

46
2e1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

COMPARACION DEL EFECTO CITOTOXICO
DE SOBRENADANTES DE CEPAS DE
Helicobacter pylori AISLADAS DE NIÑOS Y
ADULTOS SOBRE CELULAS HeLa

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
ROBERTA MARIA ELENA OJEDA HERRERA

DIRECTOR DE TESIS:
M. EN C. GERARDO GONZALEZ VALENCIA
ASESOR DE TESIS:
Q.F.B. JOSE OSCAR GONZALEZ MORENO

MEXICO, D. F. NOVIEMBRE DE 1998



IMSS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

267037



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"**

JEFATURA DE LA CARRERA DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACION DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

OJEDA HERRERA ROBERTA MARIA ELENA

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: COMPARACION DEL EFECTO CITOTOXICO DE SOBRENADANTES DE CEPAS DE Helicobacter pylori AISLADAS DE NIÑOS Y ADULTOS SOBRE CELULAS HeLa.

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE	Q.B.P. JOEL SAUCEDO CONSTANTINO
VOCAL	M. en C. GERARDO GONZALEZ VALENCIA
SECRETARIO	Q.F.B. JOSE OSCAR GONZALEZ MORENO
SUPLENTE	Q.F.B. MA. DE LA MERCEDES ZAMUDIO DURAN
SUPLENTE	Q.B.P. MA. LUISA DELGADO BRISEÑO

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
México, D.F. a, 14 de Septiembre de 1998.

Q.F.B. JOSE LUIS ALFREDO MORA GUEVARA
JEFE DE LA CARRERA

c.c.p. Departamento de Control de Egresados
c.c.p. Interesado

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Bacteriología de la Unidad de investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMEIP) ubicada en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

DEDICATORIAS

El presente trabajo lo quiero dedicar de una manera muy especial a *Dios*, por que siempre estuvo conmigo.

Con mucho cariño, admiración y respeto a Mis Padres:

Guillermina y Julian.

A quienes les estaré siempre agradecida, por que supieron impulsarme hacia la superación, representando un estímulo en mi vida y porque su apoyo moral y económico ha sido fundamental para lograr uno de mis más grandes anhelos, siendo para mí la mejor de las herencias.

GRACIAS

A mis hermanos:

Francisco, Mary, Enrique, Paty, Julian, Alfredo y Miguel

Que en todo momento me han dado su confianza para seguir adelante y por haberme brindado su ayuda cuando estuvo a su alcance.

A alguien muy especial:

Como todo lo grande que perdura en la vida; Como todo lo noble que se lleva en el alma; Como todo lo inmenso que se extiende en los cielos; Como todo lo hondo que en el mar hay oculto; Así llevo en el alma la ternura y el cariño que escondido te tengo.

Con mucho cariño y afecto por su amor y confianza y por todo el apoyo brindado en la elaboración del presente trabajo, para el *Ing. Juan Manuel Cobilt Catana.*

AGRADECIMIENTOS.

A:

M. En C. Gerardo González Valencia.

Por haber dedicado un gran espacio de su tiempo y por haberme facilitado la elaboración del presente trabajo, por sus conocimientos y consejos que fueron de gran ayuda.

A:

Q.F.B. José Oscar González Moreno.

Por haber compartido sus conocimientos y experiencia profesional y por su ayuda otorgada durante el desarrollo del presente trabajo.

A:

Lic. Gloria Salgado Flores.

Porque gracias a su comprensión, consejos y apoyo fue posible llevar a un buen termino este trabajo.

A:

Todo el personal del laboratorio de Bacteriología de la UIMEIP que colaboró de una u otra forma en la realización de este trabajo, especialmente a:

Dr. Felipe González

Dr. Javier Torres López.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION.....	1
FUNDAMENTACION TEORICA.....	2
ANTECEDENTES HISTORICOS.....	2
CARACTERISTICAS GENERALES.....	2
PATOLOGIA DIGESTIVA.....	3
PATOLOGIA EN EDAD INFANTIL.....	6
RESPUESTA INMUNE.....	7
FACTORES DE PATOGENICIDAD.....	7
FORMAS DE TRANSMISION.....	15
DIAGNOSTICO.....	16
EPIDEMIOLOGIA.....	18
TRATAMIENTO.....	18
CULTIVO DE CELULAS.....	19
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
OBJETIVOS.....	21
HIPOTESIS.....	21
DISEÑO DE INVESTIGACION.....	21
MATERIAL.....	22
MATERIAL BIOLÓGICO.....	24
REACTIVOS.....	24
EQUIPO.....	26
DIAGRAMA DE FLUJO.....	27
METODOLOGIA.....	28
I.- OBTENCION DE CEPAS DE <i>Helicobacter pylori</i> PURAS.....	28
II.- OBTENCION Y CONCENTRACION DE SOBRENADANTES.....	28
III.- PREPARACION DE CELULAS HeLa.....	28
IV.- PROTOCOLO DE INOCULACION.....	29
V.- NEUTRALIZACION CON SUEROS HOMOLOGOS.....	30
VI.- NEUTRALIZACION CON SUEROS ANTI VAC.....	30
VII.- TINCION CON GIEMSA PARA EL EFECTO VACUOLIZANTE.....	30
RESULTADOS.....	32

Tabla de Contenido

DISCUSION DE RESULTADOS	42
CONCLUSIONES	45
RECOMENDACIONES	45
ANEXO I	45
BIBLIOGRAFIA	51

COMPARACION DEL EFECTO CITOTOXICO DE SOBRENADANTES DE CEPAS DE *Helicobacter pylori* AISLADAS DE NIÑOS Y ADULTOS SOBRE CELULAS HeLa.

INTRODUCCION

En el presente estudio se comparó el efecto citotóxico de 115 sobrenadantes de cepas aisladas de *Helicobacter pylori* de las cuales 77 fueron aisladas de adultos y 38 de niños, procedentes de hombres y mujeres, entre edades comprendidas de 7 a 16 años para niños y de 18 a 82 años para adultos, utilizando a las células HeLa para observar el efecto vacuolizante de la citotoxina presente en las cepas aisladas de *Helicobacter pylori*.

Las cepas aisladas fueron obtenidas de cultivos de biopsias tomadas por endoscopia a adultos del Hospital de Especialidades y de niños del Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Se comparó el efecto citotóxico de sobrenadantes de cepas de *Helicobacter pylori* y fue mayor en adultos con un 81.8% que en niños con un 52.6% ($p=0.001$) lo cual indica que si existen diferencias significativas.

La citotoxina se presentó en un 87.8% de las cepas aisladas de pacientes con padecimiento de gastritis y un 75% en las de úlcera ($p=0.1461$) y el grado de actividad con respecto a la edad ($p=0.230$) son eventos independientes y estadísticamente no existen diferencias significativas.

El efecto citotóxico con relación al sexo es también un evento independiente ($p=0.4946$), ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

El objetivo principal de este estudio fue comparar el efecto citotóxico de sobrenadantes de cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de niños y adultos sobre células HeLa.

Reportes de la década de los 80s indican que aproximadamente el 50% de las cepas de *Helicobacter pylori* producen una citotoxina, y que las cepas citotóxicas tienen mayor probabilidad de ser aisladas de pacientes con enfermedad ulcerosa, por lo cual es importante investigar si los organismos citotóxicos poseen un potencial patógeno aumentado y si existen otros factores que contribuyan a éste.

FUNDAMENTACION TEORICA.

ANTECEDENTES HISTORICOS.

Doenges, en 1939, publica un amplio estudio donde describe la presencia de microorganismos espirales en un 43% de los estómagos procedentes de autopsias. En 1975 Steer y Colin-Jones, asociaron la presencia de una bacteria curva gramnegativa con las biopsias gástricas procedentes de pacientes con úlcera gástrica y gastritis. Sin embargo errores en el cultivo del organismo provocaron que el hallazgo fuera ignorado. ^(1,2,3)

En 1982, Warren y Marshall en Perth (Australia) lograron identificar en cultivos de muestras de biopsia gástrica de pacientes con gastritis histológica, un bacilo curvo microaerofílico gramnegativo, esta bacteria fue denominada inicialmente como un organismo similar a *Campylobacter* debido a su parecido morfológico a *Campylobacter jejuni*. ⁽³⁾

Después del exitoso cultivo en 1984, fue asignado al organismo el nombre de *Campylobacter pyloridis* el cual se cambió posteriormente, a *Campylobacter pylori* en 1987. ^(3,4)

El cultivo de la bacteria que fuera primeramente llamada *Campylobacter pylori* fue seguido por un intenso escrutinio de sus características taxonómicas, especialmente comparado con otras bacterias del género *Campylobacter*. Los resultados de estos estudios delinearon mayores diferencias entre ésta y verdaderas bacterias del género *Campylobacter* en ultraestructura, composición celular acidograsa, características del desarrollo, secuencia del RNA, etc. A diferencia de la mayor parte de los verdaderos organismos del género *Campylobacter* ésta posee una potente actividad ureasa, propiedad que puede tener importantes implicaciones patogénicas. Esta enzima de superficie celular está compuesta por dos subunidades de aproximadamente 30 a 60 kDa, los genes por los cuales han sido secuenciados. Por estas características únicas, a *Campylobacter pylori* se le asignó un nuevo nombre; *Helicobacter pylori*. ^(2,5)

CARACTERISTICAS GENERALES.

H. pylori es generalmente descrita como una bacteria gramnegativa en forma de S o bastón curvado de 0.5 a 0.9 μm de ancho y de 2 a 4 μm de largo, móvil. Su morfología colonial y microscópica varían de acuerdo a las condiciones del medio de cultivo. ³ Por ejemplo en cultivos viejos presenta formas cocoides. Sin embargo puede observarse también en forma de V, forma de U y en línea recta. ^(3,6,7)

A los 2 días de crecimiento y visto con microscopio electrónico *H. pylori* tiene típicamente de 5 a 6 filamentos flagelares polares y por lo tanto es móvil. ⁽⁸⁾

El aislamiento primario de *H. pylori* en agar sangre a 37°C requiere de 3 a 4 días, pero si no se observa crecimiento debe continuarse la incubación hasta por 7 días. ⁽¹⁾ Las colonias son pequeñas, circulares, convexas, húmedas y translúcidas de 2 mm de diámetro, alrededor de las cuales se presenta una ligera hemólisis de color gris en agar sangre. Crece en medios selectivos y enriquecidos como Skirrow, Marshall, agar infusión cerebro corazón, agar brucella y medios que contengan hemina o de 5 a 10% de sangre de camero o caballo. ^(1,9)

Todas las cepas crecen en un rango de temperatura relativamente estrecho de 33 a 40°C, algunos crecen pobremente a 30 y 42°C pero ninguna crece a 25°C. *H. pylori* crece dependiendo del medio de cultivo, en un amplio rango de pH de 5.5 a 8.5 con buen crecimiento entre un pH de 6.9 a 8.0. ⁽³⁾

H. pylori crece en condiciones microaerofílicas, se desarrolla mejor en una atmósfera de 5 a 6% de O₂, 7 a 12% de CO₂, 85% de N₂, 8% H₂ y alta humedad. ^(7,9)

Produce enzimas como oxidasa, catalasa y ureasa. La hidrólisis de la urea por la ureasa produce amonio, el cual se ha propuesto que neutraliza el ácido clorhídrico del estómago y puede dañar directamente a las células epiteliales gástricas. ^(10,11)

No produce indol, tampoco H₂S, reduce nitratos a nitritos, fermenta la glucosa e hidroliza el hipurato. ^(4,6,12) Produce una citotoxina que forma vacuolas en cultivos celulares y fosfolipasas. El contenido de C+G en el DNA de *H. pylori* es de un 35 a 44% mol. ^(13,14)

La bacteria es sensible *in vitro*, a la penicilina, ampicilina, amoxicilina, eritromicina, gentamicina, kanamicina, rifampicina, metronidazol, tetraciclina y cegalotina. También es sensible a las sales de bismuto. Se ha documentado su resistencia a la vancomicina, sulfonamidas, trimetoprim y el ácido nalidíxico. ^(1,2,6,7,15)

PATOLOGIA DIGESTIVA.

GASTRITIS

La infección por *H. pylori* es la principal causa de gastritis crónica B o antral y no se relaciona con la gastritis A autoinmune ni con otras gastritis específicas. La morfología de la gastritis asociada a *H. pylori* es característica, crónica, con leve o moderada actividad, grado variable de atrofia, presencia de folículos linfoides y con predominio en antro.

La gastritis se define como una reacción inflamatoria aguda o crónica de la mucosa gástrica. En la gastritis aguda el infiltrado inflamatorio está constituido por polimorfonucleares y suele reducirse a la mitad de la luz de la mucosa gástrica. Cualquier pérdida de epitelio es superficial con múltiples úlceras de tamaño pequeño.

La superficie epitelial perdida se remplaza por una mezcla de fibrina y células inflamatorias agudas.⁽¹⁶⁾

No existe fibrosis y cuando se cura, la mucosa vuelve a la normalidad. Las características clínicas de la gastritis aguda no son específicas y muchos pacientes pueden estar asintomáticos. Las náuseas, vómitos y el dolor epigástrico son características clínicas frecuentes.

H. pylori puede provocar cuadros clínicos de dispepsia, y la aparición brusca e histológica de gastritis aguda.

La ingestión de cultivos de *H. pylori* por parte de voluntarios sanos y accidental en investigadores produjo en ellos dispepsia y gastritis aguda.

La gastritis crónica se caracteriza morfológicamente por la presencia de inflamación de la mucosa, acompañada o no de alteración de la arquitectura glandular. Los diversos grados de gastritis crónica representan probablemente diferentes estadios de un proceso dinámico.

Histológicamente la gastritis crónica superficial se caracteriza por la presencia de un infiltrado inflamatorio que ocupa la porción superficial de la lámina propia, conservando la estructura glandular.

En la gastritis crónica atrófica, el proceso inflamatorio se extiende con profundidad, afectando a las glándulas gástricas. Dependiendo de la intensidad del proceso se distinguen tres grados: leve, moderado y severo. En el grado severo existe una desaparición total del componente glandular, apareciendo epitelio metaplásico. La nueva mucosa se puede parecer a la pilórica (metaplasia pilórica) o con más frecuencia ser semejante a la intestinal (metaplasia intestinal). Esta gastritis crónica atrófica activa corresponde a la denominada gastritis B. Cuando la atrofia es severa, pero los cambios inflamatorios y regenerativos son mínimos, se denomina inactiva, siendo este patrón el que se observa preferentemente en las gastritis tipo A o autoinmune, localizada en el cuerpo gástrico y que afecta a las glándulas oxínticas, donde se ubican las células parietales productoras de HCl y factor intrínseco, formando parte del síndrome de anemia pernicioso.⁽¹⁷⁾

La estrecha correlación entre gastritis crónica y presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica está demostrada en numerosos estudios en todo el mundo.

Los cambios histológicos que se observan en la mucosa gástrica por *H. pylori* corresponden a una gastritis crónica atrófica activa, localizada preferentemente en el antro y de intensidad leve o moderada. Se observa la presencia de nódulos linfoides con centro germinal en un 80% de los casos de gastritis por *H. pylori*.

ULCERA DUODENAL

H. pylori deteriora la barrera de la mucosa e induce hipergastrinemias postprandiales. Estos mecanismos se involucran en la patogenia de la enfermedad ulcerosa. El 90%-95% de los pacientes con úlcera duodenal están infectados por *H. pylori*.

H. pylori sólo coloniza en regiones celulares de la mucosa gástrica. Entre un 50% a 70% de individuos sanos y en pacientes con úlcera duodenal se han descrito áreas de metaplasia gástrica, es decir, zonas de mucosa gástrica en el duodeno. La metaplasia gástrica en el bulbo duodenal antecede a la formación de úlcera y *H. pylori* sólo infecta zonas duodenales con metaplasia gástrica. ⁽²⁾

H. pylori encuentra su hábitat ideal en el moco gástrico en contacto con el epitelio de superficie, que constituye la primera línea de defensa contra los agentes agresivos, principalmente ácido y pepsina. El microorganismo halla en esta barrera sus nutrientes y se defiende de los iones H^+ hidrolizando la urea, logrando así un microentorno alcalino. Además, *H. pylori* posee enzimas (proteasas y lipasas) capaces de degradar el moco gástrico, reduciendo su viscosidad y, por tanto, su capacidad defensiva. También existen evidencias de que produce citotoxinas que lesionan a las microvellosidades de las células de la mucosa gástrica, interrumpiendo las uniones intercelulares, lo que debilita la segunda barrera defensiva, facilitando la posibilidad de aparición de erosiones superficiales y ulceraciones.

La interrelación entre la infección por *H. pylori* y la úlcera duodenal es debida a la actividad del microorganismo, en el debilitamiento de los factores defensivos, tanto de la mucosa gástrica como de la metaplasia gástrica en el duodeno.

La enfermedad ulcerosa duodenal es un proceso crónico, con exacerbaciones y remisiones, que ocurren en largos períodos de tiempo, incluso 30 años o más. Desde la aparición de los antagonistas H_2 en 1976 y más recientemente con los inhibidores de la bomba de protones como el omeprazol, se consigue la curación clínica y la cicatrización del cráter ulceroso en casi el 100% de los pacientes, con facilidad y mínimos efectos secundarios. ⁽¹⁸⁾

ULCERA GASTRICA

Mientras que la úlcera duodenal se asocia en un 95% con la infección por *H. pylori*, la úlcera gástrica lo hace en un 75%, aunque probablemente la mayor parte de las úlceras gástricas sin *H. pylori* tienen relación con la ingesta de aspirinas o antiinflamatorios no esteroides. La recidiva en la úlcera gástrica, después de su curación, se estima en un 30% al año y en 50% a los dos años. Por ello, como en la úlcera duodenal, se han propuesto tratamientos de mantenimiento con bloqueadores H_2 que reducen la tasa de recidivas, aproximadamente, al 10% al año y al 20% a los dos años. La erradicación del *H. pylori* en la prevención de las recidivas en la úlcera gástrica ha sido mucho

menos estudiada que en la úlcera duodenal, ya que previsiblemente ha de ser menos eficaz. Un estudio clínico japonés sólo consiguió alargar unos meses la recidiva en los pacientes en que se erradicó el *H. pylori*, en un grupo de 41 pacientes con úlcus gástrico, tratados aleatoriamente con cimetidina o cimetidina más cefixime. ^(2,16,18)

CANCER GASTRICO

H. pylori es, sin duda, el factor etiológico más importante de la gastritis del antro y del cuerpo gástrico, y la prevalencia de gastritis atrófica en las personas de edad se correlaciona perfectamente con la prevalencia de infección en las primeras décadas de la vida, lo que sugiere que esta infección hace progresar la gastritis y, con el paso de los años, inducir gastritis atrófica.

El descenso de la prevalencia de la gastritis atrófica, consecuencia de la menor prevalencia de infección por *H. pylori* condiciona, en el transcurso de los años y sólo en una parte de los pacientes infectados, el desarrollo de una gastritis atrófica, entidad con un cierto potencial de malignidad. Simultáneamente se han publicado dos extensos estudios epidemiológicos que parecen confirmar la sospecha de que la infección, de alguna forma, incrementa el riesgo de cáncer gástrico. ^(16,19)

Parece evidente que la infección por *H. pylori* está significativamente asociada a un mayor riesgo de cáncer gástrico, aunque la mayoría de las personas infectadas no llegan nunca a desarrollar un carcinoma gástrico, probablemente porque la etiopatogenia de esta entidad es multifactorial, y otros muchos factores se interrelacionan con la infección, siendo ésta, es todo caso, condición necesaria pero nunca suficiente para el desarrollo de un carcinoma gástrico. ^(16,19)

PATOLOGIA EN EDAD INFANTIL.

Está descrito, sobre todo en niños, un cuadro clínico de importante pérdida de proteínas por tubo digestivo, asociado a un cuadro histológico de gastritis aguda con presencia de *H. pylori*. En niños la colonización de *H. pylori* está asociada con la gastritis crónica especialmente con la antral. La prevalencia de la infección aumenta con la edad y las malas condiciones de vida. ^(20,21,22)

La infección por *H. pylori* es la causa más frecuente de gastritis crónica y úlcera duodenal en niños. En el paciente pediátrico la manifestación habitual es dolor abdominal y con frecuencia éste es crónico recurrente. El dolor abdominal recurrente (DACR), definido por Appley, tradicionalmente se ha considerado como un trastorno funcional y se le ha comparado con síndrome de intestino irritable. En algunos estudios recientes se demostró la asociación significativa entre DACR y *H. pylori*. ^(23,24)

El cuadro clínico varía con la edad y el grado de afección; en lactantes o preescolares, éste puede ser tan sólo irritabilidad, rechazo al alimento o alteraciones del sueño por

sintomatología abdominal; o bien en el escolar y adolescente, dolor abdominal crónico recurrente, síndrome ácido-péptico, o reflujo gastroesofágico. Las úlceras duodenales son poco frecuentes en niños; cuando estas ocurren, se asocian a gastritis primaria y *H. pylori* en alto porcentaje. Los esquemas de erradicación más utilizados en pediatría incluyen amoxicilina, metronidazol, sales de bismuto, claritromicina, omeprazol y tetraciclina en adolescentes. ^(21,24,26)

RESPUESTA INMUNE.

Los pacientes infectados con *H. pylori* desarrollan una respuesta de anticuerpo IgM en la primo infección; Después se produce IgG e IgA, los cuales persisten, tanto en vía sistémica como en la mucosa, en títulos altos, en personas infectadas de manera crónica. ^(11,27)

H. pylori induce la liberación de factor de activación plaquetaria (PAF), leucotrienos y citocinas, mismos que median una respuesta inflamatoria en la mucosa, la cual se manifiesta histológicamente como una gastritis superficial difusa. ^(28,29)

El PAF es un potente mediador inflamatorio que induce quimiotaxis de leucocitos y cambios en la permeabilidad vascular, los leucotrienos son potentes factores quimiotácticos además de inducir daño a la mucosa. ⁽³⁰⁾

FACTORES DE PATOGENICIDAD.

Entre los principales factores de virulencia de *H. pylori* se encuentran la producción ureasa, catalasa, citotoxina (VacA), gen *vacA*, proteína de choque térmico (Heat Shock protein) de 60 kDa, movilidad, capacidad para adherirse a la mucosa gástrica, presencia del gen *cagA*, proteína CagA y lipopolisacáridos. ^(31,32)

UREASA.

La enzima más importante producida por *H. pylori* es la ureasa, ya que mediante la hidrólisis de la urea le permite la colonización en la mucosa gástrica por la producción de amonio que amortigua los hidrogeniones, además de inducir inflamación. Su actividad se observa en el citoplasma, la enzima coloniza el moco secretado por la mucosa gástrica, el pH del estómago se neutraliza por la producción de amonio, lo cual permite sobrevivir a *H. pylori*. ⁽³³⁾ Aunque la ureasa de *H. pylori* (una metaloenzima de níquel) está asociada con la superficie bacteriana y la producción de un microambiente neutro para el organismo, se puede observar actividad de la ureasa en el citoplasma, lo que sugiere además un papel en la asimilación del nitrógeno. Aunque la asociación entre la ureasa y la superficie bacterial se estabiliza aparentemente por cationes bivalentes tales como el Ca^{2+} y Mg^{2+} . Hu y Mobley encontraron que la ureasa recombinante se expresa de manera óptima cuando no se inhibe la producción de Ni^{2+} *in vitro*, y cuando se permite la síntesis suficiente de subunidades de ureasa UreA y UreB. Así, el factor limitante de los altos niveles en la

producción de la ureasa es la síntesis de genes estructurales, y no la sobre expresión de genes adicionales⁽³⁴⁾.

CITOTOXINA VACUOLIZANTE.

Las cepas citotóxicas secretan una proteína que induce la formación de vacuolas en el citoplasma de líneas celulares *in vitro*. Aunque *vacA* está presente en casi todas las cepas de *H. pylori* sólo un 50% de las cepas expresan la citotoxina.

Una vez liberada la toxina dentro del medio, esta interactúa con las células objetivo. Recientemente ha sido aclarado el mecanismo de formación de vacuolas. Partiendo de la observación de que la vacuolización *in vitro* fue prevenida y revertida con ayuda de la bafilomicina A₁ - un inhibidor de ATPasa del tipo vacuolar, el cual regula el flujo de H⁺ a través de compartimentos delimitados por la membrana.

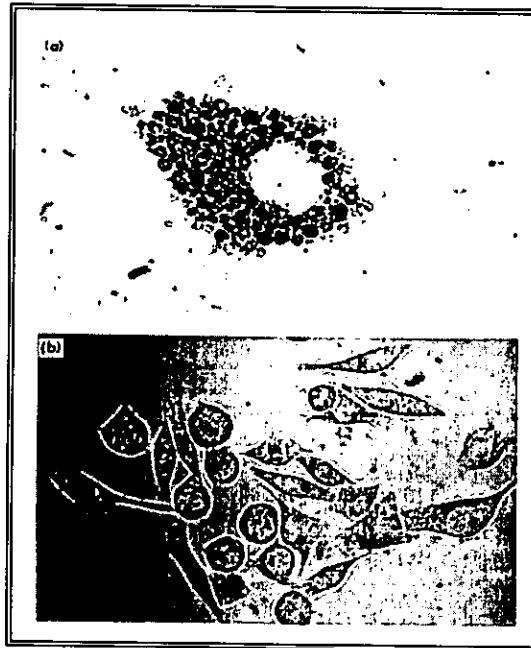


Figura 1. a) Una célula HeLa cultivada con vacuolas teñidas con indicador de rojo neutro, e inducido por un extracto citotóxico de *H. pylori*. b) Células HeLa en contacto con filtrado de caldo de cultivo (FCC) de cepa no citotóxica no concentran el rojo neutro.

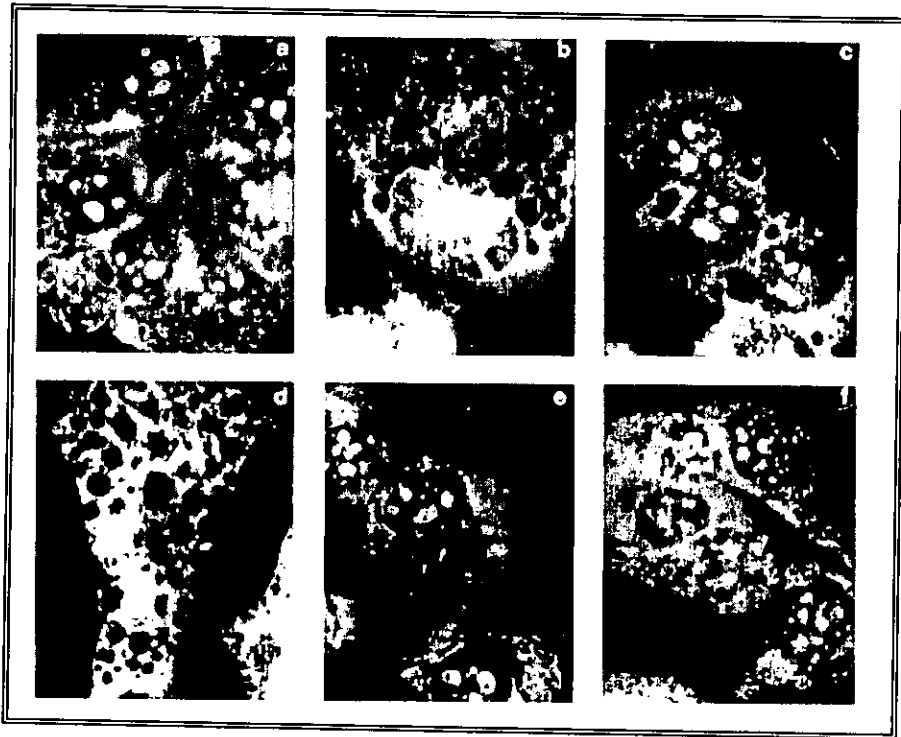


Figura 2. Vacuolización de células HeLa en cultivo. a) Después de unas horas de incubación con un Filtrado de caldo de cultivo (FCC) vacuolizante citotóxico - las vacuolas se desarrollan alrededor del núcleo. b) Con incubación prolongada (48 h), las vacuolas llegan a ser más grandes y confluentes, y desgarran la membrana de la célula. c) A concentraciones de 10 mM o más altas, el amoníaco puede inducir la vacuolización, d) incremento de la actividad vacuolizante con un FCC citotóxico. e) Células expuestas a un FCC no citotóxico, en la presencia de 10 mM de urea aparecen vacuolizadas. f) Células expuestas a un FCC no citotóxico, en la ausencia de urea, aparecen normales.

En células eucariotas normales, las vesículas se originan por invaginación de la membrana para formar endosomas, los cuales se fusionan normalmente con lisosomas o con el aparato de Golgi. El objetivo de la actividad del VacA es la ATPasa de tipo V que está presente en los últimos endosomas (las vacuolas inducidas por toxina son enriquecidas con rab7, una proteína ligada a GTP, la cual sólo está presente en los últimos compartimentos). Una vez que VacA ha reaccionado con su objetivo, los últimos endosomas no están disponibles para el aparato de endocitosis, y aquellos se fusionan uno con otro. La bomba de protón hidrogenico, estimulada por la toxina, crea un ambiente ácido dentro de las vacuolas, el cual en etapas tempranas es muy pequeño.

Las sustancias ambientales básicas, tales como el amoníaco, cruzan las membranas y son protonadas y concentradas en el pH ácido (véase la figura 1, en (a) se muestra una célula HeLa vacuolizada, afectada por un cultivo filtrado de una cepa citotóxica de *H. pylori*; en las vacuolas se ha concentrado rojo neutro, una amina permeable a la membrana, en (b) se observa un control negativo con poco aumento). Las moléculas protonadas permanecen dentro de los organelos intracelulares, debido a que ellos no son de gran permeabilidad a la membrana; ellos atraen agua osmóticamente, y las vacuolas se hinchan.

En las células cultivadas *in vitro*, las vacuolas originadas en el área perinuclear, se incrementan en número y tamaño y se fusionan unas con otras; en consecuencia, la membrana celular se rompe y las células mueren (Figura 2). El proceso tarda dos días para completarse. Las bases débiles, incluyendo el amoníaco y la nicotina, pueden incrementar la actividad vacuolizante de la toxina (Figura 2).

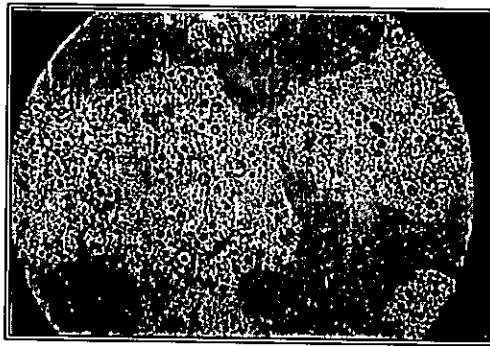


Figura 3. Con concentraciones altas de urea en el medio, la vacuolización inducida por un FCC citotóxico sobre células HeLa en cultivo, es tan intensa que las células se fusionan unas con otras.

Los niveles de nicotina en la saliva de fumadores son menores a aquéllos que son necesarios para potencializar la actividad de la toxina *in vitro*. Sin embargo, la actividad sinérgica de la nicotina debería ocurrir *in vivo*, a menores concentraciones que *in vitro*, ésta observación puede ayudar a explicar porque los fumadores tienen mayor riesgo de desarrollar úlcera duodenal.

También el amoníaco puede potencializar la actividad vacuolizante de VacA (Figura 2), y, bajo ciertas condiciones *in vitro* con altas concentraciones de urea en el medio, la vacuolización es tan intensa que las células se fusionan una con otras (Figura 3).

La vacuolización de células *in vitro* inducida por VacA es potencializada por una corta exposición de la citotoxina a pH bajo. La inducción de la activación toma lugar a un pH de 5.5; a valores de pH "normales" del estómago (alrededor de pH 2), el proceso de activación se lleva a cabo en unos cuantos segundos. Una vez ácido-activada, VacA retiene su actividad a pH neutro y se vuelve resistente ante el ataque de la pepsina.

Estos descubrimientos podrían tener consecuencias clínicas. Podría suponerse que la profunda inhibición de secreción ácida de los inhibidores de bombeo de protones (PPIs; Proton Pump Inhibitors) en el tratamiento de la úlcera péptica puede prevenir la ácido-activación de la toxina. En teoría, los inhibidores de bombeo de protones, podrían también interferir con la ATPasa de tipo vacuolar (la cual es una bomba de protones), que es el objetivo de VacA, y en consecuencia se inhibe la vacuolización.^(35,36,37)

Las ATPasas están presentes en las membranas de todas las células eucarióticas. Es posible que VacA también influya en la ATPasa H⁺ de las células no epiteliales, tal como los polimorfonucleares los cuales tienen bomba de iones hidrógeno (entre otras ATPasas) en sus membranas. Las cepas de *H. pylori* activan el PMN y obtienen una explosión oxidativa. El PMN activado, en adición a los aniones superóxido generados y otros metabolitos reactivos, también secretan iones H⁺ dentro de los fagolisosomas, en respuesta a la estimulación por la ATPasa H⁺ asociada a la membrana. La intensidad de la estimulación varía entre distintas muestras aisladas: las cepas de *H. pylori* que inducen los mayores niveles de metabolitos reactivos de oxígeno por el PMN activado son más fáciles de ser aislados de pacientes con úlcera péptica. La infección por cepas productoras de toxina vacuolizante también está asociada positivamente con la ulceración gastroduodenal. Sin embargo se ha disputado si el efector de la estimulación de PMN es VacA. Mientras Zhang et al mostraron que la producción de toxina estaba asociada con la estimulación de una rápida y fuerte quimiluminiscencia (que es la medida de la explosión oxidativa de la activación del polimorfonuclear), Crabtree et al demostraron que las propiedades de activación de los neutrófilos de las cepas era independiente de la presencia de cagA (y en consecuencia de citotoxigenicidad). En cualquier caso es posible que la habilidad para inducir neutrófilos tóxicos de radicales oxígeno está correlacionado, en ciertas cepas, con la producción de citotoxina.

Un estudio reciente ha mostrado la existencia de otro objetivo de la toxina VacA. Ricci et al han observado una actividad inhibitoria directa de un filtrado de cultivo citotóxico de *H. pylori* en los iones Na⁺, K⁺ - ATPasa del MKN de 28 células en cultivo. Un caldo de cultivo de una cepa no citotóxica no tuvo influencia en la actividad de la fosfatasa dependiente del potasio de la célula, el cual era la medida de la actividad Na⁺, K⁺ - ATPasa. Es posible que el efecto de esta bomba de protones también ocurra *in vivo*, debido a que la línea del MKN de 28 células deriva de un adenocarcinoma gástrico tubular humano y muestra diferenciación de tipo gástrico. Los autores

sostienen que la inhibición de esta actividad enzimática puede explicar la hinchazón de las células gástricas encontrada en el estómago de pacientes infectados. La inhibición de esta actividad de la adenosina trifosfatasa podría también ser responsable del edema intercelular, el cual puede ser observado en algunas ocasiones en las biopsias tomadas de áreas de mucosa colonizada por cepas citotóxicas.^(35,38,39)

El gen *vacA* codifica una proteína (protoxina), de 140 kDa, que incluye una secuencia de señal de 33 aminoácidos en la porción N-terminal la cual es fundamental para la secreción de la toxina. El dominio de la señal permanece en la membrana externa una vez que la toxina es excretada, resultando, en una toxina madura de 95 kDa.^(41,42,43) Analisis del gen *vacA* sugiere que codifica una corta secuencia señal de ruptura N-terminal y una más substancial carboxilo terminal (de aproximadamente 45kDa). De manera importante aunque no todas las cepas de *H. pylori* expresan la actividad citotóxica *in vitro*, esencialmente todas poseen el gen *vacA*. Sin embargo en ciertas regiones del gene *vacA* se conserva bien de cepa a cepa, pero en otras regiones existen una clara diversidad. Estudios recientes por Atherton et al. Han caracterizado aun más la diversidad de *vacA* y encontrado importante correlación clínica de los mismos. Se definieron 2 familias de alelos de la región media, a los que se denominó *m1* y *m2* y se encontraron 3 familias de alelos de la secuencia señal *s1a*, *s1b* y *s2*. Las familias de los alelos *s1a* y *s1b* se relacionan estrechamente pero son distintas. En total cualquier cepa de *H. pylori* puede tener uno de seis posibles genotipos (*s1a/m1*, *s1a/m2*, *s1b/m1*, *s1b/m2*, *s2/m1* y *s2/m2*), aunque en el estudio de Atherton no se encontró el genotipo *s2/m1*. El genotipo *vacA* correlaciona bien con el fenotipo de la toxina. En general las cepas *s2/m2* no produjeron citotoxina, las *s1/m1* fueron fuertes productoras y las *s1/m2* intermedias. El estado clínico de los pacientes correlacionó también con los genotipos de *vacA*, *s1a* se encontró más en individuos con enfermedad ulceropéptica que en individuos que tenían solo gastritis. Aparentemente no hay correlación de los tipos *m* con presentación clínica que es independiente del tipo *s*.^(41,42,43)

Un estudio realizado mediante microscopio de rápido congelamiento mostró que las proteínas monoméricas de 95 kDa una vez secretadas al medio ambiente se agregan para formar estructuras hexaméricas o heptaméricas de aproximadamente 700 kDa, la proteína VacA se supone que tiene epítomos conformacionales ya que únicamente anticuerpos originados contra los heptámeros son capaces de neutralizar la actividad vacuolizante de la citotoxina. De esta manera la agregación de monómeros para formar la estructura heptamérica de VacA se requiere para una expresión completa de la actividad citotóxica. Los monómeros son proteolíticamente rotos *in vitro* a fragmentos de 37 y 58 kDa ambos fragmentos penetran en la célula en cultivo pero únicamente sólo el último parece ser funcionalmente importante por estimulación del flujo de iones potasio de los liposomas. Esta observación indica que VacA se comporta de manera similar a otras toxinas bacterianas de dos cadenas, donde únicamente una subunidad tiene actividad biológica.^(46,47,50)

In vitro, VacA ejerce un efecto estimulador sobre un tipo de ATPasa presente sobre el compartimiento endosómico tardío, y un efecto inhibitorio sobre una ATPasa tipo-P que regula el flujo de Na^+ a el nivel de las membranas celulares. Ambas actividades deberían ser ejercidas también *in vivo*, lo que podría explicar la vacuolización celular y el edema intercelular que algunas veces se observa en la mucosa gástrica colonizada por *H. pylori*. La ATPasa del tipo-P de *H. pylori* ha sido clonada recientemente y la bomba de iones codificada parece ser única para *H. pylori*.^(46,48,55)

La observación reciente de que la vacuolización *in vitro* es potenciada por la exposición de la toxina a bajos valores de pH y que, una vez activada VacA se convierte resistente al efecto de la pepsina es un indicio adicional de *H. pylori* para adaptarse al medio ambiente gástrico del estomago. Esto puede explicar el papel de los agentes antisecretorios en el tratamiento de la infección de *H. pylori*. Una reducida secreción de ácido puede disminuir la secreción de la toxina y consecuentemente, el daño a la mucosa inducido por la toxina, podría ser atenuado, alterando de este modo las condiciones favorables bajo las que *H. pylori* se desarrolla.^(46,51,55)

Atherton et al. Encontraron que el gen *vacA* presente en una cepa no citotóxica, contenía una inserción que codifica para un sitio potencial de unión ATP/GTP. Aunque la proteína codificada por VacA en cepas no citotóxicas es biológicamente citotóxicas, este hallazgo indica que esta tiene probablemente varias funciones diferenciadas de acuerdo ha, si es secretada por organismos citotóxicos o no citotóxicos. Otro indicio de la naturaleza multifuncional de la citotoxina es el reporte reciente de que extractos de cepas VacA⁺ inhiben la proliferación de células gástricas *in vitro* previniendo la unión del factor de desarrollo epidérmico a su receptor en células en cultivo. De esta manera los organismos citotóxicos pueden interferir con el proceso de curación de lesiones ulcerativas y erosivas *in vivo*.⁽⁴⁶⁾

Diversos estudios serológicos han revelado una asociación entre anticuerpos neutralizantes de la citotoxina y la presencia en pacientes de gastritis, úlcera péptica y carcinoma gástrico, lo cual apoya la importancia de la citotoxina vacuolizante de *H. pylori* en la patogénesis. Estudios con inhibidores de ATPasa han mostrado que la formación de vacuolas, dentro de las células HeLa por la citotoxina, requieren la actividad de H⁺-ATPasa vacuolar (que mantiene un gradiente de pH), y está asociada con la alteración en el transporte de cationes incluyendo Na^+ , K^+ -ATPasa dentro de las células eucarióticas. Esto confirma, la medición de actividad de fosfatasa dependiente del potasio (K) en células en cultivo del epitelio gástrico, lo que indica deterioro de la acción de la ATPasa por *H. pylori*. También se ha propuesto que el amoníaco, generado por la ureasa de *H. pylori*, puede compartir un camino común con la citotoxina en la producción de vacuolas.^(34,52)

PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO.

Las proteínas de choque térmico juegan un papel en la patogénesis e inmunología de la infección por *H. pylori*. La proteína de choque térmico, HspA de *H. pylori*, se mostró que protege exitosamente en contra de una infección por *H. pylori* en el modelo de *H. felis* del ratón. Se ha clonado y secuenciado un nuevo gene de *H. pylori*, que codifica una proteína de choque térmico, homologa a ClpB de *E. coli* y otras proteínas Clp. Las proteínas constituyen una familia, recientemente descubierta de proteasas dependientes de ATP, altamente conservadas que son oblicuas tanto en procariontes y eucariontes. El papel de clpB de *H. pylori* esta en investigación.⁽⁴⁶⁾

MOVILIDAD.

La movilidad de *H. pylori* está dada por dos o seis flagelos polares cubiertos, cuyo filamento consta de dos tipos de flagelinas, codificados por los genes *flaA* y *flaB*. Ambos genes han sido clonados y mutaciones inducidas han mostrado que *flaA* es esencial para la movilidad. Pruebas futuras de mutantes de *flaA* y *flaB* en modelos animales deberán aclarar el papel de los flagelos en la patogénesis. La estructura y función de la envoltura flagelar queda incierto, aunque Geis et al, encontraron que las envolturas de los flagelos son membranas, y contienen proteínas y lipopolisacáridos. Este sugiere que el papel de la cubierta es el de proteger el filamento del flagelo o promover la adhesión.^(3,34,55)

PROTEINA DEL GEN A ASOCIADO A CITOTOXINA (CagA)

Muchas cepas citotóxicas, también producen una proteína altamente inmunogénica, llamada CagA. El peso molecular de la proteína CagA NCTC 11637 es 128 kDa, pero estimaciones sobre el tamaño en distintas cepas varían de 120 a 140 kDa. Las variaciones en el tamaño son causadas por uno o más repeticiones de 102 pares de bases en el gen *cagA*. Cerca del 10% de cepas de *H. pylori* que portan *cagA* son no citotóxicas, y una proporción similar de cepas no citotóxicas no llevan *cagA*. Aun no se ha encontrado correlación entre la expresión de los genes *vacA* y *cagA*.^(34,55)

El papel de CagA en la patogénesis de *H. pylori* aun no es claro y se ha sugerido que puede tener distintas funciones en otras especies de *Helicobacter*. Numerosos estudios han demostrado que la infección por cepas CagA+, así como su colonización *in vitro* induce a que las células epiteliales secreten cantidades incrementadas de IL-8, una citocina, la cual tienen un papel clave en la respuesta inflamatoria celular de neutrófilos y mononucleares. No hubo sin embargo, una disminución de la inducción de IL-8 por mutantes isogénicas definidas *cagA*⁻ o *cagA*/*vacA*, lo que sugiere que CagA no esta directamente involucrada en la producción de IL-8. El gen *cagA* se ha mostrado que es parte de un operón que incluye dos genes designados *picA* y *picB* (por "promover la inducción de citocinas") los dos marcos de lectura abierta codifican polipéptidos de 36 y 101 kDa este último producto del gen ha sido directamente

implicado en la inducción de la expresión de IL-8 por células epiteliales gástricas colonizadas *in vitro* además la infección experimental en animales ha demostrado que otros factores diferentes de *cagA* están involucrados en la respuesta inflamatoria todavía no es claro si existe una relación entre este operón y dos regiones genómicas llamadas *cagI* y *cagII* descritas recientemente únicamente en cepas CagA+.^(34, 53)

Cualquiera que sea el papel de CagA numerosos estudios microbiológicos y serológicos indican que la infección por cepas de *H. pylori* que poseen *cagA* o expresan el producto genómico incrementan el riesgo de desarrollar gastritis activa, lesiones mucosas neoplásticas y preneoplásticas en adultos, gastritis hemorrágica e inflamación activa y severa inflamación activa de las mucosas en niños. En contraste linfomas de células B de bajo grado del tipo de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) no parecen estar asociadas con el estatus de CagA del organismo infectante. También se encontró que los pacientes con alergia alimenticia fueron más probablemente infectados por cepas CagA+.^(34, 54)

LIPOPOLISACARIDOS.

H. pylori al igual que otras bacterias gramnegativas presenta lipopolisacáridos (LPS) en membrana externa. El LPS de *H. pylori* destruye la cubierta de mucosa gástrica interfiriendo con la interacción entre Munich y su receptor en la mucosa; el agente antiulceroso ebrotidina inhibe este efecto. Sin embargo, la característica más importante de *H. pylori* es su baja actividad proinflamatoria. Este fenómeno esta mediado por su singular estructura de lípido A y afecta a la unión CD-14. El hallazgo de los antígenos lewis son expresados sobre una parte de las cadenas laterales de los polisacáridos concuerda con que la molécula de LPS tenga un bajo perfil en su especificidad huesped.^(31, 55)

Se han identificado como receptores de lípidos en la mucosa para *H. pylori* a la fosfatidiletanolamina y la gangliotetrasilceramida, La adhesina bacteriana de *H. pylori* que reconoce estos lípidos es una exoenzima de 63 kDa, proteína con forma de S, la cual se ha expurgado. Además, las sales de bismuto y los detergentes de Tween, usados en el tratamiento de la úlcera péptica bloquean las ataduras de los lípidos realizadas por *H. pylori in vitro*^(34, 55). La expresión variable de adhesinas particulares en cepas, puede explicar la variación en la atadura bacteriana. Otros receptores potenciales para las ligaduras de *H. pylori* lo constituye la matriz extracelular, componentes que pueden llegar a ser expuestos debido a la actividad microbiana, la alimentación o una gran producción de células en el epitelio gástrico.^(33, 34, 56)

FORMAS DE TRANSMISION.

Actualmente se desconocen las formas de transmisión de *H. pylori* pero se cree que pueda ser de persona a persona,⁽⁵⁷⁾ por ruta fecal oral, por contaminación en la toma

endoscópica, sin embargo ninguna sea comprobado aunque se ha aislado de heces y placa dental, pero no de alimentos, agua y saliva.^(46,57,58,59,60)

DIAGNOSTICO.

Los métodos que permiten el diagnóstico de la infección por *H. pylori* se pueden sistematizar en dos grandes grupos: los que requieren endoscopia y toma de biopsias de la mucosa gástrica, y los métodos no endoscópicos, fundamentalmente técnicas serológicas y prueba del aliento.^(2,3,4)

METODOS QUE REQUIEREN ENDOSCOPIA.

CULTIVO DE LAS BIOPSIAS.

Es el método de elección, aunque presenta ciertas dificultades técnicas. Las muestras han de ser procesadas con cierta rapidez en el laboratorio de microbiología, requiriendo para el cultivo una atmósfera microaerofílica y medios enriquecidos, agar-sangre o Skirrow (medio selectivo con antibióticos).

HISTOLOGIA.

La observación de microorganismos de morfología espirilar en los cortes histológicos de biopsias endoscópicas de la mucosa gástrica es un método sencillo de diagnóstico de la infección por *H. pylori*. Es característica su localización, en íntimo contacto con el epitelio de superficie, en plena barrera moco-bicarbonato. La tinción de plata de Warthin-Starry es la ideal para evidenciar los gérmenes, aunque en general las tinciones habituales, hematoxilina-eosina y Giemsa, son suficientes, pues permiten una correcta visualización.

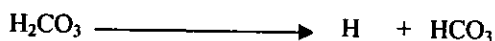
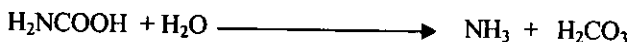
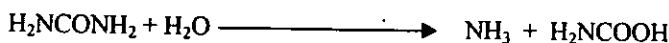
TINCION DE GRAM.

Mediante una extensión y tinción de Gram se puede diagnosticar de una forma sencilla, rápida y económica la presencia de *H. pylori* en la biopsia endoscópica. La sensibilidad y especificidad del método es del 95% y 60%, respectivamente.

PRUEBA DE LA UREASA.

H. pylori posee una intensa actividad ureásica (conversión enzimática de la urea en amonio y CO₂). Esta característica se ha aprovechado para diseñar un sistema de diagnóstico rápido, que consiste en introducir una biopsia endoscópica en un caldo de urea de Christensen. Si la actividad ureásica es elevada, se produce un cambio cromático del amarillo al rosa. La prueba de la urea tiene la ventaja de ser sencilla, económica y rápida, ya que el cambio cromático habitualmente se produce en pocas horas. Así, a las tres horas la sensibilidad es del 97%, aunque la especificidad es del 60%. Si la lectura se practica a las 24 horas, la especificidad es del 100% y la

sensibilidad del 92%. Existen algunos falsos positivos debido a la existencia de otros gérmenes con cierta actividad ureásica.



Catálisis de la hidrólisis de la urea para formar amonio y carbamato, y espontáneamente descompone dando otra molécula de amonio y ácido carbónico.

MÉTODOS NO ENDOSCÓPICOS.

Son las técnicas de elección en los estudios epidemiológicos de población y en el seguimiento de pacientes en tratamiento.

SEROLOGIA.

Se basan en que la infección por *H. pylori* provoca una respuesta inmune tanto local como sistémica. Se ha evaluado y comparado la eficacia diagnóstica de dos pruebas serológicas comercializadas, un ELISA (Pyloristat test, Whitaker), y una seroaglutinación mediante látex (Pyloriset, Orion). EL ELISA mostró una mayor eficacia diagnóstica (sensibilidad 100%, especificidad 72%) que el látex (46% y 82%, respectivamente).

Tras la erradicación de *H. pylori* se observa una disminución o desaparición de los títulos de anticuerpos, que desgraciadamente no suele ser significativa hasta unos meses después de la erradicación.

PRUEBA DEL ALIENTO.

Se basa, como la prueba de la ureasa, en la alta actividad ureásica de *H. pylori*, actividad que es posible cuantificar a través de la medida de CO₂ expirado marcado con ¹⁴C tras la administración oral de urea marcada con dicho isótopo. La dosis de radiactividad administrada es baja, y la técnica barata y al alcance de numerosos hospitales. La prueba del aliento con urea marcada con ¹³C no es radiactiva, pero la técnica es más cara debido a la necesidad de utilizar un espectrofotómetro de masas para medir la hidrólisis de la urea. La prueba del aliento es un excelente método diagnóstico con alta sensibilidad (95%) y especificidad (96%).

EPIDEMIOLOGIA.

H. pylori está presente en la mucosa gástrica de menos del 20% de personas menores de 30 años de edad, pero aumenta en frecuencia al 40 a 60% de personas de 60 años, incluyendo individuos asintomáticos. Es los países en desarrollo, la incidencia de infección puede ser del 80%, en adultos.^(11,27)

En México se han realizado pocos estudios acerca de la seroprevalencia de *H. pylori*.⁽⁶¹⁾ Sin embargo un estudio realizado en los últimos años a 12,292 sueros indico que con ELISA para extracto total se encontró que el 66% de la población mexicana está infectada por *H. pylori*; la infección aumenta con la edad; en individuos de un año la seroprevalencia es de un 20%, a los 10 años es de 50% y a los 30 años casi del 90%; los factores de riesgo asociados a esta infección son; sexo femenino, nivel socioeconómico bajo, hacinamiento y bajo nivel de escolaridad.^(60,62)

TRATAMIENTO.

Eradicación de *H. pylori*: desde el punto de vista de la interpretación de los estudios del tratamiento antimicrobiano, su erradicación no es fácil. Los estudios tampoco son al azar no ciegos, las dosis de agentes antimicrobianos y la duración del tratamiento varía en amplio grado y la definición de erradicación difiere entre los estudios. Algunos consideran la ausencia de *H. pylori* inmediatamente después del tratamiento como una evidencia de la erradicación, mientras que otros insisten en que debe esperarse un mes para descartar a los sujetos en quienes el microorganismo sólo fue suprimido de manera temporal.

Ninguno de los agentes terapéuticos estándar para la úlcera (por ejemplo antagonistas receptores H₂ y el sucralfato) tienen algún efecto sobre *H. pylori*. Administrado solo, el bismuto suprime el microorganismo pero provoca una erradicación a largo plazo en más o menos 10% de los pacientes. Se han probado numerosos antibióticos como mono tratamiento, incluyendo eritromicina, amoxicilina, fluoroquinolonas, tinidazol y metronidazol, pero ninguno ha sido aceptable. El uso de tinidazol o de metronidazol ha conducido hacia la resistencia al medicamento en un número sustancial de microorganismos. Cuando uno de estos nitroimidazoles se combina con cualquier componente de un bismuto u otro antibiótico (por ejemplo amoxicilina), la frecuencia de resistencia disminuye (pero no desaparece) y los índices de erradicación son de aproximadamente 75%. Algunos investigadores sugieren un triple tratamiento con metronidazol, bismuto y amoxicilina o tetraciclina, aunque no es claro que dicho esquema sea más eficaz que el de doble tratamiento.⁽⁵⁾

CULTIVO DE CELULAS.

REQUERIMIENTOS DE EQUIPO.

Para facilitar el cultivo celular típico en un laboratorio de diagnóstico, se requiere de por lo menos un refrigerador (4 a 10 °C), dos congeladores (-20 y -70 °C), y de un congelador de nitrógeno líquido. La selección del congelador de nitrógeno líquido será determinada por (i) la capacidad deseada (número de ampollitas), (ii) la frecuencia de acceso, y (iii) la conveniencia de acceso. Los espacios para almacenar consumibles tales como envases de cultivo, pipetas, cristalería, etc., se deben localizar en lugares de fácil acceso. Finalmente, es obligatorio tener un área de lavado, un fregadero para el lavado de manos del personal y una estación para lavado de los ojos.⁽⁴⁾

REQUERIMIENTOS DEL MEDIO DE CULTIVO.

Harrison hizo crecer un cultivo de tejido de corto plazo, en su medio natural de extracto de embrión o linfa. Desde entonces hasta la década de 1950, los practicantes del cultivo de células emplearon medios "naturales" (extractos de embrión, hidrolizados de proteína, linfa) para la propagación de células. Un medio debe tener los aminoácidos indispensables, las vitaminas, sales inorgánicas, glucosa, suplementos orgánicos, hormonas, y factores del crecimiento necesarios para el desarrollo de las células. Eagle consiguió desarrollar dos de tales medios, medio básico y medio esencial mínimo, el último de los cuales es el medio más ampliamente usado en la actualidad. Actualmente hay muchas variedades de medios de cultivo, el uso de los cuales depende del tipo específico de células que deben desarrollarse. Las formulaciones más comunes emplean: las sales equilibradas de Eagle para usarse en sistemas con 5% de CO₂ o las sales balanceadas de Hanks para sistemas de recipiente cerrado. Muchas células animales crecen bien a un pH de 7.4, pero típicamente el metabolismo normal del crecimiento de la célula maneja un pH menor, debido a lo cual se requiere que el medio de cultivo sea amortiguante. Debido a su baja toxicidad y costo, frecuentemente se usa bicarbonato, a pesar de su pobre amortiguamiento a un pH de 7.4. El amortiguante zwitterionic HEPES (N-2-hidroxietilpiperazina- N'- 2-ácido etanosulfónica; pKa = 7.55) ha ganado mucha popularidad por su fuerte capacidad de amortiguamiento en el rango de 7,2 a 7,6 y su relativamente baja toxicidad en concentraciones de 10 a 20 mM. La concentración de vitaminas y glucosa variarán según los requisitos de las células. Para incrementar la vida de almacenamiento de las cepas, a menudo se omite del medio la L-glutamina (2mM) hasta antes de su uso. También se añaden, previo a su uso, sueros y antibióticos de su elección (ej. penicilina (100 U/ ml) y streptomicina (100 ug/ ml). En medios completos, el suero proporciona los nutrientes "indefinidos", tales como: proteínas, polipéptidos, hormonas (insulina, hidrocortisona), y otros factores del crecimiento (factor de crecimiento derivado de platelet, factor de crecimiento de fibroblasto, factor de crecimiento de la epidermis, etc.). Los laboratorios típicamente emplean calor inactivo (56°C, 30 min), el suero fetal bovino, de caballo o humano se emplea como

suplemento en una proporción de 2 a 20% (vol/ vol). El suero animal proporciona muchos nutrientes en el medio de cultivo de la célula. Sin embargo, el uso del suero animal como un suplemento, especialmente el fetal bovino, tiene varias desventajas, siendo significativo el alto costo del mismo. Adicionalmente, el suero contiene componentes menores que tienen efectos adversos en el crecimiento de la célula.⁽⁴⁾

CELULAS HeLa.

Las células HeLa pertenecen a Henriqueta Lacks originaria de Baltimore, Maryland. Henriqueta se quejaba de sangrados irregulares entre un período y otro. En febrero de 1951 se le tomó una muestra de tejido del cuello del útero, encontrándosele un crecimiento maligno. Ocho meses después, a la edad de 31 años, murió de un tumor sumamente agresivo. Aunque murió hace más de cuarenta años, sus células viven en laboratorios de todo el mundo.

Sus células han desempeñado una invaluable ayuda para la investigación médica, aunada a la valoración de nuevas terapias contra el cáncer y el desarrollo de nuevas vacunas. "Normalmente, las células cultivadas en el laboratorio mueren después de cincuenta reproducciones. La explicación usual es que están programadas para destruirse. Pero el cambio canceroso masivo que había ocurrido a las células HeLa les permitió evitar la programación de la muerte celular, al ser cultivadas en una sopa de plasma de pollo, extracto de embrión de vaca y suero de placenta humana, se consiguió que vivan para siempre".

Otra diferencia es que las células HeLa no tienen el número de cromosomas humanos normal. Puede presentarse cualquier número entre 43 y 88, dependiendo del cultivo, y del material genético de los cromosomas ordenado de diferente manera.

Bajo condiciones sumamente cuidadas, es posible hacer que el núcleo de las células HeLa se fusione con el núcleo de células humanas así como las células de ratón se pueden unir con las nuestras. Pero tal hibridación entre las células humanas y las HeLa no ocurre espontáneamente bajo condiciones normales en el laboratorio.

Algunos expertos opinan que las células cervicales cancerígenas HeLa han dado un gran paso atrás, retrocediendo su proceso evolutivo, en el que habían desarrollado una forma y una función especializada que sólo pudieron sobrevivir como parte de un organismo multicelular sofisticado que había encontrado una existencia primitiva, pero independiente, similar a la de una ameba ordinaria.

Actualmente las líneas celulares se han convertido en una herramienta primordial en la investigación médica. Son las células HeLa quienes pavimentaron el camino y han sido una enorme aportación para la biología celular.⁽⁶³⁾

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En México se han realizado pocos estudios acerca de la seroprevalencia de *H. pylori*. Sin embargo un estudio realizado en el año de 1997 a 12,292 sueros usando la prueba con extracto total se mostró que el 66% de la población mexicana está infectada por *H. pylori*; la infección aumenta con la edad; en individuos de un año la seroprevalencia es de un 20%, a los 10 años es de 50% y a los 30 años casi del 90%; los factores de riesgo asociados a esta infección son; sexo femenino, nivel socioeconómico bajo, hacinamiento y bajo nivel de escolaridad.

La infección por *H. pylori* es un problema de salud para toda la población teniendo mayor prevalencia en países en vía de desarrollo incluyendo México. La caracterización del efecto citotóxico ha sido establecido casi exclusivamente con cepas de *H. pylori* aisladas de adultos. Se desconoce si el efecto citotóxico y su relación con las manifestaciones clínicas es similar en cepas aisladas de niños. Dicha caracterización es importante por ser los niños el blanco de la infección primaria con *H. pylori*

OBJETIVOS.

- Aislar, identificar y purificar cepas de *H. pylori* de una población de niños y una de adultos con enfermedad gastroduodenal.
- Determinar si existen diferencias del efecto citotóxico de sobrenadantes de cepas de *H. pylori* aisladas de niños y adultos, con enfermedad gastroduodenal.
- Comparar el efecto citotóxico de sobrenadantes de cepas de *H. pylori* de adultos con gastritis y adultos con úlcera duodenal.
- Comprobar la presencia de *H. pylori* en Concentrados de Sobrenadantes por Neutralización con sueros homólogos y anti Vac A (conejo)

HIPOTESIS.

Es probable que exista mayor efecto citotóxico de concentrados de sobrenadantes de cepas de *H. pylori* aisladas de adultos que de niños. Debido a que se ha reportado que la infección y consecuencias patológicas como gastritis, úlcera y cáncer aumentan con la edad.

DISEÑO DE INVESTIGACION

Las diferencias entre cepas del efecto citotóxico entre niños y adultos, así como cepas provenientes de gastritis y úlcera se compararon por medio de chi cuadrada (χ^2).

TIPO DE ESTUDIO.

Observacional, prospectivo, transversal y comparativo.

POBLACION DE ESTUDIO.

Se estudiarán cepas de *H. pylori* aisladas de niños con síntomas de enfermedad gastroduodenal internados en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS) y cepas aisladas de adultos con enfermedad gastroduodenal atendidos en el Hospital de Especialidades de Centro Médico Nacional Siglo XXI.

CRITERIOS DE INCLUSION.

Cepas de *H. pylori* provenientes de biopsias tomadas por endoscopia, de niños de 7 a 16 años con enfermedad gastroduodenal.

Cepas de *H. pylori* provenientes de biopsias tomadas por endoscopia, de adultos de 18 a 82 años con enfermedad gastroduodenal.

CRITERIOS DE EXCLUSION.

- Cepas de *H. pylori* no productoras de Citotoxina.
- Cepas de *H. pylori* de difícil aislamiento.
- Cepas de *H. pylori* de difícil purificación.

VARIABLE DEPENDIENTE.

Efectos citotóxicos.

VARIABLE INDEPENDIENTE.

Cepas de *H. pylori* de niños y adultos.

MATERIAL.

- Sobres generadores de atmósfera microaerofílica de CampyPak (BBL).
- Barras magnéticas (Cole-Parmer).

- Unidades de Ultrafiltración Centriprep 30 (Amicon, Inc. Beverly).
- Multipipetas 5-50 μ l (Labsystems).
- Multipipetas 20-200 μ l (Costar).
- Micropipetas automáticas 0.5-1000 μ l (Labsystems).
- Pipetas serológicas graduadas estériles de 5, 10 y 25 ml (Corning).
- Pipetas pasteur estériles (Corning).
- Puntas para micropipetas 0.5-1000 μ l (Labsystems).
- Microplacas estériles 96 pozos (Nunc).
- Membranas millipore 0.22, 0.45 μ m estériles.
- Jarras de anaerobiosis (GasPak System).
- Tubo de polipropileno estéril de 15 ml. (Costar).
- Tubo de polipropileno para centrifuga de 50 ml. (Elkay).
- Tubo para microcentrifuga de 0.5, 1, 1.5, y 2 ml (Elkay).
- Contenedores estériles de 200 ml (Costar).
- Cámara de Neubauer (Lumicyte).
- Criotubos de 2ml (Nunc).
- Cajas petri desechables (Corning).
- Jeringas desechables de 3,5, 10 y 20 ml (Plastipak).
- Botella estéril para cultivo de célula de 25 cm² (Nunc).
- Botella con tapa de rosca de 50, 100, 200, 500 y 1000 ml (Schoott).
- Matraz Erlenmeyer de 1 y 2 litros (Pyrex).
- Probetas de 500 ml, 1 y 2 litros (Pyrex).
- Vaso de precipitado de 20, 50, 100, 250, 500 y 1000 ml (Pyrex).
- Espátula (Cunsa).

- Gradillas (Kartell)
- Mechero Fisher.
- Puente de Tinción.
- Pinzas de disección.
- Asas bacteriológicas.
- Hisopos estériles (Corning).
- Guantes latex (Exam-tex).
- Portaobjetos (Corning).
- Membrana de Nylon desechable estéril 0.22 μm (MSI).
- Lápiz diamante.
- Gasas (Protec).
- Aplicadores de madera (POP).
- Marcador.
- Cronómetro.

MATERIAL BIOLÓGICO.

- Sangre de caballo.
- Células HeLa.
- Cepas de *H. pylori* puras.
- Suero Fetal Bovino SFB (Sigma).
- Biopsias de antro y cuerpo de pacientes con enfermedad gastroduodenal.

REACTIVOS.

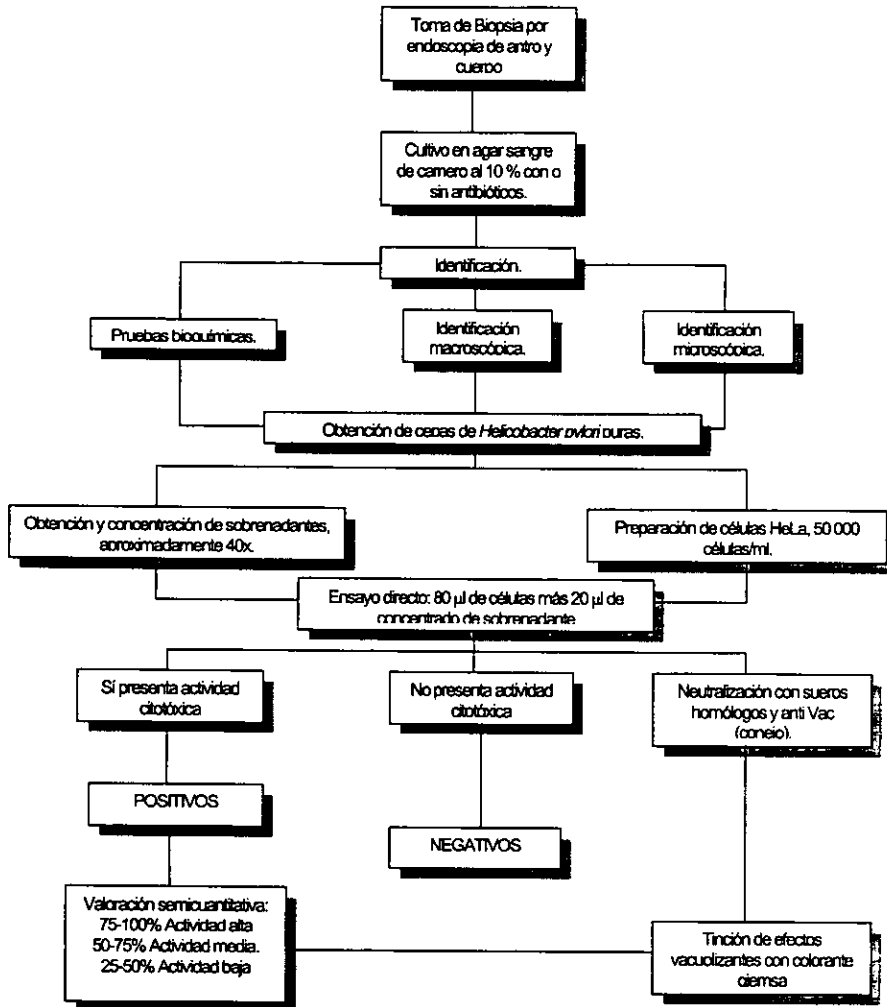
- Alcohol al 70 % (Merck).
- Medio Mínimo Esencial Eagles (Sigma).

- Agar Brucella (Bioxon).
- Hemoglobina (Bioxon).
- H₂O₂ (Sigma).
- Caldo brucella con Suero Fetal Bovino (SFB) al 5% (Difco).
- NH₄Cl al 10 mM (Sigma).
- Medio Mínimo Esencial al 10 y 2% de SFB (Sigma).
- Alcohol acidificado (Sigma).
- Colorantes para tinción de Gram (Cristal violeta, alcohol-acetona, lugol y safranina).
- Acido nalidíxico.
- Trimetropin.
- Vancomicina.
- Penicilina-Streptomina 10000 U.
- Bacitracina.
- Anfotericina.
- Buffer de fosfatos.
- Rojo de fenol al 1%
- Urea.
- Agua desionizada.
- Glicerol al 15%.
- Bicarbonato de sodio al 7.5 %.
- Buffer Hepes 1 molar.
- Glutamina 200 mMolar.
- Tripsina

EQUIPO.

- Incubadora de 37 °C ajustada a 6.5% de CO₂.
- Campana de flujo laminar (Nuair).
- Centrífuga (Sorvall RT 6000D).
- Autoclave (Fehlmex).
- Congelador de -20 °C.
- Congelador de -70 °C.
- Congelador de Nitrógeno.
- Refrigerador de 2-8 °C.
- Potenciómetro (Beckman RS 232).
- Balanza analítica (Sartorius).
- Balanza granataria (Mettler Toledo).
- Microscopio óptico (Nikon).
- Vortex (Vortex-Genie mod. K-550-6)
- Parrilla de agitación y calentamiento (Lab-line).

DIAGRAMA DE FLUJO.



METODOLOGIA.

I- OBTENCION DE CEPAS DE *H. pylori* PURAS.

- Se obtuvieron de biopsias de adultos (Hospital de especialidades CMN Siglo XXI) y de niños (Hospital de pediatría CMN siglo XXI) con enfermedad gastroduodenal.
- Se cultivaron las biopsias en agar brucella con sangre de caballo al 10% con ó sin antibiótico a 37°C, con 6-10% de CO₂ y de 3 a 10 días.
- Se identificaron las cepas de *H. pylori*.
 - Morfología colonial.- Presentó colonias, no pigmentadas, convexas de 1 mm de diámetro.
 - Morfología microscópica.- Con tinción de Gram; se colocó en un puente de tinción una preparación previamente fijada al calor, se agregó cristal violeta durante un minuto, se lavó con agua corriente. Se agregó lugol durante un minuto, se lavó con agua corriente. Se agregó alcohol acetona 30 segundos y se lavó con agua corriente. Se agregó safranina 1 minuto y se secó, se observó al microscopio con el objetivo de 100X. Se presentaron bacilos pequeños gramnegativos en forma curvada o de espiral o cocos gramnegativos cuando fueron de cultivos viejos de 5 a 10 días de incubación.
 - Pruebas bioquímicas.- Se colocó aproximadamente 50µl de caldo urea en una microplaca y se adicionó una pequeña cantidad de cepa, agitando con la asa bacteriológica en el mismo caldo, se esperó 3 minutos, presentó ureasa positiva por el vire del indicador rojo de fenol contenido en el caldo urea. Se colocó aproximadamente 50µl de H₂O₂ en una microplaca y se adicionó con el asa bacteriológica una pequeña cantidad de cepa, observando catalasa positiva al presentar burbujeo el H₂O₂.

II- OBTENCION Y CONCENTRACION DE SOBRENADANTES.

- En agitación, se cultivaron cepas de *H. pylori* por tres días a 37°C en 20 ml de caldo Brucella que contenían suero fetal bovino (SFB) al 5% en una atmósfera microaerofílica generada por CampyPak-Plus en jarra de anaerobiosis o en una incubadora ajustada a 6.5% de CO₂.
- Se centrifugó a 5000 – 8000 rpm a 4°C, y se salvaron sobrenadantes en un recipiente nuevo y conservaron a –20 °C hasta su uso.

- Se utilizaron unidades de ultrafiltración Centriprep 30 (Amicon, Beverly), y se concentraron sobrenadantes aproximadamente a 40x se esterilizaron por filtración con membranas de 0.22 μm
- Se obtuvieron finalmente 0.5 ml de concentrado de sobrenadante.

III.- PREPARACION DE CELULAS HeLa.

- Se tripsinizarón células HeLa de cultivo confluyente en fase logarítmica crecidas en botellas de 50 ml.
- Se suspendieron las células en 1ml de Medio Mínimo Esencial con Suero Fetal Bovino al 10% (MEM-SFB 10%).
- Se tomaron 200 μl de la suspensión y se mezcló con 800 μl de MEM-SFB 10% (dilución 1:5).
- Se tomó una alícuota pequeña con una pipeta Pasteur estéril y determinó el número de células por mililitro en una cámara de Neubauer de acuerdo a la siguiente fórmula: células/ml=promedio de células por cuadro x factor de dilución x 10^4 (cuenta de 10 cuadros).
- Se ajustó el número de células a 50000/ml con medio MEM-SFB determinando primero el volumen de la suspensión original que contiene 50000 células con la siguiente fórmula: volumen conteniendo 50000 células = $50000 \times 1000 \mu\text{l}/\text{No. De células por ml}$. Una vez calculado éste volumen se multiplicó por el número de mililitros necesarios para preparar cada microplaca (usualmente múltiplos de 10, ya que cada microplaca con 100 μl /pozo requiere aproximadamente 10 ml de la suspensión ajustada), y se completó el volumen requerido con MEM-SFB 10%.

IV.- PROTOCOLO DE INOCULACION.

- En una microplaca estéril se colocaron 80 μl de suspensión de células HeLa (50000 células/ml) y se adicionaron 20 μl de cada concentrado de sobrenadante a probar como se indica en el siguiente diagrama:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5	CS6	CS7	CS8	CS9	CS10	CS11	CS12
B												
C												
D												
E												
F												
G												

Tabla 1CS: Concentrado de Sobrenadante.

- Se incubó a 37°C en una incubadora de 6.5% de CO₂ durante 24 horas.
- Para potenciar el efecto vacuolizante de los concentrados de sobrenadantes, se adicionó NH₄Cl 10mM al medio MEM-SFB 10% con el que se preparará la suspensión celular, agregando 100 µl de una solución estéril de NH₄Cl 1M a 8ml de MEM-SFB 10%.

V.- NEUTRALIZACION CON SUEROS HOMOLOGOS.

- Se diluyó el suero homologo 1:100 con solución salina al 0.9% estéril.
- Se colocó 15µl de suero homologo diluido más 135µl de MEM-SFB 10%.
- Se mezcló 1:1 con concentrados de sobrenadantes; 20µl de suero diluido más 20µl de concentrado de sobrenadante.
- Se incubó 30 minutos a 37°C.
- Se colocó en una microplaca previamente preparada con 40 µl de células HeLa más 40 µl de la mezcla anterior.
- Se incubó a 37 °C durante 24 horas en un ambiente microaerofílico.

VI.- NEUTRALIZACION CON SUEROS ANTI VAC.

- Se diluyó el suero anti Vac 1:100 con solución salina al 0.9% estéril.
- Se colocó 15µl de suero anti Vac diluido más 135µl de MEM-SFB 10%.
- Se mezcló 1:1 con concentrados de sobrenadantes; 20µl de suero diluido más 20µl de concentrado de sobrenadante.
- Se incubó 30 minutos a 37°C.
- Se colocó en una microplaca previamente preparada con 40 µl de células HeLa más 40 µl de la mezcla anterior.
- Se incubó a 37 °C durante 24 horas en un ambiente microaerofílico.

VII.- TINCION CON GIEMSA PARA EL EFECTO VACUOLIZANTE.

- Se fijó el cultivo que presenta efecto vacuolizante con 100µl de formaldehído ó glutaraldehído al 3.7% con solución amortiguadora de fosfatos de Dulbecco's (DPBS) en cada pozo, se dejó actuar durante 3 ó 24 horas a temperatura ambiente.

- Se desechó formaldeído ó glutaraldehído y se enjuagó con 100µl de agua destilada en cada pozo.
- Se agregó 30µl de colorante giemsa en cada pozo, previamente filtrado con membrana de 0,45µm
- Se incubó con agitación lentamente 2 minutos a temperatura ambiente.
- Se diluyó el colorante agregando 120 ml de H₂O destilada en cada pozo, agitando lentamente 2 minutos
- Se desechó el colorante y lavó las placas 3 veces vigorosamente con H₂O corriente.
- Se enjuagó con H₂O desionizada y examinó en el microscopio mientras la monocapa permanecía húmeda, ó bien completamente seca.

RESULTADOS

Se analizaron 115 cepas en total de las cuales 77 fueron de adultos y 38 de niños, de adultos 36 fueron con padecimiento de úlcera gástrica y 41 con gastritis, mientras que para el caso de niños todas fueron con padecimiento de dolor abdominal crónico. Las edades para niños van de 7 a 16 años y para adultos de 18 a 82 años. El 38.3% de cepas son de mujeres y el 61.7% de hombres.

En la tabla 2 y 3 se muestran en detalle los resultados obtenidos para las cepas de *H. pylori* aisladas de adultos y niños respectivamente.

Tabla 2. Resultados de cepas aisladas de adultos.

Número	Cepa	Citotoxina	Efecto	Actividad	Sexo	Edad (años)	Cuadro clínico
1	2a	+	R	M	F	70	U
2	6a	+	R	B	M	22	U
3	10a	-	-	-	F	27	U
4	13a	+	R	M	M	68	U
5	14a	+	R	M	M	37	U
6	15a	+	R	M	M	62	U
7	16a	+	V	M	F	57	U
8	18a	-	-	-	F	37	U
9	19a	+	R	M	M	51	U
10	20a	-	-	-	F	23	U
11	21a	-	-	-	M	25	U
12	22a	+	V	M	M	46	U
13	23a	+	V	M	M	18	U
14	24c	+	R	M	M	40	U
15	25c	+	V	M	M	57	U
16	31a	+	R	M	M	76	U
17	32a	+	R	M	F	51	U
18	33a	+	V	M	M	57	U
19	37a	+	V	B	F	45	U
20	46a	+	V	B	M	25	U
21	47a	+	V	B	M	64	U
22	49a	+	V	B	F	44	U
23	51a	+	V	M	F	72	U
24	54a	+	R	M	M	64	U
25	54c	+	R	M	M	64	U
26	56a	+	V	B	M	21	U
27	57a	+	R	M	M	35	U
28	57c	+	V	B	M	67	U
29	60a	-	-	M	F	47	U
30	63c	+	V	B	M	64	U
31	63c	-	-	-	M	51	U
32	66a	+	V	B	M	58	U
33	69a	-	-	-	M	46	U

Número	Cepa	Citoplasma	Efecto	Actividad	Sexo	Edad (años)	Cuadro clínico
34	69c	+	V	M	M	40	U
35	71c	-	-	-	M	52	U
36	92a	-	-	-	F	47	U
37	1c	+	V	B	F	41	G
38	4c	+	V	B	F	40	G
39	4a	+	V	B	F	40	G
40	7c	+	V	A	M	74	G
41	8c	+	V	A	M	58	G
42	11c	-	-	-	M	37	G
43	12a	+	V	M	M	53	G
44	18c	+	V	A	M	61	G
45	23a	+	V	B	M	33	G
46	49a	+	V	B	M	23	G
47	49c	+	V	A	M	23	G
48	46a	+	V	A	M	63	G
49	51a	+	V	B	M	60	G
50	52c	+	V	M	M	25	G
51	53c	+	V	B	F	33	G
52	54c	+	V	A	M	48	G
53	55a	+	V	B	M	67	G
54	57c	+	V	A	F	67	G
55	61a	+	V	M	M	68	G
56	64a	-	-	-	M	58	G
57	68a	+	V	B	M	43	G
58	69a	+	V	M	M	46	G
59	69c	+	V	M	M	46	G
60	82c	+	V	B	M	32	G
61	88a	+	V	B	F	37	G
62	89a	+	V	A	M	34	G
63	90c	+	V	A	M	52	G
64	90a	+	V	A	M	52	G
65	91a	+	V	B	M	20	G
66	91c	+	V	B	M	20	G
67	101a	+	V	M	F	45	G
68	111a	+	V	B	M	34	G
69	115c	-	-	-	F	78	G
70	117a	-	-	-	M	60	G
71	117c	+	V	B	M	60	G
72	118a	+	V	B	F	43	G
73	122c	-	-	-	F	30	G
74	125c	+	V	B	M	49	G
75	128a	+	V	B	F	82	G
76	132c	+	V	B	M	36	G
77	48a	+	V	M	M	33	G

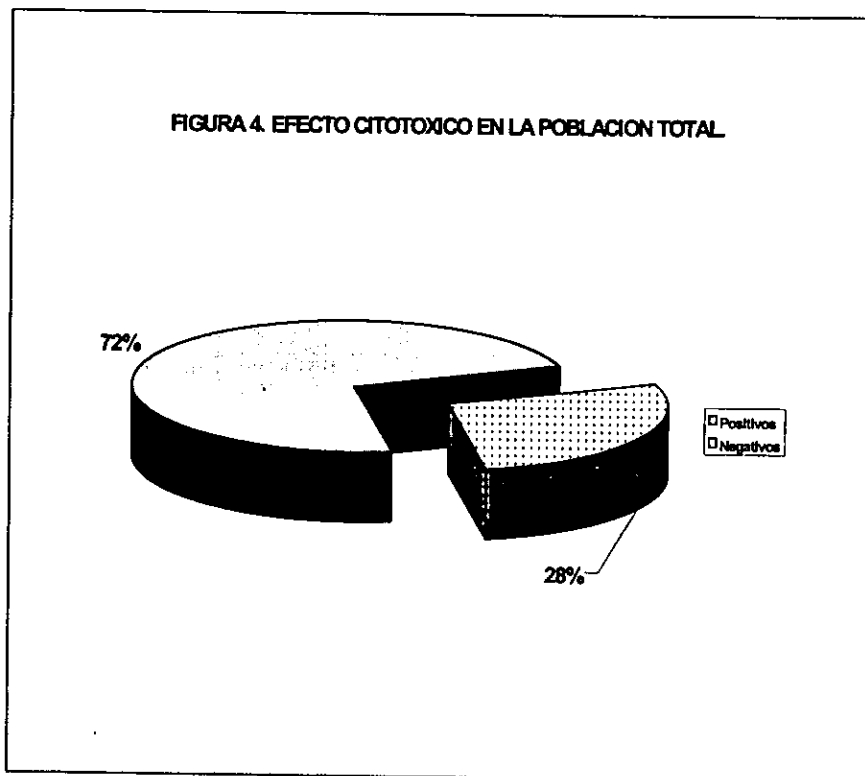
a=antro c=cuerpo +=positivo -=negativo R=arredondamiento V=vacuolización A=alta B=baja M=media
F=femenino M=masculino U=úlceras G=gastritis

Tabla 3. Resultados de cepas aisladas de niños.

Número	Cepa	Citotoxina	Efecto	Actividad	Sexo	Edad	Quadro clínico
1	23a	-	-	-	F	13	DAC
2	51c	-	-	-	M	9	DAC
3	64a	+	V	M	F	10	DAC
4	64c	+	V	A	F	10	DAC
5	69a	+	V	A	F	14	DAC
6	71a	-	-	-	M	16	DAC
7	71c	-	-	-	M	16	DAC
8	72c	-	-	-	M	16	DAC
9	72a	-	-	-	M	14	DAC
10	75a	-	-	-	M	14	DAC
11	80a	-	-	-	F	12	DAC
12	87a	-	-	-	M	16	DAC
13	91a	-	-	-	F	14	DAC
14	92a	-	-	-	F	14	DAC
15	92c	-	-	-	F	14	DAC
16	128c	+	V	B	F	15	DAC
17	128a	+	V	B	F	15	DAC
18	152a	-	-	-	F	9	DAC
19	152c	-	-	-	F	9	DAC
20	198a	-	-	-	F	14	DAC
21	234c	+	V	B	M	10	DAC
22	236a	+	V	M	M	10	DAC
23	236c	+	V	M	M	10	DAC
24	250c	-	-	-	M	15	DAC
25	250a	+	V	A	M	15	DAC
26	253a	+	V	A	F	8	DAC
27	262a	+	V	A	M	15	DAC
28	262c	+	V	A	M	15	DAC
29	263a	+	V	B	F	9	DAC
30	278a	+	V	B	F	7	DAC
31	278c	+	V	B	F	7	DAC
32	291c	+	V	M	F	7	DAC
33	291a	+	V	B	F	7	DAC
34	304a	+	V	B	M	8	DAC
35	304c	+	V	B	M	8	DAC
36	306a	-	-	-	F	9	DAC
37	309a	-	-	-	F	9	DAC
38	313a	+	V	B	F	10	DAC

a=antro c=cuerpo +=positivo -=negativo V=vacuolización A=alta M=media B=baja F=femenino
M=masculino DAC=dolor abdominal crónico

En la figura 4 se observa que un 72.2% de las cepas presentan efecto citotóxico y el 27.8% son negativas en la población total analizada



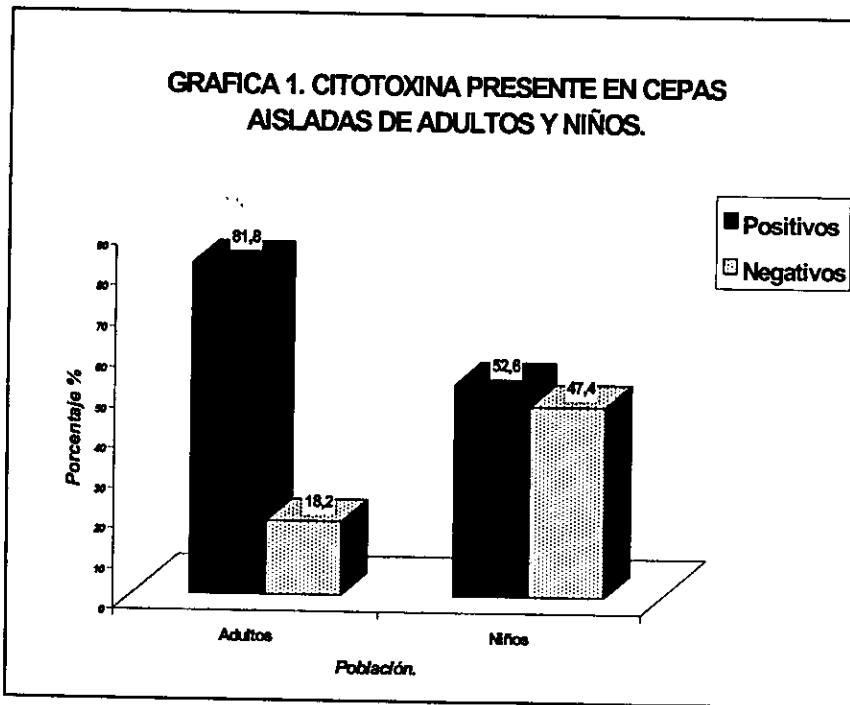
Los resultados obtenidos para la presencia de la citotoxina en cepas aisladas de adultos y niños se muestran a continuación:

Tabla 4. Citotoxina presente en cepas aisladas de niños y adultos

CEPAS AISLADAS	POSITIVOS		NEGATIVOS		TOTALES	
	No	(%)	No	(%)	No	(%)
ADULTOS	63	81.8	14	18.2	77	100
NIÑOS	20	52.6	18	47.4	38	100

$\chi^2_{\text{obs. tab.}} = 10.79$
 $\chi^2_{\text{crit. tab.}} = 3.841$

$p=0.001$
 $\alpha=0.05$



Si existen diferencias significativas con relación a la presencia de la citotoxina de las cepas aisladas en la población estudiada por lo tanto si depende de la edad. En la gráfica 1, se observa que es mayor la presencia de la citotoxina en cepas aisladas de adultos que en las de niños, comparándose al realizar el análisis estadístico que si hubo una diferencia significativa.

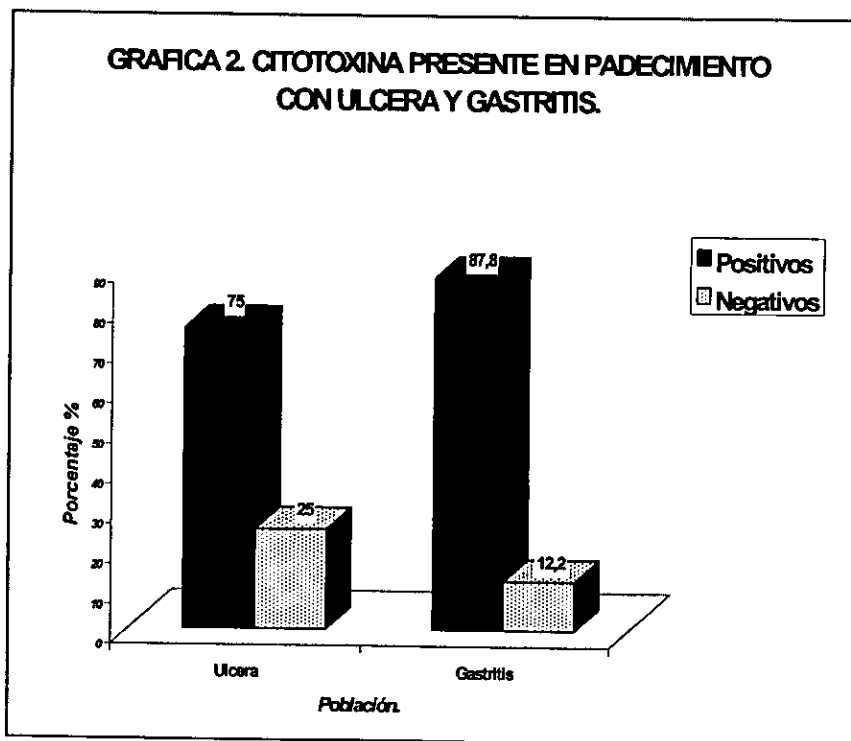
Los resultados obtenidos para la citotoxina presente en padecimiento con úlcera y gastritis se muestran a continuación:

Tabla 5. Citotoxina presente en padecimiento con úlcera y gastritis

CEPAS AISLADAS (ADULTOS)	<u>POSITIVOS</u>		<u>NEGATIVOS</u>		<u>TOTALES</u>	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
GASTRITIS	36	87.8	5	12.2	41	100
ULCERA	27	75	9	25	36	100

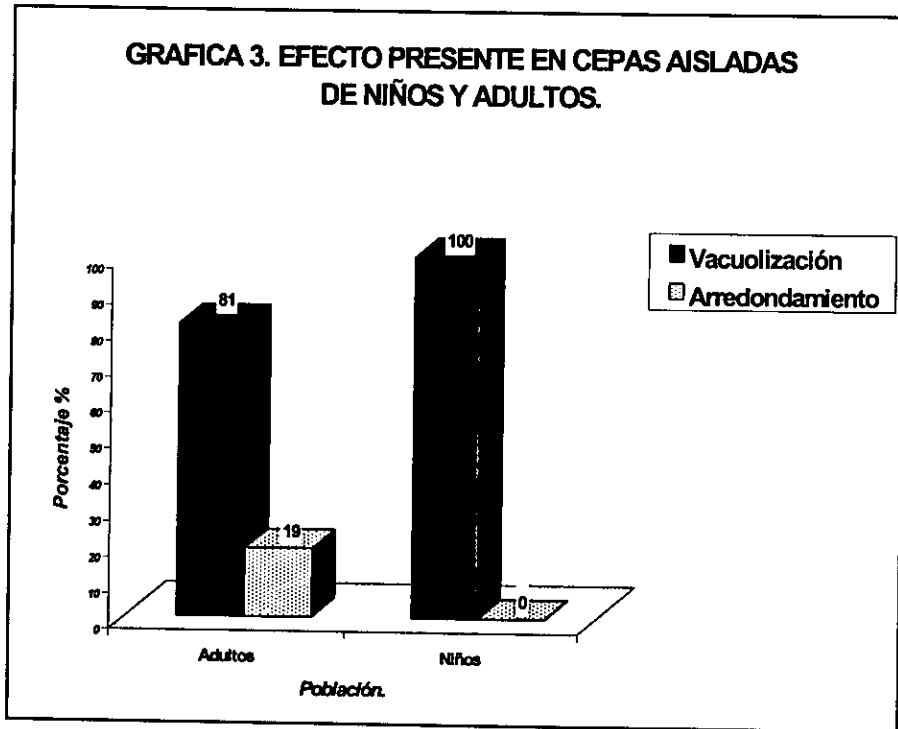
$\chi^2_{calculado} = 2.11$
 $\chi^2_{tabla} = 3.841$

$p = 0.1461$
 $\alpha = 0.05$



No existen diferencias significativas, son eventos independientes la presencia de la citotoxina con el tipo de padecimiento.

En las cepas analizadas de adultos se mostraron dos tipos de efectos, de arredondamiento y vacuolización, para las cepas de niños únicamente se presentó el efecto vacuolizante.



Debido a que la actividad varió para cada caso se calificaron tres criterios semicuantitativos:

Actividad Alta.- de 75 a 100% de las células HeLa presentes en el pozo de la placa, fueron vacuolizadas.

Actividad media.- de 50 a 75% de las células HeLa presentes en el pozo de la placa, fueron vacuolizadas.

Actividad baja.- de 25 a 50% de las células HeLa presentes en el pozo de la placa, fueron vacuolizadas.

Tabla 6. Grado de actividad por rango de edades.

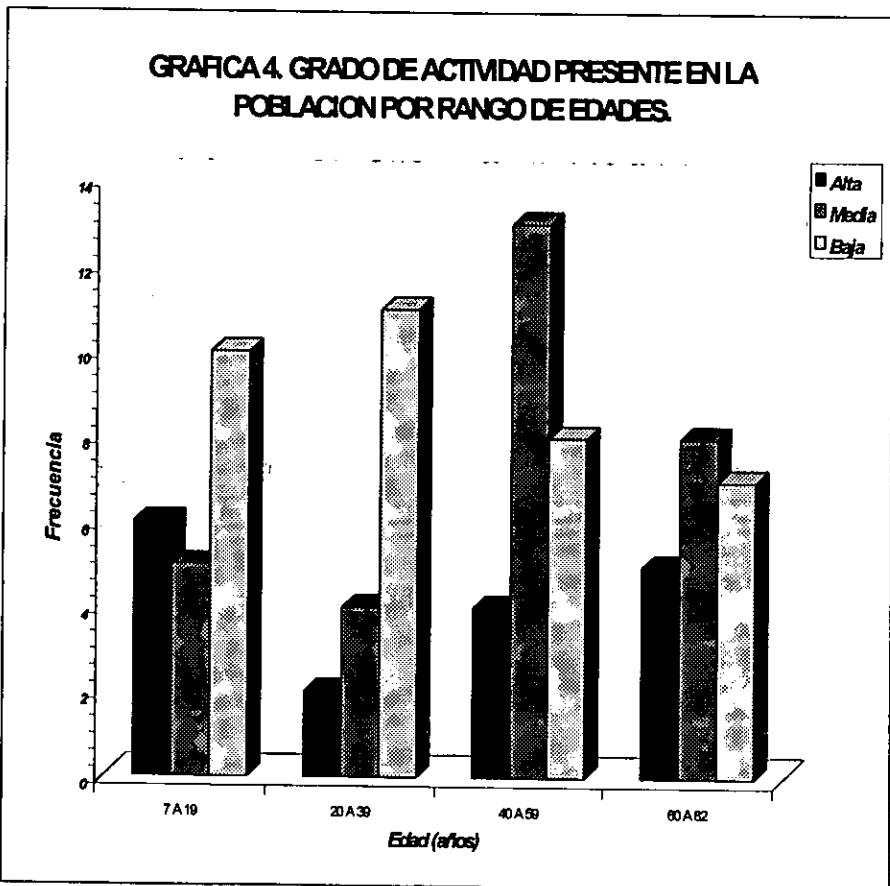
EDAD (años)	ACTIVIDAD ALTA		ACTIVIDAD MEDIA		ACTIVIDAD BAJA	
	No	(%)	No	(%)	No	(%)
7-14	6	7.2	5	6.0	10	12.0
20-39	2	2.5	4	4.8	11	13.3
40-59	4	4.8	13	15.7	8	9.7
60-82	5	6.0	8	9.6	7	8.4
TOTAL	17	20.5	30	36.1	36	43.4

$\chi^2_{obtido} = 8.140$

$p = 0.0230$

$\chi^2_{critico} = 12.592$

$\alpha = 0.05$



No existen diferencias significativas, son eventos independientes el grado de actividad con respecto a la edad.

La actividad baja en la población total tuvo mayor prevalencia con un 43%, siguiendo la actividad media con un 36% y por último la actividad alta con un 21%

FIGURA 5. GRADO DE ACTIVIDAD PRESENTE EN LA POBLACION TOTAL

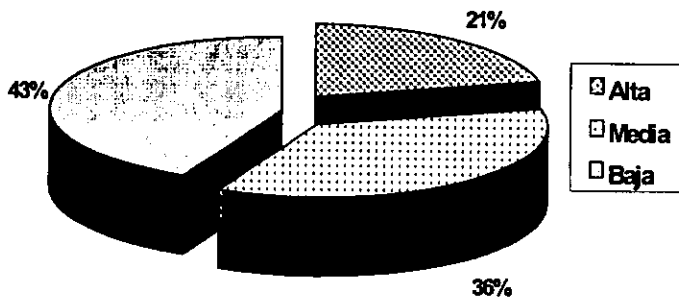
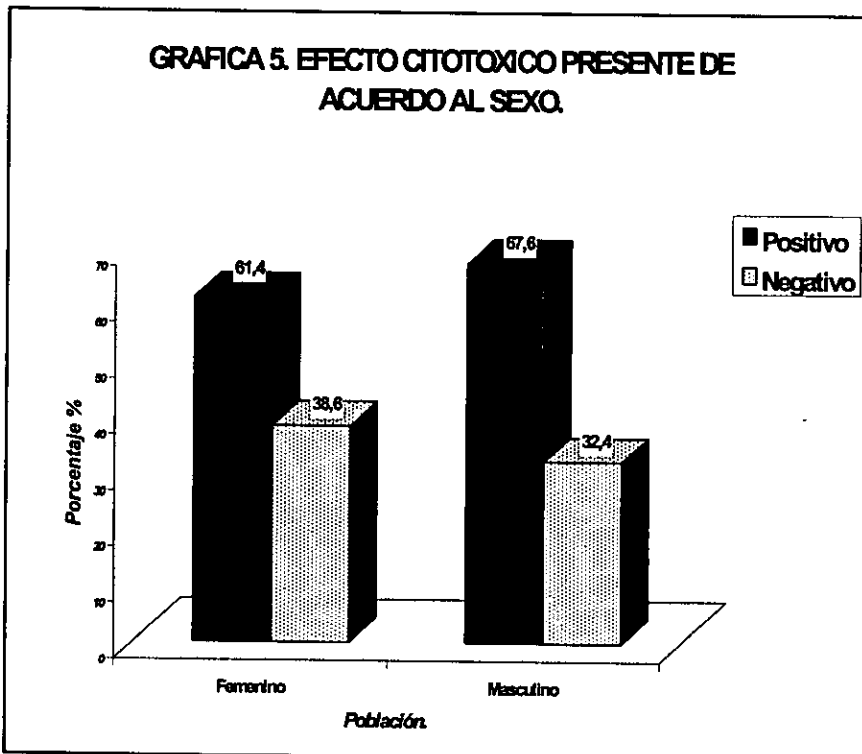


Tabla 7. Efecto citotóxico de acuerdo al sexo.

SEXO	E.C. POSITIVOS		E.C. NEGATIVOS		TOTALES	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
FEMENINO	27	61.4	17	38.6	44	100
MASCULINO	48	67.6	23	32.4	71	100

$\chi^2_{calculado} = 0.4665$
 $\chi^2_{total} = 3.841$

$p = 0.4946$
 $\alpha = 0.05$



No existe diferencia significativa, son eventos independientes, la presencia del efecto citotóxico respecto al sexo.

RESULTADOS

Se analizaron 115 cepas en total de las cuales 77 fueron de adultos y 38 de niños, de adultos 36 fueron con padecimiento de úlcera gástrica y 41 con gastritis, mientras que para el caso de niños todas fueron con padecimiento de dolor abdominal crónico. Las edades para niños van de 7 a 16 años y para adultos de 18 a 82 años. El 38.3% de cepas son de mujeres y el 61.7% de hombres.

En la tabla 2 y 3 se muestran en detalle los resultados obtenidos para las cepas de *H. pylori* aisladas de adultos y niños respectivamente.

Tabla 2. Resultados de cepas aisladas de adultos.

Número	Cepa	Citotoxina	Efecto	Actividad	Sexo	Edad (años)	Cuadro clínico
1	2a	+	R	M	F	70	U
2	6a	+	R	B	M	22	U
3	10a	-	-	-	F	27	U
4	13a	+	R	M	M	68	U
5	14a	+	R	M	M	37	U
6	15a	+	R	M	M	62	U
7	16a	+	V	M	F	57	U
8	18a	-	-	-	F	37	U
9	19a	+	R	M	M	51	U
10	20a	-	-	-	F	23	U
11	21a	-	-	-	M	25	U
12	22a	+	V	M	M	46	U
13	23a	+	V	M	M	18	U
14	24c	+	R	M	M	40	U
15	25c	+	V	M	M	57	U
16	31a	+	R	M	M	76	U
17	32a	+	R	M	F	51	U
18	33a	+	V	M	M	57	U
19	37a	+	V	B	F	45	U
20	46a	+	V	B	M	25	U
21	47a	+	V	B	M	64	U
22	49a	+	V	B	F	44	U
23	51a	+	V	M	F	72	U
24	54a	+	R	M	M	64	U
25	54c	+	R	M	M	64	U
26	56a	+	V	B	M	21	U
27	57a	+	R	M	M	35	U
28	57c	+	V	B	M	67	U
29	60a	-	-	M	F	47	U
30	63c	+	V	B	M	64	U
31	63c	-	-	-	M	51	U
32	66a	+	V	B	M	58	U
33	69a	-	-	-	M	46	U

Número	Cepa	Citoplasma	Efecto	Actividad	Sexo	Edad (años)	Cuadro clínico
34	69c	+	V	M	M	40	U
35	71c	-	-	-	M	52	U
36	92a	-	-	-	F	47	U
37	1c	+	V	B	F	41	G
38	4c	+	V	B	F	40	G
39	4a	+	V	B	F	40	G
40	7c	+	V	A	M	74	G
41	8c	+	V	A	M	58	G
42	11c	-	-	-	M	37	G
43	12a	+	V	M	M	53	G
44	18c	+	V	A	M	61	G
45	23a	+	V	B	M	33	G
46	49a	+	V	B	M	23	G
47	49c	+	V	A	M	23	G
48	46a	+	V	A	M	63	G
49	51a	+	V	B	M	60	G
50	52c	+	V	M	M	25	G
51	53c	+	V	B	F	33	G
52	54c	+	V	A	M	48	G
53	55a	+	V	B	M	67	G
54	57c	+	V	A	F	67	G
55	61a	+	V	M	M	68	G
56	64a	-	-	-	M	58	G
57	68a	+	V	B	M	43	G
58	69a	+	V	M	M	46	G
59	69c	+	V	M	M	46	G
60	82c	+	V	B	M	32	G
61	88a	+	V	B	F	37	G
62	89a	+	V	A	M	34	G
63	90c	+	V	A	M	52	G
64	90a	+	V	A	M	52	G
65	91a	+	V	B	M	20	G
66	91c	+	V	B	M	20	G
67	101a	+	V	M	F	45	G
68	111a	+	V	B	M	34	G
69	115c	-	-	-	F	78	G
70	117a	-	-	-	M	60	G
71	117c	+	V	B	M	60	G
72	118a	+	V	B	F	43	G
73	122c	-	-	-	F	30	G
74	125c	+	V	B	M	49	G
75	128a	+	V	B	F	82	G
76	132c	+	V	B	M	36	G
77	48a	+	V	M	M	33	G

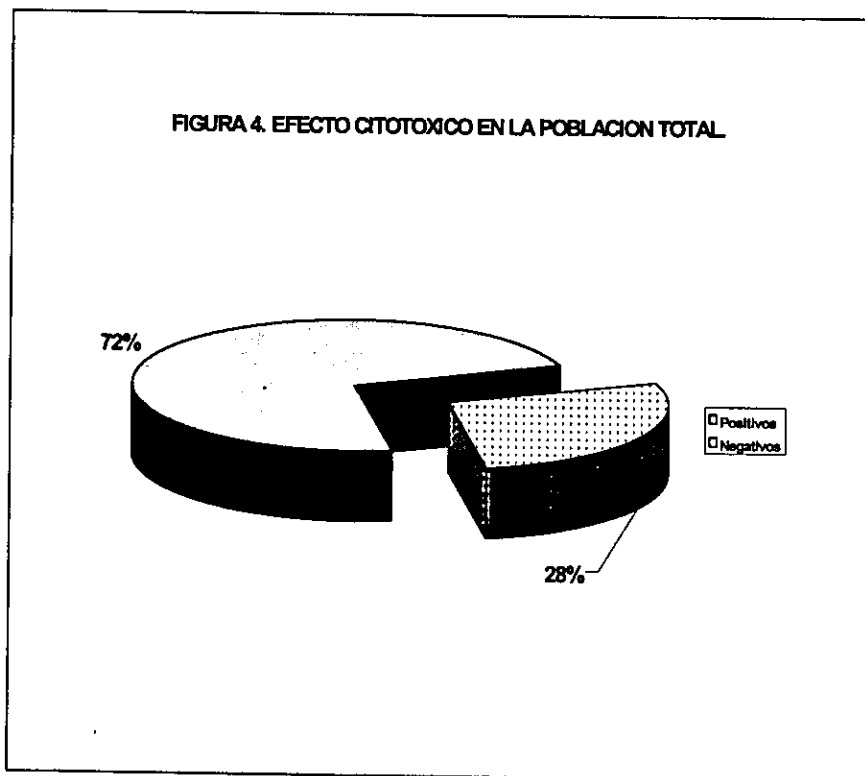
a=antro c=cuerpo +=positivo -=negativo R=arredondamiento V=vacuolización A=alta B=baja M=media
F=femenino M=másculino U=úlceras G=gastritis

Tabla 3. Resultados de cepas aisladas de niños.

Número	Cepa	Citotóxica	Efecto	Actividad	Sexo	Edad	Quadro clínico
1	23a	-	-	-	F	13	DAC
2	51c	-	-	-	M	9	DAC
3	64a	+	V	M	F	10	DAC
4	64c	+	V	A	F	10	DAC
5	69a	+	V	A	F	14	DAC
6	71a	-	-	-	M	16	DAC
7	71c	-	-	-	M	16	DAC
8	72c	-	-	-	M	16	DAC
9	72a	-	-	-	M	14	DAC
10	75a	-	-	-	M	14	DAC
11	80a	-	-	-	F	12	DAC
12	87a	-	-	-	M	16	DAC
13	91a	-	-	-	F	14	DAC
14	92a	-	-	-	F	14	DAC
15	92c	-	-	-	F	14	DAC
16	128c	+	V	B	F	15	DAC
17	128a	+	V	B	F	15	DAC
18	152a	-	-	-	F	9	DAC
19	152c	-	-	-	F	9	DAC
20	198a	-	-	-	F	14	DAC
21	234c	+	V	B	M	10	DAC
22	236a	+	V	M	M	10	DAC
23	236c	+	V	M	M	10	DAC
24	250c	-	-	-	M	15	DAC
25	250a	+	V	A	M	15	DAC
26	253a	+	V	A	F	8	DAC
27	262a	+	V	A	M	15	DAC
28	262c	+	V	A	M	15	DAC
29	263a	+	V	B	F	9	DAC
30	278a	+	V	B	F	7	DAC
31	278c	+	V	B	F	7	DAC
32	291c	+	V	M	F	7	DAC
33	291a	+	V	B	F	7	DAC
34	304a	+	V	B	M	8	DAC
35	304c	+	V	B	M	8	DAC
36	306a	-	-	-	F	9	DAC
37	309a	-	-	-	F	9	DAC
38	313a	+	V	B	F	10	DAC

a=arito c=cuerpo +=positivo -=negativo V=vacuolización A=alta M=media B=baja F=femenino
M=masculino DAC=dolor abdominal crónico

En la figura 4 se observa que un 72.2% de las cepas presentan efecto citotóxico y el 27.8% son negativas en la población total analizada



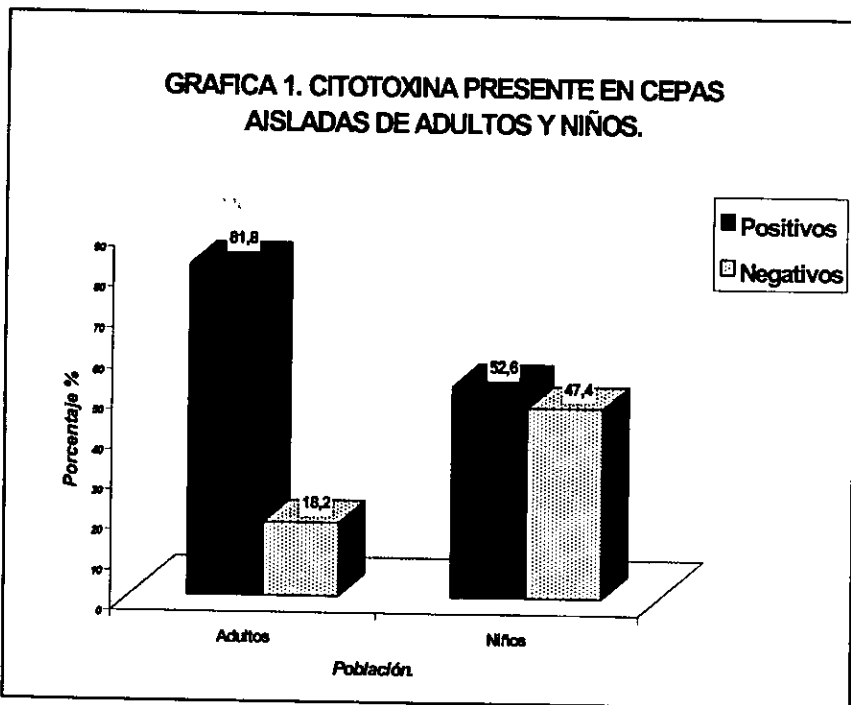
Los resultados obtenidos para la presencia de la citotoxina en cepas aisladas de adultos y niños se muestran a continuación:

Tabla 4. Citotoxina presente en cepas aisladas de niños y adultos

CEPAS AISLADAS	POSITIVOS		NEGATIVOS		TOTALES	
	No	(%)	No	(%)	No	(%)
ADULTOS	63	81.8	14	18.2	77	100
NIÑOS	20	52.6	18	47.4	38	100

$\chi^2_{obtenido} = 10.79$
 $\chi^2_{tabla} = 3.841$

$p=0.001$
 $\alpha=0.05$



Si existen diferencias significativas con relación a la presencia de la citotoxina de las cepas aisladas en la población estudiada por lo tanto si depende de la edad. En la gráfica 1, se observa que es mayor la presencia de la citotoxina en cepas aisladas de adultos que en las de niños, comparandose al realizar el análisis estadístico que si hubo una diferencia significativa

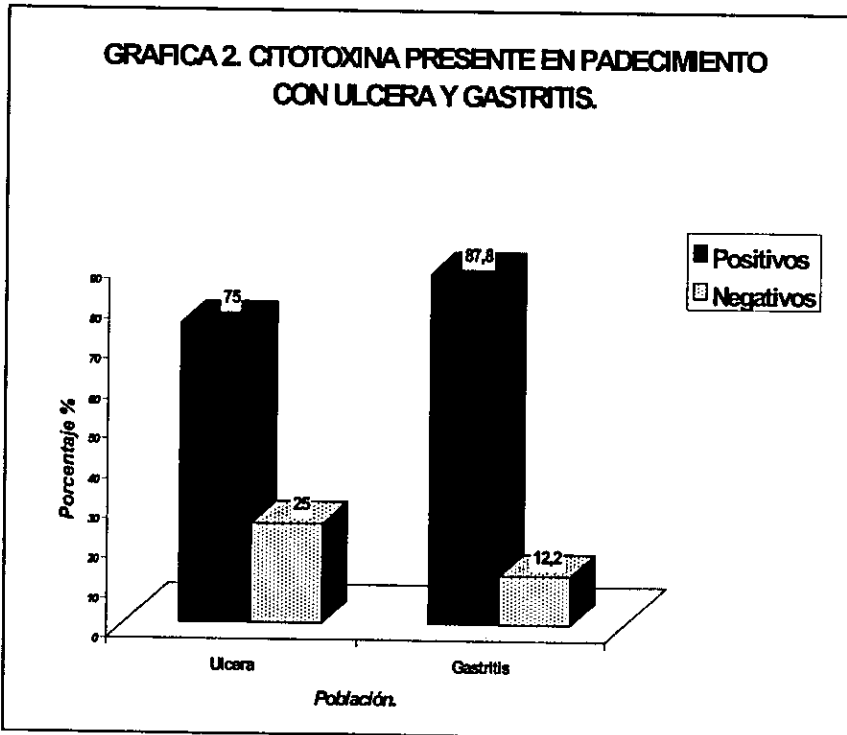
Los resultados obtenidos para la citotoxina presente en padecimiento con úlcera y gastritis se muestran a continuación:

Tabla 5. Citotoxina presente en padecimiento con úlcera y gastritis

CEPAS AISLADAS (ADULTOS)	POSITIVOS		NEGATIVOS		TOTALES	
	No	(%)	No.	(%)	No.	(%)
GASTRITIS	36	87.8	5	12.2	41	100
ULCERA	27	75	9	25	36	100

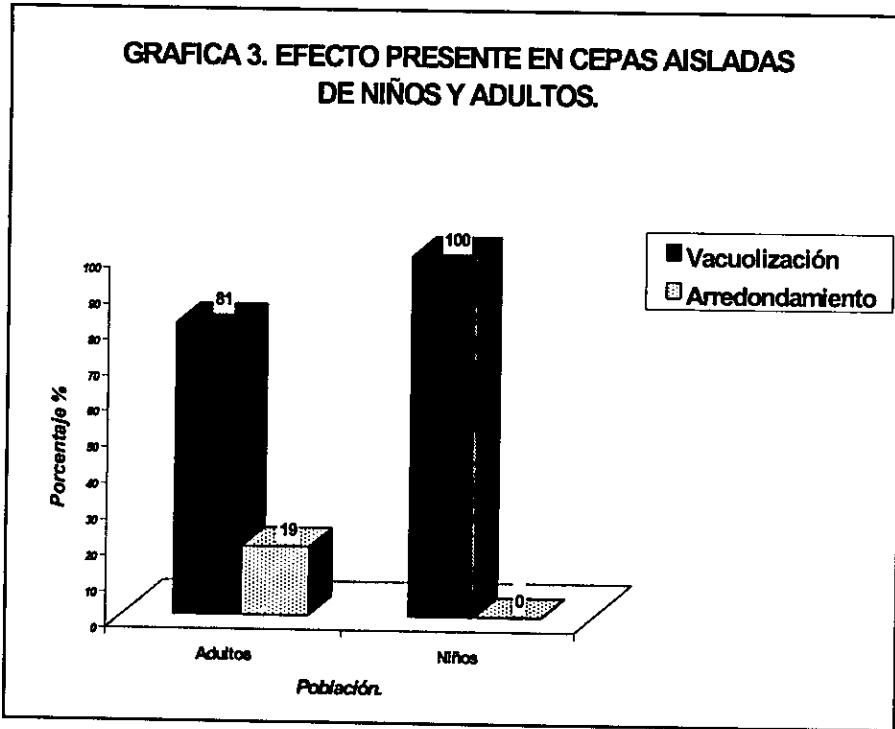
$\chi^2_{obtido} = 2.11$
 $\chi^2_{teoria} = 3.841$

$p = 0.1461$
 $\alpha = 0.05$



No existen diferencias significativas, son eventos independientes la presencia de la citotoxina con el tipo de padecimiento.

En las cepas analizadas de adultos se mostraron dos tipos de efectos, de arredondamiento y vacuolización, para las cepas de niños únicamente se presentó el efecto vacuolizante.



Debido a que la actividad varió para cada caso se calificaron tres criterios semicuantitativos:

Actividad Alta.- de 75 a 100% de las células HeLa presentes en el pozo de la placa, fueron vacuolizadas.

Actividad media.- de 50 a 75% de las células HeLa presentes en el pozo de la placa, fueron vacuolizadas.

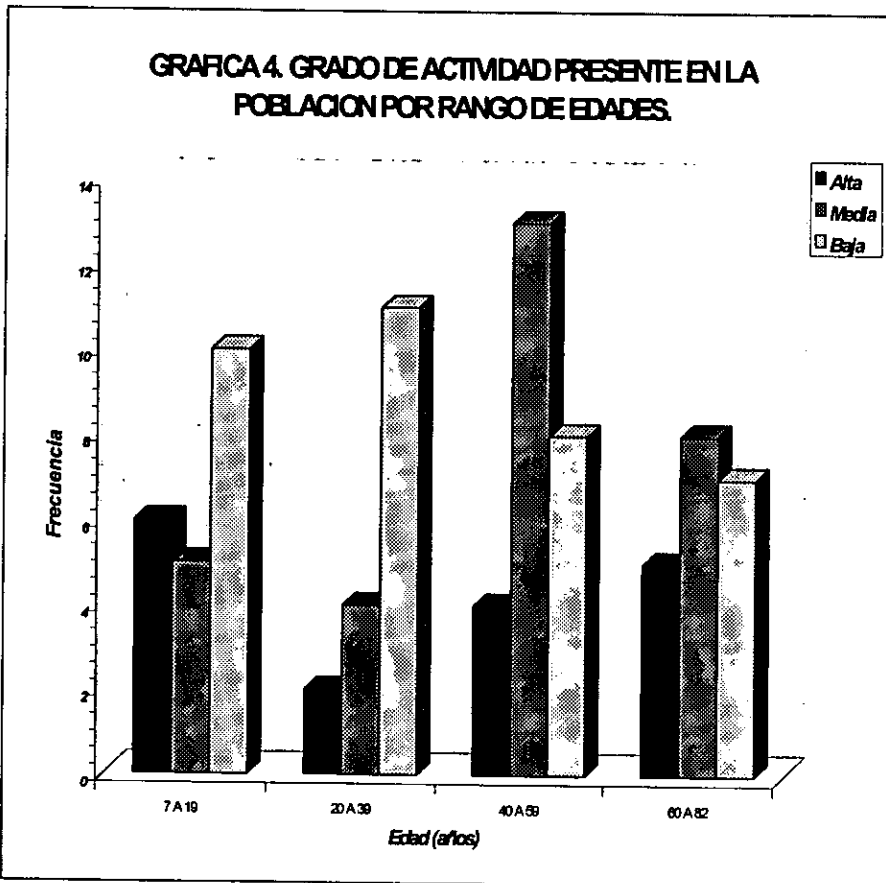
Actividad baja.- de 25 a 50% de las células HeLa presentes en el pozo de la placa, fueron vacuolizadas.

Tabla 6. Grado de actividad por rango de edades.

EDAD (años)	ACTIVIDAD ALTA		ACTIVIDAD MEDIA		ACTIVIDAD BAJA	
	No	(%)	No	(%)	No	(%)
7-14	6	7.2	5	6.0	10	12.0
20-39	2	2.5	4	4.8	11	13.3
40-59	4	4.8	13	15.7	8	9.7
60-82	5	6.0	8	9.6	7	8.4
TOTAL	17	20.5	30	36.1	36	43.4

$\chi^2_{obtido} = 8.140$
 $\chi^2_{teoria} = 12.592$

$p = 0.0230$
 $\alpha = 0.05$



No existen diferencias significativas, son eventos independientes el grado de actividad con respecto a la edad.

La actividad baja en la población total tuvo mayor prevalencia con un 43%, siguiendo la actividad media con un 36% y por último la actividad alta con un 21%

FIGURA 5. GRADO DE ACTIVIDAD PRESENTE EN LA POBLACION TOTAL

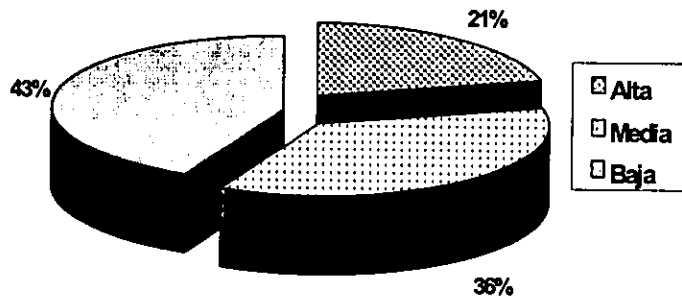
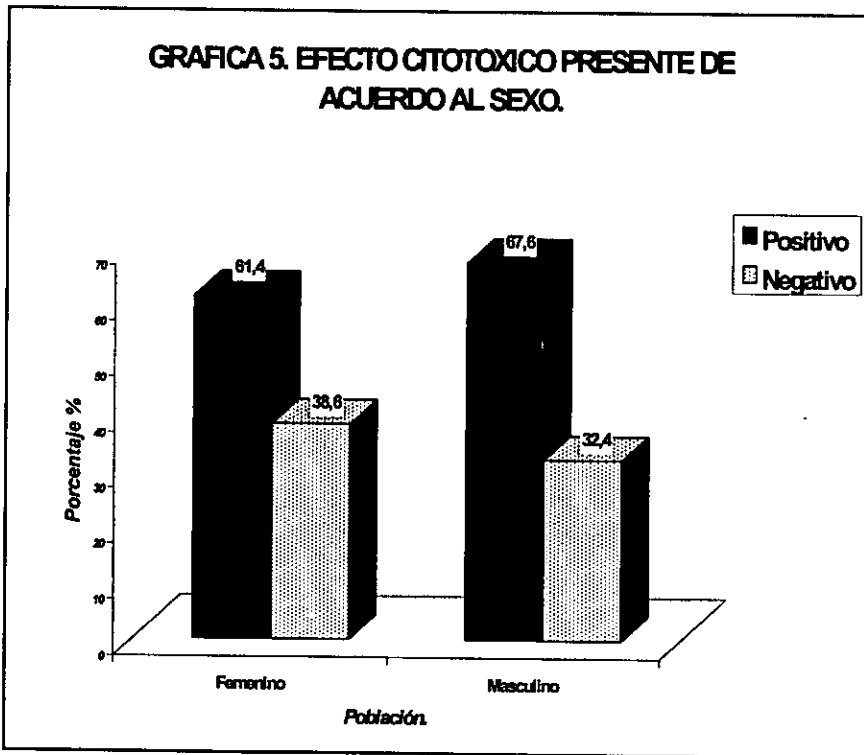


Tabla 7. Efecto citotóxico de acuerdo al sexo.

SEXO	E.C. POSITIVOS		E.C. NEGATIVOS		TOTALES	
	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)
FEMENINO	27	61.4	17	38.6	44	100
MASCULINO	48	67.6	23	32.4	71	100

$\chi^2_{obtido} = 0.4665$
 $\chi^2_{critico} = 3.841$

$p = 0.4946$
 $\alpha = 0.05$



No existe diferencia significativa, son eventos independientes, la presencia del efecto citotóxico respecto al sexo.

DISCUSION DE RESULTADOS

H. pylori, antes llamada *Campylobacter pylori*, ha generado gran interés desde su aislamiento y caracterización en mucosa gástrica en 1982. Varios estudios que se han hecho sugieren que esta bacteria juega un papel importante en la etiología de la gastritis antral, úlcera gástrica y duodenal y posiblemente cáncer gástrico.

Tan pronto se esclareció que *H. pylori* era el agente etiológico de la gastritis crónica superficial y un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico, los microbiólogos iniciaron pruebas para determinar características de virulencia, tales como la adherencia, o la producción de enzimas o toxinas, que podrían intervenir en las lesiones observadas en la mucosa gastroduodenal de individuos infectados. Una vez que llegó a ser aparente que la infección por *H. pylori* era necesaria para la ulcerogénesis, se dió inicio a la búsqueda de factores de virulencia de *H. pylori*.

Entre los principales factores de virulencia propuestos de *H. pylori* se encuentran la producción de ureasa, catalasa, gen *vacA*, proteína de choque térmico (Heat Shock Proteína) de 60 kDa, movilidad, capacidad de adherirse a la mucosa gástrica, presencia del gen *cagA*, proteína CagA, lipopolisacáridos y citotoxina (VacA) (31,32,33,34,35,36,37,38,39,40).

En el presente estudio se analizaron 115 sobrenadantes de cepas aisladas de *H. pylori*, los aislados de adultos fueron obtenidos del Hospital de Especialidades, mientras que los de niños del Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Quizá el aspecto más sobresaliente de la infección por *H. pylori* es que la mayoría de los sujetos infectados permanecen asintomáticos a través de toda su vida y nunca desarrollan un cáncer. Una explicación posible para esto es que la mayoría de individuos es infectado por cepas de *H. pylori* saprófitas (o comensales).

No es fácil definir las características de virulencia específicas de una bacteria que es considerada como la causa de la enfermedad ulcerativa (ulceración péptica), y un factor de predisposición de una enfermedad neoplásica (cáncer gástrico). La situación se complica aún más por las peculiaridades de *H. pylori*: su hábitat (restringido al estómago, un ambiente en el cual ninguna otra bacteria puede sobrevivir); la variabilidad genómica (cepas de distintos pacientes tienen distintos genomas); y la infección (la cual perdura durante toda la vida del paciente sino es tratada). Además la metodología para investigar las características de virulencia de las bacterias han sido desarrolladas en su mayor parte para crecimiento rápido, organismos no fácil desarrollo, los cuales crecen bien en caldo y casi siempre causan infecciones agudas. *H. pylori* es un organismo inusual, de difícil desarrollo, de crecimiento lento que no

crece en caldo si él inoculo no es denso. *H. pylori* muestra de manera inusitada que ningún otro órgano humano en las poblaciones del occidente es infectado por bacteria alguna para toda su vida.

Los estudios realizados en México demuestran que la prevalencia aumenta significativamente con la edad en el primer año de vida hay un 20.8% de niños positivos y a partir de los 10 años más del 50% de la población ya es positiva, hasta llegar a un máximo de 88.3% entre los 51 y 60 años.

La alta prevalencia conforme aumenta la edad tanto en hombres como en mujeres, sugiere una exposición continua de la población al microorganismo. Mitchel H. M en un estudio realizado en China sugiere que el incremento en prevalencia de *H. pylori* conforme a la edad es debido a 2 fases de infección: la primera ocurre en la niñez y la segunda a través de toda la vida. En la figura 4 se observa que un 72.2% de las cepas presentan efecto citotóxico y el 27.8% son negativas en la población total analizada.

Al analizar el efecto citotóxico de sobrenadantes de cepas de *H. pylori* aisladas de niños y adultos sobre células HeLa, se observó que si existe relación de la actividad citotóxica de las cepas aisladas en la población estudiada, que un 81.8% son positivas para adultos y un 52.6% para niños ($p=0.001$) y que por lo tanto estadísticamente si existen diferencias significativas, siendo mayor el efecto citotóxico en adultos que en niños. En la gráfica 1 se observan claramente las diferencias.

Es importante señalar que se analizaron alrededor de 250 cepas en total incluyendo las de niños y adultos y que sólo 115 fueron purificadas y analizadas hasta el ensayo final.

Los reportes de la última década indican que aproximadamente el 50% de cepas de *H. pylori* aisladas producen una citotoxina, y que las cepas citotóxicas tienen mayor probabilidad de ser aisladas de pacientes con enfermedad gastroduodenal. De acuerdo a los resultados obtenidos observamos que en adultos el porcentaje obtenido es de más del 50% (81.8) y que en niños se obtuvo alrededor del 50% (52.6).

Generalmente se acepta que *H. pylori* causa gastritis. Si la gastritis por *H. pylori* es verdaderamente una enfermedad sintomática es un tema en controversia. Se ha sugerido que la gastritis por *H. pylori* es causal de los síntomas de un subgrupo de pacientes con dispepsia no ulcerosa. Otros han sugerido que por su frecuencia casi universal en pacientes con úlcera duodenal. La gastritis por *H. pylori* teóricamente predispone a la ulceración a lo largo de su infección de las áreas de la metaplasia gástrica. ⁽⁵⁾

En el presente estudio se observó que la presencia de la citotoxina en relación con el tipo de padecimiento, úlcera y gastritis son eventos independientes ($p=0.1461$) y que por lo tanto estadísticamente no existen diferencias significativas. En la gráfica 2 se

observa que un 87.8% son positivas para padecimiento con gastritis y un 75% para ulcera.

H. pylori induce varios cambios morfológicos en células *in vitro*, como arredondamiento, vacuolización, pero sólo ha sido investigado hasta el momento la infección por cepas que inducen citovacuolización.^(35,36,37)

En la gráfica 3 se muestra que en las cepas aisladas de adultos se presentó un 81% de efecto vacuolizante y un 19% de efecto de arredondamiento, mientras que para las cepas aisladas de niños todas presentaron efecto vacuolizante.

Debido a que la actividad varió para cada caso, se calificaron 3 criterios:

Actividad alta.- de 75 a 100% de las células HeLa presentes en el pozo de la placa, fueron vacuolizadas.

Actividad media.- de 50 a 75% de las células HeLa presentes en el pozo de la placa fueron vacuolizadas.

Actividad baja.- de 25 a 50% de las células HeLa presentes en el pozo de la placa fueron vacuolizadas.

Sin embargo debido a que la infección así como el efecto citotóxico aumentan con la edad se esperaba que la actividad aumentara, a mayor edad, pero los resultados obtenidos indican que el grado de actividad con relación a la edad son eventos independientes ($p=0.230$) y que estadísticamente no existen diferencias significativas como se puede observar en la gráfica 4.

La actividad baja en la población total tuvo mayor prevalencia con un 43.4%, siguiendo la actividad media con un 30% y por último la actividad alta con un 20.5% como se observa en la figura 5.

En un estudio realizado en México en 1996 a 11,658 sueros procedentes de hombres y mujeres entre edades de 1 a 98 años de edad. Las mujeres presentaron mayor seroprevalencia (67.58%) que los hombres(64.95%)⁽⁶¹⁾

En estudios realizados en otros países esta reportado que el sexo no influyó en la seroprevalencia de *H. pylori*: Brasil 35.8% y 32.2% para hombres y mujeres respectivamente en una población de 249 niños de 1 a 18 años.^(61,64); en Perú 88% para hombres y 82% para mujeres menores de 30 años.^(61,65)

Sin embargo es necesario realizar más estudios con relación al sexo, para conocer las causas reales. Ya que en el presente estudio se observo mayor efecto citotóxico en el sexo masculino (67.6%) que en el femenino (61.4%), como se muestra en la gráfica 5,

lo cual estadísticamente indica que no existen diferencias significativas y que son eventos independientes la presencia del efecto citotóxico con respecto al sexo.

CONCLUSIONES.

De acuerdo a la población de estudio;

1. Se aislaron, identificaron y purificaron cepas de *H. pylori* de dos poblaciones una de niños y otra de adultos con enfermedad gastroduodenal.
2. El efecto citotóxico de sobrenadantes de cepas de *H. pylori* aisladas de adultos es mayor (81.8%) que en las de niños (52.6%).
3. El efecto citotóxico de sobrenadantes de cepas de *H. pylori* aisladas de adultos con gastritis fue mayor (87.8%) que las aisladas de úlcera (75%).
4. Se comprobó la presencia de *H. pylori* en concentrados de sobrenadantes por neutralización con sueros homólogos y anti Vac (conejo).
5. Se presentaron 3 grados de actividad las cuales se clasificaron de manera cualitativa, debido a la cantidad de citotoxina producida por cada cepa aislada y se observó que el grado de actividad no está relacionado con la edad.
6. El efecto citotóxico fue mayor en hombres (67.6%) que en mujeres (61.4%).

RECOMENDACIONES.

Es de gran importancia continuar realizando más investigaciones en México sobre *H. pylori*, ya que quizá el aspecto más importante de la infección por *H. pylori* es que sujetos infectados permanecen asintomáticos a través de toda su vida y nunca desarrollan un cáncer. Una explicación posible para esto es que los individuos son infectados por cepas de *H. pylori* saprofiticas (o comensales). Aunque el saprofitismo no ha sido demostrado para *H. pylori*, puesto que la colonización epitelial debida a este organismo está asociada siempre con lesiones inflamatorias de la mucosa y que por lo tanto a la fecha existen aun muchas controversias, porque otros individuos infectados presentan desde gastritis, úlcera y cáncer.

El presente trabajo permitió ver con claridad el efecto citotóxico de sobrenadantes de cepas de *H. pylori*, sin embargo es necesario optimizar la técnica utilizada para la obtención y concentración de sobrenadantes debido a que es laboriosa y durante su desarrollo permite el crecimiento de una gran cantidad de contaminantes lo que ocasiona problemas u omisión en la determinación final.

lo cual estadísticamente indica que no existen diferencias significativas y que son eventos independientes la presencia del efecto citotóxico con respecto al sexo.

CONCLUSIONES.

De acuerdo a la población de estudio;

1. Se aislaron, identificaron y purificaron cepas de *H. pylori* de dos poblaciones una de niños y otra de adultos con enfermedad gastroduodenal.
2. El efecto citotóxico de sobrenadantes de cepas de *H. pylori* aisladas de adultos es mayor (81.8%) que en las de niños (52.6%).
3. El efecto citotóxico de sobrenadantes de cepas de *H. pylori* aisladas de adultos con gastritis fue mayor (87.8%) que las aisladas de úlcera (75%).
4. Se comprobó la presencia de *H. pylori* en concentrados de sobrenadantes por neutralización con sueros homólogos y anti Vac (conejo).
5. Se presentaron 3 grados de actividad las cuales se clasificaron de manera cualitativa, debido a la cantidad de citotoxina producida por cada cepa aislada y se observó que el grado de actividad no esta relacionado con la edad.
6. El efecto citotóxico fue mayor en hombres (67.6%) que en mujeres (61.4%).

RECOMENDACIONES.

Es de gran importancia continuar realizando más investigaciones en México sobre *H. pylori*, ya que quizá el aspecto más importante de la infección por *H. pylori* es que sujetos infectados permanecen asintomáticos a través de toda su vida y nunca desarrollan un cáncer. Una explicación posible para esto es que los individuos son infectados por cepas de *H. pylori* saprofiticas (o comensales). Aunque el saprofitismo no ha sido demostrado para *H. pylori*, puesto que la colonización epitelial debida a este organismo está asociada siempre con lesiones inflamatorias de la mucosa y que por lo tanto a la fecha existen aun muchas controversias, porque otros individuos infectados presentan desde gastritis, úlcera y cáncer.

El presente trabajo permitió ver con claridad el efecto citotóxico de sobrenadantes de cepas de *H. pylori*, sin embargo es necesario optimizar la técnica utilizada para la obtención y concentración de sobrenadantes debido a que es laboriosa y durante su desarrollo permite el crecimiento de una gran cantidad de contaminantes lo que ocasiona problemas u omisión en la determinación final.

ANEXO I.

- 1) Agar Brucella con sangre de caballo al 10% y antibiótico.
 - a) Agar Brucella 43 g
 - b) Sangre de Caballo 100 ml
 - c) Agua desionizada, aforar a 1000 ml
 - d) Mezcla de antibióticos 1 ml
 - i) 100 mg de ácido nalidíxico
 - ii) 50 mg de trimetropin
 - iii) 30 mg de vancomicina
 - iv) 20 mg de anfotericina
 - v) Se disolvió y aforó a 1 ml. de agua
 - e) Se disolvió y se esterilizó durante 15 minutos a 121°C y 15 libras de presión.
 - 2) Agar Brucella con sangre de caballo al 10% sin antibiótico.
 - a) Agar Brucella 43 g
 - b) Sangre de caballo 100 ml
 - c) Agua desionizada, aforar a 1000 ml
 - d) Se disolvió y se esterilizó durante 15 minutos a 121°C y 15 libras de presión
 - 3) Caldo Urea
 - a) 0.03 g de urea.
 - b) 50 ml de solución amortiguadora de fosfatos de Dulbecco's (DPBS)
 - c) 2 gotas de rojo de fenol al 1%.
 - d) Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 μ
 - 4) Caldo Brucella con Suero Fetal Bovino al 5%
-

a) Caldo Brucella	28 g
b) Suero Fetal Bovino descomplementado (30 minutos a 56°C)	50 ml
c) Aforar con agua desionizada a	1000 ml
5) Medio Mínimo Esencial Eagle (Sigma)	
	g/l
a) Cloruro de calcio dihidratado	0.265
b) Sulfato de magnesio (anhidro)	0.09767
c) Cloruro de potasio	0.4
d) Fosfato de sodio Monobásico (anhidro)	0.122
e) Cloruro de sodio	6.8
f) L-Arginina • HCl	0.126
g) L-Cistina • 2HCl	0.0313
h) L-Glutamina	0.292
i) L-Histidina • HCl • H ₂ O	0.042
j) L-Isoleucina	0.052
k) L-Leucina	0.052
l) L-Lisina • HCl	0.0725
m) L-Metionina	0.015
n) L-Fenilalanina	0.032
o) L-Treonina	0.048
p) L-Triftofano	0.01
q) L-Tirosina • 2Na • 2H ₂ O	0.0519
r) D-valina	0.092
s) Acido fólico	0.001

t) Mio-inositol	0.002
u) Cloruro de colina	0.001
v) Niacinamida	0.001
w) Acido D-pantotenico	0.001
x) Piridoxal • HCl	0.001
y) Ribofavina	0.0001
z) Tiamina • HCl	0.001
aa) Glucosa	1.0
bb) Rojo fenol • Na	0.011
6) Medio Mínimo Esencial con Suero Fetal Bovino al 10% (MEM-SFB 10%).	
	ml
a) Medio Minimo Esencial Eagle 2X	50
b) Bicarbonato de sodio al 7.5%	1.5
c) Penicilina-Streptomicina 10000 U	1.0
d) Buffer Hepes (1 molar)	1.0
e) Glutamina (200 mmolar)	1.0
f) Suero Fetal Bovino	10.0
g) Agua destilada	35.5
h) Total	100.0
i) Mezclar y esterilizar por filtración con membrana de 0.22 μ	
7) MEM-SFB 20% Con glicerol (15%) para congelar células HeLa	
	ml
a) Medio Mínimo Esencial Eagle 2X	10.0
b) Bicarbonato de sodio 7.5%	0.3

- | | |
|-------------------------------------|-----|
| c) Penicilina-Streptomicina 10000 U | 0.2 |
| d) Buffer Hepes (1 molar) | 0.2 |
| e) Glutamina (200 mmolar) | 0.2 |
| f) Suero Fetal Bovino | 4.0 |
| g) Glicerol | 3.0 |
| h) Agua destilada | 2.1 |
| i) Total | 20 |
- j) Mezclar y esterilizar por filtración con membrana de 0.22 μ
- 8) Caldo Brucella con glicerol (15%) para congelar cepas de *H. pylori*.
- | | |
|--|---------|
| a) Caldo Brucella | 2.8 g |
| b) Suero Fetal Bovino descomplementado | 5.0 ml |
| c) Glicerol | 15.0 ml |
| d) Aforar con agua desionizada a | 100 ml |
- e) Se disolvió y esterilizó durante 15 minutos a 121°C y 15 libras de presión.
- 9) Preparación de Hepes.
- | | |
|---|--|
| a) (N-[2-Hidroxietyl] piperazina-N'-[2-ácido etanosulfónico]) | |
| b) P.M. 238.3 g | |
| c) Pureza: 99.5% | |
| d) 47.89 g de Hepes para 200 ml se disolvió, se ajustó a pH 7.4 y se esterilizó por filtración con membrana de 0.22 μ | |
- 10) Preparación de L-Glutamina (200 mmolar).
- | | |
|--|--|
| a) P.M. 146.1 g | |
| b) 5.844 g de glutamina para 200 ml | |
| c) Se disolvió y se esterilizó por filtración con membrana de 0.22 μ | |

BIBLIOGRAFIA.

1. Drumm B, *Helicobacter pylori*, Archives of disease in childhood. 1990;65:1278-1282.
2. Monés J, Sainz S, Sancho F.J., *Helicobacter pylori* en patología digestiva. Medicina Integral. 1994;8:435-447.
3. Owen Robert J., Bacteriology of *Helicobacter pylori*. Bailliere's clinical gastroenterology. 1995;9:415-430.
4. Murray Patrick R, Berron Ellen J, Manual of clinical microbiology, 6^a. Edición. 1994:492-496.
5. Walter L. Peterson, *Helicobacter pylori* y enfermedad ulceropéptica. 1994;6:279-288.
6. Marshall J., Warren J., Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet. 1984;1:1311-1315.
7. Goodwin CS, Armstrong Ja, Microbiological aspects of *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol. Infect. Dis 1990;9:1-13
8. Noach L. A., Rolf T. and Tytgat J., Electron microscopic study of asociación between *Helicobacter pylori* and gastric and duodenal mucosa. Clin Pathol. 1994;47:699-704.
9. Mc Nulty C., Watson M., Spiral bacteria of the gastric antrum. Lancet. 1984;1:1068-1069.
10. Covacci A., Ghiara P., *Helicobacter pylori*: Pathogenesis and feasibility of vaccine development. Molecular and clinical aspects of bacterial vaccine development. 1995;1:323-334.
11. Jawetz, Melnick y Adelberg, Microbiología Médica, 15^a. edición. 1996:279-281.
12. Murray Patrick R, Berron Ellen J, Manual of clinical microbiology, 6^a. Edición. 1994:492-496.
13. Cover TL., Blaser MJ., *Helicobacter pylori* and gastroduodenal disease. Ann Rev Med 1992;48:135-145

14. Blaser MJ, Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterology* 1992;102:720-727
15. Marshall BJ, Armstrong JA, Mc Geachie DB, Glaanng RJ, Attempt to fulfill Koch's postulate for *Campylobacter pylori*. *Med J Aust* 1985;142:436-439
16. Hov-Ac. Chen JJ and Jin ZP, An epidemiological Survey on *Helicobacter pylori* infection en children 1995;16:237-239
17. Olbe L. and Malferteiner P., Gastric Pathophysiology-emphasis on acid secretion and gastrointestinal motility. *Current Opinion in Gastroenterology*
18. Arnold R. and Quina M. Peptic ulcer pathogenesis. *Current Opinion in Gastroenterology*. 1996;12:24-27.
19. Walker M., Petolani S. and Gasbarrini G., Gastric carcinoma and gastric lymphoma. *Current Opinion in Gastroenterology*. 1996;12:33-36.
20. Bourke B, Jones N and Sherman Philip, *Helicobacter pylori* infection and peptic ulcer disease in children. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 1996;15:1-13
21. Vicent P, Gottrand F, Pernes P. High prevalence of *Helicobacter pylori* infection in cohabiting children. Epidemiology of a cluster, with special emphasis on molecular typing. *Gut* 1994;35:313-316
22. Hassall E, and Dimmick James, Unique Features of *Helicobacter pylori* disease in children. *Digestive Diseases and Sciences* 1991;36:417-420
23. Wewer V, Christiansen KM, Andersen LP, Henriksen FW, Hart Hansen JP, et al. *Helicobacter pylori* infection in children with recurrent abdominal pain. *Acta Paediatr* 1994;83:1276-1281
24. Madrazo de la Garza F, Erradicación del *Helicobacter pylori* y dolor abdominal crónico. *Rev Gastroenterol Méx*. 1996;61(4):398-399
25. Philip Sherman, Leslie Karen MD, Golderg Eudice MD, MacMillan J, et al. *Helicobacter pylori* infection in adolescents with eating disorders and dyspeptic symptoms. *The Journal of Pediatrics*. 1993;122:824-826
26. Crabtree Je, Mahony MJ, Taylor JD, et al. Immune responses to *Helicobacter pylori* in children with recurrent abdominal pain. Department of Paediatrics, St James's Hospital, Leeds . 1991;768-771

27. Nomura Abraham, Stemmermann Grant N., et al., *Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration. *Annals of Internal Medicine*. 1994;120:977-981
28. Riouy KP, Hogaboam Cm, Wallace JL, Gastric mucosal injury: interactions of mast cell, cytokines and nitricoxide. In *Helicobacter pylori* basic mechanisms to clinical cure. Hunt RH, Tytgat GNJ, eds. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/Condon. 1994:188-197
29. Blaser MJ, Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterology*. 1992;102:720-277
30. Fukuda T, Kimura S, Arakawa T, Koboyashi K., Possible role of leukotienes in gastritis asociated with *Campylobacter pylori*. *J Clin Gastroenterol*. 1990;12(1) S131-134
31. Drouet EM, D'Monrelos HP, Andujar M, Boude M, Grimaud JA, Denoyel GA, Partial characterization of an external polysacaeide of *Helicobacter pylori* by using and immunoglobulin M monoclonal antibody. *Infect Immun*. 1993;61:2732-2736
32. Macchia G, Massone A, Burroni D, Covacci A, Censini S and Rappuoli R. The hps 60 protein of *Helicobacter pylori*: Structure and immune response in patients with gastroduodenal diseases. *Mol Microbiol*. 1993;9:645-652
33. Evans DJ, Engstrand L, and Graham D. Ureasa-Asociation heat protein of *Helicobacter pylori*. 1982;60:2125-2127
34. Moran Anthony P, and Wadstroin T. Bacterial pathogenic factors. The year in *Helicobacter pylori*. 1994:17-19
35. Figura N., *Helicobacter pylori* exotoxins and gastroduodenal diseases associated with cytotoxic strain infection, *Aliment Pharmacol Ther*. 1996;10(Suppl. 1):79-96
36. Figura N, Bugnoli m, Cusi MG, et al. Pathogenic mechanisms of *Helicobacter pylori*: production of cytotoxin. In: Malferteiner P. Ditschuneit H, eds. *Helicobacter pylori*, Gastritis and Peptic Ulcer . Berlin: Springer-Verlag, 1990:86-95
37. Cover TL., Dooley CP. Blaser MJ. Characterization of and human serological response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolising cytotoxin activity. *Infect Immun* 1990;58:603-610
38. Goossens H, Glupczynski Y, Burette A, Lambert J-P, Vlaes L, Butzler J-p. Role of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of duodenal and gastric ulcer. *Med Microbiol Lett* 1992;1:153-159

39. Owen RJ, Hurtado A, Banatvala N, et al. Conservation of the cytotoxin-associated (*cagA*) gene of *Helicobacter pylori* and investigation of association with vacuolating-cytotoxin activity and gastroduodenal disease. *FEMS Immunol Med microbiol* 1994;9:307-316
40. Telford JL, Covacci A, Ghiara P, Dell'Orco M, et al. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp Med* 1994;179:1653-1658
41. Cover TL, Cao P, Lind CD, Tham KT, Baser MJ, Correlation between vacuolating cytotoxin production by *Helicobacter pylori* isolates in vitro and in vivo. *Infect Immun.* 1993;61:5008-5016
42. Phadnis Suhas H, Ulver D, Jarzon L, et al. Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori* infection and immunity. 1994;62:1557-1565
43. Cover TL, and Blaser Martin J. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *The Journal of Biological Chemistry.* 1992;267:10570-10575
44. Tummury MK, Cover Tl and Blaser M. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: Evidence of linkage to cytotoxin production. 1993;61:1799-1809
45. Cover TL, Cao A, et al. Serum Neutralizing antibody response to the vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *The Journal of Clinical Investigation Inc.,* 1992;90:913-918
46. Figura N, Tabaqchali S. Bacterial pathogenic factors. *The year in Helicobacter pylori.* 1996:12-14
47. Atherton JC, Cao Ping, Peek RM, et al. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*.
48. Figura N, Guglielmetti P, Rosselin A, Barberi A, Cursi G, Musmanno RA, Russi M, Quarante S, Cytotoxin production of *Campylobacter pylori* strains isolates from patients with peptic ulcer and from patients with chronic gastritis only. *J Clin Microbiol.* 1989;27:225-226
49. Cover TL, Blaser MJ, *Helicobacter pylori* a bacterial cause of gastritis, peptic ulcer disease and gastric cancer. *Features.* 1995;61:21-26

50. Garner Juli A and Cover Timothy L.. Binding and internalization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by epithelial cells. *Infection and Immunity*. 1996;64:4197-4203
51. Telfoud JL, Ghiara P, Dell 'orco M, Comanducci M, Burrini D, Bugnoli et al. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp Med*. 1994;179:1653-1658
52. Cover TL, Tummury MR, Cao P, Thompson SA and Blaser MJ. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J Biol Chem*. 1994;269:10566-10573
53. Salyers A, Dixie WD, Bacterial pathogenesis a molecular approach. Washington: ASM press; 1994: 273-281.
54. Lee A, Fox and Hazell S. Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: a perspective. *Infec Immun*. 1993;61:1601-1610
55. Dunn Be, Cohen H and Blaser Martin, *Helicobacter pylori* *Clinical Microbiology Reviews*, 1997; 10: 720-739.
56. Manetti R, Massari P, Bernard M, et al. *Helicobacter pylori* cytotoxin importance of native conformation for induction of neutralizing antibodies. 1995;63:4476-4480
57. Nataly HM, Graham DY, Klein PD, Erans DG, et al. Tansmission of *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol*. 1991;26:927-932
58. Ferguson DA, Patel NR, Mayberry WR, Chi DS, Thomas E, Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. *J Clin Microbiol*. 1993;31:2802-2804
59. Goodwin CS, Blincon E, Peterson G, et. Al. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Campylobacter pyloridis*: correlation with presence of C. pyloridis in the gastric mucosa. *J Infect Dis*. 1987;155:488-494
60. Hopkins Robert J, Vial A. Pablo, et al. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in chile: Vegetables May seve as one route of transmission. *The Journal of Infections Diseases*. 1993;168:222-226
61. Jimenez Ramirez C, Seroprevalencia de *Helicobacter pylori*. en la República Mexicana en población de diferentes edades y nivel socioeconómico, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, 1996: 30-35.

62. Leal Herrera Y, Seroprevalencia y características sociodemográficas asociadas a infección por *H. pylori* en la República Mexicana. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mex. D.F., 1997; 26-36.
63. Flores E M, Las células inmortales de Henrietta Lacks, Geo mundo: 1996; 12: 18-20.