, se seleccionaron 9 cepas de Hp aisladas de pacientes con diferentes cuadros clínicos, con diferente resistencia a antimicrobianos y expresión o no de ureasa y citotoxina. A esta cepas se les cuantificó la actividad de ureasas y la hidrofobicidad superficial. La capacidad y grado de adherencia se cuantificó por el ensayo de adherencia a células HEP-2. El fenómeno de transporte en células polarizadas fue valorado, contando el número de bacterias viables capaces de atravesar una monocapa de células polarizadas Caco-2, y la integridad de la monocapa celular fue evaluada midiendo tanto la resistencia transepitelial como por microscopía electrónica.

En tres de las cepas caracterizadas fenotípicamente, demostramos que Hp no sólo induce cambios en la superficie apical de las células epiteliales, sino también es capaz de atravesar las células

epiteliales, manteniendo la integridad de la monocapa sin causar daño celular aparente en el transcurso de 8 hrs. Con estos hallazgos de interacción de la bacteria con las células Caco-2 polarizadas, demostramos que *H. pylori* es un patógeno capaz de inducir transcitosis, contrario a la observación general de que no es una bacteria invasiva, lo cual podría explicar la inducción de la respuesta inflamatoria que ocurre en la lamina propia, por la presencia de la bacteria en este compartimento.

Por ensayos de adherencia a células HEP-2 logramos diferenciar cepas adherentes de *H. pylori* en mayor proporción que las no adherentes, con la presencia de dos patrones de adherencia en estas células: el difuso y el agregativo.

La hidrofobicidad superficial fue la única característica fenotípica en *H. pylori* que correlacionó con la adherencia a células HEP-2, lo cual nos permitió diferenciar entre cepas hidrofóbicas e hidrofílicas, y en la que pudimos observar el fenómeno de autoagregación, no visto antes en *H. pylori*.

Finalmente, la severidad de la enfermedad en la infección por *H. pylori* no tuvo ninguna correlación con la actividad de ureasa, con la hidrofobicidad superficial, con la capacidad de adherencia ni con el patrón de adherencia a células HEP-2; y solo hubo una correlación con la producción de citotoxina.

INTRODUCCIÓN.

GENERALIDADES

Helicobacter pylori es un bacilo gram negativo, pleomórfico, y microaerofílico que coloniza la mucosa gástrica humana. La colonización con esta bacteria en la mayoría de las veces no produce síntomas por largo tiempo, o bien puede provocar todo un proceso inflamatorio y causar gastritis aguda y/o crónica. Se ha propuesto que la infección por *H. pylori* es un proceso lento de autorregulación y adaptación sobre la liberación local de agentes antiinflamatorios (1). La progresión de la enfermedad es un factor importante en la patogénesis de úlceras gastroduodenales y el desarrollo de cáncer gástrico (2-4).

H. pylori causa una de las infecciones crónicas más comunes en el humano. La incidencia de la infección aumenta y continúa con la edad(5), y la incidencia varía de acuerdo a las poblaciones estudiadas (6). Los principales factores que se han considerado de riesgo para adquirir la infección por *H. pylori* son: la edad, la condición socioeconómica, las condiciones deficientes de higiene y limpieza durante la niñez (5,7), y recientemente se ha descrito que hay un mayor riesgo en algunos grupos étnicos independientes de la clase social(8). En países desarrollados la infección es rara en los niños y es progresivamente más común en adultos, mientras que en los países en desarrollo es muy común a edad temprana, y es frecuente que en los adultos la infección se haya adquirido durante la niñez (6).

H. pylori es un claro ejemplo de tropismo al tejido, debido a que este microorganismo puede observarse en las células epiteliales gástricas, principalmente en la región antral, aún cuando, ocasionalmente, puede ser visto en forma simultánea en el cuerpo y región fúndica. La infección en duodeno ocurre cuando se encuentran células gástricas a ese nivel (metaplasia) (9).

Aún cuando *H. pylori* cumple con los criterios para considerarse un patógeno, existe gran controversia sobre los mecanismos por los que puede inducir enfermedad. Para estudiar estos mecanismos se han empleado modelos experimentales en animales. Sin embargo, son pocas y limitadas las especies susceptibles de infección con esta bacteria (cerdos, primates, perros, ratones) (10-12). También se han empleado modelos *in vitro*, usando líneas celulares epiteliales y cultivos primarios de células humanas y de animales, con la finalidad de encontrar un modelo adecuado que se acerque más a los procesos de enfermedad observados *in vivo*(13-16).

FACTORES DE PATOGENICIDAD DE *Helicobacter pylori*

La función que tienen diversas estructuras de *H. pylori* como factores de patogenidad ha sido ampliamente reconocida(17), y pueden dividirse en tres grupos: factores de colonización, factores de persistencia e inductores de enfermedad.

Factores de colonización.

Son características que le permiten a la bacteria establecerse en el hospedero, y entre ellos se encuentran: la movilidad, la producción de ureasa, y los mecanismos de adherencia de la bacteria (adhesinas) a la mucosa gástrica (receptores celulares).

Movilidad

La forma espiral de *H. pylori* le permite desplazarse con facilidad en el medio viscoso del estómago, y su movimiento en forma de "tirabuzón" le confiere flexibilidad y permite el alineamiento que adopta con respecto a las células de la mucosa (18). La bacteria posee de dos a ocho flagelos con filamentos formados por dos tipos de flagelinas, que son codificadas por los genes *flaA* y *flaB* (19-20). En estudios de mutaciones inducidas en estos genes, se demuestra que el gen *flaA* es esencial para la movilidad. Estudios realizados en lechones muestran una correlación entre movilidad y virulencia de las cepas de *H. pylori* (21,22).

Ureasa

Entre las principales enzimas producidas por *H. pylori* se encuentra la ureasa, que al hidrolizar la urea libera amonio y proporciona un microambiente neutro que protege a la bacteria de los efectos del ácido gástrico (18). Se ha observado actividad de la ureasa en el citoplasma, lo que ha sugerido que tiene un papel adicional en la asimilación de nitrógeno(23). La acumulación excesiva de amonio puede causar pérdida de la integridad iónica del moco gástrico, lo cual induce hipoclorhidria, el cual es un mecanismo propuesto como responsable de la producción de úlceras(24,25), por lo que la ureasa también es considerada un factor inductor de enfermedad.

Mecanismos de adherencia

In vivo, *H. pylori* se adhiere principalmente a células gástricas secretoras de moco, especialmente en las criptas y las uniones intercelulares, causando su disrupción con la mucosa (18). Por microscopía electrónica, se han descrito diferentes tipos de interacción de la bacteria con la mucosa gástrica, incluyendo la "adherencia en pedestal" que es similar a la observada en *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) (13,26,28). También se ha observado la desaparición de mucina y la degeneración epitelial, caracterizada por eliminación de las microvellosidades, infiltración de linfocitos polimorfonucleares y vacuolización de las células epiteliales asociadas a la bacteria (13,28).

Estudios *in vitro* han demostrado que *H. pylori* se adhiere a diversas líneas celulares, entre las que se encuentran células de carcinomas de laringe (HEp-2), de cervix (HeLa), de intestino de embrón humano (Int-407), gástrico humano (Kato III, AGS y HGT-1), de colon humano (Caco-2) y de adreno cortical (Y-1), así como a cultivos primarios de células epiteliales del estómago (13,32). Sin embargo, pocos de estos estudios han descrito los fenómenos que ocurren posteriores a dicha adherencia. Evans y cols. describieron, en estudios de microscopía, la adherencia e internalización de *H. pylori* a células HEp-2, demostrando la capacidad de la bacteria para introducirse a una célula eucariote que no sea un fagocito (31).

Adhesinas. La unión específica de *H. pylori* con el hospedero implica interacción de las adhesinas bacterianas con los receptores en las células superficiales. En general, la mayoría de las adhesinas bacterianas son hemaglutininas, y comparten entre sí la propiedad de ser de moderada a fuertemente hidrofóbicas, y la capacidad para reconocer receptores específicos. Las hemaglutininas producidas por cepas de *H. pylori* tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos de varias especies, y se consideran candidatos de adhesinas, por la correlación que hay entre la capacidad de las cepas de adherirse a diferentes líneas celulares y su habilidad de aglutinar eritrocitos (33). Se han identificado en *H. pylori* una gran variedad de adhesinas, entre las que se encuentran: la adhesina de 31 kDa (34), una proteína de 19.6 kDa parecida a pili (35), una proteína de 63kDa parecida a exoenzima S (36), una proteína con propiedades similares a lectinas (37), y una hemaglutinina fibrilar que se une a una sialoproteína del eritrocito que contiene N-acetilneuramín α 2,3 lactosa y tiene afinidad a fetuina (38). Las dos últimas adhesinas son específicas a ácido siálico.

Receptores celulares. Los receptores celulares que se han encontrado para *H. pylori* se han clasificado en receptores de afinidad alta e intermedia (39). Los receptores de alta afinidad incluyen la fosfatidil-etanolamina y gangliotetraosilceramido (presentes en la mucosa gástrica humana y en el eritrocito) (40), y los glicolípidos sialados GM₁ y GM₂. Los receptores de mediana afinidad incluyen el gangliósido GM₁ y paraglobósido (41,42). Otros receptores

importantes para *H. pylori*, que son componentes de la matriz extracelular, son la colágeno tipo IV, la fibronectina y la laminina (43-45). Hay evidencias recientes que sugieren que la unión específica de *H. pylori* a la superficie de las células del moco es mediada por glicoproteínas fucosiladas (46).

Factores de persistencia

Estos factores permiten una colonización prolongada, mediante mecanismos complejos de supervivencia, evadiendo la respuesta inmune y produciendo proteínas adaptativas. En los estudios de microscopía electrónica de *H. pylori* asociado al epitelio lesionado, se muestra la presencia de gránulos de fosfolípidos en la bacteria, que podrían funcionar como reservas de energía para sobrevivir(47). La bacteria tiene defensas contra diversas formas de tratamiento, como son el desarrollo de resistencia a antimicrobianos y de una dificultad de erradicación de la infección, que es también considerada como un mecanismo de supervivencia (48,49).

Para evadir la respuesta inmune, se ha postulado que *H. pylori* es resistente a la presencia de catalasa y superóxido dismutasa, enzimas importantes en la inducción de muerte oxidativa por fagocitos. Se sabe que el gen que codifica la superóxido dismutasa de *H. pylori* presenta una gran homología con la de otros patógenos intracelulares(50). Por otro parte, los lipopolisacáridos de *H. pylori* inducen una disminución de la respuesta inmune, por la menor producción de radicales de oxígeno tóxicos de neutrófilos y de citocinas, en comparación con otras enterobacterias (51,52).

Factores inductores de enfermedad

Estos factores producen cambios adversos en el epitelio gástrico colonizado por *H. pylori*. Dentro de este grupo se incluye la producción de ureasa y de citotoxina, factores que causan ruptura de la barrera mucosa gástrica, e inducen inflamación, así como los factores que producen cambios fisiológicos gástricos. La producción de ureasa y citotoxina se ha considerado de gran importancia en la inducción de la enfermedad.

La citotoxina de *H. pylori* se encuentra aproximadamente en 50% de las cepas(53,54); está

relacionada con el desarrollo de úlceras duodenales y produce un efecto vacuolizante en las células. La actividad vacuolar de la citotoxina es mediada por una proteína de 87kDa codificada por el gen *vacA* y se ha demostrado que la formación de vacuolas en células HeLa requieren de la actividad de ATPasa-V vacuolar (55). Se ha identificado también una proteína de 128 kDa codificada por el gen *cagA*, que está asociada con la presencia de la citotoxina y es altamente inmunogénica (56,57). Se ha encontrado una fuerte asociación entre la presencia de úlcera péptica y cáncer gástrico, con el aislamiento de cepas de *H. pylori* *cagA* positivo(57,58).

Más que la ureasa, se postula que el producto formado por el catabolismo de la urea, el amonio, interfiere en la difusión de iones hidrógeno y de esta manera induce daño celular por ácido(24); sin embargo, también se ha sugerido que el amonio por sí mismo ejerce un efecto tóxico (60).

PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACION DEL PROBLEMA

El conocimiento de los procesos involucrados en la interacción bacteria-célula es importante para definir la patogénesis bacteriana. Estos procesos tienen gran importancia en *H. pylori*, ya que esta bacteria tiene mecanismos altamente efectivos como son su forma espiral, movilidad y la producción de ureasa (18), que le permite sobrevivir en el microambiente hostil del estómago y persistir por largo tiempo sin causar daño.

La adherencia a la mucosa gástrica es un prerrequisito esencial en el proceso de infección, que le confiere a *H. pylori* ciertas ventajas sobre el huésped para provocar enfermedad, como son: 1) protección contra el arrastre de las secreciones gástricas, así como de los alimentos y líquidos ingeridos; 2) persistencia a pesar del continuo recambio del epitelio gástrico; y 3) una gran eficiencia para causar daño en la célula blanco gracias a la liberación de sus factores de virulencia como la actividad de ureasa y citotoxina entre otros.

Los mecanismos por los cuales *H. pylori* se adhiere a la mucosa gástrica y causa daño no han sido completamente dilucidados. A pesar de los múltiples estudios de virulencia realizados, estos se han enfocado al estudio del proceso de patogénesis, analizando algunos factores de virulencia de manera aislada como son: movilidad de la bacteria, propiedades superficiales de carga e hidrofobicidad, actividad de ureasa y de citotoxina, así como los factores que determinan la adherencia bacteriana a células de la mucosa gástrica y a diferentes líneas celulares. Hasta el momento son pocos los estudios que involucran más de dos factores de virulencia relacionados con la adherencia, el proceso de patogénesis y el grado de daño causado al paciente (22,61,62). Por lo tanto es necesario realizar estudios que evalúen en forma integral los principales mecanismos de virulencia propuestos en la patogénesis de *H. pylori*, así como su intervención en el proceso de la interacción célula-bacteria, tomando en cuenta la hidrofobicidad superficial y su capacidad de adherencia.

Para estudiar la interacción de *H. pylori* con la célula, se han empleado sistemas *in vitro* de células epiteliales, que no siempre pueden extrapolarse a fenómenos que ocurren *in vivo*. En estos sistemas, al cultivar las células epiteliales en superficies de plástico o de vidrio, la monocapa celular formada no adquiere una completa diferenciación celular, ni una adecuada orientación de sus componentes de superficie. El empleo de nuevos sistemas *in vitro* de monocapas de células polarizadas, en estudios de interacción célula-bacteria realizados con varios enteropatógenos, tiene grandes ventajas sobre las técnicas convencionales (63-67), ya que las células adquieren una diferenciación celular similar a la observada *in vivo*, con la formación de microvellosidades y orientación adecuada de sus componentes apicales y basales (68). La diferenciación celular se logra cultivando las células sobre un filtro que separa dos compartimentos, permitiéndole a la célula exponer su porción apical al medio y la basal adherida a la superficie de soporte. Estos

sistemas de dos cámaras permiten también la inoculación de bacterias en la parte apical, para estudiar no sólo la capacidad de adherencia superficial, sino también la penetración bacteriana de dicha monocapa y el proceso de transporte a través de ésta. Por esto, se llevó a cabo un estudio de *H. pylori* con monocapas de células polarizadas, empleando cepas bacterianas fenotípicamente caracterizadas, aisladas de enfermos con cuadro clínico de gastritis, úlcera péptica, o cáncer gástrico, para estudiar el fenómeno de transporte a través de monocapas celulares.

HIPÓTESIS

La capacidad, grado de adherencia y el transporte de *H. pylori* en monocapas celulares varían de cepa a cepa y esta variación podría estar determinada por la expresión fenotípica de la hidrofobicidad superficial, y de la actividad de ureasa y de citotoxina.

OBJETIVO GENERAL

Definir la capacidad de adherencia de *H. pylori* a células epiteliales, así como la relación que existe entre sus características fenotípicas de hidrofobicidad superficial y actividad de ureasa y citotoxina; y evaluar el fenómeno de transporte en células Caco-2 polarizadas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Seleccionar cepas de *H. pylori* con base en el cuadro clínico, resistencia a antimicrobianos y expresión fenotípica de ureasa y citotoxina; cuantificar la actividad de ureasa, hidrofobicidad superficial y capacidad de adherencia a células HEp-2 de estas cepas
2. Evaluar el proceso de adherencia, internalización y transporte en monocapas de células polarizadas, de las cepas de *H. pylori* caracterizadas.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para poder cumplir el objetivo planteado, el trabajo se dividió en dos objetivos específicos:

Objetivo 1

La selección de las cepas de *H. pylori* se llevo a cabo en base a: cuadro clínico (gastritis crónica, úlcera duodenal, mucosa gástrica normal y cancer gástrico), resistencia a antimicrobianos (por el método de concentración mínima inhibitoria (MIC)), y expresión fenotípica de ureasa y cicoxina.

Para la caracterización fenotípica se cuantificó: hidrofobicidad superficial, producción de ureasa y adherencia a células Hep-2. Primero se estableció la fase óptima de crecimiento bacteriano a emplear en todas las técnicas, tomando como parámetro de comparación la cuantificación de hidrofobicidad superficial por adherencia a n-hexadecano a las 24, 48,72 y 96 hrs. Todas las técnicas empleadas fueron previamente establecidas para *H. pylori*. La producción de ureasa fue cuantificada por el método de Berthelot, con modificaciones a la técnica de Labigne (69). La hidrofobicidad superficial bacteriana fue medida empleando dos métodos diferentes: agregación con sulfato de amonio y adherencia al hidrocarburo n-hexadecano. Finalmente, se evaluó la capacidad de adherencia a la línea celular HEP-2 por el método de Cravioto, con algunas modificaciones (70).

Una vez caracterizadas las cepas, se seleccionaron tres cepas de *H. pylori* con diferencias en la expresión fenotípica y adherencia a células HEP-2, para evaluar el proceso de adherencia, internalización y transporte en monocapas de células polarizadas.

Objetivo 2

Para obtener monocapas de células epiteliales se seleccionó la línea celular Caco-2. Tomando en cuenta que esta línea no se había trabajado antes en nuestro laboratorio, hubo la necesidad de conocer, manejar y mantener la línea celular.

Una vez crecidas las células Caco-2 en monocapas, se estableció optimamente la técnica de formación de monocapas polarizadas descrita por Falkow (63) y se estableció la cantidad de células empleada y los tiempos óptimos para obtener las monocapas estables. Esto se hizo empleando equipos Transwell, que consisten de un sistema de dos cámaras (superior e inferior), comunicadas por un filtro que funciona como soporte sobre el cual se cultivan las células. Este sistema crea un ambiente apropiado para polarizar las células. La confluencia e integridad de la monocapa se midió por el valor de resistencia transmonocapa.

Las monocapas polarizadas fueron infectadas con *H. pylori*, empleado como control positivo una cepa patógena de *Salmonella typhimurim* capaz de romper la integridad de la membrana y atravesar la monocapa de células; como control negativo se empleó una cepa no-patógena de *Escherichia coli*. Se evaluó la integridad de la monocapa midiendo la resistencia transepitelial, y para el fenómeno de transcitosis, se cuantificaron UFC/ml en función del tiempo.

Finalmente, se fijaron monocapas de células polarizadas después de 0.5, 1, 1.5 y 2 h. de infección con *H. pylori*, para observar el fenómeno de adherencia y transporte por microscopía electrónica.

MÉTODOS

OBJETIVO 1

Las cepas seleccionadas con características fenotípicas previamente establecidas se muestran en la Tabla 1.

Líneas celulares empleadas

Células HEp-2 (ATCC CCL 23) aisladas de carcinoma de laringe humano
Células Caco-2 (ATCC HTB 37) aisladas de carcinoma de colon humano

Establecimiento del ensayo de la adherencia de *H. pylori* a n-hexadecano

El método de adherencia a n-hexadecano consiste en lo siguiente: Se prepara una suspensión bacteriana conocida y se mide absorbancia (Abs) a 540 nm antes de agregar un volumen conocido del hidrocarburo n-hexadecano; posteriormente se mezcla durante 1 min. en vórtex y se deja reposar la emulsión hasta separar la fase del hidrocarburo de la fase acuosa, y finalmente se cuantifica la absorbancia a la fase acuosa. El porcentaje de adherencia es calculado con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de adherencia} = \left(\frac{\text{Abs. después de agitar}}{\text{Abs. antes de adición de n-hexadecano}} - 1 \right) \times 100$$

Para valorar la adherencia de *H. pylori* a n-hexadecano, se estableció la técnica de la siguiente manera:

- 1 Se determinó la cantidad de n-hexadecano (pureza del 99%) capaz de lograr una máxima adherencia y reproducibilidad de la técnica, con una cepa control de *H. pylori*, empleando 0.1, 0.15 y 0.2 ml de n-hexadecano por cada ml de suspensión.
- 2 Se comprobó la reproducibilidad de la técnica con el volumen seleccionado de n-hexadecano, empleando controles positivo y negativo para este método y una cepa de *H. pylori*:

a.- Control positivo para adherencia a n-hexadecano [*A. calcoaceticus* RAG-1 (ATCC31012)], con una gran capacidad de adherencia al hidrocarburo y a células HEP-2.

b.- Control negativo para adherencia a n-hexadecano (*A. calcoaceticus* MR 481), mutante de la cepa RAG-1 deficiente en adherencia al hidrocarburo y a células HEP-2.

c.- Cepa de referencia de *H. pylori* CCUG15818

Tabla 1. Cepas seleccionadas de *H. pylori*

CEPAS DE <i>H. pylori</i> (Procedencia)	ORIGEN DE AISLAMIENTO	FENOTIPOS Urea Ctx	GENOTIPO Caga VacA	RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS M µg/ml N
92-2 (México)	Mucosa normal	+ -	ND +	16R 6S
CCUG15818 (Suecia)	Gastritis crónica	+ +	ND +	1.5S 1S
84-183 (EUA)	Úlcera duodenal	+ +	+ +	ND ND
Hp 55 (México)	Gastritis crónica	+ -	ND +	32R 12R
Hp 152 (México)	Gastritis crónica	+ -	ND +	32R 12R
PCR 23 (México)	Cáncer gástrico	+ +	ND +	ND ND
88-23 (Inglaterra)	Úlcera Duodenal	+ +	+ +	ND ND
88-23-4 variante (Inglaterra)	Úlcera duodenal	- +	+ +	ND ND
88-22 (Inglaterra)	Dispepsia	+ -	- +	ND ND

R = Resistente
S = Sensible
Ctx = Citotoxina

N = Nitrofurantoina
M = metronidazol
Urea = Ureasa

+ = Presente
- = Ausente
ND = No Determinado

Selección de la fase de crecimiento óptima para cuantificar la adherencia a n-Hexadecano

- 1 De una suspensión de la cepa de referencia de *H. pylori* crecida en agar infusión cerebro corazón (BHI), se tomó un inóculo y se sembró en caldo BHI durante 96 hrs.
- 2 Se tomaron muestras del caldo sembrado a las 0, 24, 48, 72 y 96 hrs.
- 3 La absorbancia fue leída a 540 nm y se cuantificó (UFC /ml) en las muestras tomadas a los diferentes tiempos de crecimiento.
- 4 Se determinó la adherencia a n-hexadecano para cada uno de los tiempos de crecimiento bacteriano, y finalmente se analizaron e interpretaron los resultados.

Ensayos de hidrofobicidad

Agregación con sulfato de amonio

- 1 Se prepararon soluciones de sulfato de amonio a diferente molaridad (0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 M) en PBS y ajustando el pH a 7.
- 2 Cada concentración de sulfato de amonio se mezcló en proporción 1:1 con una suspensión bacteriana en portaobjetos, agitando durante corto tiempo. Posteriormente se observó la presencia o ausencia de agregación.
- 3 El control negativo fue PBS con la solución bacteriana.
- 4 Como control positivo se empleó la cepa de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) H-10407, con un valor de agregación $\leq 1M$ de sulfato de amonio

La bacteria fue considerada hidrofóbica si se observaba agregación con una solución de sulfato de amonio $\leq 1M$

Ensayo de adherencia de *H. pylori* a n-hexadecano

- Una suspensión bacteriana en 3 ml de PBS (pH 7.4) se ajustó a una lectura de absorbancia de 0.15 a 540 nm., de los siguientes cultivos:
 - a.- Cultivos de 48 hrs de *H.pylori*.
 - b.- Control positivo para adherencia a n-hexadecano.
 - c.- Control negativo para adherencia.

- A cada tubo se le agregaron 0.45 ml de n-hexadecano y se agitó por 1 minuto en vórtex.

- Los tubos se mantuvieron en reposo hasta lograr la separación de las fases agua-hidrocarburo

- Se midió la absorbancia final y se calculó el porcentaje de adherencia.

Ensayo de actividad de ureasa

Un cultivo de *H. pylori* de 48 hrs se suspendió en PBS-E (PBS 0.1M-EDTA10 mM [pH 7.4]) para dar una absorbancia final de 0.15 a 540 nm.

Se determinó la concentración de proteínas en la suspensión bacteriana por el método de Bradford(48).

La actividad de ureasa fue cuantificada por el método de Berthelot, con modificaciones de la técnica descrita por Ferrero y Labigne(49).

10-50 μ l de una dilución 1:10 de la suspensión inicial se puso a reaccionar con 200 μ l del sustrato urea (50nm en PBS-E) a 37°C durante 30 ,35, 40 y 45 min por reacción para cada cepa bacteriana .

Como blanco se empleo la misma suspensión bacteriana, inactivando la ureasa por ebullición durante 5 min.

Las reacciones y el blanco fueron paradas al agregar 400 μ l de nitroprusiato de fenol y 400 μ l de hipoclorito alcalino, e incubando a 50°C.

Las reacciones fueron leídas después de 30 minutos a 625 nm. La cantidad de amonio liberado fue determinado de una curva estandar, correlacionando la absorbancia con la concentración de amonio. La liberación de 2 μ mol de amonio fue equivalente a la hidrólisis de 1 μ mol de urea

La actividad de ureasa fué expresada en nanomoles de urea hidrolizada/ min/ μ g de proteína.

Ensayo de adherencia de *H pylori* a células HEp-2

- 1 Las células HEp-2 se cultivaron a confluencia en microplacas de cultivo de 8 pozos (8.9 x 8.9cm Lab-Tek). Cada pozo, conteniendo 400 μ l de una suspensión de 1×10^6 células viables/ml, fue incubado a 37°C en atmósfera del 5% de CO₂ por 18-24 hrs.
- 2 Posteriormente, 100 μ l de las suspensiones con 3×10^7 UFC de *H. pylori*, se agregaron a cada pozo por duplicado, incubando durante 3.5 hrs a 37°C en atmósfera del 5% de CO₂.
- 3 Se lavaron las células en PBS, se fijaron con formalina al 10%, y se tificaron con colorante de Giemsa para ser observadas al microscopio.
- 4 La lectura se realizó contando el número de bacterias adheridas en 100 células.

Una cepa fue considerada adherente cuando se encontraron ≥ 20 bacterias adheridas por célula en $\geq 50\%$ de las células.

OBJETIVO 2

Cultivo de células Caco-2

Las células Caco-2 se obtuvieron del ATCC (HTB37) y el medio de crecimiento empleado fue Medio Mínimo Esencial Modificado de Eagle (MEM-E) con sales de Earle, aminoácidos no esenciales, 10% de suero fetal bovino (MEM-EEA-10% SFB) y antibióticos.

Las monocapas confluentes de células, al término de 2 lavados con PBS celular, fueron desprendidas de la superficie con tripsina-EDTA (0.05% - 0.5 mM) durante 5 min a 37° C.

Las células se suspendieron en medio de cultivo y se determinó la concentración de células viables por ml con azul de tripano.

En botellas de cultivo de 175 cm² se agregaron 1.08×10^7 células, incubándose a 37°C durante 6-7 días para obtener una monocapa confluyente.

Establecimiento óptimo de la producción de monocapas de células Caco-2 polarizadas

Para el establecimiento óptimo de la producción de monocapas polarizadas: 1) se seleccionó el tiempo óptimo y la concentración adecuada de células, para obtener una monocapa estable; y 2) se evaluó la integridad de la monocapa de células, midiendo indirectamente el valor de la resistencia transmonocapa en función del tiempo y cuantificando el transporte bacteriano utilizando: a) células sin bacterias; b) *E. coli* DH5 α (control negativo), cepa no patógena, incapaz de romper la integridad de la monocapa y de atravesar una monocapa de células polarizadas; y c) *S. typhimurium* 1702B (control positivo), cepa patógena capaz de romper la integridad de la monocapa y atravesar una monocapa de células polarizadas.

1.- Selección del tiempo y concentración de células Caco-2

Los filtros Transwell (No. Cat. 3415 Costar EUA) con membranas de 0.33 cm² de diámetro y de tamaño de poro de 3 μ m, se incubaron por 30 min en placas de cultivo Transwell con MEM-

EEA-10%SFB para la medición de la resistencia eléctrica antes de agregar las células.

A cada filtro se le agregaron 100 μ l de una suspensión con 4.8×10^5 ó 2.4×10^5 células Caco-2 en MEM-EEA-10% SFB, y se transfirió a 1 ml de medio fresco.

Para medir la resistencia transepitelial se empleó un medidor de resistencia eléctrica Millicell-ERS y 2 electrodos Ag/AgCl (Millipore Corporation USA).

Para cada uno de los filtros, fue introducido un electrodos en el medio de cultivo del compartimento exterior de la cámara y el otro en compartimento interior, sin tocar la monocapa celular, y se hizo pasar corriente a través de los electrodos.

La resistencia (Ω) transepitelial fué calculada por la siguiente fórmula:

[Ω de la monocapa celular - Ω del filtro sin células] X área del filtro

Diariamente fué cambiado el medio de la parte apical y basolateral y medida la resistencia transmonocapa, hasta obtener una resistencia alta y constante.

La concentración de células Caco-2 adecuada y el tiempo óptimo se obtuvo, midiendo los valores de resistencia transmonocapa (Ω ms/cm²) contra tiempo (hrs).

2.- Técnica de evaluación de la integridad de la monocapa de células Caco-2 polarizadas, infectadas con bacterias, y el fenómeno de transporte

Las bacterias fueron cosechadas a partir de placas de agar y suspendidas en medio MEM-EEA-1% SFB sin antibiótico , ajustando a una concentración aproximadamente de 1×10^8 UFC/ml.

Los filtros con células fueron lavados y transferidos a placas de cultivo con MEM-EE 1% SFB sin antibiótico, incubándose por 1 hr. La resistencia fue medida antes de infectar las monocapas (tiempo 0).

Las monocapas fueron infectadas con 100ul de suspensión bacteriana por la parte apical y se determinó el número bacterias viables del inóculo inicial, por dilución en placa determinando UFC/ml.

Al término de cada 2 hrs. de incubación en una atmósfera de 10% CO₂, 5% O₂ y 85% N₂, se midió la resistencia transmonocapa y el filtro fué transferido a 1 ml de medio fresco a temperatura ambiente.

Las bacterias viables en el medio basolateral fueron cuantificadas cada 2 hrs. determinándose UFC/ml.

Al concluir 0.5, 1, 1.5 y 2 h , los filtros se lavaron 3 veces con PBS celular y se fijaron con glutaraldehído al 2.5% , en amortiguador de cacodilato, para valorar la integridad de la monocapa y el proceso de internalización de la bacteria por microscopía electrónica.

RESULTADOS

OBJETIVO 1

Establecimiento del grado óptimo de adherencia de *H. pylori* a n-hexadecano

Para seleccionar el volumen óptimo de n-hexadecano, se determinó el porcentaje de adherencia al hidrocarburo y el coeficiente de variación para cada uno de los volúmenes empleados. Los resultados obtenidos en la Tabla 2 muestran que el volumen de n-hexadecano que tuvo un mayor porcentaje de adherencia, y un menor coeficiente de variación, fue el de 0.15 ml de suspensión bacteriana, por lo que éste fue considerado el volumen óptimo.

Tabla 2.- Establecimiento de la técnica de adherencia de *H. pylori* cepa CCUG15818 a n-hexadecano, empleando 3 diferentes volúmenes del hidrocarburo y realizando el ensayo 6 veces en condiciones similares.

No. de ensayos (n)	Cantidad de n-hexadecano* (ml)	% de adherencia ($\bar{x} \pm \sigma$)	CV (%)
6	0.1	74.57 \pm 4.3	5.80
6	0.15	77.80 \pm 4.6	5.90
6	0.2	56.00 \pm 17.7	29.50

* cantidad de n-hexadecano por ml de suspensión bacteriana ajustada al 0.15 de absorbancia a 540nm.

CV Coeficiente de variación

Una vez establecido el método de adherencia al hidrocarburo, se evaluó la reproducibilidad de la técnica empleando sus respectivos controles positivo y negativo para adherencia a n-hexadecano y una cepa de *H. pylori*. Los resultados del porcentaje de adherencia y coeficiente de variación de la Tabla 3, muestran que esta técnica fue reproducible en 8 ensayos de la cepa de *H. pylori*, con un porcentaje de adherencia de 74 % y un coeficiente de variación < 10%.

Tabla 3. Reproducibilidad de la técnica de adherencia de *H. pylori* a n-hexadecano.

Cepas *	No. de ensayos (n)	% de adherencia ($\bar{x} \pm \sigma$)	CV (%)
CONTROL POSITIVO <i>A. calcoaceticus</i> [RAG-1(ATCC31012)]	10	89 ± 3.43	3.8
CONTROL NEGATIVO <i>A. calcoaceticus</i> mutante no adherente (MR481)	11	1.1 ± 1.89	174.9
<i>H. pylori</i> cepa de referencia CCUG15818	8	74.7 ± 6.64	8.8

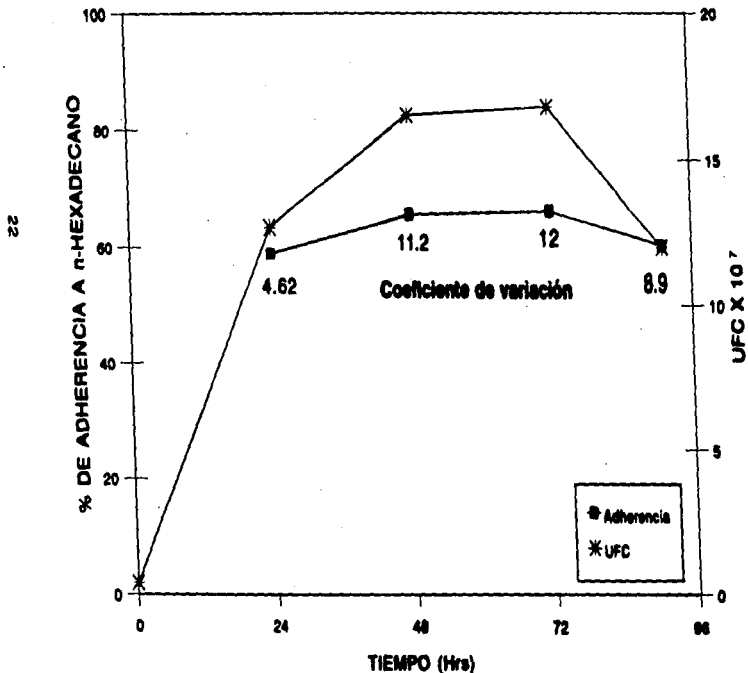
C.V. Coeficiente de variación

* Suspensión bacteriana ajustada a 0.15 de absorbancia a 540 nm, con 0.15 ml de n-hexadecano por ml de suspensión.

Selección de la fase de crecimiento de *H. pylori*

Para seleccionar la fase de crecimiento óptima de *H. pylori*, en la caracterización fenotípica, en la Figura 1 se graficó la media aritmética del porcentaje de adherencia a n-hexadecano con respecto al tiempo de crecimiento bacteriano, en un ensayo por duplicado, y se determinaron los coeficientes de variación para cada uno de los diferentes tiempos de incubación. En esta figura se muestra que la adherencia de *H. pylori* a n-hexadecano se mantuvo constante, independientemente del tiempo de crecimiento de la bacteria, y que las variaciones de adherencia con respecto al tiempo no fueron significativas.

Figura 1. Adherencia a n-hexadecano en función del tiempo crecimiento de *H. pylori*



Caracterización fenotípicas de las cepas estudiadas

En la Tabla 4 se muestra el origen de aislamiento de las nueve cepas y sus características fenotípicas. Se puede observar que sólo la expresión de citotoxina correlacionó con el cuadro clínico de todas las cepas aisladas de úlcera duodenal y 1 de cáncer gástrico, y sólo una cepa aislada de gastritis expresó la citotoxina.

Los valores de la actividad de ureasa en todas las cepas varió entre 20 a 95 nmol/min/ μ g de proteína y esta variación no estuvo asociada al cuadro clínico de procedencia. En cepas aisladas de mucosa normal y gastritis la actividad fue de 20 y de 39 a 95 nmol/min/ μ g de proteína, respectivamente; en cepas aisladas de úlcera duodenal y cáncer gástrico esta fue de 28 y 36 nmol/min/ μ g de proteína, respectivamente.

La hidrofobicidad evaluada por los dos métodos logró diferenciar 7 cepas hidrofóbicas y 2 hidrofílicas; sin embargo, esta característica tampoco fue asociada al cuadro clínico de procedencia; de 3 cepas aisladas de gastritis crónica 1 fue hidrofílica y 2 hidrofóbicas.

Finalmente, la adherencia a células Hep-2 se observó en 77% de las cepas estudiadas. El grado de adherencia a células fue independiente del origen de aislamiento, observándose que tanto en una cepa aislada de úlcera duodenal como en una aislada de mucosa gástrica normal, el porcentaje de adherencia fue $> 80\%$.

Tabla 4. Caracterización cualitativa y cuantitativa de la expresión fenotípica de *H. pylori*

CEPA DE <i>H. pylori</i>	GENOTIPO cagA vacA	FENOTIPO Cit UreA		ACTIVIDAD DE UREASA $X \pm \sigma$	DETERMINACION DE HIDROFOBICIDAD		ADHERENCIA A CÉLULAS HEp-2 $X \pm \sigma$	PATRON DE ADHERENCIA
					(NH ₄) ₂ SO ₄ (M) *	n-hexadecano $X \pm \sigma$ **		
92-2 Mucosa normal	ND +	-	+	20.25 ± 2.8	0.25	63.8 ± 5.1	92 ± 3.5	Difuso
CCUG 15918 Gastritis	ND +	+	+	52.72 ± 6.1	0.25	72.6 ± 10	85 ± 3.5	Difuso
84-183 Úlcera duodenal	+	+	+	30.86 ± 12.3	0.25	75.2 ± 1.7	89 ± 7.1	Difuso
Hp-55 Gastritis	ND +	-	+	39.95 ± 8.1	0.50	54.8 ± 2.8	85 ± 4.9	Difuso
Hp-152 Gastritis	ND +	-	+	95.11 ± 4.6	1.50	41 ± 0.3	4 ± 0.5	Difuso
PCR-23 Cáncer gástrico	ND +	+	+	36.92 ± 6.8	0.50	67.8 ± 9.2	62 ± 5.8	Difuso
88-23 Úlcera duodenal	+	+	+	28.61 ± 4.4	Agregativa	67.8 ± 9.2	61 ± 3.5	Agregativo
88-23-4 (variante) Úlcera duodenal	+	+	+	Sin actividad a las 2 h.	Agregativa	77.2 ± 4.9	31 ± 1.4	Agregativo
88-22 dispepsia	-	+	-	40.38 ± 4.2	> 2.0	48.7 ± 1.2	40 ± 7	difuso

* Es hidrofóbica si se agrega con < 1M de (NH₄)₂SO₄

** Es hidrofóbica si la adherencia a n-hexadecano es > 50%

En los ensayos de adherencia bacteriana a células HEP-2, además de evaluar el porcentaje de células con bacterias adheridas, se observó el patrón de adherencia que presentaban las cepas de *H. pylori*, y se encontraron dos patrones diferentes: el difuso en 7 cepas (figura 2), y el agregativo en dos de las cepas estudiadas (figuras 3a y 3b).

Por otra parte, se observó una correlación entre la hidrofobicidad y la adherencia a células HEP-2; de 7 cepas hidrofóbicas, en 6 la adherencia a células fue $\geq 50\%$, mientras que en todas las cepas hidrofílicas la adherencia fue $< 50\%$. Por otro lado, las 2 cepas que presentaron el patrón de adherencia agregativo, fueron las cepas que autogregaron en ausencia de sulfato de amonio.

Figura 2. Patrón de adherencia difuso de *H. pylori* en células Hep-2



Figura 3a. Patrón de adherencia agregativo de *H. pylori* en células Hep-2



Figura 3b. Patrón agregativo de *H. pylori* sin células



OBJETIVO 2

Establecimiento óptimo de la producción de las monocapas de células Caco-2 polarizadas

La formación gradual de la monocapa de células polarizadas en el transcurso de los días de crecimiento celular, se monitoreó con la medición diaria de la resistencia transmonocapa para evaluar la integridad de la monocapa de células polarizada. Para seleccionar la concentración inicial de células Caco-2 y el tiempo óptimo para la formación de la monocapa polarizada, se emplearon concentraciones de células de 2.4×10^5 , y 4.8×10^5 . La concentración inicial de células seleccionada fue de 2.4×10^5 , por tener una mejor cinética de formación. El tiempo de crecimiento celular seleccionado para realizar los ensayos de interacción bacteria-célula fue de 5-7 días, por ser el tiempo en el que se estabilizaron los valores de resistencia transmonocapa (Figura 4 y 5)

Evaluación de la integridad celular de monocapas polarizadas de células Caco-2 infectadas con *H. pylori*.

La evaluación de la integridad de la monocapa celular infectada se realizó midiendo la resistencia transmonocapa en función del tiempo de contacto de la monocapa con bacterias. Para la validación de esta técnica se empleó *S. typhimurium*, que es capaz de romper la integridad de la monocapa celular como control positivo; y *E. coli* no patógena, que es incapaz de romper la integridad de la monocapa, así como un control negativo de células sin bacterias, que indican el comportamiento de la resistencia en células no infectadas en función del tiempo (Figura 6).

En la Figura 7 se graficaron los resultados de resistencia obtenidos cada 2 hrs después de infectar monocapas de células polarizadas con 3 cepas de *H. pylori* durante 8 horas. Cada una de las gráficas corresponde a una de las cepas estudiadas; y se puede observar que para las tres cepas el comportamiento de la resistencia es muy parecido y no hay una disminución significativa en la resistencia por la presencia de *H. pylori*. Esto significa que no hay una pérdida aparente en la integridad celular, durante las 8 hrs en que las 3 cepas de *H. pylori* estuvieron en contacto.

Figura 4. Formación de monocapas de células Caco-2 polarizadas con una concentración inicial de 2.4×10^5 células

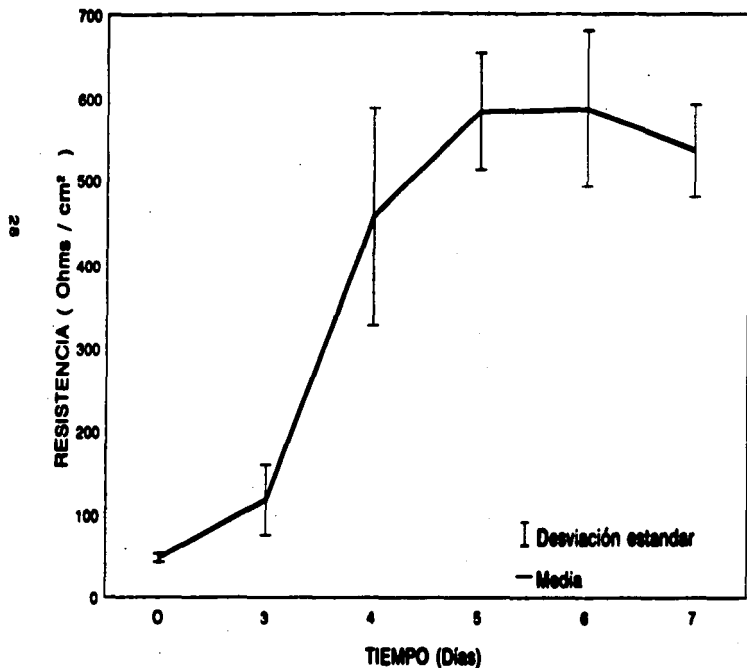


Figura 5. Formación de monocapas de células Caco-2 polarizadas con una concentración inicial de 4.8×10^5

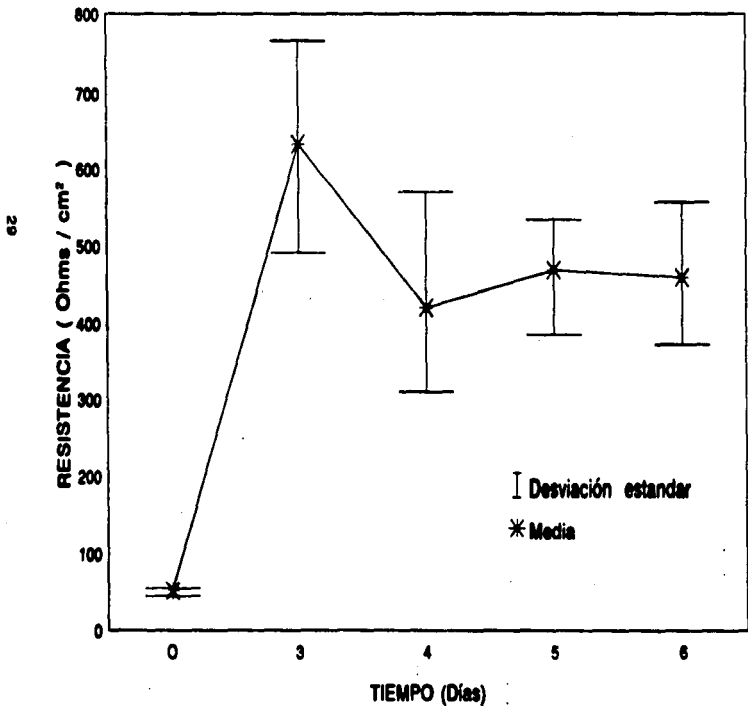


Figura 6. Evaluación de la integridad de la monocapa de células Caco-2 polarizadas, con *S. typhimurium* y *E. coli*

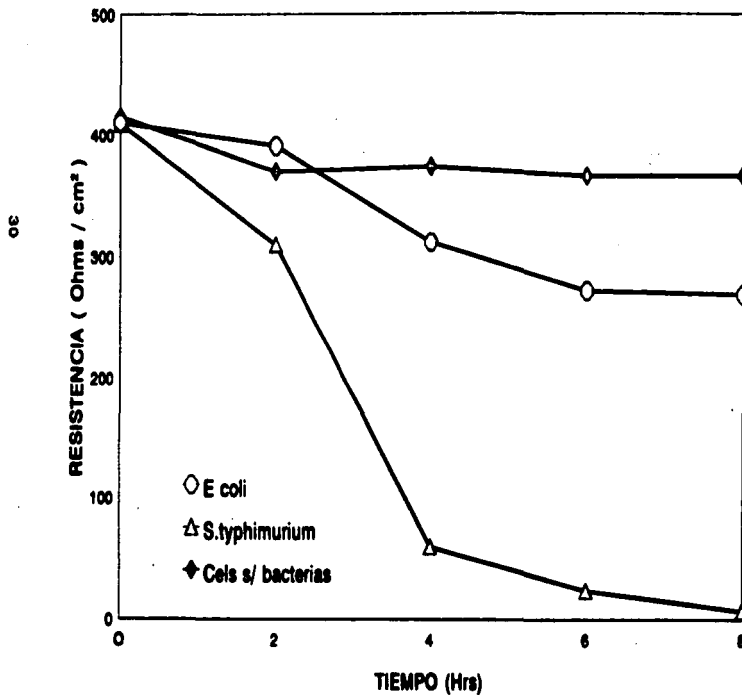
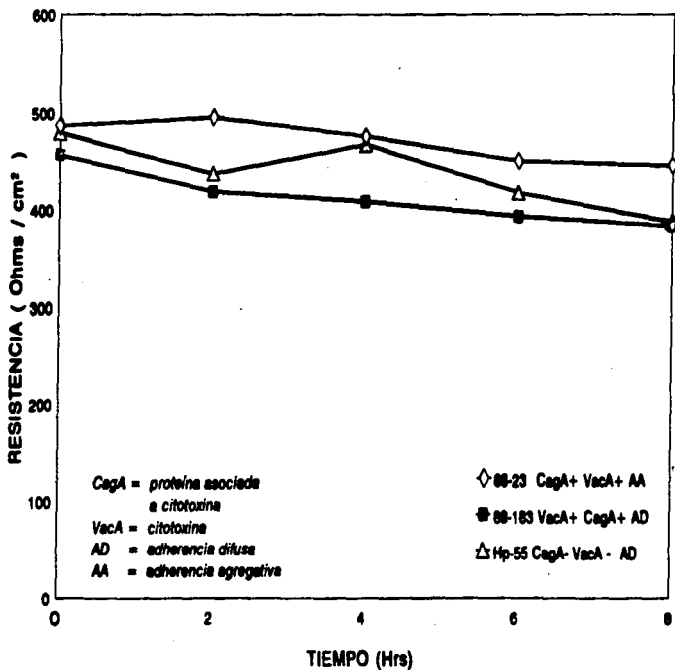


Figura 7. Evaluación de la integridad de la monocapa de células Caco-2 polarizadas, infectadas con diferentes cepas de *H. pylori*



Evaluación del fenómeno de transporte a través de células Caco-2 polarizadas.

El fenómeno de transporte se determinó por la cuantificación del número de bacterias viables capaces de atravesar una monocapa polarizada estable, desde la superficie apical (superior) a la superficie basal (inferior). En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos en UFC de las bacterias capaces de atravesar la monocapa polarizada, después de 2,4,6 y 8 hrs de infección con tres cepas de *H. pylori*, *S. typhimurium* (bacteria capaz de atravesar la monocapa celular polarizada) y *E. coli* (incapaz de atravesar la monocapa). Como se puede observar, *S. typhimurium* fue capaz de atravesar desde las 2 primeras horas de infección, y al completar las 8 hrs del ensayo la cantidad de bacterias que atravesaron fue muy similar a la cantidad inicial de bacterias que se emplearon. Para la cepa no invasiva de *E. coli*, se comprobó la incapacidad de la bacteria para pasar a través de la monocapa después de 8 hrs de ensayo. Finalmente, para las tres cepas de *H. pylori*, la bacteria fue capaz de atravesar a las 2 y a las 4 hrs de infección, pero en una proporción mucho menor que *S. typhimurium*.

Tabla 5 Transporte de *H. pylori* en comparación con *S. typhimurium* (bacteria invasiva) y con *E. coli* (no invasiva) a través de monocapas de células Caco-2 polarizadas

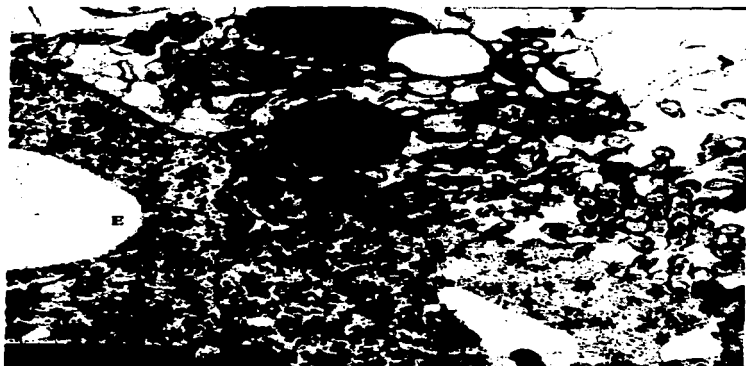
Cámara	horas post-infección	<i>S. typhimurium</i> 17028	<i>E. coli</i> DH5 α	<i>H. pylori</i> Hp 55	<i>H. pylori</i> 88-183	<i>H. pylori</i> 88-23
	Tiempo (hrs)	UFC min-max	UFC min-max	UFC min-max	UFC min-max	UFC/mL min-max
Apical	0	4.8-9 x 10 ⁷	3-4.4x10 ⁷	0.16-1.4x10 ⁷	1.7 X 10 ⁷	1.6 x 10 ⁷
Basal	2	1.4-2 x 10 ³	<10	0.03-5x10 ³	0.04-3x10 ³	0.2-0.8x10 ²
	4	2-3.6 x 10 ³	<10	0.2-0.4x10 ²	0-0.2x10 ²	0-0.4x10 ²
	6	3.6-4.6 x 10 ⁶	<10	<10	<10	<10
	8	6.4-12 x 10 ⁷	<10	<10	<10	<10

Fenómeno de internalización de *H. pylori* , a través de monocapas de células Caco-2 polarizadas evaluado por microscopía electrónica.

Las Figuras 8 a 11 muestran fotografías de microscopía electrónica de transmisión, en las que se observa el fenómeno de transcitosis de la cepa 88-23 de *H. pylori* en las monocapas de células Caco-2 polarizadas.

En la Figura 8 se puede ver el contacto de *H. pylori* con la monocapa de células Caco-2 polarizadas, después de 30 min de infección, donde la bacterias se encuentran acumuladas y rodeadas por microvellosidades cortas irregulares. Algunas de las bacterias muestran separaciones (evidentes) entre el contenido crómico y el citoplasma, y estructuras parietales con vacuolización intrabacterial formando anillos (estructuras de polifosfatos).

Figura 8. Microscopía electrónica de transmisión de monocapas de células polarizadas fijadas 30 minutos después de ser infectadas con *Helicobacter pylori*. A, bacteria con granulos de polifosfato; B y C, bacterias; D, microvellosidades; E, célula.



En la Figura 9 se observa el contacto íntimo de la bacteria con la membrana plasmática de células Caco-2 polarizadas, formando una adherencia en pedestal.

Figura 9. Microscopía electrónica de transmisión de monocapas de células Caco-2 polarizadas infectadas con la cepa 88-23 de *Helicobacter pylori*. A, bacteria; B, célula.



En la Figura 10 se observa la adherencia de *H. pylori* a la superficie de monocapas de células Caco-2 polarizadas. La bacteria está cubierta por microvellosidades y las células epiteliales se encuentran en un proceso metabólico activo, por la presencia de mitocondrias cerca de la bacteria adherida.

Figura 10 Microscopía electrónica de transmisión que muestra los sitios de adherencia de *Helicobacter pylori* a la superficie de monocapas de células polarizadas. A-C, mitocondrias; D, bacterias.



Finalmente en la Figura 11 se observa las células Caco-2 polarizadas con bacterias intracelulares.

Figura 11. Microscopía electrónica de transmisión que muestra *Helicobacter pylori* dentro de las células Caco-2 polarizadas. A, células; b, bacteria.



DISCUSION

El objetivo de este estudio fue definir la capacidad de adherencia de cepas de *H. pylori* a células epiteliales y su relación con algunas de sus características fenotípicas; e investigar si esta bacteria tiene la capacidad de atravesar células Caco-2 polarizadas. Nuestros resultados revelaron dos hallazgos importantes. El primero fue que *H. pylori* tiene la capacidad de atravesar la monocapa de células Caco-2 polarizadas sin causar daño celular aparente manteniendo la integridad celular, a diferencia de otros enteropatógenos invasivos como *S. typhimurium*, que al internalizar rompen la integridad de la monocapa. Este hallazgo en *H. pylori* fue demostrado de dos formas: indirectamente mediante la medición de la resistencia de la monocapa celular, la cual se mantuvo constante durante el tiempo del ensayo, indicando la integridad de la monocapa; y de manera directa, fue valorada por la observación de la interacción célula-bacteria por microscopía electrónica, mostrando que *H. pylori* no produce daño en la membrana plasmática al internalizarse en la célula polarizada (figuras 9 y 10).

El segundo hallazgo importante, fue que el mecanismo de internalización de la bacteria en las células polarizadas, observado por microscopía electrónica, aparentemente depende de un proceso metabólico activo de las células epiteliales similar al observado en la endocitosis. Esto se sugiere por la presencia de mitocondrias en el citoplasma celular cercanas al sitio de contacto de la bacteria con la membrana de las células epiteliales, con la subsecuentemente internalización dentro del citoplasma (figura 10 y 11).

Por otra parte identificamos cepas clínicas adherentes y no adherentes, siendo la gran mayoría adherentes. Esta alta capacidad de adherencia de las cepas de *H. pylori* a células epiteliales confirma lo descrito en estudios anteriores (28,30,32). Sin embargo, no se había descrito previamente la presencia de dos patrones diferentes de adherencia, uno difuso y otro agregativo. Desconocemos la importancia que pueda tener este hallazgo, pero pudiera ser relevante como mecanismo de colonización en epitelio gástrico. Por otro lado, nuestros resultados mostraron una correlación de la adherencia a células HEP-2 con la hidrofobicidad superficial de las cepas. Esta correlación concuerda con lo establecido para otras bacterias, en que a mayor hidrofobicidad mayor es la capacidad de adherencia a células.

Este estudio confirma la capacidad que tiene *H. pylori* para adherirse al epitelio, y apoya los estudios *in vivo* que demuestran que la densidad de bacterias que colonizan el epitelio gástrico es directamente proporcional a la severidad de la enfermedad, pudiendo deducirse que la interacción con células gástricas es de gran importancia en la virulencia de la infección por *H. pylori*. Sin embargo, este es el aspecto menos entendido en el proceso de infección, debido a que en los estudios de interacción no se ha definido claramente si *H. pylori* tiene la capacidad, o no, de invadir células epiteliales. El demostrar en este estudio que *H. pylori* tienen la capacidad de atravesar una monocapa de células polarizadas sin causar daño celular aparente, y que las bacterias que

atravesan pueden ser cultivables nos permite sugerir que *H. pylori* es una bacteria invasiva. Para apoyar esta evidencia de invasividad, existen los hallazgos reportados en otros estudios que se mencionan a continuación:

- 1) El examen ultraestructural de biopsias de antro gástrico de pacientes con *H. pylori* muestra una interacción íntima de la bacteria con la membrana plasmática de células epiteliales y la destrucción de microvellosidades, alteraciones de la membrana celular hospedera por polimerización de actina en el sitio de contacto con la bacteria (adherencia en pedestal), y ocasionalmente la bacteria se observa en el citoplasma y dentro de vacuolas endocíticas (26,28).
- 2) La bacteria y antígenos de *H. pylori* se han observado dentro de la lámina propia de pacientes con infección activa, lo que sugiere que la penetración en este epitelio puede ser responsable de la intensa respuesta inmune (26, 72-74).
- 3) Estudios *in vitro* en células HEP-2 han mostrado que la bacteria es capaz de internalizar células epiteliales, que no son fagocitos profesionales(31).

Sin embargo, si se toma en cuenta que en los estudios *in vivo* rara vez se ha encontrado a la bacteria dentro de la célula epitelial y que en el presente estudio sólo algunas bacterias que atravesaron la monocapa celular pudieron ser cultivables; se hace evidente que son necesarios otros estudios para determinar si en condiciones *in vivo* *H. pylori* puede ser invasivo y si las células epiteliales participan activamente para mantener o eliminar la bacteria del lumen gástrico.

Los estudios *in vitro* realizados hasta la fecha, se han llevado a cabo con monocapas de células crecidas en superficies de plástico. Estos sistemas no permiten la polarización de las células en su porción apical y basal y por lo tanto, la orientación de sus receptores es al azar (75). El uso de membranas de policarbonato como soporte para el crecimiento y desarrollo de una monocapa celular, utilizando una doble cámara para depositar el medio, permite polarizar las células y orientarlas en una misma dirección como ocurre en los epitelios de mucosas; creando una porción apical con microvellosidades orientadas hacia el medio de cultivo. la unión estrecha entre las células por desmosomas por su porción lateral, y su porción basal adherida a la membrana de policarbonato.

En el presente trabajo se estudió el fenómeno de interacción célula-bacteria y transporte en monocapas de células polarizadas *in vitro*, que cumplen con las características estructurales de las células *in vivo*. Para estudiar este fenómeno se seleccionó la línea celular Caco-2, por ser una línea

que en condiciones normales de crecimiento alcanza una mayor diferenciación celular comparada con otras líneas celulares, además presenta células mucoides al igual que en el estómago y tiene receptores específicos para *H. pylori* (68).

Para evaluar la integridad de la monocapa celular y el fenómeno de translocación de *H. pylori* en células Caco-2 polarizadas, se seleccionaron dos cepas con actividad de citotoxina y una sin esta actividad; esto con la finalidad de analizar la importancia de esta característica en el daño e interacción con las células polarizadas. De las cepas con actividad de citotoxina, se seleccionaron dos que presentarían los dos patrones de adherencia a células HEP-2 encontrados; con el propósito de determinar si las diferencias de la distribución de la bacteria sobre la células pudiera ser un factor importante en la interacción bacteria-células.

Para evaluar la integridad de la monocapa celular se determinó la resistencia transmonocapa, que mide el impedimento al paso de corriente de un compartimento a otro a través de dicha monocapa celular. El incremento en el valor de la resistencia está directamente relacionado con la formación gradual de la monocapa celular. La estabilización del valor de la resistencia es un indicativo de que la monocapa celular se encuentra confluyente.

Al valorar la integridad de la monocapa celular, por la resistencia transmonocapa en la cepas de *H. pylori*, se encontró que de las tres cepas estudiadas, independientemente de la presencia o no de la citotoxina y del patrón de adherencia que presentan las cepas en células HEP-2, ninguna fue capaz de causar cambios significativos en la resistencia transcelular durante las 8 horas de contacto con células Caco-2; mientras que en la cepa patógena de *S. typhimurium*, que es capaz de romper la integridad de la monocapa celular, el decremento y la pérdida casi total de la resistencia transmonocapa se observó a las 4 hrs de contacto con las células polarizadas. Esta gran diferencia en la integridad de la monocapa entre los dos patógenos, podría explicarse por el hecho de que *S. typhimurium* es una bacteria invasiva que causa una infección aguda, y que es capaz de destruir las células epiteliales en un corto tiempo y atravesar a otros órganos, para generar una infección sistémica. Por otro lado, *H. pylori*, que por observaciones *in vivo* se ha visto que genera un daño local en células epiteliales gástricas, después de una infección crónica, puede persistir por largo tiempo, y hasta el momento no se ha detectado infección sistémica por la presencia de esta bacteria.

Es importante sin embargo, señalar que el método para medir la integridad celular, empleando el valor de resistencia transmonocapa, permite evidenciar la permeabilidad y la ruptura en uniones estrechas célula-célula, pero no detecta cambios muy pequeños en la permeabilidad transcelular, por lo que se considera que este método es poco sensible cuando se pretende medir daños mínimos. Por otra parte, la resistencia transepitelial también es afectada por los cambios de pH del medio, y esto se puede notar en los resultados obtenidos de las células infectadas con *E. coli* no patógena ya que el crecimiento de la bacteria en el medio de cultivo es muy rápido, por lo que hay una pronta acidificación y, esto, podría explicar el decremento en la resistencia que se observa.

Cuando se evaluó el fenómeno de translocación con las tres cepas de *H. pylori*, se observaron bacterias viables que lograron pasar de la superficie apical a la superficie basal a las 2 y 4 horas del ensayo. Sin embargo, después de este tiempo se observaron formas cocoides de la bacteria, en los frotis obtenidos del medio basal a las 6 y 8 hrs del ensayo (datos no mostrados). Es importante hacer notar que en este estudio, fue posible recuperar formas cultivables de la bacteria, a pesar del requerimiento de condiciones microaerofílicas y de medios enriquecidos para el crecimiento de *H. pylori*.

Las diferencias en la cantidad de bacterias que atraviesan la monocapa celular en *S. typhimurium* y *H. pylori* no es comparable, por ser bacterias con diferentes tiempos de generación. Mientras que para la primera el tiempo de duplicación es de 20 minutos, para la segunda es de 12 hrs; lo que indica que el tiempo en el que se desarrolló el ensayo no fue suficiente para que *H. pylori* se duplicara.

Los mecanismos de invasión e interacción célula-bacteria empleando células polarizadas se han estudiado en enteropatógenos invasivos como *S. typhimurium* y *Shigella sp.* y se ha comprobado que estas tienen la capacidad de atravesar monocapas de células polarizadas, con pérdida de la integridad celular y empleando diferentes mecanismos (63, 64). Sin embargo, el mecanismo de translocación sin la ruptura de la integridad celular también se ha observado en la enterobacteria invasiva *Campylobacter jejuni*, que tiene la capacidad de penetrar células epiteliales, y uno de los mecanismos postulados para causar daño es que al atravesar las células epiteliales polarizadas, la bacteria penetra la superficie del epitelio sin dañar la célula y prolifera en la lámina propia y nódulos linfáticos mesentéricos, generando una infección extraintestinal. La capacidad que tienen *C. jejuni* y *H. pylori* para atravesar monocapas de células Caco-2 polarizadas, sin daño aparente de la integridad celular, podrían explicar la gran respuesta local inflamatoria que generan estas dos bacterias, con la infiltración de polimorfonucleares en el lumen de estómago y duodeno con *H. pylori* y en el lumen intestinal con *C. jejuni*. Así, al ganar acceso a la lámina propia, las bacterias y/o sus productos liberados inducen una pronta y mayor respuesta inflamatoria.

En algunos estudios con *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* enteropatógena, se han encontrado algunas diferencias distintivas en el modo de invasión y efectos en las células hospedadoras, con el uso de estos sistemas de células polarizadas *in vitro*, y con la ayuda de microscopía electrónica. Por ejemplo, en el caso de *S. typhimurium*, como ya se mencionó antes, el proceso de translocación produce una reducción drástica en la resistencia celular (63); mientras que en *EPEC* la membrana celular también es afectada en este proceso, pero mas gradualmente, con la reducción de la resistencia transepitelial (66). En niveles ultraestructurales, se han observado otras diferencias distintivas en el lugar de penetración. Mientras que en *S. choleraesuis* el sitio de entrada a células es mas eficiente en el lado apical que basolateral, y la penetración es acompañada con la pérdida de microvellosidades y la formación de grande vejigas, quienes por microscopía de video corresponden a formas parecidas a "ruffles" (arrugamiento), en los sitios de entrada de la bacteria; en *S. flexneri* la entrada a

células es casi exclusivamente por la parte basolateral (76); observación que sugirió que *Shigella* penetra el epitelio intestinal a través de las células M y se dispersa por invasión lateral a las células epiteliales. En este estudio con *H. pylori*, las observaciones, por microscopía electrónica de transmisión, fueron después de 0.5, 1, 1.5 y 2 hrs de contacto de células Caco-2 polarizadas, con una cepa productora de citotoxina 88-23; tomando en cuenta que esta bacteria fue capaz de atravesar desde las 2 primeras horas de contacto con las células polarizadas.

En las fotografías de la interacción de *H. pylori* con la monocapa celular, se observó que algunas bacterias unidas a la superficie de células Caco-2 presentaban gránulos de polifosfato en su interior. Estos gránulos se han visto antes en *H. pylori* asociado a tejido gástrico, con gran daño celular. Se ha sugerido, que estas estructuras pueden actuar como reservas de energía en *H. pylori*, cuando hay ausencia de suficientes fuentes de energía exógena(47). La formación de adherencia íntima bacteria-célula en pedestal, que se observó en este estudio con *H. pylori*, se ha reportado en otros estudios ultraestructurales de *H. pylori* en biopsias de pacientes con gastritis crónica y en células de cáncer gástrico AGS. Esta forma de adherencia que es común en *EPEC* y *E. coli* enterohemorrágica, (*EHEC*) (77), es una respuesta celular con la polimerización de actina en el sitio de contacto de la bacteria con la célula. En *H. pylori* este efecto de polimerización indica que la bacteria puede inducir cambios en el citoesqueleto de las células de epitelio gástrico, y que el contacto directo de la bacteria con la célula, y la transferencia de algunos factores de virulencia podrían influir en la respuesta de la célula hospedera a la bacteria. Finalmente, al observar que por microscopía electrónica muchas de las manifestaciones de la interacción de *H. pylori* con las mucosa gástrica que se observan *in vivo*, estas pueden ser confirmadas con el empleo de monocapas de células Caco-2 polarizadas *in vitro*, y este modelo puede ser una alternativa no sólo para estudiar el proceso de interacción célula-bacteria, sino también la patogénesis de la infección por *H. pylori*, tomando en cuenta las desventajas y la dificultad que implica el emplear modelos animales para producir la enfermedad.

Considerando que en los estudios anteriores no se habían analizado de manera global los factores de virulencia descritos, que pudieran estar relacionados con la interacción célula-bacteria, en este estudio se analizó esta interacción con algunas de las características fenotípicas más importantes de las nueve cepas.

Las características ya conocidas de las cepas seleccionadas fueron: el cuadro clínico y procedencia de la cepa, la resistencia antimicrobiana a metronidazol y nitrofurantoina de algunas de ellas, y la expresión fenotípica de ureasa y citotoxina. Las características fenotípicas que se cuantificaron y la importancia de estas para la completa caracterización fueron: la cuantificación de actividad de ureasa, por estar implicadas en la liberación de amonio como producto de degradación de la urea (provocando daño a nivel celular); y la hidrofobicidad superficial, por considerar que la adherencia a la bacteria es un proceso de dos pasos, en que la interacción molecular específica es inducida por una asociación inicial no específica, entre la bacteria y la célula a la que se adhiere.

Para cumplir la primera fase del trabajo, de valoración y comparación de las características fenotípicas de las nueve cepas, fue importante tomar en cuenta las siguientes observaciones: 1) La caracterización fenotípica de *H. pylori* en este estudio sería a nivel de estructuras superficiales 2) El desarrollo de estructuras moleculares superficiales en los microorganismos depende de la fase de crecimiento en las que se encuentren, y 3) *H. pylori* tiene la propiedad de ser pleomórfica y encontrarse en forma coccoide en cultivos viejos, cambiando de esta manera su composición superficial(78); por lo que fue necesario establecer la fase óptima de crecimiento a emplear en todas las técnicas, y de esta manera poder comparar los resultados obtenidos en hidrofobicidad y adherencia.

Para evaluar la hidrofobicidad superficial se seleccionaron dos métodos: la técnica de agregación con sulfato de amonio, que en términos de composición molecular de la superficie celular, permite la evaluación de la completa hidrofobicidad del organismo; y la técnica de adherencia a n-hexadecano, que permite la evaluación de la unión de la bacteria a un ligando hidrofóbico, en este caso el hidrocarburo; esta técnica puede consider hidrofóbica a una cepa, si sólo una fracción de la superficie bacteriana es hidrofóbica. Se seleccionó más de una técnica para medir hidrofobicidad ya que, en estudios anteriores, los resultados de hidrofobicidad han sido controversiales. Goodwin y Sherman (79,80) concuerdan con el hallazgo de que *H. pylori* posee una superficie celular hidrofóbica, cuando se evalúa por el método de cromatografía de intercambio hidrofóbico (mecanismo para evaluar hidrofobicidad similar a la adherencia a n-hexadecano), mientras que el mismo Sherman y Emody sugieren que la superficie celular de cepas de *H. pylori* son parcialmente hidrofílicas cuando se cuantifica por agregación con sulfato de amonio(80,81). Por otro lado, hay estudios que han demostrado que el tratamiento de la bacteria con glicina ácida, y en presencia de urea, incrementa la hidrofobicidad superficial, sugiriendo que en condiciones ácidas del estómago, puede haber una mayor exposición de las regiones hidrofóbicas escondidas en la superficie de la bacteria y, de esta manera, contribuir a la inducción de adherencia y penetración al moco (79).

El método de hidrofobicidad con n-hexadecano no se ha utilizado en *H. pylori*; sin embargo el motivo de emplear este método fue por dos razones: primero, por la sencillez de la técnica para evaluar hidrofobicidad en otras bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Sireptococcus pyogenes* que son hidrofóbicas por este método, siendo que habilidad para adherirse a superficies hidrofóbicas, está relacionada con su mayor patogenicidad; y segundo, por la correlación directa que hay entre la adherencia a n-hexadecano con la adherencia a células HEp-2 en algunas bacterias, como es el caso de *S. pyogenes*, donde el grado de adherencia tiene gran importancia en la patogénesis de la infección (82,83).

Tomando en cuenta las ventajas que presenta la cuantificación de hidrofobicidad por adherencia a n-hexadecano, se seleccionó esta técnica como parámetro de comparación para establecer la fase óptima de crecimiento bacteriano a emplear, en la valoración de las características fenotípicas. Los resultados de hidrofobicidad obtenidos en cultivos bacterianos de 24, 48, 72 y 96 hrs de crecimiento,

no presentaron diferencias significativas en los porcentajes de adherencia a n-hexadecano. Sin embargo, para evitar variables que pudieran influir en la caracterización, todas las determinaciones se evaluaron a las 48 hrs de crecimiento.

Los resultados que se obtuvieron en este estudio de hidrofobicidad con sulfato de amonio, muestran que una gran proporción de las cepas de *H. pylori* estudiadas fueron hidrofóbicas (77%). Sin embargo, estos resultados son contrarios a los obtenidos por Shelman y Col. quienes, empleando el mismo método, clasifican a sus cepas estudiadas de *H. pylori* como ligeramente hidrofílicas. Las diferencias en hidrofobicidad en ambos estudios, pudieran ser variaciones en la técnica; sin embargo, esto no se pueden analizar ya que Shelman no describe la técnica utilizada. Por otro lado, es importante resaltar que con esta técnica, se identificaron dos cepas autoagregativas (cepas que se agregan por si solas en ausencia de sulfato de amonio); y este fenómeno de autoagregación no se había descrito antes en cepas de *H. pylori*.

En los resultados de adherencia a n-hexadecano no hay un punto de corte para determinar si una cepa es hidrofóbica. Sin embargo, si se toma el mismo punto de corte de adherencia a células HEp-2, que es $\geq 50\%$, se pueden diferenciar las mismas cepas hidrofóbicas e hidrofílicas obtenidas por el método de sulfato de amonio. Sin embargo, estas diferencias no son tan significativas, si se toma en cuenta la desviación estándar que presenta la técnica; ya que mientras una cepa con adherencia a n-hexadecano del 48.7% se considera hidrofílica, otra con el 54.8% de adherencia es considerada hidrofóbica, (Tabla 4)

Los dos métodos para determinar hidrofobicidad superficial revelan que la mayoría de las cepas estudiadas por ambos métodos fueron hidrofóbicas. Sin embargo, por el método de sulfato de amonio las diferencias entre hidrofóbicas e hidrofílicas, fueron significativas. Por otro lado, con este mismo método, se observó el fenómeno de autoagregación no visto antes en otros estudios de hidrofobicidad con *H. pylori*.

En *E. coli* se ha identificado el patrón de adherencia agregativo, en cepas aisladas de niños con diarrea aguda, y esta propiedad en *H. pylori* pudiera ser importante en el proceso de infección. Por otro lado, considerando que las cepas de *E. coli* con patrón de adherencia agregativo, tiene la propiedad de adherirse entre si en ausencia de células, se realizó un ensayo similar con las cepas de *H. pylori* con patrón de adherencia agregativo, y se encontró que estas cepas presentan la propiedad de autoadherirse.

Al comparar los resultados de adherencia celular con hidrofobicidad superficial se observó que hay una gran correlación entre ellos. De igual manera, las dos cepas que presentaron el patrón de adherencia agregativo con células HEp-2 fueron las cepas que autoagregaron en ausencia de sulfato de amonio. La correlación que hay entre hidrofobicidad y adherencia a células en *H. pylori*

concuerta con lo establecido para otras bacterias: a mayor hidrofobicidad, mayor capacidad de adherencia a células.

Al correlacionar los resultados de hidrofobicidad superficial y capacidad de adherencia de *H. pylori* a células HEP-2, con el cuadro clínico de procedencia de las nueve cepas, no se encontró ninguna correlación entre estos dos fenotipos y la severidad de la infección con *H. pylori*. Estos resultados son diferentes a los observados para otras bacterias patógenas, en que la capacidad de adherencia está relacionada con la patogénesis de la infección.

La importancia de evaluar la cuantificación de actividad de ureasa en la interacción célula bacteria, radica en que al inducir la infección por *H. pylori* en modelos animales, se ha demostrado que la ureasa juega un papel importante en la colonización, contrarrestando el efecto del medio ácido y permitiendo la colonización de cepas que muestran actividad de ureasa; mientras que mutantes deficientes en ureasa son incapaces de colonizar e inducir la enfermedad en animales de experimentación (10). Considerando esto, y el hecho de que no se conoce el papel que juega la ureasa en la interacción célula-bacteria, se seleccionó una cepa ureasa(-), que fue una variante sustraída de la cepa SS-23, con completa ausencia de actividad de ureasa. Como esta cepa no fue una mutante sino sustraída de una población, fue considerada como una cepa independiente.

Los resultados de actividad de ureasa obtenidos en las nueve cepas estudiadas, más que mostrar las diferencias significativas en la actividad de ureasa que produce cada una de las cepas, son un indicativo de la variación fenotípica entre las cepas; sin embargo, esta característica no tuvo ninguna correlación con la severidad de la infección, ni con las otras características fenotípicas estudiadas.

Los estudios antes realizados, en relación al daño que puede generarse en la célula por la presencia de la actividad de ureasa, o por la presencia de la citotoxina, han generado gran controversia, ya que hay investigadores que comprueban que el efecto dañino a la célula es únicamente por la presencia de la citotoxina, cuando se emplean cepas con citotoxina deficientes en ureasa. Por otro lado, otros investigadores observan un efecto dañino en la célula cuando se emplean cepas con actividad de ureasa en presencia de urea. Finalmente en estudios más recientes se concluye que la producción de amoníaco, mediada por la ureasa, contribuye a la toxicidad citoletal y también potencia la actividad de la citotoxina vacuolizante (61). Por lo antes mencionado y porque se ha demostrado que la presencia de citotoxina es una característica importante en el desarrollo de úlcera duodenal(54), fue necesario considerar aquí este fenotipo.

La producción de citotoxina en las nueve cepas se comparó con el origen de aislamiento; y se encontró que de cinco cepas que presentaron actividad de citotoxina, cuatro fueron aisladas de pacientes con mayor grado de severidad de la infección, 3 fueron aisladas de pacientes con úlcera

duodenal y 1 de cáncer gástrico; mientras que las 4 sin actividad de citotoxina provenían de gastritis crónica y dispepsia. Aún cuando el número de cepas estudiadas fue pequeño, se demostró la alta correlación entre la severidad de la infección y la presencia de actividad de citotoxina, antes mencionada por otros investigadores(50,61). Finalmente, al comparar la citotoxina con las otras características estudiadas, no se encontró ninguna correlación con esta propiedad.

Es importante señalar que recientemente se determinó la presencia del gen *cagA*, que es el primero que se detecta, en *H. pylori*, que no está presente en todas las cepas. La proteína CagA que expresa este gen es de gran importancia en el proceso inflamatorio de la infección y se encuentra en una alta proporción de pacientes con úlceras duodenales y cáncer gástrico (62). Sin embargo esta proteína no se analiza en este estudio.

CONCLUSIONES

- *H. pylori* no sólo induce cambios en la superficie apical de las células epiteliales, sino también es capaz de atravesar las células epiteliales, manteniendo la integridad de la monocapa sin causar daño celular aparente
- Estos hallazgos sobre lo que ocurre en la interacción de *H. pylori* con las células polarizadas Caco-2, demuestran que es un patógeno capaz de inducir transitois, contrario a la creencia general de que no es una bacteria invasiva, y podrían explicar la inducción de la respuesta inflamatoria, que ocurre en la lámina propia, por la presencia de la bacteria en este compartimento.
- Por ensayos de adherencia a células HEP-2, se logró diferenciar células adherentes en una mayor proporción que las no adherentes, con la presencia de dos patrones de adherencia a células HEP-2: el difuso y el agregativo.
- La hidrofobicidad superficial fue la única característica fenotípica que correlacionó con la adherencia a células HEP-2
- Los ensayos de hidrofobicidad superficial con *H. pylori*, permitieron diferenciar entre cepas hidrofóbicas e hidrofílicas de *H. pylori*, y se observó el fenómeno de autoagregación, no visto antes en *H. pylori*
- El cuadro clínico de la infección por *H. pylori* no tuvo ninguna correlación con la actividad de ureasa, con la hidrofobicidad superficial, o con la adherencia y el patrón de adherencia a células HEP-2; y sólo hubo una correlación con la producción de citotoxina.

BIBLIOGRAFIA

1. Blaser MJ. *Helicobacter pylori*: Microbiology of a 'Slow' Bacterial Infection. Trends Microbiol 1993; 1: 255-260.
2. Sippen P, Seppala K, Aarvynen M, Helakke t, Keittunen P: Chronic Gastritis and Gastroduodenal Ulcer: A Case Control Study on Risk of Coexisting Duodenal or Gastric Ulcer in patients with Gastritis. Gut 1989; 30:922-929.
3. Labenz J, Borch G: Evidence for the Essential Role of *Helicobacter pylori* in Gastric Ulcer Disease. Gut 1994; 35:19-22.
4. Eurogast study Group: An International Association between *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Cancer. Lancet 1993; 341: 1359-1362.
5. Van Zanten SJOV, Pollak PT, Best LM, Bezanson GS, Marris T: Increasing Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection with Age: Continuous Risk of Infection in Adults Rather than Cohorte Effect. J Infect Dis 1994; 169: 434-37
6. Taylor DN, Blaser MJ: The Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. Epidemiol Rev 1991; 13: 42-59.
7. Mendall MA, Goggin PM, Molineaux n, Levy J, Toosy T, Strachan D, Northfield TC. Childhood Living-Conditions and *Helicobacter pylori* Seropositivity in Adult life. Lancet 1992; 339: 896-7.
8. Blecker U, Hauser B, Lanciers S, Peeteers S, Suys b, Vandeplass Y: The Prevalence of *Helicobacter pylori*-Positive Serology in Asymptomatic Children. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1993; 16: 252-256.
9. Wyatt JI, Rathbone BJ, Dixon MF, Heatley RV. *Campylobacter pyloridis* and Acid Induced Gastric Metaplasia in the pathogenesis of duodenitis. J Clin Pathol 1987; 40: 841-48

10. Eaton KA, Morgan DR, Krakowka. *Campylobacter pylori* Virulence Factors in Gnotobiotic Piglet. *Infect Immun*. 1989; 57: 1119-1125 .
11. Hazell SL, Eichberg JW, Lee DR, Alpert L, Evans DG, Evans DJ Jr, Graham DY: Selection of Chimpanzee over the Rabbit as a Model for *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterology* 1992; 103: 848-854.
12. Radin MJ, Eaton KA, Krakowka S, Morgan DR, Lee A, Otto G, Fox J. *Helicobacter pylori* Gastric Infection in Gnotobiotic Beagle Dogs. *Infect Immun* 1990; 58:2606-2612.
13. Smoot DT, Resau JH, Naab T, Desbordes BC, Gilliam T, Bull-Henry K, Curry SB, Mobley HLT. Adherence of *Helicobacter pylori* to Cultured Human Gastric Epithelial Cells. *Infect Immun* 1993; 61: 350-355.
14. Clyne M, Drumm B. Adherence of *Helicobacter pylori* to Primary Human Gastrointestinal Cells. *Infect Immun* 1993; 61: 4051-4057.
15. Kobayashi Y, Okazaki KI, Murakami K. Adhesion of *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells in Primary Cultures obtained from stomachs of various animals. *Infect Immun* 1993; 61: 4058-4063.
16. Dytoc M, Gold B, Louie M, Huesca M, Fedorko L, Growe S, Lingwood C, Brunton J, Sherman P. Comparison of *Helicobacter pylori* and Attaching-Effacing *Escherichia coli* Adhesion to Eukaryotic Cells. *Infect Immun* 1993; 61: 448-456.
17. Moran AP, Wadström t. Bacteria Pathogenic Factor. En Malfertheiner P, Megraud F, Michetti P, Price A. The Year in *Helicobacter pylori*. 1994 Inglaterra. Ed Current Science Ltd.
18. Hazell SL, Lee A, Brady L. *Campylobacter pyloridis* and gastritis : Association with intracellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J Infect Dis* 1986; 153: 658-63.
19. Kostrzynska M, Betts JD, Austin JW, Trust TJ. Identification, Characterization, and

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- spacial localization of two flagellin species in *Helicobacter pylori* flagella. J bacteriol 1991; 173: 937-46.
20. Geis G, Suerbaum S, Forsthoff b, Leying H, Opferkuch W. Ultrastructure and Biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol 1993; 38: 371-377.
 21. Suerbaum S, Jodenhans C, Labigne A. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flaB flagellin genes and construction of *H. pylori* flaA and flaB negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. J Bacteriol 1993; 175: 3278-88.
 22. Eaton KA, Morgan DR, Krakowka S. Motility as a factor in the colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol 1992; 37: 123-127.
 23. Bode G, Malfertheiner P, Lehnardt G, Nilius M, Ditschuneit H. Ultrastructural localization of urease of *Helicobacter pylori*. Med Microbiol Immunol 1993; 182: 299-302.
 24. Hazell ST, Lee A. *Campylobacter pyloridis*, urease, hidrogen ion back diffusion, and gastric ulcers. Lancet. 1986; 2: 15-7.
 25. Desai MA, Vadgama PM. An in vitro study of enhanced H⁺ diffusion by urease action on urea. Implications for *H pylori*-associated peptic ulceration. Scand J Gastroenterol 1993; 28: 915-19.
 26. Hessey SJ, Wyatt JJ, Axon ATR, Sobala GM, Rathbone BJ, Dixon MF. The relationship between adhesion sites and disease activity in *Campylobacter pylori* associated gastritis. En Meegraud F, Lamouliatte 1989 Amsterdam. Ed Elsevier science.
 27. Wyle FA, Tarnawski A, Schulman D. Evidence for gastric mucosal cell invasion by *C. pylori*: An ultrastructural study. J Clin gastroenterol 1990; 12: 592-98.
 28. Hessey SJ, Wyatt JJ, Sobala G, Rathbone BJ, Axon ATR, Dixon MF. Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter pylori* associated chronic gastritis. Gut 1990; 31:

29. Neri M, Susi D, Bovani I, Laterza F, Mezzetti A, Cuccurullo F. Bacterial mucosal infiltration in *Helicobacter pylori*-associated gastritis: Histological and clinical consequences. *Am J Gastroenterol* 1994; 89:1801-5.
30. Evans DG, Evans DJ, Graham DY. Receptor-mediated adherence of *Campylobacter pylori* to mouse Y-1 adrenal cell monolayers. *Infect Immun* 1989; 57:2272-78.
31. Evans DG, Evans DJ Jr, Graham DY. Adherence and internalization of *Helicobacter pylori* by HEp-2 cells. *Gastroenterol* 1992; 102: 1557-67.
32. Rosberg K, Bergliindh T, Gustavsson S, Hubinette R. Adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosal biopsy specimens cultured *In Vitro*. *Scand J Gastroenterol* 1991; 26: 1179-87.
33. Huang J, Smyth CJ, Kennedy NP, Arbuthnott JP, Keeling PWN. Haemagglutinating activity of *Campylobacter pylori*. *FEMS Microbiol Letters* 1988; 56: 109-12.
34. Evans DG, Karjalainen TK, Evans DJ, Graham DY, Lee CH. Cloning, nucleotide sequence and expression of a gene encoding and subunit protein of *Helicobacter pylori*. *J bacteriol* 1993; 175: 674-83.
35. Doig P, Austin JW, Trust TJ. Identification and characterization of a conserved *Helicobacter pylori* pilus. *Microbial Ecology in Health and Disease* 1992;4: S124.
36. Lingwood CA, Wasfy G, Han H, Huesca M. Receptor affinity purification of a lipid-binding adhesin from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1993; 61: 2474-2478.
37. Lelwala-Guruge J, Ascencio F, Ljungh Å, Wadström T. Rapid detection of and characterization of sialic acid-specific lectins of *Helicobacter pylori*. *APMIS* 1993; 101: 695-702.

38. Evans DG, Evans DJ, Moulds JJ, Graham DY. **N-acetylneuramyl lactose-binding fibrillar hemagglutinins of *Helicobacter pylori*: a putative colonization factor antigen.** Infect Immun 1988; 56: 2896-2906
39. Dunn BE. **Pathogenic mechanisms of *Helicobacter pylori*.** Gastroenterol Clin Nor Am 1993; 22: 436-47.
40. Lingwood CA, Law H, Pellizzari A. **Gastric glycolipid as a receptor for *Campylobacter pylori*.** Lancet 1989; 2: 238.
41. Slomiany BL, Piotrowski A, Samanta K, Vanhorn VLM, Slomiany M, Slomiany A. ***Campylobacter pylori* colonization factor shows specificity for lactosylceramide sulfate and GM3 ganglioside.** Biochem Int 1989; 19: 929-936.
42. Saitoh T, Natomi M, Zhao W, Okuzumi K, Sugano M, Iwamori M, Nagai Y. **Identification of glycolipid receptors for *Helicobacter pylori* by TLC-immunostaining.** FEBS Lett 1991; 282: 385-387.
43. Trust TJ, Doig P, Emödy L, Kienle Z, Wadström T, Toole PO. **High-affinity binding of the basement membrane proteins collagen type IV lamina to the gastric pathogen *Helicobacter pylori*.** Infect Immun 1991; 59: 4398-4404.
44. Moran AP, Kausela P, Kosunen TU. **Interaction of *Helicobacter pylori* with extracellular matrix proteins.** J Appl Bacteriol 1993; 75: 184-189.
45. Valkonen KH, Wadström T, Moran AP. **Interaction of lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* with basement membrane protein lamina.** Infect Immun 1994; 62: 3640-48.
46. Falk P, Roth KA, Boren T, Westblom TU, Gordon JI, Normark S. **An *in vitro* adherence assay reveals that *Helicobacter pylori* exhibits cell lineage-specific tropism in the human gastric epithelium.** Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 2035-39.
47. Bode G, MAuch H, Malferteiner D, Malferteiner P. **Identification of structures containing polyphosphate in *Helicobacter pylori*.** J Gen Microbiol 1993; 139: 3029-33.

48. Wang Y, Roos KP, Taylor DE. Transformation of *Helicobacter pylori* by chromosomal metronidazole resistance and by a plasmid with a selectable chloramphenicol resistance marker. J Gen Microbiol 1993; 139: 2485-2493.
49. Midolo PD, Lambert JR, Turnidge J. Metronidazol Resistance- A predictor of failure to eradicate *Helicobacter pylori* by triple therapy. The VIIIth Workshop on Gastroduodenal Pathology and *Helicobacter pylori*. Houston Texas. 1994; abstract 390.
50. Spiegelhalder C, Gerstenecker B, Kersten A, Schiltz E, Kist M. Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. Infect Immun 1993; 61: 5315-25.
51. Nielsen H, Moran AP, Birkholz S, Anderson LP. Neutrophil oxidative activation by *Helicobacter pylori* Lipopolysaccharide. Gastroenterology 1993; 104: A 754.
52. Birkholz S, Knipp U, Nietzki C, Adamek RJ, Opferkuch W. Immunological activity of lipopolysaccharide of *Helicobacter pylori* on human peripheral mononuclear blood cells in comparison to lipopolysaccharides of other intestinal bacteria. FEMS Immunol Med Microbiol 1993; 6: 317-384.
53. Cover TL, Blaser MJ. Purification and Characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. J Biol Chem 1992; 267: 10570-5.
54. Cover TL, Cao P, Lind CD, Tham KT, Blaser MJ. Correlation between vacuolating cytotoxin production by *Helicobacter pylori* isolated in vivo and in vitro. Infect Immun 1993; 61: 5008-12.
55. Papini E, Bugnoli M, De Bernard M, Figura N, Rappuoli R, Montecucco C. Bafilomycin A1 inhibit *Helicobacter pylori*-induced vacuolization of HeLa cells. Mol Microbiol 1993; 7: 323-27.
56. Tummurum MKR, Cover TL, Blaser MJ. Cloning and expression of a high molecular mass major antigen of *Helicobacter pylori*: Evidence of linkage to cytotoxin production. Infect Immun 1993; 61: 1799-1809.

57. Covaccio A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N, Rappuoli R: **Molecular Characterization of the 128 Kda immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer.** Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 5791-95.
58. Grabtree JE, Wyatt JI, Sobala GM, Miller G, Tompkins DS, Primrose JN, Morgan AG. **Systemic and mucosal humoral responses to *Helicobacter pylori* in gastric cancer.** Gut 1993; 34: 1339-43.
59. Triebling AT, Korsten MA, Dlugosz JW, DLugosz F, Paronetto F, Lieber CS. **Severity of *Helicobacter pylori*-induced gastric injury correlates with gastric juice ammonia.** Dig Dis Sci 1991; 36: 1089-96.
60. Murakami M, Saita H, Teramura S, Dekigai H, Asagoe K, Kusaka S, Kita T. **Gastric ammonia has a potent ulcerogenic action on the rat stomach.** Gastroenterology 1993; 105: 1710-1715.
61. Cover TL, Puryear W, Perez-Perez GI, Blaser MJ. **Effect of urease on HeLa cell vacuolation induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin.** Infect Immun 1991; 59: 1264-1270.
62. Ghiara P, Marchetti M, Blaser MJ, Tumuru MKR, Cover TL, Segal ED, Tompkins LS, Rappuoli R. **Role of the *Helicobacter pylori* virulence factors vacuolating cytotoxin, CagA, and urease in a mouse model of disease.** Infect Immun 1995; 63: 4154-4160.
63. Finlay BB, Falkow S. ***Salmonella* Interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells.** J Infect Dis. 1990, 162: 1096-1106.
64. Moinier J, Vasselot T, Hellio R, Lesourd M, Sansonetti PJ. ***Shigella flexneri* enters human colonic Caco-2 epithelial cells through the basolateral pole.** Infect Immun 1992; 60: 237-48.
65. Konkel ME, Mead DJ, Hayes SF, Cieplak W. **Translocation of *Campylobacter jejuni* across human polarized epithelial cell monolayer cultures.** J Infect Dis 1992; 166: 308-15.

66. Canil C, Rosenshine I, Ruschkowski S, Donnenberg MS, Kaper JB, Finlay BB. Enteropathogenic *Escherichia coli* decreases the transepithelial electrical resistance of polarized epithelial monolayers. *Infect Immun* 1993; 61: 2755-62.
67. Griffiths JK, Moore R, Dooley S, Keusch GT, Tzipori S. *Cryptosporidium parvum* infection of Caco-2 cell monolayers induces an apical monolayer defect, selectively increases transmonolayer permeability and causes epithelial cell death. *Infect Immun* 1994; 62: 4506-4514.
68. Rodriguez-Boulan E, Nelson WJ. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* 1989; 245: 718-725.
69. Labigne A, Ferrero L, Cussac V. Expression of *Helicobacter pylori* urease genes in *Escherichia coli* grown under nitrogen-limiting conditions. *J bacteriol* 1992; 174: 2466-73
70. Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* 1979; 3: 95-99.
71. Bradford M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding . *Anal biochem* 1976;72:248.
72. Mai UE, Perez-Perez GI, Allen JB, Wahl SM, Blaser MJ, Smith PD. Surface proteins from *Helicobacter pylori* exhibit chemotactic activity for human leukocytes and are present in gastric mucosa. *J Exp Med* 1992; 175: 517-25.
73. Macchia GA, Massone D, Burroni A, Covacci S, Censini S, Rappuoli R. The Hsp60 protein of *Helicobacter pylori*: structure and immune response in patients with gastroduodenal disease. *Mol Microbio* 1993; 9: 645-52.
74. Andersen LP, Holck S. Possible evidence of invasiveness of *Helicobacter (Campylobacter) pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9: 135-8.

75. **Experimental Approaches to Investigating the host-bacterium Interaction.** In Salyers AA and Whitt DD. Bacterial pathogenesis a molecular approach. 1994 USA. ASM press.p 75-77.
76. **Goldberg MB, Sansonetti PJ. Shigella Subversion of the cellular cytoskeleton: A strategy for epithelial colonization.** Infect Immun 1993; 61: 4941-46.
77. **Knutton S, Baldwin T, Williams PH, McNeish AS. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of the new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*.** Infect Immun 1989;57: 1290-98.
78. **Chan WY, Hui PK, Leung KM. Coccioid forms of *Helicobacter pylori* in the stomach.** Am J Clin Pathol 1994; 102: 503-7.
79. **Fruul H, Goodwin CS, McDonald PJ, Lewis G, Pankhurst D. Hydrophobic characterization of *Helicobacter (Campylobacter) pylori*.** J Med Microbiol 1990; 32: 93-100.
80. **Smith JI, Drumm B, Neumann W, Policova Z, Sherman PM. In vitro surface properties of the newly recognized gastric pathogen *Helicobacter pylori*.** Infect Immun 1990; 58: 3056-60.
81. **Emody L, Carlsson, Ljungh A, Wadstrom T. Mannose-resistant haemagglutination by *Campylobacter pylori*.** Scand J Infect Dis 1988; 20: 353-4.
82. **Morris EJ, Ganeshkumar N, McBride BC. Cell surface components of *Streptococcus sanguis*: relationship to aggregation, adherence and hydrophobicity.** J bacteriol 1985; 164: 255-62.
83. **Reifsteck F, Wee S, Wilkinson BJ. Hydrophobicity-hydrophilicity og staphylococci.** J Med Microbiol 1987; 24: 65-73.