



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

*"Efectos de inhibidores del metabolismo energético de Helicobacter pylori"*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

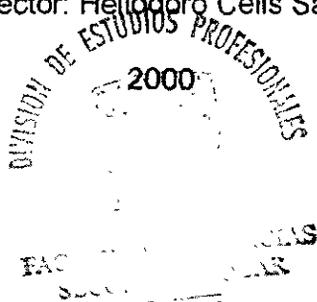
BIOLOGO

PRESENTA:

Marco Antonio Briones Orta



Director de Tesis: Dra. Irma Romero Álvarez  
Coodirector: Heliodoro Celis Sandoval



2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

*“Efectos de inhibidores del metabolismo energético de Helicobacter pylori”*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIOLOGO

PRESENTA:

Marco Antonio Briones Orta

Director de Tesis: Dra. Irma Romero Álvarez  
Coodirector: Heliodoro Celis Sandoval

2000

*para ti papá,  
en donde quiera que estés...*

Marco A. Briones Torres (1950-1997)

*“Los hombres somos cual las hojas. El viento las esparce por la tierra y la floresta hace germinar otras, y las primaveras se suceden. Así nace y se extingue toda generación de hombres”*

La Ilíada

Homero

## AGRADECIMIENTOS

A los cuates. El problema más grave al que me enfrento en esta parte de la tesis es no olvidar a ninguna de las personas que me ayudaron en la realización de la misma, pues fueron muchas, también diferentes las clases de apoyo que recibí, y algo largo el camino recorrido hasta llegar por fin a este objetivo. Lo que más temo es no mencionar a alguno de mis amigos (por falta de espacio), algunos cercanos, otros lejanos pues el tiempo o la distancia nos ha separado, pero que a pesar de eso recuerdo y recordare por siempre. Gracias a todos.

Por mi fe (o lo que de ella queda) a Dios, pues me ha acompañado durante todo momento y le da sentido a mi vida. A mi madre, por haberme dado la oportunidad de venir a este mundo. A mi hermana, quién llegó a darle un giro a mi vida, te quiero mucho Zigrith, espero acompañarte y verte crecer en todos sentidos.

A la Biol. Blanca Delgado, no puedo decir aquí todo lo que te debo, gracias por tu compañía, amistad, consejos. Blanquita, tu nombre va muy bien junto con Jorge (gracias por permitirme entrar en su hogar) y espero que la amistad crezca, madure y se fortalezca ahora que en la familia Bravo-Delgado también esta Rodrigo.

A mes amis du français, la petite Saidaly, Dora, Bartus et Pierre (le plus récent membre), nous ne savons pas parler très bien le français, mais vous êtes de les meilleures amis que j'ai trouvé (merci beaucoup par tout).

A mi super equipo de la carrera: Alma y Sophia, gracias por aguantarme tanto tiempo, creo que aprendí mucho en la carrera pero lo mejor fue hacerlo en su compañía. A la Reme, Yessica (felicidades por la boda ☺), al loco del Mauricio, Genaro, Dalia y a Ere (gracias tus consejos, no importa si han funcionado). A todos por estar conmigo en las buenas y en las malas.

A Concha y Lorena, por crecer y sufrir conmigo los gajes de la a-dolescencia. A Suzel, que me acompañó largo tiempo en el camino.

A Ricardo y Adrián, a Israel, Rafa, Thelma, Karla y Rosa María, A la Nancy, que le perdí la pista hace poco. A todo ellos por caminar conmigo, en diferentes tiempos y escenarios. A Vicky, una amistad reciente que espero crezca. A José Luis (Chepe), Maricruz, Lupe, Mark, con los que compartí la alegría de la naturaleza (que ninguna soledad abate).

A mi papá, quién siempre me apoyo en todos los aspectos y me dio total libertad para escoger mi camino, estaré siempre en deuda contigo, gracias por el tiempo que estuviste conmigo.

A la Dra. Irma Romero, a quien le debo el haberme involucrado en este proyecto y quien siempre me animó a seguir adelante, a pesar de los muchos tropiezos que tuvimos. Al Dr. Heliodoro Celis por permitirme estar en su laboratorio y el asesoramiento que me brindo. A los miembros del jurado. A la M. en C. Guadalupe Oliva (Lupis) quien es un ejemplo a seguir en este negocio, gracias por los comentarios a la tesis y por ser mi amiga. A la M. en C. Aurora Zlotnik, por darme de las mejores clases de la carrera, por tantas sugerencias a la tesis y por el entusiasmo que me mostró al revisarla. A la Dra. Guadalupe Ayala por interesarse en la tesis y plantear tantas perspectivas a la misma. A la M. en C. Silvia Escobedo (Silviux) por la ayuda técnica en el laboratorio y por su cinéfila amistad, te quiero de regreso muy pronto Silviux. A los compañeros del laboratorio, sobre todo a Israel (Cuacha) que me ayudo con los cultivos finales de la bacteria. A la Dra. Ariane Atteia y Jorge Ramírez por la asesoría en los experimentos de oximetría y sus sugerencias al trabajo. A Malena Gutiérrez por la ayuda que me dio y por las muchas charlas que hemos tenido.

Por último a mis maestros, que muchas veces fueron también mis amigos, excelentes personas y de quienes aprendí a aprender. Nelva Urrutia, Rosa María, Tovar, Silvia, Pompeyo por mencionar solo algunos.

# ÍNDICE

## ABREVIATURAS

1.	INTRODUCCIÓN	
1.1	GENERALIDADES.....	1
1.2	CARACTERÍSTICAS DE <i>Helicobacter pylori</i> .....	2
1.2.1	Taxonomía.....	2
1.2.2	Morfología.....	3
1.2.3	Hábitat.....	4
1.3	PATOLOGÍA.....	5
1.3.1	Gastritis.....	6
1.3.2	Úlcera Gástrica y Duodenal.....	8
1.3.3	Cáncer Gástrico.....	9
1.4	GENÉTICA.....	10
1.5	METABOLISMO.....	10
1.5.1.	Metabolismo energético.....	12
1.5.1.1.	Glucólisis y gluconeogénesis.....	12
1.5.1.2.	Entner Doudoroff y vía de las pentosas.....	14
1.5.1.3.	Metabolismo de piruvato.....	15
1.5.1.4.	Ciclo de Krebs.....	16
1.5.1.5.	Catabolismo de lípidos.....	18
1.5.1.6.	Metabolismo de aminoácidos.....	19
1.5.2.	Cadena respiratoria.....	20
1.5.3.	ATPasas.....	23
1.5.3.1.	ATPasa F <sub>1</sub> -F <sub>0</sub> .....	23
1.5.3.2.	ATPasa tipo P.....	25
1.5.4.	Pirofosfato y polifosfato.....	26
1.6	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
1.7	OBJETIVOS.....	28
1.7.1.	Objetivo General.....	28
1.7.2.	Objetivo Particular.....	28
2.	MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1.	GENERALIDADES DEL CULTIVO DE <i>Helicobacter pylori</i> .....	29
2.1.1.	Material biológico.....	30
2.1.2.	Cultivos.....	30
2.1.1.1.	Cultivos sólidos.....	30
2.1.1.2.	Cultivos líquidos.....	31
2.1.3.	Incubación.....	31
2.1.4.	Cosecha de bacterias.....	32
2.1.5.	Pruebas.....	32
2.1.6.	Curva de crecimiento.....	33
2.2.	DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE INHIBIDORES DE METABOLISMO ENERGÉTICO <i>IN VIVO</i> .....	33

2.3.	OBTENCIÓN DE FRACCIÓN CITOPLÁSMICA Y FRACCIÓN MEMBRANAL DE <i>Helicobacter pylori</i> .....	35
2.4.	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA.....	36
2.5.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ATPASAS.....	36
2.6.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE FOSFATASA.....	37
2.7.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PIROFOSFATASA CITOPLÁSMICA.....	33
2.8.	DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE INHIBIDORES DE LA CADENA RESPIRATORIA EN EL CONSUMO DE OXÍGENO.....	38
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1.	CULTIVOS.....	40
3.2.	CURVAS DE CRECIMIENTO.....	40
3.3.	EFECTO DE LOS INHIBIDORES SOBRE LOS CULTIVOS DE <i>Helicobacter pylori</i> .....	41
3.3.1.	Inhibidores de Cadena Respiratoria.....	42
3.3.2.	Inhibidores de ATPasas.....	43
3.3.3.	Inhibidores de Pirofosfatasas y Fosfatasas.....	45
3.3.4.	Desacoplantes.....	47
3.4.	EFECTO DE LOS INHIBIDORES SOBRE LAS ENZIMAS BLANCO.....	48
3.4.1.	Actividad de ATPasas en membranas y efecto de inhibidores.....	48
3.4.2.	Actividad de Fosfatasas en membranas y efecto de inhibidores.....	54
3.4.3.	Actividad de ATPasa en citoplasma y efecto de inhibidores.....	55
3.4.4.	Actividad de Fosfatasas en la fracción citoplásmica y efecto de inhibidores.....	56
3.4.5.	Actividad de Pirofosfatasa en citoplasma.....	58
3.5.	MEDICIÓN DEL CONSUMO DE OXÍGENO Y EL EFECTO DE INHIBIDORES EN LOS COMPLEJOS I, II Y IV.....	59
3.6.1.	Efecto de los inhibidores de la cadena respiratoria sobre el consumo de oxígeno .....	62
4.	CONCLUSIONES.....	68
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	70

## ABREVIATURAS

Acetil-CoA	acetil-coenzima A
ADN	ácido desoxiribonucleico
ADP	adenosindifosfato
ARN	ácido ribonucleico
ASB	albúmina sérica bovina.
ATP	adenosintrifosfato
CCCP	carbonil cianuro 3-clorofenilhidrazona
DCCD	N,N-diciclohexilcarbodiimida
G+C	guanina y citocina
KCN	cianuro de potasio
MIC	concentración inhibitoria mínima
NADH	dinucleótido de nicotinamida adenina reducido
NADPH	fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina reducido
NaF	fluoruro de sodio
OOR	$\alpha$ -cetoglutarato:aceptor oxidoreductasa
pb	pares de bases
Pi	fosfato inorgánico
PPI	pirofosfato inorgánico
POR	piruvato:flavodoxina oxidoreductasa
PIPES	ácido 2-etanosulfónico N,N'-bis-piperazina
p-NPP	paranitrofenilfosfato
r. p. m.	revoluciones por minuto
Tris	hidroximetil aminometano
g	gramos

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 GENERALIDADES

En 1979, John Warren, un patólogo de Perth, en el oeste de Australia, notó la presencia de bacterias espiraladas parecidas a *Campylobacter*, sobre la mucosa gástrica proveniente de pacientes con gastritis crónica activa. En colaboración con su colega Barry Marshall, lograron aislar y cultivar las bacterias de sus observaciones a partir de muestras de 11 pacientes con gastritis (Warren y Marshall, 1983). Originalmente, el nuevo organismo descubierto fue nombrado *Campylobacter pyloridis*, pero el epíteto fue gramaticalmente incorrecto; así que el nombre fue corregido a *Campylobacter pylori* (Marshall y Goodwin, 1987). A pesar de tener algunas características del género *Campylobacter*, estudios más detallados que incluían diferencias en los ácidos grasos, ultraestructura y morfología, diferencias en la susceptibilidad a antibióticos, además de diferencias en el ARN ribosomal 5S y 16S, sugirieron que estos organismos deberían de estar incluidos en un nuevo género llamado *Helicobacter* y la bacteria finalmente recibió el nombre de *Helicobacter pylori* (Goodwin *et al.*, 1989).

El aislamiento de *H. pylori* ha sido responsable de un nuevo interés en la microbiología gástrica, ya que es reconocida como la causa de una de las infecciones humanas más comunes en el mundo. Se le han asociado diversas enfermedades que pueden ir desde gastritis y úlcera péptica hasta carcinoma y linfoma gástrico (Hazell *et al.*, 1986). No se conoce otro género de bacteria que se establezca en este inhóspito nicho ecológico, por lo que la sobrevivencia de *H. pylori* probablemente se debe a que ha desarrollado diversas características especializadas (Lee *et al.*, 1993).

Hasta el descubrimiento de *H. pylori* se había pensado que la gastritis, úlcera péptica y otras enfermedades relacionadas, eran el resultado de alteraciones en la secreción del ácido del estómago, así como malos hábitos

alimenticios. Los tratamientos que se daban a los pacientes con este tipo de problemas gástricos eran principalmente medicamentos poderosos antsecretorios de ácido, particularmente antagonistas de los receptores H<sub>2</sub>. Estas drogas lograban una mejoría en los malestares que presentaba el paciente, pero no prevenían la frecuente recurrencia de la enfermedad.

Los medicamentos diseñados contra la infección por *H. pylori* han revolucionado la forma en que se trata la gastritis y la úlcera; ahora es posible curar completamente las lesiones causadas por estas enfermedades; además de prevenir la recurrencia de la enfermedad con la completa erradicación de la bacteria del estómago (Hosking *et al.*, 1994; Sung *et al.*, 1995).

Otro punto que hace destacar la importancia de *H. pylori*, es que la cantidad de personas infectadas en el mundo es enorme. Se estima que el 50% de las personas en los países desarrollados y arriba del 90% en los países en vías de desarrollo pueden estar infectadas, haciendo de la infección por *H. pylori* una de las más comunes en el mundo. Por estas razones, a nivel mundial, hay un gran auge en la investigación sobre esta bacteria abarcando los más diversos campos como son: estudios en métodos de diagnóstico, epidemiológicos, vías de transmisión, patología, patogénesis y erradicación (Doolittle, 1997).

## **1.2 CARACTERÍSTICAS DE *Helicobacter pylori***

### **1.2.1 Taxonomía**

La bacteria pertenece al dominio eubacteria (Woese *et al.*, 1990) dentro del grupo de las proteobacterias o bacterias púrpuras no sulfurosas (Stackbrandt *et al.*, 1988), en la subdivisión épsilon y dentro del grupo de los *Helicobacter*. En la subdivisión épsilon se encuentra relacionada con géneros como *Wollinella*, *Campylobacter* y *Thiovulum*, por similitud en análisis de ARN ribosomal principalmente.

### 1.2.2 Morfología

*Helicobacter pylori* es una bacteria gram-negativa, no productora de esporas, de forma bacilar espiralada o curva de 0.5-0.9  $\mu\text{m}$  de ancho y 2-4  $\mu\text{m}$  de largo (Fig. 1). Presenta de 5 a 6 flagelos lofótricos (polares), los cuales tienen 30 nm de diámetro con un filamento de 12-15 nm; además tienen bulbos terminales cuya función no se ha definido (Jones *et al.*, 1985).

Se ha sugerido al examinar biopsias humanas, que la morfología espiral es más aparente cuando la bacteria es móvil, y menos aparente una vez que está adherida al epitelio gástrico (Hazell *et al.*, 1986). Sin embargo, en los cultivos de laboratorio se pueden encontrar ambas formas.

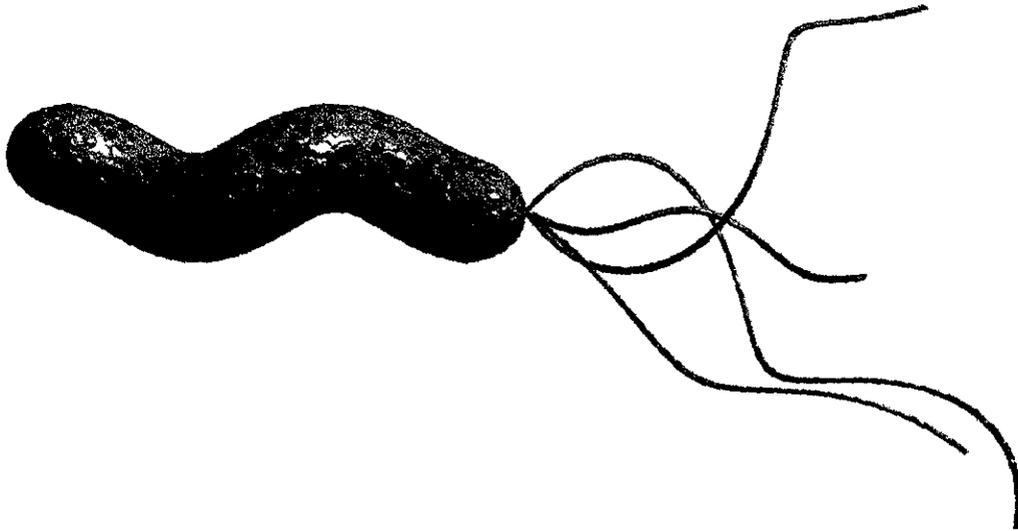


Fig. 1. Esquema de *H. pylori* X10, 000

*H. pylori* es microaerofílica y requiere de condiciones muy especiales para su cultivo en el laboratorio por la atmósfera que necesita y por los requerimientos nutricionales tan complejos que tiene (estas condiciones se detallan en la sección de Materiales y Métodos). Además, es una bacteria de lento crecimiento con un

tiempo de duplicación de 4-8 horas en condiciones óptimas, comparado con *E. coli* que necesita un tiempo de duplicación de 20 min (Morgan *et al.*, 1987).

Otra característica de *H. pylori*, es que los cultivos *in vitro* en su fase terminal tienen cambios morfológicos de la forma característica bacilar espiralada a una forma cocoide (Catrenich y Makin, 1991). El cambio de forma lleva a una pérdida de la capacidad de cultivar a la bacteria y a un incremento de pH de los cultivos. Hay cierta controversia en cuanto a este punto, ya que aunque las bacterias ya no son cultivables, hay autores que afirman que la forma cocoide permanece viable (Bode *et al.*, 1993; Shahamat *et al.*, 1993); por lo que mencionan que este estadio pudiera representar un mecanismo de supervivencia para cuando las condiciones del medio le son hostiles y que pudiera estar involucrado en el contagio de la infección o en la reaparición de la misma (Bode *et al.*, 1993). Sin embargo, no hay evidencia de que las formas cocoides puedan originar nuevamente formas bacilares y *H. pylori* no sería la única bacteria en este caso, de hecho existe el término "viable pero no cultivable" para varias bacterias (Oliver, 1993).

Estudios realizados por Kusters *et al.* (1997), muestran que la inhibición de la síntesis de proteína o de ARN no se afecta la conversión a cocos y que las células cocoides no tienen un potencial de membrana detectable, lo cual indicaría que los cocos están muertos y que el cambio de forma es el resultado de un proceso pasivo de conversión a partir de la forma espiralada. Esta idea es apoyada por la mayor parte de los investigadores en esta área.

### 1.2.3 Hábitat

*H. pylori* es una bacteria que infecta exclusivamente al humano estableciéndose en la capa mucosa que cubre al epitelio gástrico, principalmente en el antro y fondo del estómago, donde se expone a gradientes de pH en un intervalo de 2 a 7 (Chen *et al.*, 1986; Quigley y Turnberg, 1987). A la fecha, el género *Helicobacter* abarca a 26 especies de bacterias que colonizan, como en el

humano, la mucosa gástrica de otros animales y muchas de las especies incluidas son también patógenas.

### 1.3 PATOLOGÍA

La bacteria *H. pylori* presenta varios determinantes patogénicos, que le permiten colonizar y persistir en el estómago, como son: 1) la forma espiralada y la presencia de flagelos, con los que puede penetrar y desplazarse dentro de la viscosa mucosa gástrica, permitiendo al organismo escapar de una exposición prolongada a pHs extremadamente bajos y de ser desalojado por los movimientos peristálticos del estómago (Hazell *et al.*, 1986); 2) el metabolismo microaerofílico, que le permite vivir dentro de este ambiente, donde los niveles de oxígeno son bajos; 3) la producción de una ureasa que hidroliza urea a amonio y dióxido de carbono, elevando el pH, lo cual se requiere para que el organismo pueda llevar a cabo la colonización del estómago (Dunn *et al.*, 1990; Eaton y Krakowka, 1994; Eaton *et al.*, 1991); 4) la producción de catalasa que puede proteger a la bacteria del peróxido de hidrógeno producido por los polimorfonucleares (Hazell *et al.*, 1991); 5) la producción de adhesinas, que le permiten que se adhiera a las células epiteliales gástricas (Evans *et al.*, 1988; Piotrowski *et al.*, 1992) y 6) la síntesis de una citotoxina que induce la formación de vacuolas en células en cultivo, nombrada comúnmente como citotoxina vacuolizante (VacA) (Cover y Blaser, 1992).

El desarrollo de gastritis o úlcera péptica por la infección de *H. pylori* depende de muchos factores que incluyen el genotipo bacteriano (ya que cada cepa varía mucho en sus características), la fisiología, genotipo, los hábitos alimenticios y modo de vida del hospedero; además, la presencia de *H. pylori* puede incrementar la susceptibilidad a otras infecciones (Clemens *et al.*, 1995).

La infección de *H. pylori* persiste por años y posiblemente toda la vida (Blaser, 1993), si no se administra el tratamiento adecuado. Se encuentra

presente en casi la mitad de la población mundial (Cover y Blaser, 1996), aunque la mayoría de las personas infectadas no presenta manifestaciones clínicas de la infección inducida por esta bacteria, por lo que se le asocia a la gastritis crónica activa tipo B. Existe la hipótesis de que la infección se transmite de persona a persona a través de la ingestión de comida o agua contaminada con saliva, heces fecales, contenido gástrico o mascotas (Lee *et al.*, 1991; Vaira *et al.*, 1992).

### **1.3.1 Gastritis**

La gastritis es una inflamación de la mucosa gástrica. La gastritis se clasifica en aguda o crónica con base en el modo evolutivo de aparición. La gastritis aguda es de aparición brusca. Los síntomas son generalmente leves, la sintomatología suele ceder a los pocos días, siempre y cuando se retire el factor causal. Las causas más frecuentes de este tipo de gastritis son el alcohol, fármacos (principalmente antiinflamatorios no esteroideos), tóxicos, químicos, radiaciones y estrés. Histopatológicamente, en la gastritis aguda se observa inflamación de la mucosa gástrica de aparición brusca, con infiltración de neutrófilos, destrucción epitelial más o menos extensa y profunda, edema en la zona que bordea y sobre la que se asienta la lesión. Puede coexistir o no hemorragias subepiteliales puntiformes o extensas. Los endoscopistas hablan de “lesiones agudas de la mucosa gástrica” para referirse a las gastritis hemorrágicas, y a las úlceras y erosiones agudas gastrointestinales ligadas a los factores etiopatogénicos antes mencionados (alcohol, fármacos, etc). Antes se clasificaba a estas gastritis como Tipo I (López, 1993).

En cuanto a las gastritis crónicas, se han clasificado desde diferentes puntos de vista. Desde el punto de vista anatomopatológico, Whitehead y col., en 1972 clasificaron a la gastritis crónica en: a) gastritis crónica superficial, caracterizada por una infiltración de linfocitos y mononucleares a nivel de la lámina propia, con indemnidad glandular (o sea, sin pérdida en el número y la estructura glandular gástrica); y b) gastritis crónica atrófica, en donde además de la infiltración de linfocitos, se encuentra infiltrado de células plasmáticas, con pérdida

de glándulas gástricas, pudiendo llegar estas a desaparecer. En fases muy evolucionadas de la enfermedad, las células normales gástricas pueden ser sustituidas por las células caliciformes, se habla entonces de metaplasia intestinal. Otros autores como Strickland y McKay en 1973, la clasificaron de acuerdo al sitio del estómago en donde se localiza la inflamación y dieron el término de gastritis tipo A a las formas de gastritis que afectan el cuerpo gástrico y se asocian a anemia perniciosa (se piensa que estas tienen una base autoinmune), y gastritis tipo B, a las gastritis que se localizan en el antro gástrico. Correa en 1988 hace una distinción de las formas de gastritis crónicas, denominandolas superficial, difusa antral, difusa corporal y multifocal. Estas y otras clasificaciones de gastritis crónicas no erosivas quedaban englobadas en gastritis tipo II. Las gastritis incluidas en gastritis tipo III son aquellas de carácter específico enfermedad de Menetrier, enfermedad de Crohn, sarcoidosis, etc, etc (López, 1993).

Esta ampliamente aceptado que la gastritis crónica antral es el resultado de una infección por la bacteria *H. pylori*. Este tipo de gastritis que se localiza predominantemente en el antro, se asocia con hipoclorhidria y ulceración péptica, no involucra una respuesta autoinmune (aunque si hay una respuesta inmunológica de parte del hospedero hacia la infección por *H. pylori*), y está clasificada como una gastritis "tipo B" debido al sitio en el que se localiza (López, 1993). Está distribuida mundialmente y la prevalencia aumenta con la edad. La gastritis "B" se caracteriza por una degeneración del epitelio, infiltración de neutrófilos, influxo de linfocitos y plasma, atrofia glandular y metaplasia intestinal. Antes de la asociación de *H. pylori* a la gastritis no se conocía la etiología de la inflamación antral, aunque se sugerían como causas irritantes, como en el caso de la gastritis aguda: el reflujo biliar, algunos medicamentos como los antiinflamatorios no esteroideos, bebidas calientes y comidas muy condimentadas o saladas. A la fecha, no todos los investigadores están convencidos de que todas las gastritis no autoinmunes son causadas por *H. pylori*; lo anterior se debe a que existen distintos patrones de inflamación acompañados de diferentes estados de la enfermedad, ya que como se mencionó anteriormente, muchos individuos

infectados exhiben síntomas de gastritis que pueden derivar a una úlcera gástrica, y aún al desarrollo de un carcinoma, mientras que una gran parte son asintomáticos (Dixon, 1994). La evidencia más fuerte que se tiene para proponer a *H. pylori* como el principal agente causal de la gastritis aguda es el hecho de que cuando voluntarios humanos no infectados y sanos ingirieron un cultivo de la bacteria, desarrollaron los síntomas de gastritis después de algunos días (Marshall *et al.*, 1985). La subsecuente erradicación de la bacteria resultó en la total desaparición de los síntomas de gastritis.

### 1.3.2 Úlcera Gástrica y duodenal

La inflamación crónica del epitelio gástrico, puede llevar a la aparición de lesiones o llagas en el recubrimiento del estómago o del duodeno llamadas úlceras. El 70% de los pacientes con úlcera gástrica son *H. pylori* positivos, mientras que casi el 100% de los pacientes con úlcera duodenal tienen la infección (O'Connor, 1994). Ésto sugiere que 30% de las úlceras gástricas pueden ser causadas por otros agentes, principalmente por fármacos antiinflamatorios no esteroideos. La propuesta de que *H. pylori* podría estar relacionada con el desarrollo de úlcera en el duodeno tuvo un problema inicial, ya que la bacteria solamente coloniza epitelio gástrico (Moss y Calam, 1992). Sin embargo, células del epitelio gástrico pueden estar presentes en el duodeno (metaplasia) (Wyatt *et al.*, 1987). La colonización puede derivar en duodenitis con la predisposición a una úlcera duodenal. La metaplasia gástrica está presente solamente en un 5-30 % de la gente que está infectada por *H. pylori*, pero no hay desarrollo de ulceración del duodeno (Wyatt *et al.*, 1987; Fitzgibbons *et al.*, 1988). Se piensa que *H. pylori* una vez establecida en el duodeno, puede causar la ulceración al inducir una inflamación y por la liberación de una toxina ulcerogénica VacA. También se ha sugerido que las cepas que se establecen en el duodeno son genéticamente diferentes a aquellas que están asociadas a otros trastornos gástricos (Moss y Calam, 1992). Un hecho que comprueba lo anterior, es que el 100% de los pacientes con úlcera duodenal presentan anticuerpos específicos

contra la citotoxina vacuolizante, en comparación con un 61% de los pacientes con *H. pylori* que no tienen úlcera (Cover *et al.*, 1990).

Otra evidencia adicional que liga a *H. pylori* con las úlceras duodenales, es que la erradicación de la bacteria previene una recaída de la enfermedad (O'Connor, 1994), por lo que la terapia actual contempla tanto un tratamiento para la úlcera, así como una total eliminación de la infección.

### **1.3.3 Cáncer Gástrico**

Algunas gastritis crónicas pueden degenerar en atrofia y por último en cáncer gástrico. Teniendo en cuenta que se ha identificado a *H. pylori* como el agente causal de la gastritis crónica, se ha propuesto que la infección bacteriana podría estar involucrada en el desarrollo de cáncer gástrico (Forman *et al.*, 1991). Lo anterior fue posteriormente apoyado al descubrir que la población en alto riesgo para cáncer gástrico tenía una alta prevalencia de la infección con *H. pylori* desde una edad temprana (Fox *et al.*, 1989).

Otro tipo de neoplasia que se encuentra asociada a la infección por *H. pylori* es el linfoma tipo MALT (tejido linfoide asociado a mucosa) de bajo grado, llamado comúnmente maltoma gástrico. Algunos estudios han demostrado que el tratamiento de erradicación en contra *H. pylori* produce una completa remisión de los maltomas de bajo grado, sin embargo, los maltomas que evolucionan a alto grado son resistentes al tratamiento contra este microorganismo (Wotherspoon *et al.*, 1993)

Los mecanismos por los que *H. pylori* causa cáncer son indirectos, ya que no se conoce que la bacteria dañe directamente el ADN de la células. Se ha propuesto que el amonio o sustancias que contienen amoniacaes producidas por la actividad de la ureasa de la bacteria, pueden actuar como agentes cancerígenos, ya que causarían un incremento en la tasa de división celular (Tsuji *et al.*, 1992). Las fosfolipasas de la bacteria podrían dañar la bicapa de fosfolípidos

del epitelio de la membrana celular y degradar la capa protectora de mucus (Goggin *et al.*, 1991; Marshall, 1991), además se ha reportado que las cepas productoras de citotoxina vacuolizante se encuentran en los pacientes con mayor riesgo de desarrollo de cáncer (Fox *et al.*, 1992). Otro factor importante es la respuesta inmunológica del hospedero a *H. pylori*; las citocinas y especies reactivas de oxígeno que se producen durante estos procesos, pueden estimular la proliferación de las células epiteliales y causar daños al ADN de las células que están en la zona infectada (O'Connor, 1992).

#### 1.4 GENÉTICA

A la fecha se ha secuenciado completamente el genoma de dos cepas de *H. pylori*, la J99 y la 26695. Ésto ha permitido visualizar que el tamaño del genoma, el contenido genómico y el orden de los genes de estas dos cepas son muy similares (Alm *et al.*, 1999). Los genomas fueron secuenciados de cromosomas circulares teniendo 1, 643, 831 pb en la cepa J99 y 1, 667, 867 pb en la 26695. El tamaño de los genomas es similar al genoma de *Haemophilus influenzae* y cerca de un tercio del genoma de *E. coli* (Blattner *et al.*, 1997; Fleischmann *et al.*, 1995). El contenido de G+C es de 39%, pero cinco regiones del genoma en la cepa 26695 (nueve en la J99) tienen una composición distinta.

Con el conocimiento del genoma de la bacteria, se ha entrado en una nueva etapa en la investigación de este organismo, ya que es mucha la información que puede ser obtenida a partir de los genes que se encuentran identificados. El tener disponible el genoma de *H. pylori* ha permitido que se tenga un mejor entendimiento de cómo es la fisiología y patología del organismo.

#### 1.5 METABOLISMO

Por muchos años, aspectos biológicamente importantes de *H. pylori* permanecieron sin ocupar un lugar importante para las investigaciones que sobre

esta bacteria se realizaban, siendo el metabolismo uno de ellos. Hasta hace algunos años eran muy contados los reportes que había sobre este rubro, existiendo muchas dudas acerca de los mecanismos básicos que la bacteria tenía para llevar a cabo sus funciones vitales; por ejemplo, la obtención de energía o la respiración celular. Con la liberación del genoma de la bacteria ha aumentado el interés por su metabolismo. Las investigaciones se están dirigiendo a corroborar la información experimental que se tenía previamente, comparando los genes identificados con las actividades enzimáticas presentadas por las bacterias. La mayor parte de la información que se tenía ha coincidido, pero quedan por analizar muchos detalles, ya que las predicciones de las vías metabólicas y funciones que se realizan a partir de las secuencias que se tienen, necesitan forzosamente de la comprobación experimental. Además, algunos datos experimentales que se tienen, sugieren que se tiene que hacer un análisis más detallado del genoma, pues existen funciones para las cuales no se encuentran identificados genes y varios marcos de lectura que no tienen ningún homólogo en las bases de datos disponibles.

En la actualidad se tiene un panorama general de cómo es el metabolismo de *H. pylori*, siendo de vital importancia este conocimiento, pues además de ser información fundamental es de utilidad, ya que con ella se podrían elaborar nuevas terapias contra la bacteria. A continuación se presentará información básica del metabolismo de la bacteria, que está relacionada principalmente con la bioenergética del organismo. En la literatura existen revisiones muy extensas que brindan detalles en cuanto a otros aspectos del metabolismo y fisiología de *H. pylori* (Hazell y Mendz, 1997; Marais *et al.*, 1999; Doig *et al.*, 1999), no siendo la intención de este trabajo llegar a ese punto.

Inicialmente a *H. pylori* se le realizaron una serie de pruebas de laboratorio, con las que se pudo elaborar un esquema básico de características (Megraud *et al.*, 1985; MacNulty y Dent, 1987). Las cepas clínicamente aisladas tenían actividad de oxidasa, catalasa, ureasa, fosfatasa alcalina,  $\gamma$ -glutamil

aminopeptidasa, leucina aminopeptidasa y ADNasa. Estas actividades fueron rápidamente usadas como pruebas para la identificación de *H. pylori* y mostraron que la bacteria era homogénea en cuanto al perfil enzimático que presentaba; no fueron investigados los mecanismos metabólicos de estas pruebas y no permitieron detectar alguna actividad fermentativa u oxidativa en la bacteria para carbohidratos. Algunos grupos empezaron estudios más detallados para dilucidar el metabolismo de este patógeno, aunque es realmente hasta años recientes cuando se despierta un mayor interés en este aspecto como ya indicamos.

### **1.5.1 Metabolismo energético**

#### **1.5.1.1 Glucólisis y gluconeogénesis**

Recién descubierta, se creía que *H. pylori* era incapaz de catabolizar carbohidratos como los otros miembros del grupo de los Campylobacter, aunque estudios posteriores de la fisiología de la bacteria han demostrado que es capaz de metabolizar glucosa, tanto por vía oxidativa como fermentativa, pero siendo un microaerofílico obligado (Burns *et al.*, 1993; Chalk *et al.*, 1994; Mendz *et al.*, 1995; Mendz y Hazell, 1991, 1994; Mendz *et al.*, 1993; Mendz *et al.*, 1994)

La glucosa es transportada a la célula por una permeasa que es específica para D-glucosa y galactosa. Este transporte es dependiente de sodio y no es afectado por los inhibidores que inciden sobre otras permeasas bacterianas (Burns *et al.*, 1993; Mendz, 1995). La glucosa después de entrar a la célula es fosforilada por una glucocinasa, en lugar de una hexocinasa, lo cual puede ser una razón de la limitada capacidad de utilización de carbohidratos por la bacteria. Además en *H. pylori* no se han identificado los genes del metabolismo de carbohidratos que estarían involucrados en la degradación de azúcares complejos a azúcares simples (Menz y Hazell, 1993).

La utilización de la glucosa muestra características bifásicas, con un inicio lento seguido de un catabolismo más rápido, cuyo consumo depende de las

condiciones de cultivo de la bacteria, lo cual sugiere que *H. pylori* no utiliza preferentemente esta molécula como fuente de energía, pero que es usada cuando otras fuentes de energía se han agotado (Mendz y Hazell, 1994; Mendz *et al.*, 1993).

Una vez que la glucosa se encuentra en el interior de la célula, en forma de glucosa-6-fosfato, puede tomar los siguientes caminos: la vía de las pentosas fosfato, la vía de Entner Doudoroff y la vía de la glucólisis. Algunos autores no detectaron la presencia de todas las enzimas de la glucólisis en *H. pylori* (Mendz *et al.* 1994; Chalk *et al.*, 1994), pero otros reportan la actividad, tanto de la glucólisis como de la gluconeogénesis (Hoffman *et al.*, 1996). Las dos vías tienen siete pasos reversibles comunes y se distinguen por tres pasos opuestos irreversibles (Fig. 2). Una actividad enzimática que no se ha observado es la de fosfoglicerato mutasa, aunque un gene muy parecido (44.6 % de similitud) se ha identificado. En la actualidad se han identificado los genes homólogos para cada una de las enzimas que llevan a cabo los pasos reversibles en la glucólisis y la gluconeogénesis, además de dos pasos no reversibles de la gluconeogénesis, el de la fructosa-1,6-bifosfatasa y de la fosfoenol piruvato sintasa. No se han identificado los genes de las enzimas glucolíticas de la fosfofructo cinasa y piruvato cinasa (Tomb *et al.*, 1997).

Tomando en cuenta que se han encontrado dos de los genes que codifican a enzimas de pasos irreversibles de la gluconeogénesis y no se han identificado dos de los genes de los pasos irreversibles de la glucólisis se ha sugerido que *H. pylori* utiliza las enzimas de las vías glucolítica/gluconeogénica para biosíntesis anabólica mas que para la obtención catabólica de energía. La evidencia experimental apoya esto (Hoffman *et al.*, 1996).

### 1.5.1.2 Entner-Doudoroff y vía de las pentosas

La glucosa-6-fosfato puede ser utilizada alternativamente por la vía de Entner-Doudoroff (Chalk *et al.*, 1994; Mendz *et al.*, 1994) (Fig. 2). La diferencia más importante con la vía de la glucólisis es que, aunque genera sólo una molécula de ATP (en la glucólisis se generan dos), la molécula de piruvato se sintetiza en menos pasos, lo que la hace más eficaz para este fin. Esta vía es inducible en *E. coli* y raramente empleada por las cepas silvestres, sin embargo, en *H. pylori* parece ser constitutiva. Aunque la vía de Entner-Doudoroff tiene un potencial de generación de energía menor en comparación al de la glucólisis, ofrece la posibilidad de llevar a cabo el metabolismo de ácidos aldónicos. Estos ácidos orgánicos, como el gluconato, pueden representar una fuente importante de nutrientes cuando la bacteria se encuentra en el estómago (Fraenkel y Levisohu, 1967).

Menz y Hazell (1991) aportaron las primeras evidencias acerca de la existencia de la vía de las pentosas en *H. pylori*. Esta vía proporciona NADPH y NADH para la síntesis de moléculas en las que se necesita poder reductor y de carbohidratos C<sub>5</sub> fosforilados, esenciales para la síntesis de nucleótidos (Menz y Hazell, 1991; Mendz *et al.*, 1993; Mendz *et al.*, 1994; Mendz *et al.*, 1995). Todos los genes involucrados en la vía han sido identificados en el genoma, excepto el gene de la fosfogluconato-6-deshidrogenasa, una enzima clave, lo cual sugiere la existencia que una proteína con una función similar (Marais *et al.*, 1999).

La vía de Entner Doudoroff podría ser utilizada como un mecanismo más eficiente que la glucólisis para la producción de piruvato para fines biosintéticos. Existe controversia en que la glucólisis sea la principal vía para llevar a cabo la degradación de la glucosa, considerando la coexistencia de esta vía, también llamada Embden-Mayerhof-Parnas y la vía alterna de Entner-Doudoroff, algo que es inusual en el metabolismo bacteriano, lo que hace necesario más investigaciones al respecto para dilucidar este punto.

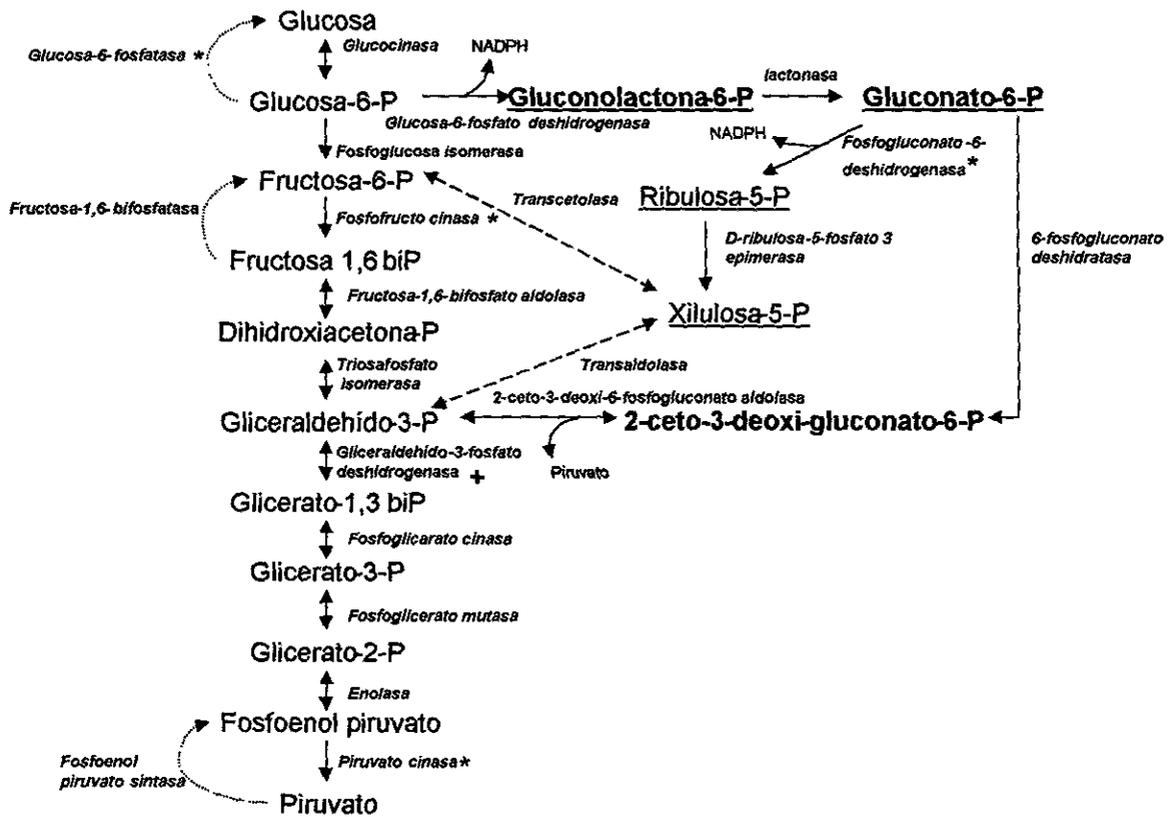


Fig. 2. Glucólisis, gluconeogénesis, vías de las pentosas fosfato abreviada (subrayado) y Entner-Doudoroff (negritas). La gluconeogénesis se presenta con los mismos pasos que la glucólisis pero señalando los pasos unidireccionales (""). Los asteriscos denotan las enzimas para las que no se ha identificado ningún gen. El + denota la actividad que no se ha identificado pero que tiene un gen identificado (modificado de Marais *et al.*, 1999).

### 1.5.1.3 Metabolismo del piruvato

El piruvato es un producto terminal tanto de la vía glucolítica, como de la vía de Entner Doudoroff y es un importante intermediario en la fisiología de la bacteria, ya que puede ser convertido a Acetil-CoA y entrar al ciclo de Krebs, o bien, ser usado como sustrato en la vía fermentativa. Por la vía anaeróbica, Chalk *et al.* (1994) muestran que el piruvato es metabolizado para producir lactato, etanol y acetato, mientras que aeróbicamente el principal producto acumulado es acetato. Otros estudios hechos por Mendz *et al.* (1994) demuestran que células de *H. pylori*, incubadas microaerofílicamente con piruvato producen lactato, acetato, formato, succinato y alanina. La formación de succinato sugiere que *H. pylori* es capaz de utilizar al piruvato como un precursor del ciclo de Krebs hacia la parte reductiva. Por otro lado, la síntesis de alanina muestra que el piruvato puede tener

un valor muy importante para la biosíntesis de moléculas. Los estudios realizados por Mendz *et al.* (1994) sobre el metabolismo aeróbico de *H. pylori* revelan la producción de acetato, con pequeñas cantidades de lactato, etanol y alanina, además de muchos otros productos no identificables.

El piruvato puede ser descarboxilado para formar acetil-CoA mediante la acción de la piruvato:flavodoxina oxidoreductasa (POR), en vez de una piruvato deshidrogenasa aeróbica (Hughes, 1995) y entrar al ciclo de Krebs (Fig. 3). La POR es una enzima característica del metabolismo anaeróbico y se piensa que la flavodoxina es el aceptor de electrones *in vivo* de esta enzima.

#### 1.5.1.4 Ciclo de Krebs

La función principal del ciclo de Krebs es la oxidación de acetil-CoA, para la producción de dióxido de carbono y la generación de nucleótidos reducidos, que son utilizados posteriormente para la biosíntesis de moléculas o para la producción de energía a través de la cadena respiratoria acoplada a la fosforilación oxidativa. El ciclo también provee de precursores para la biosíntesis como son: oxaloacetato, succinil CoA y  $\alpha$ -cetoglutarato.

En *H. pylori* se ha reportado la ausencia del complejo de la  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa (Hoffman *et al.*, 1996) y de la succinil-CoA sintetasa (Pitson *et al.*, 1999). Sin embargo se reportó la existencia de una  $\alpha$ -cetoglutarato:aceptor oxidoreductasa (OOR), la cual cataliza la conversión directa de  $\alpha$ -cetoglutarato a succinato.

Existe evidencia de que en *H. pylori*, el ciclo de Krebs está bifurcado, con el brazo de los ácidos dicarboxílicos trabajando en reversa (reductivamente) de oxalacetato a succinato, muy similar al que tiene *E. coli*; mientras que el brazo de los ácidos tricarboxílicos procede oxidativamente de oxaloacetato a  $\alpha$ -cetoglutarato (Pitson *et al.*, 1999) .

Una característica interesante que apoya el concepto de la rama reductiva del ciclo es la identificación de una fumarato reductasa que produce succinato. Por esta vía metabólica el fumarato podría actuar como un aceptor terminal de electrones en la respiración anaeróbica (Mendz et al., 1995).

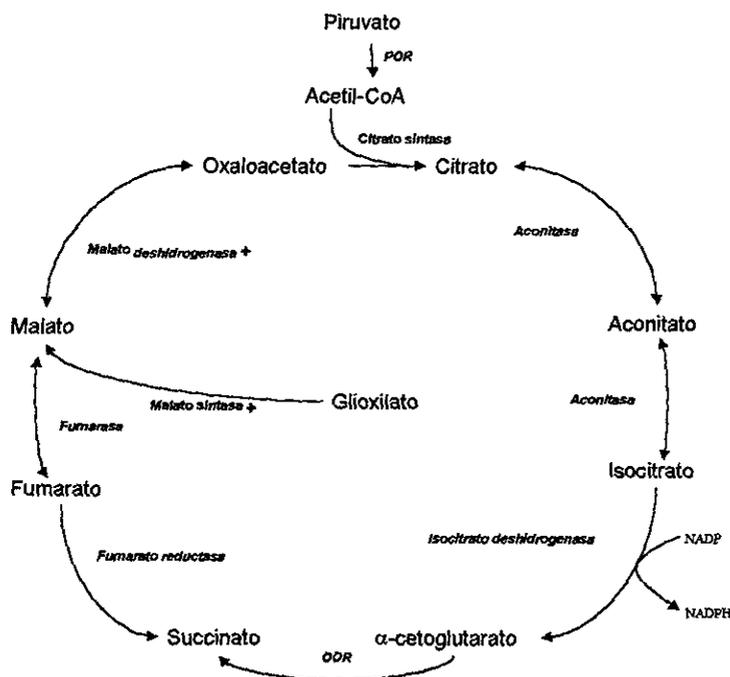


Fig. 3. El ciclo de Krebs de la bacteria *H. pylori*. En el esquema se observa que sería un ciclo incompleto, con el lado de los ácidos dicarboxílicos corriendo reductivamente desde oxaloacetato a succinato y el de los ácidos tricarboxílicos trabajando oxidativamente desde oxalaloacetato hasta  $\alpha$ -cetoglutarato. Los signos + denotan aquellas enzimas cuya actividad se ha observado pero no se ha identificado el gen.

La fumarato reductasa en *H. pylori* es una enzima constitutiva y ligada a la membrana plasmática; esta enzima no está presente en los humanos por lo que se ha propuesto como un blanco terapéutico potencial contra *H. pylori*.

La importancia de la fumarato reductasa en la respiración depende de las condiciones ambientales y su papel aún está en discusión. En condiciones microaerofílicas la enzima no es esencial, lo que explica que se necesiten concentraciones muy altas de inhibidor específico de la enzima para matar a *H. pylori* o inhibir su crecimiento (Mendz et al., 1995); en estas condiciones la respiración oxigénica se utilizaría preferentemente. En ausencia de  $O_2$ , la fumarato reductasa ahora sí sería esencial. En presencia de  $O_2$  y fumarato, *H. pylori* debe

preferir el fumarato como aceptor de electrones terminal, que llevar a cabo respiración oxigénica (Holt *et al.*, 1994).

No se ha encontrado el gen para la succinato deshidrogenasa o algún homólogo, aunque se ha observado tal actividad (Doig y Trust, 1994; Hoffman *et al.*, 1996). Esta discrepancia podría deberse a que la fumarato reductasa puede convertir succinato a fumarato *in vitro*.

La actividad de la malato deshidrogenasa y la malato sintasa ha sido detectada (Pitson *et al.*, 1999), sin embargo los genes correspondientes no se han identificado, sugiriendo que debe haber enzimas homólogas (Fig.3).

La presencia de enzimas como OOR y la POR, que son altamente sensibles a O<sub>2</sub>, y la actividad de la fumarato reductasa en la respiración anaerobia apoyan el concepto de que *H. pylori* sea una bacteria microaerofílica.

#### **1.5.1.5 Catabolismo de lípidos**

La degradación de lípidos también puede ser una fuente importante de carbono, fosfato y energía para *H. pylori* (Ottlecz *et al.*, 1993); sin embargo, hay poca información disponible acerca de su metabolismo general. Se ha demostrado la existencia de las fosfolipasas A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> y C. Existe también acetil-CoA carboxilasa, enzima para la biosíntesis de ácidos grasos (Burns *et al.*, 1995).

Hasta la fecha se han identificado todos los genes necesarios para llevar a cabo el catabolismo de ácidos grasos de cadena corta o C<sub>2</sub>, así como el de un transportador de los mismos, pero no se han identificado los genes involucrados en la β-oxidación de ácidos grasos de cadena larga. Acorde con estos resultados, se ha observado que *H. pylori* puede utilizar acetoacetato y no acetobutirato como una fuente de catabolitos de los ácidos grasos de cadena corta (Corthesy-Theulaz *et al.*, 1997).

#### 1.5.1.6 Metabolismo de aminoácidos

El desarrollo de un medio definido para el cultivo de *H. pylori*, así como la posterior determinación del requerimiento de aminoácidos fueron pasos importantes en el estudio de su metabolismo (Nedenskov, 1994; Reynolds y Penn, 1994). Todas las cepas probadas requieren arginina, histidina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina y valina y solo algunas requieren alanina y serina. Las necesidades para arginina e histidina se pueden explicar debido a la ausencia en el genoma de las correspondientes enzimas de las vías biosintéticas para estos aminoácidos, a excepción del gen para la glutamato deshidrogenasa que cataliza la síntesis de glutamato a partir de  $\alpha$ -cetoglutarato (Glansdorff; Reitzer; Winkler; 1996).

Los aminoácidos son fuente importante de carbono, nitrógeno y energía (Reynolds y Penn, 1994; Mendz y Hazell, 1995). El aspartato es un aminoácido importante ya que es el paso clave para la biosíntesis de muchos otros aminoácidos; es formado a partir del oxaloacetato por transaminación del glutamato como donador del amino (Reitzer, 1996). La síntesis de metionina, treonina y de isoleucina se encuentra igualmente ligada al aspartato (Greene; Patte, 1996).

*H. pylori* es capaz de crecer en un medio libre de glucosa, pero suplementado con arginina, aspartato, asparagina, glutamato, glutamina y serina (Menz y Hazell, 1995). Los principales productos observados del catabolismo de aminoácidos fueron acetato, formato, succinato y lactato, por lo que los aminoácidos pueden ser utilizados como nutrientes básicos; además, se ha visto que en presencia de glucosa y aminoácidos, *H. pylori* no utiliza la glucosa hasta que los demás metabolitos son utilizados (Menz *et al.*, 1994). La comparación de los datos experimentales y moleculares del genoma muestra una buena correlación y revelan que el catabolismo de los aminoácidos se lleva a cabo prácticamente por las vías convencionales.

Por otro lado, la desaminación de los aminoácidos conduce a un aumento del nitrógeno intracelular, que se resuelve por la acción acoplada de la ureasa y el ciclo de la urea, actuando como una "bomba" de nitrógeno hacia el espacio extracelular para mantener el balance nitrogenado (Moblely *et al.*, 1995). Además, la urea podría funcionar como una fuente de nitrógeno para ciertas vías biosintéticas, como lo demuestran los experimentos hechos por Chalk *et al.* (1994) en el que incubando urea y piruvato, se obtiene como producto a la alanina.

### 1.5.2 Cadena respiratoria

Muchos sustratos pueden ser oxidados por la célula para generar energía metabólica. El objetivo principal de la respiración es utilizar poder reductor para generar fuerza protonmotriz, la cual será utilizada para sintetizar ATP. Las cadenas respiratorias bacterianas tienen un carácter modular, que comprenden complejos de deshidrogenasas, una poza de quinonas, citocromos y oxidoreductasas terminales (Genis y Stewart, 1996). Los aceptores terminales de la cadena pueden ser el oxígeno (respiración aeróbica) u otros sustratos (respiración anaeróbica). En *H. pylori* podemos encontrar la maquinaria celular necesaria para llevar a cabo ambos tipos de respiración. Además de la generación de fuerza protonmotriz, las cadenas respiratorias desempeñan un papel en el mantenimiento del balance redox intracelular (regeneración de NAD<sup>+</sup>) y en el control de la cantidad de dióxígeno.

En cuanto a los componentes de la cadena respiratoria de *H. pylori* se han identificado diversos tipos de deshidrogenasas. Los experimentos con membranas mostraron que hay oxidación de NADH, NADPH, D-lactato y succinato. Con el sustrato que se observa una mayor oxidación es con NADPH (Chang *et al.*, 1995). Los genes para una NADH-quinona oxidoreductasa se encuentran en un operón codificando para un complejo NDH-1. En las bacterias este complejo se encuentra constituido por 14 proteínas y sus genes están arreglados con el mismo orden siempre, aunque puede faltar alguno (Yagi *et al.*, 1998). El complejo NDH-1

de *H. pylori* presenta 12 subunidades, pero carece de los genes que codifican para 2 subunidades del complejo, involucradas en la unión y la oxidación de NADH. Estos genes no se encuentran en ninguna otra parte del genoma y su lugar lo ocupan dos genes que no tienen ninguna secuencia de unión para el NADH, para el flavin mononucleótido o para un centro FeS, lo que sugiere que en realidad, el complejo NDH-1 en *H. pylori* es una quinona reductasa y una bomba de protones, y no una NADH deshidrogenasa (Finel, 1998). En el genoma de *H. pylori* no se encuentran los genes que codifican para el complejo NDH-2, otro tipo de NADH quinol reductasa que sirve, en otras bacterias, como punto de entrada en la cadena respiratoria para los electrones que son donados a partir del NADH, pero que no es un sitio de acoplamiento, por lo que no transloca protones a través de la membrana (Gennis, y Stewart, 1996). Se ha visto que el NADPH es un sustrato oxidable en preparaciones de membranas (Chang *et al.*, 1995) y sobrenadantes bacterianos (Smith y Edwards, 1997), por lo que en un principio se pensó que el NADPH pudiera ser el sustrato para el complejo NDH-1, pero los estudios hechos por Finel (1998) muestran que es improbable.

Las otras deshidrogenasas involucradas en el transporte de electrones que el análisis del genoma de *H. pylori* revela, incluyen a la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, la D-lactato deshidrogenasa y un complejo hidrogenasa (Tomb *et al.*, 1997). La actividad de la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa sirve para donar electrones, convirtiendo el gliceraldehido-3-fosfato en dihidroxiacetona fosfato. Se han identificado posiblemente 2 de estas enzimas en *H. pylori*, una de las cuales estaría involucrada en la respiración aeróbica y otra en la respiración anaeróbica. La D-lactato deshidrogenasa también puede servir como donadora de electrones (Marais *et al.*, 1999). El complejo de hidrogenasa que se propone tiene *H. pylori* es del tipo NiFe, que puede actuar como un donador de electrones a la quinona en la cadena respiratoria, si el hidrógeno molecular se encuentra presente (Fig. 4).

En cuanto a las quinonas, se ha identificado que el principal componente en las membranas es la menaquinona tipo 6, trazas del tipo 4 y la ausencia de ubiquinona (Marcelli *et al.*, 1996). Estos tipos de menaquinonas son característicos en las bacterias con metabolismo anaerobio. Lo anterior nos habla nuevamente del metabolismo microaerofílico de *H. pylori*.

Los análisis espectroscópicos revelan que en *H. pylori* están presentes citocromos tipo b y c, pero no hay evidencia del tipo a ó d (Marcelli *et al.*, 1996). El citocromo c debe estar localizado en el periplasma y es el responsable de la oxidación de ascorbato en extractos de células (Odum y Andersen, 1995).

Los datos bioquímicos y genéticos sugirieron la presencia de un complejo bc<sub>1</sub> y una citocromo c oxidasa del tipo cbb<sub>3</sub> (Clayton *et al.*, 1995; Marcelli *et al.*, 1996; Nagata *et al.*, 1996; Tomb *et al.*, 1997). Este tipo de oxidasa tiene una alta afinidad por oxígeno, lo que permitiría una respiración aeróbica eficiente en un ambiente microaerofílico (García-Horsman *et al.*, 1995), con una Km de 0.4 μM por O<sub>2</sub> y una I<sub>50</sub> por KCN de 2.6 μM (Tsukita *et al.*, 1999).

Sin embargo, existen datos que sugieren la presencia de más de un tipo de oxidasas terminales en *H. pylori*. La fumarato reductasa, que como se describió anteriormente puede utilizar fumarato como aceptor final de electrones y la N-óxido reductasa cuyos genes se han identificado y que puede usar óxidos de nitrógeno (dimetilsulfóxido y trimetil amina-N-óxido) como aceptores terminales de electrones. Estas oxidasas terminales serían responsables de la respiración anaeróbica en *H. pylori* (Doig *et al.*, 1999). Se ha reportado que la hidrogenasa y la fumarato reductasa podrían ser los componentes de una cadena respiratoria anaerobia en *H. pylori*, que utilizaría fumarato como el aceptor terminal de electrones (Marais *et al.*, 1999).

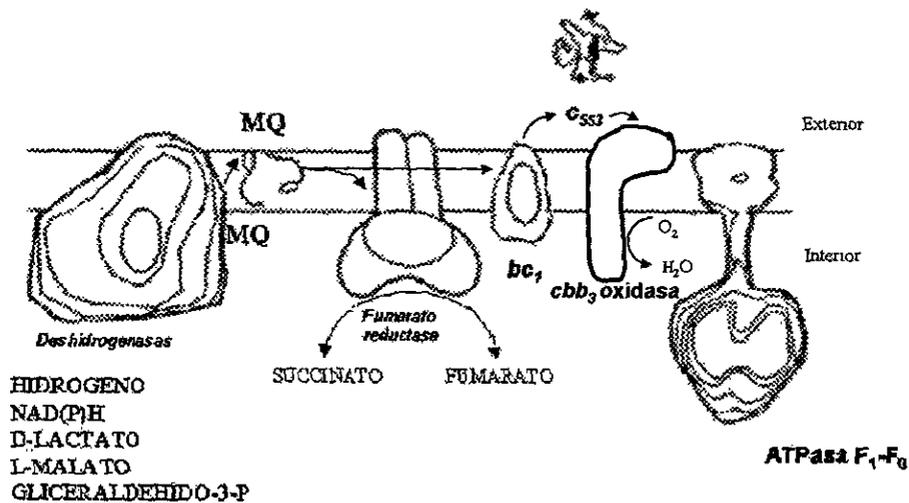


Fig. 4. Esquema de la membrana de *H. pylori* que muestra a cadena respiratoria y la ATPasa. MQ, menaquinona 6; bc<sub>1</sub>, citocromo c quinol oxidasa; cbb<sub>3</sub>, citocromo c oxidasa.

Como ya se mencionó (pag. 16 en Ciclo de Krebs), no se han encontrado en el genoma genes homólogos que codifiquen para la succinato deshidrogenasa, aunque tal actividad se ha observado en extractos de *H. pylori* (Doig y Trust, 1994; Hoffman *et al.*, 1996).

### 1.5.3 ATPasas

#### 1.5.3.1 ATPasa F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>

Las ATPasas F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub> son enzimas compuestas de múltiples subunidades y se encuentran en las membranas citoplásmicas de las bacterias. Su función principal es utilizar el gradiente electroquímico de H<sup>+</sup> generado por la respiración para la síntesis de ATP, aunque al ser reversibles pueden catalizar la hidrólisis de este compuesto energético para la generación de un gradiente electroquímico en sentido inverso. Estas enzimas están muy conservadas en la naturaleza y tienen básicamente la misma estructura a pesar de que se encuentren en diferentes

organismos. El sector  $F_1$ , que es la parte catalítica, consta de las subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ , y puede ser solubilizada conservando la actividad hidrolítica (ATPasa). El sector membranal o  $F_0$ , se compone de las subunidades a, b, y c, y funciona como un canal que transloca protones a través de la membrana (Fig. 5). De las ocho subunidades, la  $\beta$  es la más conservada, con un 40 % de identidad entre las secuencias bacterianas (Futai *et al.*, 1989).

*H. pylori* posee una ATPasa  $F_1$ - $F_0$  que es la encargada de sintetizar al ATP de una manera acoplada al gradiente electroquímico de protones generado por la respiración celular (Matin *et al.*, 1996; McGowan *et al.*, 1997). En *E. coli* todo el complejo enzimático está codificado por un operón, el *atp* operon. En *H. pylori* las 5 subunidades del complejo  $F_1$  y la subunidad b del  $F_0$  se encuentran contiguas en el cromosoma. Las otras dos subunidades del complejo  $F_0$ , están en otras regiones del cromosoma. *H. pylori* tiene una subunidad adicional que es homóloga a la b', la cual es una forma divergente y duplicada de la subunidad b, que se encuentra en plantas y bacterias fotosintéticas. El gene que codifica para esta subunidad está localizado al final del grupo de genes de la ATP sintasa.

Debido al nicho ecológico en que se desarrolla *H. pylori*, se ha destacado que la ATPasa  $F_1$ - $F_0$  tiene un papel muy importante en la tolerancia a la acidez. La estrategia básica sería mantener la fuerza protonmotriz ajustando la diferencia de potencial en la membrana para compensar el gradiente de pH (Meyer-Rosberg, *et al.*, 1996). Se ha visto que la bacteria posee mecanismos análogos a los de otras bacterias que son ácidotolerantes y que habitan el tracto gastrointestinal como *Salmonella typhimurium* y *E. coli*. Entre estos mecanismos estaría la inducción de síntesis de nuevas proteínas con la exposición a un estrés moderado a ácido (pH 6) que le permitirían soportar cambios subsecuentes en el pH  $\leq 4.5$ , lo cual requeriría la actividad de la ATPasa  $F_1$ - $F_0$ . Otro ejemplo serían los estreptococos orales que muestran varios niveles de ácidotolerancia, que parecen depender de la actividad transportadora de protones de la ATPasa  $F_1$ - $F_0$  del interior al exterior de la célula (Kobayashi y Unemoto, 1986).

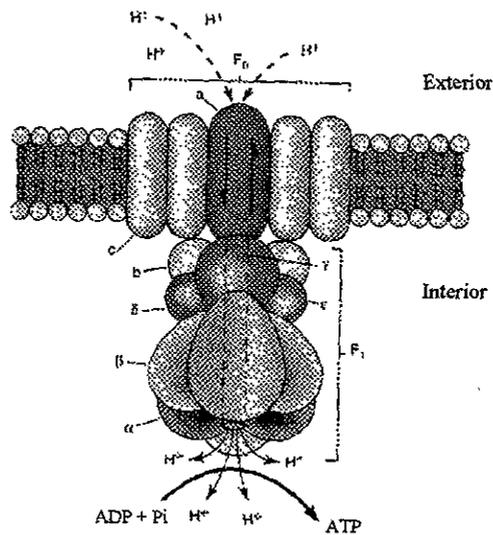


Fig. 5. Esquema de la ATPasa  $F_1-F_0$  bacteriana.

#### 1.5.3.4 ATPasa tipo P

Las ATPasa tipo P se encuentran distribuidas ampliamente dentro de los organismos vivos. Constan usualmente de una subunidad, son exclusivamente hidrolíticas y se caracterizan por la presencia de un intermediario fosforilado. El sitio de fosforilación es una región altamente conservada, en donde se encuentra un residuo de aspartato responsable de formar el intermediario  $\beta$  aspartil fosfato durante el ciclo catalítico (Glynn y Karlsh, 1990). El resto de la secuencia de aminoácidos de estas ATPasas divergen ampliamente, lo que refleja en parte su diversidad funcional en el transporte de iones. Los análisis de hidrofobicidad muestran que pueden ser divididas en dos grupos: las de 8 y las de 10 hélices transmembranales.

Se han encontrado en *H. pylori* tres ATPasas translocadoras de  $H^+$  tipo P. Se han clonado y caracterizado parcialmente dos de ellas (Ge *et al.*, 1995; Melchers *et al.*, 1996). Una está relacionada con el transporte de cobre, otra que participa en el suministro de níquel, un componente esencial en la actividad de la

ureasa y relacionada con el transporte de cadmio (Melchers *et al.*, 1996) y la tercera no esta bien caracterizada, pero por su secuencia parece estar relacionada con transportadores de cationes divalentes (Tomb *et al.*, 1997). Se pensaba que estas ATPasas tipo P podrían estar relacionadas con el bombeo de  $H^+$  hacia el exterior de la célula (Melchers *et al.*, 1996), pero estudios posteriores han corroborado que la función de estas ATPasas tipo P en *H. pylori* está más estrechamente relacionada con el transporte de cationes divalentes y la eliminación de metales tóxicos (Marais *et al.*, 1999).

#### 1.5.4 Pirofosfato y polifosfatos

La fuente principal de energía de *H. pylori*, como en los demás sistemas vivos, es el ATP, pero existen otras moléculas de alta energía, como el PPI y los polifosfatos (Kornberg, 1995; Lathi, 1983), que también pueden ser utilizadas como fuente de energía y a la fecha no se ha evaluado su papel.

La pirofosfatasa es la enzima encargada de hidrolizar el pirofosfato inorgánico (PPI) a fósforo inorgánico (Pi). Existen dos tipos de pirofosfatasas: las citoplásmicas y las membranales. Las pirofosfatasas citoplásmicas se encuentran en prácticamente todos los organismos y tienen la función de hidrolizar el PPI que se produce en varias reacciones biosintéticas como son la síntesis de proteína, ARN y ADN por mencionar sólo algunas de ellas, dándole direccionalidad a estas vías. Las pirofosfatasas membranales se encuentran en algunas bacterias fotosintéticas, en la membrana interna mitocondrial y en el tonoplasto de las plantas. Las pirofosfatasas membranales llevan a cabo la misma función de hidrólisis de pirofosfato, pero acoplada al transporte de  $H^+$ , y en el caso de las bacterianas pueden llevar a cabo la síntesis de pirofosfato.

La presencia de polifosfatos ha sido reportada para numerosas bacterias (Harold, 1963; Kjedstad *et al.*, 1991) y para *H. pylori* en tres diferentes partes de la célula (Bode *et al.*, 1993). La acumulación más importante que ocurre en *H. pylori*

es la de gránulos de polifosfatos intracitoplásmicos, que pueden representar un reservorio para el almacenamiento energético y de fósforo, y una fuente alternativa de energía cuando el ATP está en niveles bajos (Dawnes y Senior, 1973). Otros puntos en los que hay acumulación de polifosfatos es cerca de la base del flagelo y en pequeñas agregaciones en asociación con la membrana celular; el depósito cercano al flagelo podría estar relacionado con la fuente de energía para la movilidad en la bacteria (Berg y Tuner, 1979), los que están cerca de la membrana podrían estar relacionados con el mantenimiento de la integridad de la membrana citoplásmica (Storko, 1989).

Sin embargo, la importancia y metabolismo de estas moléculas de alta energía en *H. pylori* no se ha estudiado a la fecha.

## **1.6 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

*H. pylori* representa un problema de salud para el humano que en los últimos años ha tomando mayor relevancia. Como se mencionó antes, la infección causada por esta bacteria está distribuida ampliamente en la población general, pasando muchas veces sin la atención médica adecuada, pudiendo provocar serios daños a la salud del individuo que la padece, por lo que el tratamiento es uno de los tópicos principales sobre esta bacteria. Cabe destacar la gran atención que se le ha prestado en los últimos años al diseño de nuevas terapias para su erradicación, habiendo un gran campo de investigación en este rubro, ya que además se ha observado que la resistencia de la bacteria a los medicamentos que tradicionalmente se emplean para su tratamiento va en aumento. Por esta razón y por ser el estudio del metabolismo de la bacteria un campo de gran interés biológico por sí mismo, la evaluación de la respuesta de *H. pylori* a inhibidores clásicos, tanto de cadena respiratoria, ATPasas y pirofosfatasas podría ser, en el futuro, de vital importancia en la implementación de nuevas estrategias en la creación de nuevos fármacos para el tratamiento de la infección por esta bacteria.

A la fecha se han hecho diferentes estudios sobre el efecto terapéutico de fármacos en el crecimiento de *Helicobacter pylori* y sobre cuál es el blanco de estos compuestos en la bacteria. Hay pocos experimentos sobre el efecto de inhibidores específicos para las ATPasas tipo P y la ATPasa F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>, la cadena respiratoria y la pirofosfatasa, sobre el crecimiento de la bacteria *in vivo* o en la inhibición específica de la enzima *in vitro* y de los que se tiene referencia, muestran resultados contradictorios (Belli y Fryklund, 1995; Beil *et al.*, 1995). Por lo tanto, la evaluación de diversos tipos de inhibidores de las ATPasas tipo P y F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>, así como de la cadena respiratoria en el crecimiento de *H. pylori*, permitirá profundizar en la importancia del papel que están jugando estas proteínas en el metabolismo energético de la bacteria.

## **1.7 OBJETIVOS**

### **1.7.1 Objetivo general**

- Evaluar el efecto de diversos inhibidores del metabolismo energético en *H. pylori*.

### **1.7.2 Objetivos particulares**

- Cuantificar el efecto de inhibidores de la cadena respiratoria, ATPasas y pirofosfatasa en el cultivo bacteriano de *H. pylori*.
- Cuantificar el efecto de inhibidores de la cadena respiratoria, ATPasas y pirofosfatasa en la actividad de sus enzimas blanco *in vitro*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. GENERALIDADES DEL CULTIVO DE *Helicobacter pylori*

*H. pylori* presenta características que hacen de su cultivo un trabajo laborioso. En primer lugar, es una bacteria de crecimiento lento, necesita de una atmósfera microaerófila con un contenido de 10% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 85% de N<sub>2</sub> y no se tienen definidas completamente sus necesidades nutricionales. Se ha cultivado tradicionalmente en medios complejos, que contienen suero, sangre u otros derivados sanguíneos, que no tienen una composición exacta y que dificultan el trabajo con la bacteria (Olivieri *et al.*, 1993; Nedenskov, 1994). Para solucionar este problema se ha intentado sustituir a la sangre y sus derivados adicionando al medio de cultivo almidón, carbón y catalasa (Olivieri, 1993). Sin embargo, no se obtiene el mismo rendimiento como cuando se utilizan derivados sanguíneos. Una alternativa que se ha utilizado con buen resultado es el adicionar al medio ciclodextrinas (Olivieri, 1993), que son moléculas que se producen a partir del almidón, por la acción de la enzima ciclodextrina glicosiltransferasa. Se componen de 6, 7 u 8 unidades de D-glucopiranosido, lo que les da el prefijo de ciclodextrinas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , respectivamente. Las unidades de D-glucopiranosidos se encuentran unidas por enlaces glicosídicos  $\alpha$ -1-4. Tienen una conformación en forma de toroide (la parte inferior de un cono), con una parte abierta grande y una pequeña, en donde se encuentran grupos hidroxilos secundarios y primarios respectivamente. El interior del toroide es hidrofóbico como resultado de un ambiente rico en electrones proporcionado, en gran parte, por los átomos de oxígeno glicosídico. Estos compuestos pueden formar complejos estables en su cavidad apolar (Bar, 1989). El uso de la ciclodextrinas en microbiología y en procesos biotecnológicos se ha incrementado, ya que con la formación de complejos pueden incrementar la solubilidad de ciertos compuestos necesarios, como pueden ser substratos, y disminuye la concentración de sustancias perjudiciales como inhibidores o toxinas (Szejtli, 1988). En medios de cultivos en los que se han utilizado ciclodextrinas se ha observado un incremento en el

crecimiento celular de microorganismos (Imaizumi *et al.*, 1983). Sin embargo, en el cultivo de *H. pylori* no se ha generalizado su uso.

### **2.1.1. Material biológico**

La cepa utilizada en el trabajo fue la 8823, que produce citotoxina VacA.

### **2.1.2 Cultivos**

Para la realización del trabajo se cultivó a la bacteria en medios sólidos y líquidos, a continuación se describen las características de cada uno de ellos:

#### **2.1.2.1 Cultivos sólidos**

##### Placas de agar-sangre

El medio de cultivo empleado es agar Casman (Difco) 43 g/l de agua desionizada o destilada, con sangre desfibrinada de carnero al 5% (Microlab), adicionado con 10 µg/ml de vancomicina. Tanto la vancomicina como la sangre se deben añadir cuando el medio alcance una temperatura alrededor de los 50°C, ya que la sangre se puede aglutinar y los antibióticos pierden su actividad si se someten a altas temperaturas. Se dejan las placas en una incubadora a 37°C por 24 h para eliminar las cajas que pudieran tener contaminaciones. Posteriormente se guardan en envolturas de plástico, a 4°C. No se usaron cajas con más de 3 semanas de almacenamiento en estas condiciones, ya que se ha visto que disminuye el rendimiento del cultivo. Las cajas se inoculan con células de *H. pylori* que se almacenan hasta ese momento a -70°C en caldo brucella (Difco), con 10% de suero bovino fetal y 10 % de glicerol. La cantidad del inóculo es variable pero

los mejores resultados se obtienen al sembrar aproximadamente 3 mg de bacterias en cada caja.

### Placas de agar-ciclodextrinas

La preparación es básicamente la misma que para las placas con sangre. Se utiliza agar Casman (Difco) 43 g/l de agua desionizada o destilada, con 0.2 % de  $\alpha$ -ciclodextrina C Cavitron 82000 (Cerestar) y 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de vancomicina. El tratamiento posterior a la elaboración de las placas y la forma de inoculación es la misma que en las placas de sangre.

### **2.1.2.2 Cultivos líquidos**

#### Medio caldo brucella

Su preparación consiste en resuspender 28 g/l de caldo brucella (Difco) agregando 0.2 % de  $\alpha$ -ciclodextrina C Cavitron 82000 (Cerestar) y 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de vancomicina. Los cultivos se llevan a cabo colocando 100 ml del medio en matraces de 250 ml. El medio caldo brucella se inocula con 1 ml del material obtenido de una caja de petri recién cultivada y resuspendido a una densidad óptica de 1.0 (dilución 1:10).

### **2.1.3 Incubación**

Una vez sembradas las bacterias ya sea en medio sólido o líquido, se introducen en una incubadora Nuair TS autoflow (mod. 3500) con un tiempo de  $\text{CO}_2$  de 6 para la obtención de 10 % de  $\text{CO}_2$  calibrando en contra de aire. El  $\text{CO}_2$  que se inyecta a la incubadora es de una pureza estándar (INFRA). La

temperatura en la estufa es de 37 °C y se incuba por 40 hrs, tanto a los cultivos sólidos como líquidos. Los cultivos líquidos se mantienen durante este tiempo en agitación constante, a una velocidad de 120 r. p. m.

#### **2.1.4 Cosecha de bacterias**

Las bacterias cultivadas en placa se cosechan por medio de asas de siembra de plástico, con una capacidad en el aro de 10 µl (El Crisol). El asa se va pasando sobre el cultivo, tratando de cosechar solamente la capa de bacterias sobre el agar, dejando intacto este último para no sobrestimar el peso. En el caso de cultivos líquidos la cosecha se efectúa por centrifugación a 3, 000 r.p.m. por 10 min en una centrifuga clínica. En todos los casos las bacterias se cosechan en medio caldo brucella, al que se le adiciona 10 % de glicerol y 10 % de suero bovino fetal. En este medio se conservan a -70 ° C, se descongelan cada vez que se vayan a utilizar, una vez descongelado no se vuelve a utilizar la alícuota.

#### **2.1.5. Pruebas**

Las siguientes pruebas se elaboran a cada cultivo obtenido para verificar su pureza y corroborar la morfología de la bacteria *H. pylori*.

Actividad de oxidasa: en un cuadro de una placa de Dry Slide Oxidase (Difco) se pone un poco de cultivo de la placa o del sedimento con la asa de siembra. En unos cuantos segundos ocurre la reacción, obteniéndose una coloración azul si la bacteria es oxidasa positiva y ninguna si es oxidasa negativa.

Actividad de catalasa: en un portaobjetos se ponen unas gotas de peróxido de hidrógeno y se les adiciona con el asa de siembra una pequeña asada de cultivo.

La prueba es positiva si se comienzan a producir burbujas en la muestra de cultivo expuesta al peróxido.

Actividad de ureasa: se prepara una solución de urea 6 M a un pH de 7.0 y se le agrega un poco de 0.05% de rojo de fenol hasta que tome un color rosáceo. A 300 µl de esta solución se agrega una asada de bacterias. El color variará a un color rojo si en el medio hay actividad de ureasa, ya que el rojo de fenol toma este color si el medio se alcaliniza.

Tinción de gram: con el asa de siembra se toma un poco de cultivo y se extiende en una gota de solución salina, sobre un portaobjeto. Se realiza la tinción de gram estándar. La bacteria se tiñe del color rojizo de la safranina, lo que indica que es una bacteria gram negativa. La morfología también es tomada en cuenta, ya que las bacterias deben de tener una forma bacilar espiralada.

### **2.1.6 Curva de crecimiento**

Para determinar la etapa de crecimiento en que se utilizarían las bacterias se hicieron curvas de crecimiento en medio líquido. Se probaron diferentes volúmenes conservando la proporción de 100 µl de inóculo a una densidad óptica de 1 (dilución 1:10) en 3 ml de caldo brucella, en las mismas condiciones de incubación que para los cultivos líquidos.

## **2.2. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE INHIBIDORES DEL METABOLISMO ENERGÉTICO *IN VIVO***

El efecto de los inhibidores se determinó midiendo la diferencia de absorbencia de cultivos en presencia y en ausencia del compuesto probado a diferentes concentraciones. Se prepararon tubos de plástico estériles de 50 ml con

3 ml de medio de cultivo caldo brucella; a este medio, se añaden los inhibidores a la concentración deseada y en el caso del control sin inhibidor, se añade el mismo volumen del solvente correspondiente.

Utilizando un vial de cultivo con aproximadamente 21 g de bacterias, se diluye con el medio de cosecha a una absorbencia de 1.0 a 600 nm, de una dilución 1:10. De este inóculo se toman 100 µl para sembrar en cada uno de los tubos ya preparados con los inhibidores. Después de la incubación se lee la absorbencia de los tubos haciendo una dilución 1:10 a la misma longitud de onda anterior. Los porcentajes de inhibición de crecimiento se hacen con respecto al control sin inhibidor.

Los inhibidores utilizados, las enzimas blanco, el solvente usado para su preparación así como la concentración de la solución madre se indican en la siguiente tabla:

INHIBIDOR	BLANCO	SOLVENTE	CONCENTRACIÓN
Oligomicina	ATPasa $F_1F_0$	Etanol	5 mg/ ml
Azida de sodio	ATPasa $F_1F_0$	Agua desionizada	0.5 M
Rotenona	Complejo I cadena respiratoria	Etanol	7 mM
Antimicina	Complejo III cadena respiratoria	Etanol	5 mM
Cianuro de potasio	Complejo IV cadena respiratoria	Agua desionizada	1 M
Fluoruro de sodio	Pirofosfatasa, fosfatasas	Agua desionizada (ajustar pH 7)	1 M
CCCP	Desacoplante	Dimetilformamida	1 mM
Molibdato de amonio	Fosfatasas	Agua desionizada	100 mM

Tabla 1. Método de preparación de los inhibidores, se indica la enzima blanco, así como el solvente y la concentración de la solución madre. Los inhibidores disueltos en agua se esterilizan por filtración. Cuando los inhibidores están disueltos en etanol, no se esterilizan. La concentración máxima de etanol usada fue de 1%, que se ve no tiene ningún efecto sobre el crecimiento de la bacteria.

Los porcentajes de inhibición del crecimiento se grafican y se determina la concentración mínima inhibitoria (MIC), que es la menor concentración de un compuesto a la que se logra inhibir el crecimiento de bacteria.

### 2.3. OBTENCIÓN DE FRACCIÓN CITOPLÁSMICA Y FRACCIÓN MEMBRANAL DE *Helicobacter pylori*

Las células cosechadas se lavan dos veces por centrifugación en una solución de 20 mM de TRIS-HCl pH 8.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> (1/6 v/v) para eliminar el glicerol presente, se agrega una pizca de ADNasa, la muestra se divide en fracciones de 35 ml, y se someten a 1 min de sonicación por medio de un sonicador Branson 250 con 40 watts de salida en un baño de hielo; este aparato produce vibraciones mecánicas que se transmiten a las moléculas del medio, lo que provoca que se agiten intensamente y se rompan las bacterias que contiene la muestra. Para separar a las bacterias sin romper, se centrifuga la preparación a 27, 000 X g por 20 min. a 4°C. El sobrenadante se colecta y se centrifuga a 100, 000 X g por 80 min. a 4°C. El precipitado obtenido contiene la fracción membranar que es resuspendida en el mismo amortiguador. El sobrenadante contiene la fracción citoplásmica. Las membranas resuspendidas se lavan dos veces con el mismo amortiguador. Si las membranas se van a utilizar para experimentos de oximetría, se resuspenden finalmente en una solución de sacarosa 0.25 M, KCl 10 mM, PIPES 50 mM, a un pH 7.5. Si se van a utilizar para actividad de ATPasa se resuspenden en el primer amortiguador.

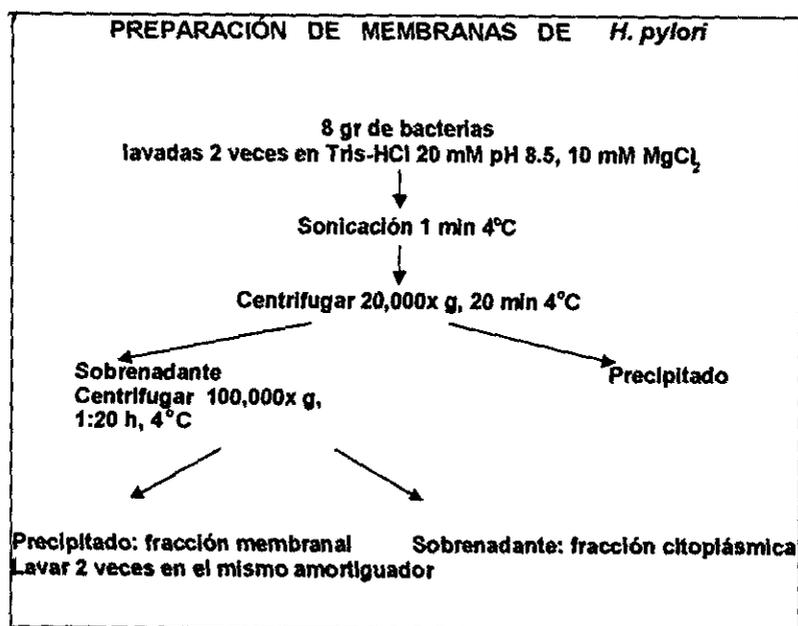


Fig. 6. Diagrama de flujo de la preparación de membranas de *H. pylori*.

## 2.4 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

La determinación de la concentración de proteína se llevó a cabo mediante el método de Lowry *et al.* (1951). Se hace una curva patrón empleando una solución estándar de albúmina sérica bovina para preparar varias diluciones en un intervalo de concentración de 10 a 100 µg.

## 2.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ATPasa

La actividad hidrolítica de la ATPasa se determina en un sistema regenerador de ATP. El ensayo contiene TRIS-acetato 50 mM pH 7.5, ATP 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 3mM, fosfoenol piruvato 1.5 mM y 7 µg de piruvato cinasa. La reacción se inicia al adicionar las membranas o fracción citoplásmica de la bacteria en un volumen final de 500 µl. Las diferentes concentraciones de proteína se especifican en los pies de cada figura en la sección de Resultados y Discusión.

Para determinar el efecto de los inhibidores en la actividad de ATPasa, se preincuban los inhibidores y las membranas en TRIS-acetato 50 mM pH 7.5, en un volumen de 250 µl, por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionan 250 µl del medio de reacción que contiene en concentración final TRIS-acetato 50 mM, ATP 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 3mM, fosfoenol piruvato 1.5 mM y 7 µg de piruvato cinasa y se deja transcurrir la reacción por 30 min a 37 °C. La reacción se detiene adicionando ácido tricloroacético a una concentración final de 6.0%. Se centrifugan las muestras a 3, 000 r.p.m. durante 10 min y se determina en el sobrenadante el fosfato liberado.

La concentración de fosfato liberado se mide colorimétricamente (Sumner, 1944). Se toman 0.4 ml de sobrenadante y se afora a 2 ml con agua desionizada. Al mismo tiempo se hace una curva patrón de fosfatos con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2.5 mM al mismo volumen de las muestras. Se adicionan los siguientes reactivos: 0.25 ml de

una mezcla de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  40.5 mM con 111 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  36 N y se agita en el vortex. Después se adicionan 0.25 ml de la mezcla de p-metilaminofenol sulfato (Elon) 29 mM y metabisulfito de sodio 157.8 mM y se agita nuevamente. Se esperan 10 min para que se estabilice el color. El aumento de color es proporcional a la concentración de fosfato; éste se cuantifica tomando 0.3 ml de cada tubo y leyendo en una placa de ELISA, con un filtro de 700 nm. Las nmolas de fosfato liberado se calculan interpolando la lectura de los tubos experimentales con los valores obtenidos de la curva patrón de fosfatos.

## **2.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE FOSFATASA**

La determinación de la actividad de fosfatasa se llevó a cabo midiendo la liberación de fosfato utilizando como substrato artificial *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP), el cual puede ser utilizado casi exclusivamente por fosfatasas.

El ensayo de actividad se realiza en un amortiguador TRIS-acetato 50 mM pH 7.5 *p*-NPP 2 mM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM y 0.1 mg de membranas en un volumen final de 500  $\mu\text{l}$ . Los inhibidores se preincuban con las membranas por 20 min a temperatura ambiente, habiendo un control al que no se agrega ningún inhibidor sino agua desionizada, completando el volumen a 500  $\mu\text{l}$ . La reacción se incuba 30 min a 37 °C y se detiene adicionando ácido tricloroacético a una concentración final de 6.0%. La determinación del fosfato se calcula por el método de Sumner (1944), como se hizo para la actividad de ATPasa.

## **2.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PIROFOSFATASA CITOPLÁSMICA**

La actividad de pirofosfatasa se realiza en amortiguador TRIS-maleato 50 mM pH 8.5, NaPPi 2 mM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM y 10  $\mu\text{g}$  de proteína citoplásmica en un volumen final de 500  $\mu\text{l}$ . Para los ensayos de inhibición, el NaF se agrega al medio de reacción sin alterar el volumen y las concentraciones de los compuestos del

ensayo. La reacción se incubó 15 min. a 37 °C y se detiene adicionando ácido tricloroacético a una concentración final de 6.0%. La determinación del fosfato liberado de la hidrólisis de PPi se realiza por el método de Sumner (1944).

## **2.7 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE INHIBIDORES DE LA CADENA RESPIRATORIA EN EL CONSUMO DE OXÍGENO**

El consumo de oxígeno se usa como una herramienta para evaluar la actividad de los complejos enzimáticos que hay en la cadena respiratoria de *H. pylori*. La sensibilidad de estos complejos a los inhibidores clásicos para cada uno de ellos se determina midiendo la diferencia en la velocidad de consumo de oxígeno, con y sin inhibidor.

En este caso, el consumo de oxígeno se realizó utilizando un oxímetro YSI modelo 5300 provisto de un electrodo tipo Clark. Las membranas se resuspendieron en la cámara del oxímetro, cuya capacidad es de 3 ml, en un amortiguador de sacarosa 0.25 M, KCl 10 mM, PIPES 50 mM, a un pH 7.5. La concentración de membranas utilizada fue de 0.5 mg de proteína y los ensayos se llevaron a cabo con agitación constante a 25 °C. La solubilidad del oxígeno en el agua, a una temperatura de 25 °C, se consideró de 400 ngátomos de O<sub>2</sub> / ml a una altitud de 2240 metros.

En el oxímetro se deja correr una línea basal con el amortiguador y las membranas antes de comenzar el experimento y se inicia la reacción adicionando el sustrato específico. Se dejó que consumieran oxígeno por un período de 15 min, tiempo suficiente para obtener una pendiente adecuada.

En la siguiente tabla se muestran las concentraciones de los sustratos utilizados para probar la actividad de los complejos respiratorios y los inhibidores empleados para cada uno de ellos.

COMPLEJO DE CADENA RESPIRATORIA	SUSTRATO	CONCENTRACIÓN MADRE	SOLVENTE	CONCENTRACIÓN UTILIZADA	INHIBIDOR
Complejo I	NADH	0.5 M	Agua	5 mM	Rotenona
	NADPH		Desionizada		
Complejo III	NADH	0.5 M	Agua	5 mM	Antimicina
	NADPH		Desionizada		
Complejo IV	Succinato	1 M	Agua Desionizada	5 mM	Cianuro de potasio
	NADH	0.5 M			
	NADPH	0.5 M			

Tabla 2. Se indica el complejo respiratorio y los sustratos que se utilizaron para medir el consumo de oxígeno de cada uno de ellos. También se señala el solvente utilizado para su preparación, así como la concentración de la solución madre y la concentración final utilizada.

Todos los sustratos fueron preparados en agua desionizada y para la elaboración del succinato se utiliza ácido succínico y se ajusta la solución acuosa a un pH 7.0 con NaOH. Los inhibidores se preparan igual que para los ensayos de inhibición de crecimiento, excepto el cianuro, que se prepara en el mismo amortiguador que se utiliza en el ensayo a un pH 6.8.

El control respiratorio de las membranas se realiza adicionando ADP a una concentración final de 0.2 mM, Pi 1 mM y MgCl<sub>2</sub> 2 mM.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1 CULTIVOS**

El primer objetivo para cumplir con la elaboración del presente trabajo, era obtener cultivos de *Helicobacter pylori* en suficiente cantidad y con todas las características de la bacteria en buen estado. Esto se consiguió utilizando las condiciones que se mencionan en Materiales y Métodos. A este respecto hay que resaltar el uso de las ciclodextrinas, ya que estos compuestos hacen más eficiente el crecimiento de las bacterias, el desarrollo de las formas cocoides de los cultivos tradicionales se retarda y en general los cultivos son más limpios, pues no se utilizan derivados sanguíneos; ésto es importante en materia de seguridad, en virtud de que la persona que los elabora no tiene contacto con este tipo de sustancias. Por otra parte se reducen costos, ya que las ciclodextrinas son baratas, fáciles de conseguir y se pueden almacenar a temperatura ambiente por un largo período de tiempo, cosa que no se puede hacer con los derivados sanguíneos que caducan en poco tiempo. El rendimiento promedio de cada caja de cultivo está entre 30 a 50 mg de peso húmedo de bacteria.

#### **3.2 CURVAS DE CRECIMIENTO**

Para decidir la fase de crecimiento en que se encontraban las bacterias al momento de la cosecha y el tiempo adecuado para determinar el efecto de los inhibidores sobre *H. pylori*, se realizaron curvas de crecimiento. En la Fig. 7, se muestra una curva de crecimiento de *H. pylori* en medio líquido, donde se puede observar el típico comportamiento logístico de la población. La pendiente de la curva en la fase de crecimiento exponencial y el máximo de población en la fase estacionaria varían de acuerdo con el inóculo de bacterias sembrado y el volumen de cultivo.

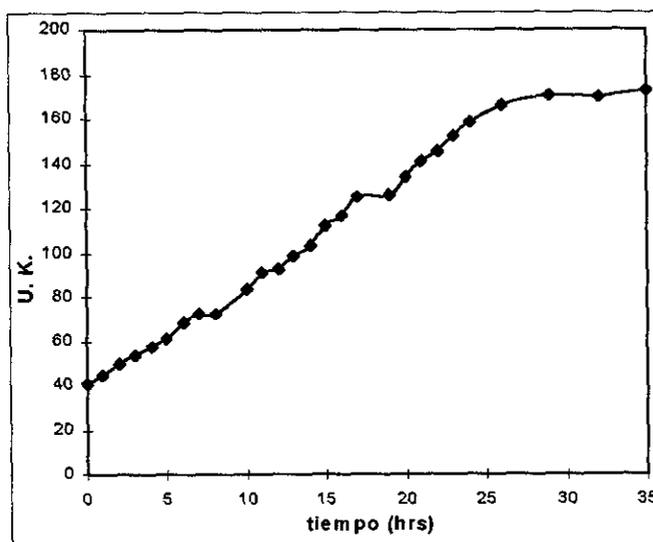


Fig. 7. Curva de crecimiento de *H. pylori* en un experimento representativo para. El volumen utilizado fue de 18 ml de caldo brucella con 600  $\mu$ l de inóculo, las condiciones de incubación se detallan en la sección de Materiales y Métodos.

Se buscó una forma práctica y económica de monitorear los cultivos continuamente para evaluar el efecto de los inhibidores sobre los cultivos. Se midió la densidad óptica del cultivo en la etapa inicial y en la fase estacionaria, para lo cual se verificó que en esta fase de la curva las bacterias tuvieran todas sus características morfológicas típicas y cumplieran con las pruebas de identificación de la bacteria.

### 3.3 EFECTO DE LOS INHIBIDORES SOBRE LOS CULTIVOS DE *Helicobacter pylori*

Cada uno de los compuestos probados fueron capaces de inhibir el crecimiento de la bacteria de una forma dependiente de su concentración; de esta manera, se pudo obtener la concentración inhibitoria mínima (MIC) para cada uno de los inhibidores. A continuación se describen los resultados obtenidos para cada uno de los compuestos.

### 3.3.1 Inhibidores de Cadena Respiratoria

Rotenona. Es un inhibidor clásico del complejo I NADH – ubiquinol oxidoreductasa. En la Fig. 8 se muestra que inhibe el crecimiento de la bacteria a bajas concentraciones, obteniéndose una MIC de 0.5  $\mu\text{M}$ .

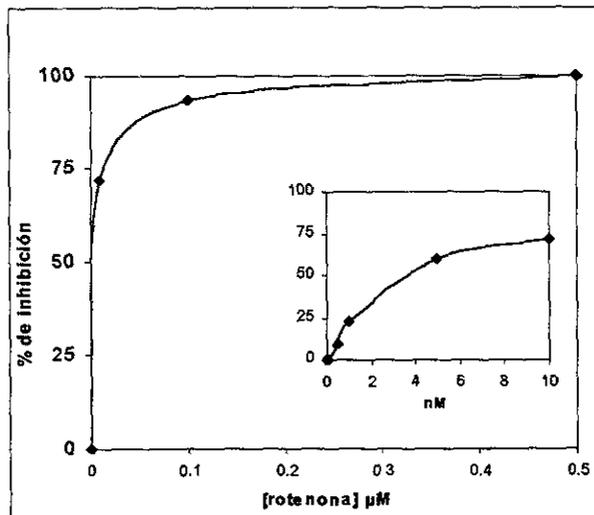


Fig. 8. Inhibición del crecimiento de *H. pylori* con rotenona. El ensayo se llevó a cabo en tubos con 3 ml de caldo brucella añadiendo 100  $\mu\text{l}$  de un inóculo a una densidad óptica de 1 (dilución 1:10) de bacterias. Los cultivos se incuban con el inhibidor a diferentes concentraciones en una atmósfera con 10 % de  $\text{CO}_2$ , a 37°C durante 40 hrs.

Antimicina. El blanco de este compuesto es el complejo III, ubiquinol – citocromo c oxidoreductasa. La antimicina inhibe los cultivos de *H. pylori* a concentraciones bajas en el orden  $\mu\text{M}$  (Fig. 9), con una MIC de 0.25  $\mu\text{M}$ .

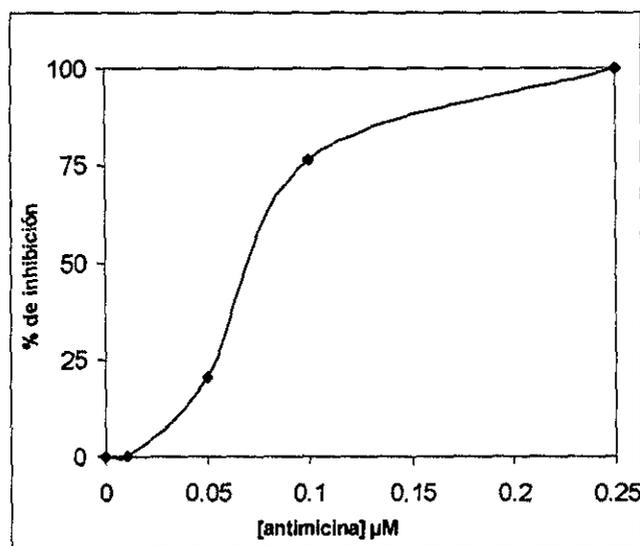


Fig. 9. Inhibición del crecimiento de *H. pylori* con antimicina. Las condiciones experimentales son las mismas que para rotenona.

**KCN.** El cianuro es un inhibidor clásico del complejo IV, citocromo c oxidasa. El efecto inhibitorio de este compuesto sobre el crecimiento de *H. pylori* es del orden mM, a diferencia de los dos inhibidores anteriores. La MIC es de 0.5 mM (Fig. 10).

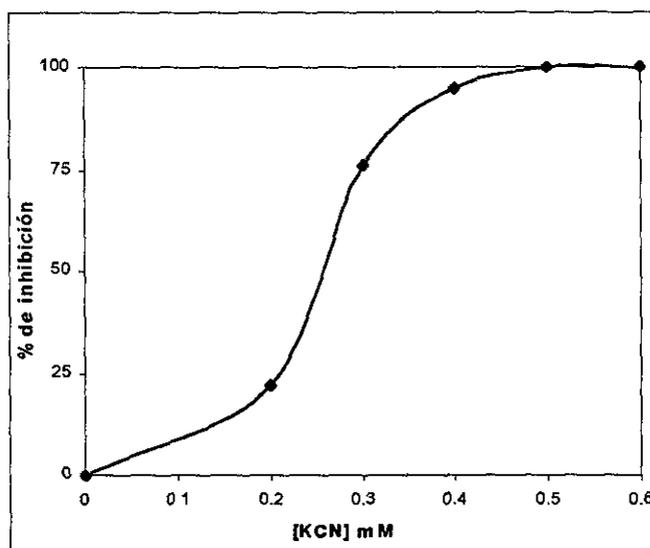


Fig. 10. Inhibición del crecimiento de *H. pylori* con cianuro de potasio. Las condiciones experimentales son las mismas que en la Fig. 7.

### 3.3.2 Inhibidores de ATPasas

Oligomicina y azida de sodio. Ambos compuestos tienen como blanco a la ATPasa  $F_1-F_0$ . La oligomicina es un inhibidor clásico de la ATPasa mitocondrial y sólo de algunas bacterianas, la azida inhibe a ambas. En las Figs. 11 y 12 se muestran las curvas de inhibición para dichos compuestos, obteniéndose los valores de MIC de 30  $\mu$ M para la oligomicina y 2 mM para el azida de sodio.

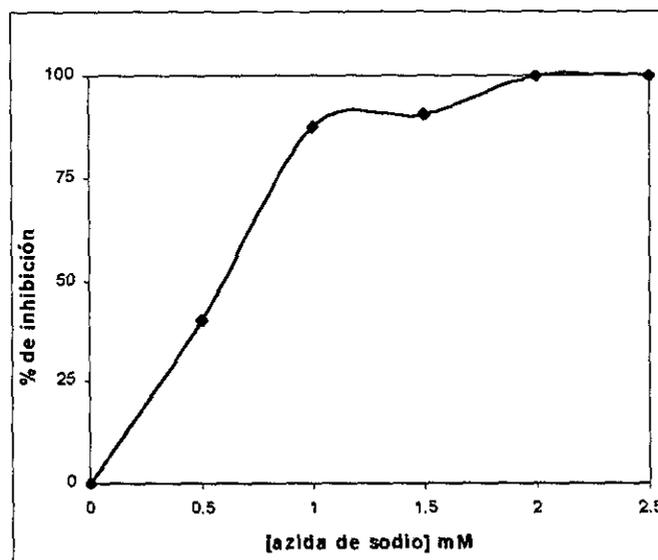
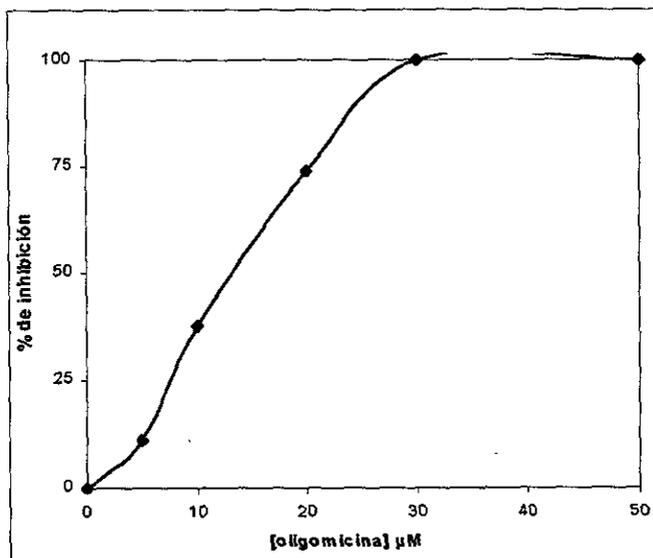


Fig. 11 y 12. Inhibición del crecimiento de *H. pylori* con oligomicina y azida de sodio. Las condiciones experimentales son las mismas que para la Fig. 7

**DCCD.** Esta carbodiimida hidrofóbica inhibe a todas las ATPasas que involucran un movimiento de protones a través de la membrana. En el caso de las ATPasas tipo  $F_1-F_0$  se sabe que inhibe en el sector  $F_0$  bloqueando el bombeo de protones al interactuar con la subunidad c. El crecimiento de *H. pylori* fue inhibido por DCCD con una MIC de  $25 \mu\text{M}$  (Fig. 13).

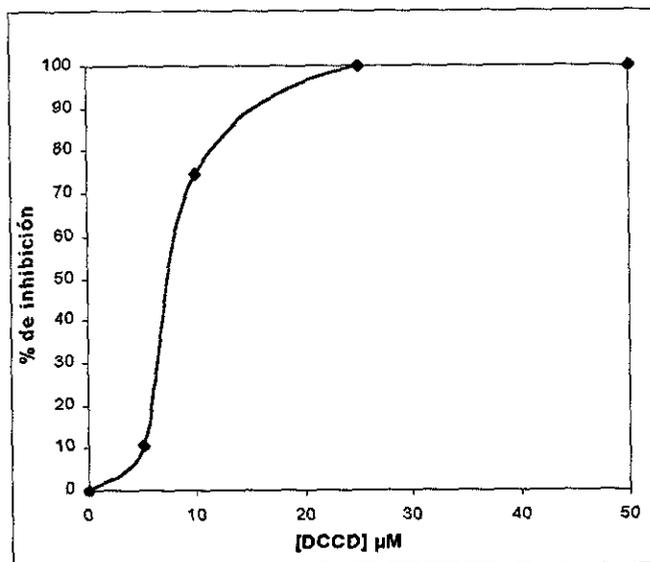


Fig. 13. Inhibición del crecimiento de *H. pylori* con DCCD. Las condiciones experimentales se indican en la Fig. 7.

Vanadato. Es un compuesto que se emplea principalmente para inhibir a las ATPasas tipo P. En este caso la MIC que se obtuvo fue de 5 mM (Fig. 14).

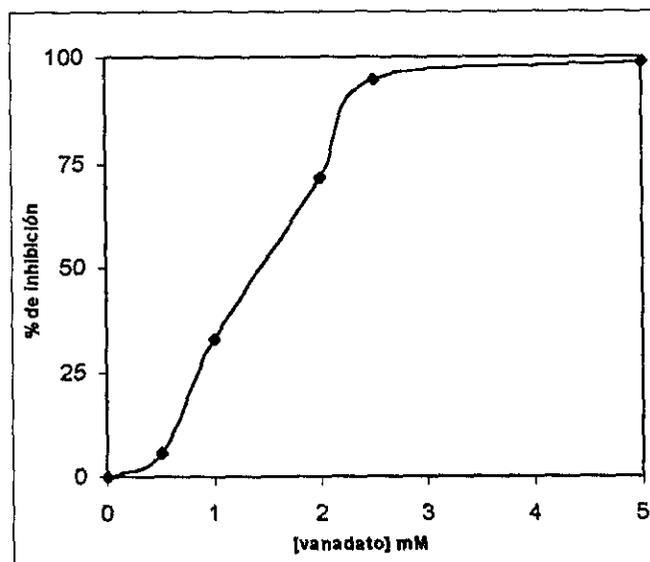


Fig. 14. Inhibición del crecimiento de *H. pylori* con vanadato. Las condiciones experimentales se indican en la Fig. 7.

### 3.3.3 Inhibidores de Pirofosfatasas y Fosfatasas

NaF. El fluoruro es un inhibidor clásico de pirofosfatasas, sin embargo también tiene efecto sobre algunas fosfatasas ácidas (Zollner, 1993). Este compuesto

inhibe el crecimiento de *H. pylori* a concentraciones elevadas (Fig. 15), la MIC obtenida fue de 100 mM.

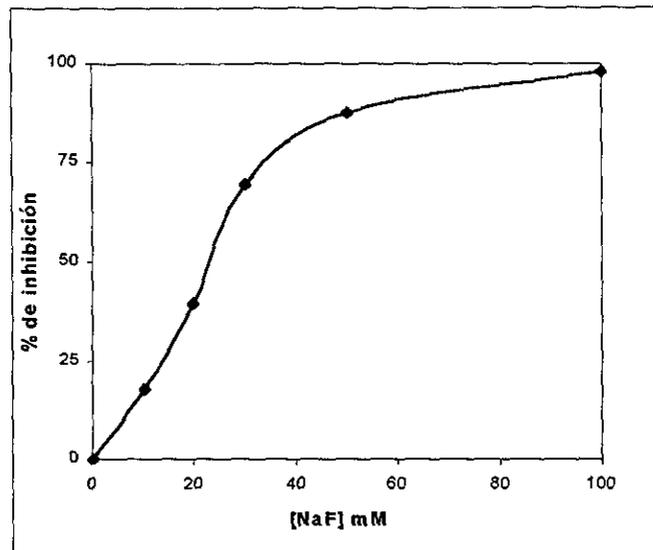


Fig. 15. Inhibición del crecimiento de *H. pylori* con fluoruro de sodio. Las condiciones experimentales se indican en la Fig. 7.

Molibdato de sodio. Este inhibidor tiene como blanco a las fosfatasa. Como puede observarse en la Fig. 16, inhibe a los cultivos de *H. pylori* con una MIC de 10 mM.

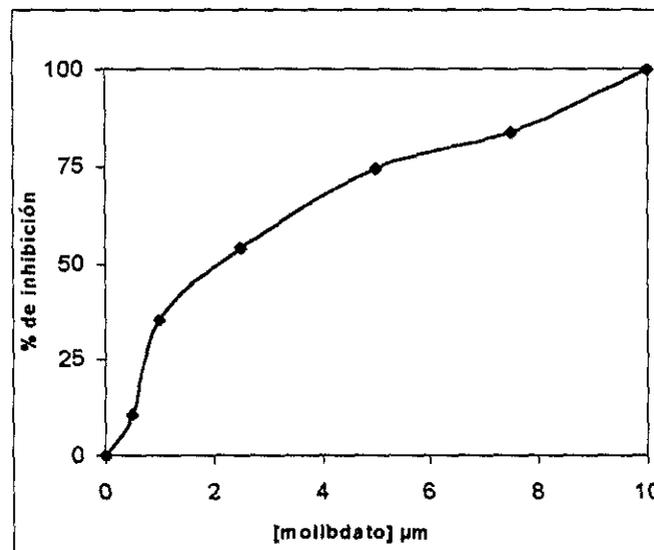


Fig. 16. Inhibición del crecimiento de *H. pylori* con molibdato. Las condiciones experimentales se indican en la Fig. 7.

### 3.3.4 Desacoplantes

CCCP. En general este tipo de compuestos desacopla la fosforilación oxidativa de la síntesis de ATP. El cultivo de *H. pylori* es altamente sensible a CCCP, la MIC es de 500 nM (Fig. 17).

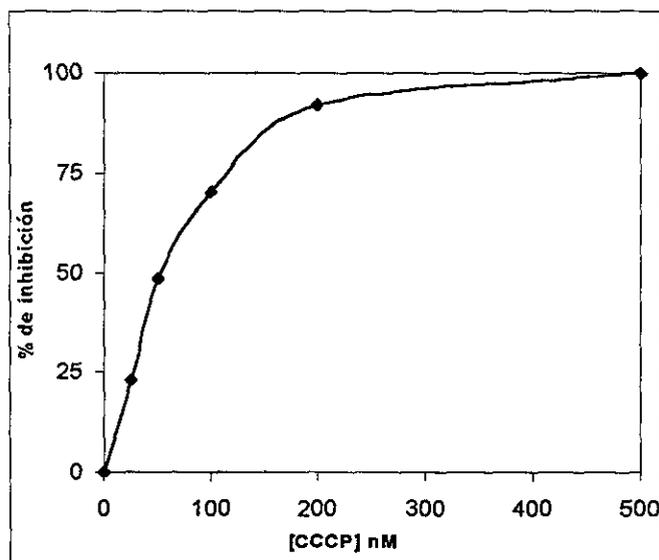


Fig. 17. Inhibición del crecimiento de *H. pylori* con CCCP. Las condiciones experimentales se indican en la Fig. 7.

El efecto de los inhibidores sobre el crecimiento de *H. pylori* se resume en la Tabla 3:

COMPUESTO	MIC
Oligomicina	30 $\mu$ M
Azida de sodio	2 mM
DCCD	25 $\mu$ M
Vanadato	5 mM
NaF	100 mM
Rotenona	0.5 $\mu$ M
Antimicina	0.25 $\mu$ M
KCN	0.5 mM
Molibdato de sodio	10 mM
CCCP	0.5 $\mu$ M

Tabla 3. MIC para cada uno de los inhibidores probados en *H. pylori*

Todos los compuestos probados tienen efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la bacteria, lo que indica la presencia de las enzimas blanco y que

dichas enzimas tienen características similares a las de otros organismos, al menos en cuanto a la sensibilidad a los inhibidores.

En términos generales, se puede observar que las concentraciones necesarias para inhibir 100% a los cultivos de *H. pylori* están en función de la naturaleza hidrofílica o hidrofóbica del compuesto probado. Los compuestos de naturaleza hidrofóbica como oligomicina, rotenona, antimicina, CCCP y que de hecho se disuelven en solventes orgánicos, tienen una MICs en el orden de  $\mu\text{M}$ , mientras que los demás compuestos lo hacen en el orden de mM. Esto nos sugiere la facilidad que tienen el compuesto para cruzar o particionarse a la membrana plasmática de la bacteria y llegar a su enzima blanco. Ahora bien, teóricamente el inhibidor debe ir a ejercer su acción sobre la enzima blanco; sin embargo, al estar realizando los experimentos sobre la bacteria íntegra, cabe la posibilidad que los inhibidores interactúen inespecíficamente en otros sitios.

A la fecha no existen datos en la literatura referente a MIC para ninguno de los compuestos sobre *H. pylori*, excepto para el DCCD del que se tiene un reporte de una MIC de  $10\mu\text{M}$  (McGowan *et al.*, 1997), que es parecida a la que se encontró en el presente trabajo; para los demás inhibidores se muestran por primera vez dichos valores.

### **3.4 EFECTO DE LOS INHIBIDORES SOBRE LAS ENZIMAS BLANCO**

Una vez determinado que los diferentes compuestos inhiben a los cultivos de *H. pylori*, se procedió a probar su efecto sobre las enzimas blanco midiendo la actividad correspondiente en la fracción membranal o en la citoplásmica.

#### **3.4.1 Actividad de ATPasas en membranas y el efecto de inhibidores**

Como ya se describió en la introducción, por el análisis del genoma de *H. pylori*, se sabe que presenta ATPasa tipo  $F_1-F_0$  y también tres ATPasas tipo P en su membrana; ninguna de estas ATPasas se ha purificado. Por lo tanto, se midió la actividad ATPasa total de la fracción membranal de la bacteria para,

mediante el uso de los inhibidores específicos, se cuantificó la contribución de los dos tipos de ATPasas (tipo F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub> y P) a la actividad total.

En la Tabla 4, se muestra la actividad de ATPasa total de la fracción membranal y el efecto de los diferentes inhibidores sobre la actividad, a una concentración, que por la bibliografía, se sabe inhibe a las ATPasas (Cover *et al.*, 1990; Dean *et al.*, 1984; van Dyke *et al.*, 1985).

	CONCENTRACIÓN	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (nmol Pi/min/mg)
Control		22.6
Oligomicina	50 µM	22.6
Azida de sodio	1 mM	20.92
DCCD	20 µM	21.15
Vanadato	100 µM	7.66
CCCP	0.06 µM	22.6

Tabla 4. Actividad de ATPasa en las membranas de *H. pylori* y el efecto de cada uno de los compuestos señalados. La concentración del compuesto utilizada es la que normalmente inhibiría la enzima blanco. Las condiciones experimentales del ensayo fueron preincubar el inhibidor con las membranas 20 min a temperatura ambiente en un amortiguador de TRIS-acetato 50 mM, pH 7.5, en un volumen de 250 µl. La actividad se inicia agregando 250 µl del medio de reacción que contiene como concentraciones finales ATP 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 3mM, fosfoenol piruvato 1.5 mM y 7 µg de piruvato cinasa. Se incuba la reacción por 30 min a 37 °C y se detiene adicionando ácido tricloroacético a una concentración final de 6.0%.

Belli y Fryklund (1995) midieron la actividad de ATPasa total de bacterias de *H. pylori* permeabilizadas con cloroformo y reportaron una actividad de ATPasa, a pH 7.5 de 27 nmol de Pi/min/mg de proteína, la cual coincide con nuestros valores. Sin embargo, en su preparación podrían estar participando otras enzimas citoplásmicas que degradan al ATP, a diferencia de nuestra preparación que es membranal únicamente; un indicio de ésto podría ser que, a pH 6 ellos reportan más actividad que a pH 7.5.

El otro trabajo que existe en la literatura y que mide actividad de ATPasa es el de Beil *et al.* (1995). Estos autores miden la actividad de ATPasa de la subunidad F<sub>1</sub> solubilizada y reportan un valor de 160 nmol Pi/min/mg de proteína. La diferencia en la actividad de este trabajo con el nuestro, refleja un paso de purificación más de la ATPasa F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>, por lo que explicaría su mayor actividad específica.

Como puede observarse en la Tabla 4, existen compuestos que no modifican la actividad, por lo que se decidió hacer curvas de concentración para tratar de definir si ésto era un problema debido a la concentración utilizada.

Para la inhibición por oligomicina se realizaron ensayos a diferentes concentraciones pero en ningún caso hubo un aumento significativo en la inhibición de la actividad. La concentración máxima usada fue de 126.5  $\mu\text{M}$ , más del doble de la  $I_{50}$  para la ATPasa  $F_1-F_0$  en otros sistemas (Van Dyke *et al.*, 1985).

En el caso de la curva de concentración con azida de sodio se obtiene un máximo de inhibición alrededor del 20% de la actividad de ATPasa a partir de 2 mM del compuesto y hasta 10 mM (Fig. 18).

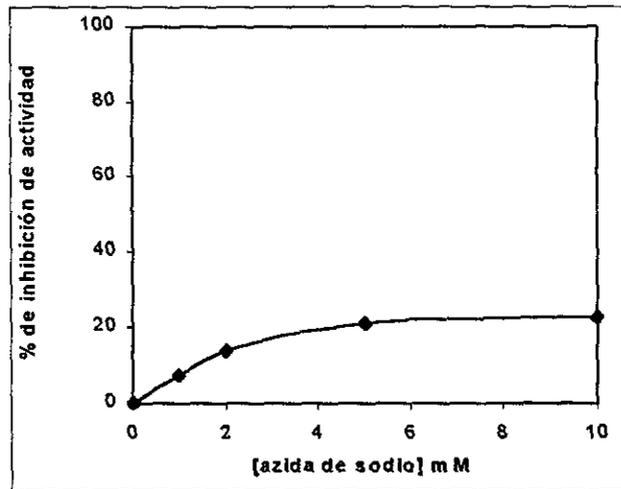


Fig. 18. Curva de inhibición de la actividad de ATPasa por azida de sodio. El compuesto se preincuba con las membranas 20 min a temperatura ambiente en un amortiguador de TRIS-acetato 50 mM, pH 7.5, en un volumen de 250  $\mu\text{l}$ . La actividad se inicia agregando 250  $\mu\text{l}$  del medio de reacción que contiene como concentraciones finales ATP 2 mM,  $\text{MgCl}_2$  3mM, fosfoenol piruvato 1.5 mM y 7  $\mu\text{g}$  de piruvato cinasa. Se incuba la reacción por 30 min a 37  $^\circ\text{C}$  y se detiene adicionando ácido tricloroacético a una concentración final de 6.0%.

Los resultados con los inhibidores de ATPasa  $F_1-F_0$  sugirieron las siguientes posibilidades para el caso de la oligomicina:

- 1) Que la enzima sea insensible a la oligomicina: se ha reportado que la mayor parte de las ATPasas de procariotes, a diferencia de las ATPasas mitocondriales, son insensibles a la oligomicina (Downie *et al.*, 1979), por lo que esto podría explicar nuestros resultados.

2) Que el tratamiento de sonicación al que se someten las bacterias en la obtención de membranas esté afectando la estructura de la enzima, haciendo que la oligomicina no sea capaz de inhibirla.

Sin embargo, con azida de sodio encontramos un máximo de inhibición del 20 %, lo que muestra que al menos este porcentaje de la actividad de ATPasa total se debe a la ATPasa  $F_1-F_0$  y el resto a otras enzimas. Por tanto, esto sugiere que la ATPasa  $F_1-F_0$  de *H. pylori* no es sensible a oligomicina, aunque quedaría aún por demostrar si la sonicación no afecta a la enzima, quizá liberando al sector  $F_1$  de la membrana, lo cual haría subestimar la cantidad de ATPasa  $F_1-F_0$  de la membrana. Para estimar esta posibilidad, más adelante se midió la actividad de ATPasa en la fracción citoplásmica.

Por otra parte, con el DCCD se obtiene un máximo de inhibición del 30% con una concentración de 200  $\mu\text{M}$  (Fig. 19). La inhibición por el DCCD, que afecta a la ATPasas que tienen canal de protones en general, se esperaba que fuera mayor a la obtenida con azida, ya que estaría afectando a otras enzimas además de la ATPasa  $F_1-F_0$ . Esto sugiere que a las ATPasas translocadoras de protones no se les puede relacionar con el resto de la actividad de ATPasa que el azida de sodio no es capaz de inhibir. Por ello queda por definir qué enzimas son responsables de un 70% de la actividad de ATPasa total.

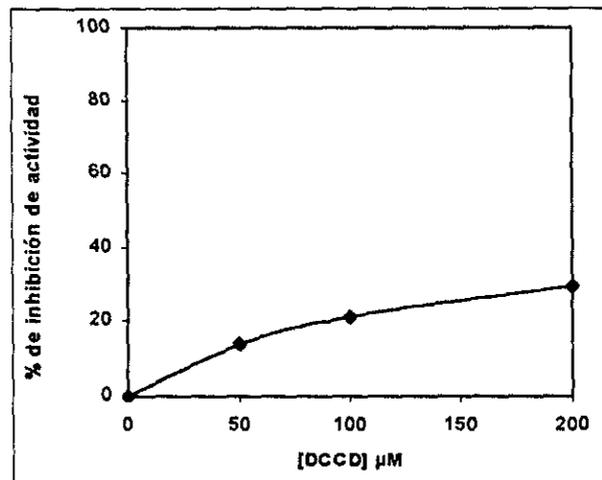


Fig. 19. Curva de inhibición de la actividad de ATPasa por DCCD. Las condiciones del ensayo fueron las mismas que para la Fig. 18, a excepción que se preincubó con el inhibidor por 30 min en hielo, para tratar de encontrar mejores condiciones de inhibición.

Al comparar nuestros resultados con el trabajo de Belli y Fryklund (1995), que como ya referimos trabajan con células permeabilizadas, observamos que, al igual que nuestros resultados, reportan inhibición por azida y DCCD. No obstante, los valores que muestran son del 75% con 100  $\mu\text{M}$  de azida y 35% con 100  $\mu\text{M}$  de DCCD a pH 6.0. El valor del DCCD es cercano al obtenido por nosotros, sin embargo con azida su valor es mayor. Esto podría deberse a la diferente preparación empleada y al pH utilizado (ver páginas 47 y 48).

El CCCP no tiene un efecto significativo sobre la actividad de ATPasa, como se reportó anteriormente en la Tabla 4. Ésto estaría indicando que las membranas están rotas o desacopladas.

Con vanadato se obtiene una inhibición máxima del 70% con una concentración de 100  $\mu\text{M}$  de compuesto (Fig. 20). El gran efecto que tiene el vanadato sobre la actividad de ATPasa podría hacer pensar que la mayor parte de ella se debe a ATPasas del tipo P, ya que este es un compuesto que, como se ha señalado, se usa tradicionalmente para estudiar a este tipo de enzimas, inhibiendo en el orden de micromolar. El vanadato inhibe impidiendo la hidrólisis del ATP al unirse en el sitio catalítico de estas enzimas (Cantley *et al.*, 1977).

Sin embargo, este porcentaje de inhibición no coincide con el 30% de inhibición obtenido con el DCCD. Un dato que cabe señalar aquí, es que el vanadato inhibe algunas fosfatasas ácidas, que son enzimas capaces de hidrolizar ATP, por lo que es necesario estudiar el efecto de los inhibidores de fosfatasas antes de sacar conclusiones con respecto al efecto inhibitorio del vanadato.

Comparando nuestros datos para el vanadato con los que reporta Belli y Fryklund (1995) observamos que sólo reportan un 15 % de inhibición con vanadato sobre la actividad de ATPasa en las células permeabilizadas.

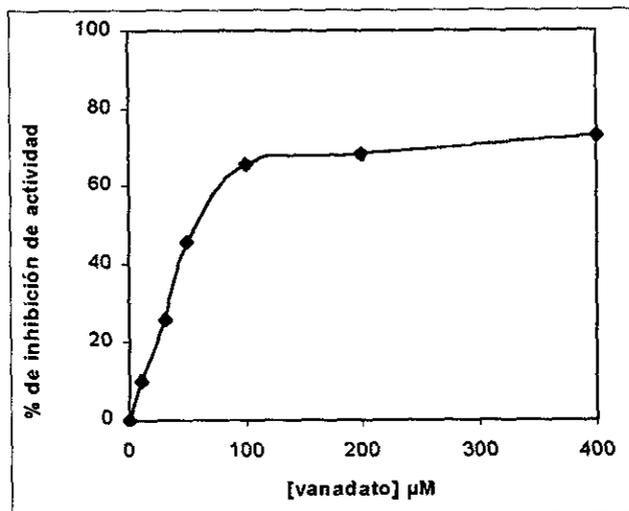


Fig. 20. Curva de inhibición de la actividad de ATPasa por vanadato. Las condiciones son las mismas que se especifican en la Fig. 18.

Así, se procedió a determinar el efecto de inhibidores de fosfatasas sobre la actividad total de ATPasa. Se utilizó el molibdato de sodio, como inhibidor de fosfatasas (Zollner, 1993) y al NaF, que aunque es inhibidor de pirofosfatasas, se ha visto que puede ejercer efecto inhibitorio sobre las fosfatasas ácidas (Zollner, 1993). La inhibición máxima obtenida con molibdato es de aproximadamente 60% con 2 mM y de ahí se mantuvo constante hasta 5 mM (Fig. 21). Esto indica que de la actividad total de ATPasa, un 60% es debido a fosfatasas y del tipo membranal.

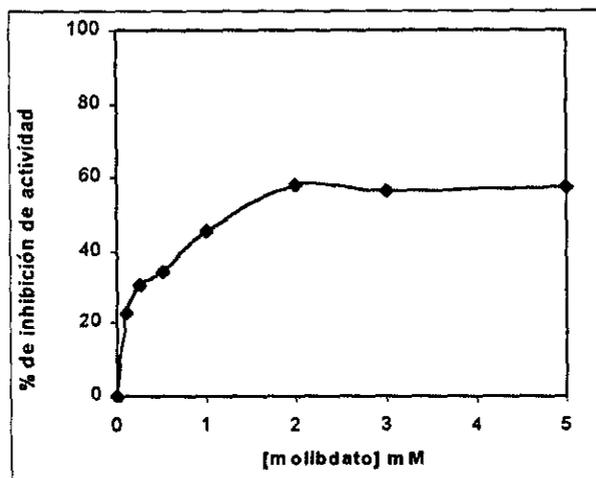


Fig. 21. Curva de inhibición de la actividad de ATPasa por molibdato. Las condiciones son las mismas que se especifican en la Fig. 18.

La inhibición por NaF de la actividad de ATPasa fue del 80% a una concentración 150 mM (Fig. 22).

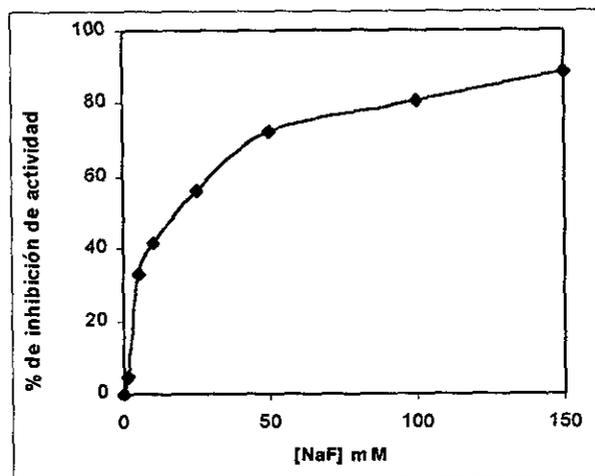


Fig. 22. Curva de inhibición de la actividad de ATPasa por NaF. Las condiciones son las mismas que se especifican en la Fig. 18.

Los resultados con los inhibidores de fosfatasa nos permiten apreciar que probablemente en las membranas de *H. pylori* existe una actividad de fosfatasa muy importante y que esta actividad contribuye en gran parte a la actividad de ATPasa que nosotros queremos caracterizar. Esta interferencia que encontramos en el estudio de la ATPasa, por parte de las fosfatasas, se tratará de caracterizar a continuación.

### 3.4.2 Actividad de fosfatasas en membranas y el efecto de inhibidores

La actividad de fosfatasa en la fracción membranal de *H. pylori* se determinó por medio de la hidrólisis de *p*-NPP, que como ya se mencionó es un sustrato artificial específico para fosfatasas. En la Tabla 5 se muestra el efecto de diferentes inhibidores a una concentración que inhibe considerablemente la actividad de ATPasa.

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	% DE INHIBICIÓN
Molibdato de sodio	1 mM	38 %
NaF	50 mM	98.5 %
Vanadato	100 $\mu$ M	21 %
Azida de sodio	5 mM	3 %

Tabla 5. Inhibición de la actividad de fosfatasa en membranas de *H. pylori*. El ensayo de actividad se realiza en un amortiguador tris-acetato 50 mM pH 7.5, *p*-NPP 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM y 0.1 mg de membranas en un volumen final de 500  $\mu$ l. Los inhibidores se preincubaban con las membranas por 20 min a temperatura ambiente, habiendo un control al que no se agrega ningún inhibidor sino agua desionizada, completando el volumen a 500  $\mu$ l. La reacción se incubó 30 min a 37 °C y se detiene adicionando ácido tricloroacético a una concentración final de 6.0%. La actividad de fosfatasa control fue de 21.16 nmolPi/min/mg.

Dentro de los inhibidores para fosfatasa el molibdato inhibió la actividad fosfatasa en un 38% y el NaF en un 98.5%, a una concentración de 1 mM y 50 mM respectivamente. Esto permite corroborar lo que los resultados de actividad de ATPasa ya sugerían, que una importante actividad de fosfatasa está presente en las membranas. Esta actividad no había sido reportada anteriormente, aunque existen en el genoma los genes para fosfatasa a las cuales se les puede atribuir la actividad. El que no haya sido reportada la actividad puede deberse a que los estudios que se han hecho no toman en cuenta que el ATP puede ser hidrolizado inespecíficamente por otras enzimas, principalmente fosfatasa, por lo que, la actividad de estas enzimas estaría siendo tomada como actividad de ATPasa. La actividad de fosfatasa puede ser de gran importancia para una bacteria como *H. pylori*, ya que en un ambiente tan hostil como puede ser la mucosa gástrica, estas enzimas pueden estar involucradas en los procesos de desfosforilación de proteínas que son necesarios para la señalización intracelular, que harían posible a la célula responder a cambios en el medio ambiente .

Por otra parte el vanadato, que se utiliza principalmente como un inhibidor de ATPasa tipo P, pero que puede ejercer un efecto inhibitorio sobre algunas fosfatasa, inhibió un 21% a una concentración de 100 mM. Ésto nos indica que de la inhibición que tenemos de vanadato en la actividad de ATPasa, una parte se debe a la inhibición que ejerce este compuesto en las fosfatasa y por lo tanto el efecto del vanadato se está sobrestimando.

El azida de sodio no tiene un efecto significativo en la actividad de fosfatasa, aún a una concentración inhibitoria para la actividad de ATPasa, con lo que se puede observar la especificidad de este compuesto.

### **3.4.3 Actividad de ATPasas en citoplasma y el efecto de inhibidores**

Al existir la posibilidad que la actividad debida a la ATPasa  $F_1$ - $F_0$  en membranas estuviera siendo subestimada, debido a la liberación de la subunidad  $F_1$  al citoplasma (ver pag. 49), se procedió a analizar la fracción citoplásmica que se obtiene al preparar las membranas de *H. pylori*. Los inhibidores que se

emplearon fueron la azida de sodio para ATPasa  $F_1-F_0$  y el molibdato y el fluoruro de sodio para fosfatasa, que son los dos tipos de enzimas que pudieran estar presentes en el citoplasma.

En la Tabla 6 se puede observar que el azida efectivamente tiene un efecto inhibitorio de alrededor del 47 % como máximo sobre la actividad de ATPasa en el citoplasma, lo cual está sugiriendo que la subunidad  $F_1$  de esta enzima se solubiliza y está presente en la fracción citoplásmica. Lo anterior podría explicar el que la actividad específica de ATPasa en las membranas tenga un valor bajo y también que se tenga una inhibición sólo del 20 % por azida de sodio. Por lo tanto, se puede concluir que en realidad la membrana de *H. pylori* debe tener una cantidad mayor de ATPasa  $F_1-F_0$  que la cuantificada.

COMPUESTO	CONCENTRACION(mM)	% DE INHIBICIÓN
Azida de sodio	5	42.0
	20	47.0
Molibdato de sodio	1	5.2
NaF	100	30.0

Tabla 6. Actividad de la ATPasa en citoplasma y el efecto de inhibidores. La actividad específica de ATPasa en citoplasma fue de 41.89 nmolPi/min/mg.

El molibdato tuvo un efecto poco significativo sobre la actividad de ATPasa en el citoplasma, (5.2 % de inhibición con 1 mM de este compuesto) para el NaF la inhibición fue de 30 % con 100 mM; ésto nos indica que hay un porcentaje de fosfatasas en la fracción citoplásmica.

#### 3.4.4 Actividad de fosfatasas en fracción citoplásmica y efecto de inhibidores

La inhibición por NaF y molibdato en la actividad de ATPasa en citoplasma nos sugirió la presencia de fosfatasas en la muestra, por lo que se determinó la actividad de fosfatasa (p-NPPasa) en la fracción citoplásmica.

La actividad específica de fosfatasa en el citoplasma fue de 13.54 nmolPi/min/mg de proteína, menor que en las membranas. Esta actividad es

inhibida 73 % por NaF a una concentración de 25 mM y un 58 % con 10 mM de molibdato de Na. Esto sugiere que si bien hay una pequeña cantidad de fosfatasa en el citoplasma, la mayor parte de ellas están ancladas a la membrana de la bacteria. Se requerirían estudios más detallados para determinar la naturaleza de las fosfatasa citoplásmicas.

Con los resultados anteriores podemos obtener un perfil general de qué clase de enzimas y en qué proporción contribuyen a la actividad total de ATPasa. Primeramente a la ATPasa  $F_1-F_0$  se le puede atribuir el 20 % de la actividad de ATPasa, pues ese es el porcentaje de inhibición máxima que se encuentra con azida. El resto de la actividad sería debido a la actividad de fosfatasa, por lo que son responsables de la mayor parte de la actividad. Las ATPasa tipo P en realidad no están participando en la actividad de ATPasa total, ya que no son activas sin la presencia del catión que transportan. *H. pylori* cuenta con ATPasas tipo P para el transporte de cationes divalentes como  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  y cationes divalentes (Ge *et al.*, 1995; Melchers *et al.*, 1996; Tomb *et al.*, 1997). Con base en lo anterior podemos decir que en nuestro caso no estamos midiendo actividad de ATPasa tipo P porque los cationes que transportan estas enzimas y que son necesarios para su actividad no están presentes. En los reportes acerca de la actividad de ATPasa en la literatura (Belli y Fryklund; Beil *et al.*, 1995), la inhibición por vanadato se atribuye al efecto que tiene sobre las ATPasas tipo P; lo más probable es que esta inhibición sea en realidad el efecto del vanadato sobre la actividad de fosfatasa principalmente, pues aunque puede haber una muy pequeña actividad basal de ATPasa tipo P debida a la presencia de  $Mg^{2+}$  en el medio, su actividad quedaría encubierta por la inhibición de fosfatasa, a las que correspondería la mayor parte de la actividad.

Un punto adicional para apoyar lo anterior es que la acción combinada de NaF y azida nos permite obtener un 92 % de la inhibición en la actividad de ATPasa total, con lo que se estarían alcanzando casi la inhibición total de esta

actividad, debido a la inhibición de las dos clases de enzimas que participan en la actividad de ATPasa.

Dentro de las perspectivas que se pueden desprender de este trabajo esta el estudio de las fosfatasa en *H. pylori*. Este tipo de enzimas puede ser el objeto de una investigación más detallada para definir si es posible incluir a los inhibidores de estas enzimas dentro de los compuestos que, además de tener una actividad bactericida, pueden ser buenos candidatos a convertirse eventualmente en medicamentos en contra la infección *H. pylori*.

### **3.4.5 Actividad de Pirofosfatasa en citoplasma y efecto de inhibidores**

Los resultados acerca de la pirofosfatasa que se muestran a continuación son parte del trabajo de doctorado de la Mtra. Guadalupe Oliva realizado en el laboratorio 323-N, del Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M. (Oliva *et al.*, 2000).

La pirofosfatasa citoplásmica de *H. pylori* fue parcialmente purificada, presenta una actividad específica de 30  $\mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína, e hidroliza únicamente al complejo Mg-pirofosfato como sustrato. No se inhibe por molibdato de sodio y se inhibe 100 % por NaF, clásico inhibidor de pirofosfatasas. La  $I_{50}$  para NaF es de 40  $\mu\text{M}$  (Fig. 23), esta inhibición estaría en el mismo orden que las pirofosfatasas de eucariontes, con una  $I_{50}$  de 6.7  $\mu\text{M}$  para la pirofosfatasa de levadura y de 50  $\mu\text{M}$  para la porcina. Las pirofosfatasas bacterianas son menos sensibles al NaF con una  $I_{50}$  de 5 mM para la de *Rhodopseudomonas palustris* (Schwarm, *et al.*, 1986) y de 0.9 mM para *Methanobacterium thermoautotrophicum* (van Alebeek, *et al.*, 1994). La pirofosfatasa de *E. coli* se inhibe 91 % con 1 mM de fluoruro (Josse, 1966), por lo que se puede ver que la pirofosfatasa de *H. pylori* es una enzima con una alta sensibilidad al NaF si se compara con sus similares bacterianas.

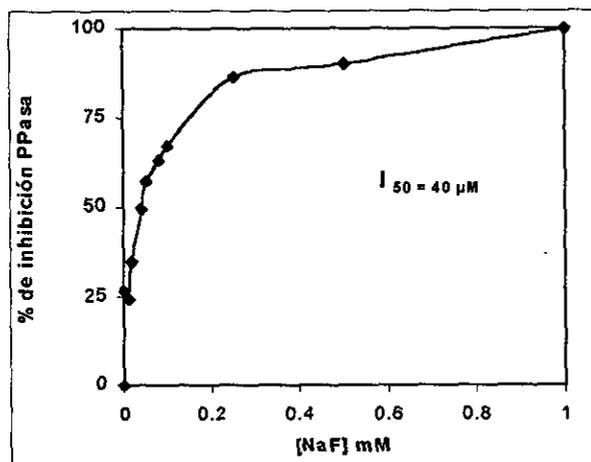


Fig. 23. Curva de inhibición de la actividad de pirofosfatasa por NaF. La actividad de pirofosfatasa se mide en amortiguador TRIS-maleato 50 mM pH 8.5, NaPPi 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM y 10 μg de proteína citoplásmica en un volumen final de 500 μl. En los ensayos de inhibición, el NaF se agrega al medio de reacción sin alterar el volumen y las concentraciones de los compuestos del ensayo. La reacción se incuba 15 min a 37 °C y se detiene con ácido tricloroacético a una concentración final de 6.0%. La determinación del fosfato liberado de la hidrólisis de PPi se realiza por el método de Sumner (1944). La actividad específica de la enzima fue de 30 μmol Pi/min/mg de proteína.

### 3.6 MEDICIÓN DEL CONSUMO DE OXÍGENO Y EL EFECTO DE INHIBIDORES EN LOS COMPLEJOS I, III Y IV

Con el método descrito en Materiales y Métodos se pudo obtener una medición del consumo de oxígeno en las membranas de *H. pylori*, que permitió evaluar el efecto de cada uno de los inhibidores utilizados. Un ejemplo de cómo se lleva a cabo el experimento y el efecto que ejerce un compuesto sobre la tasa de consumo de oxígeno se puede observar en la Fig. 24.

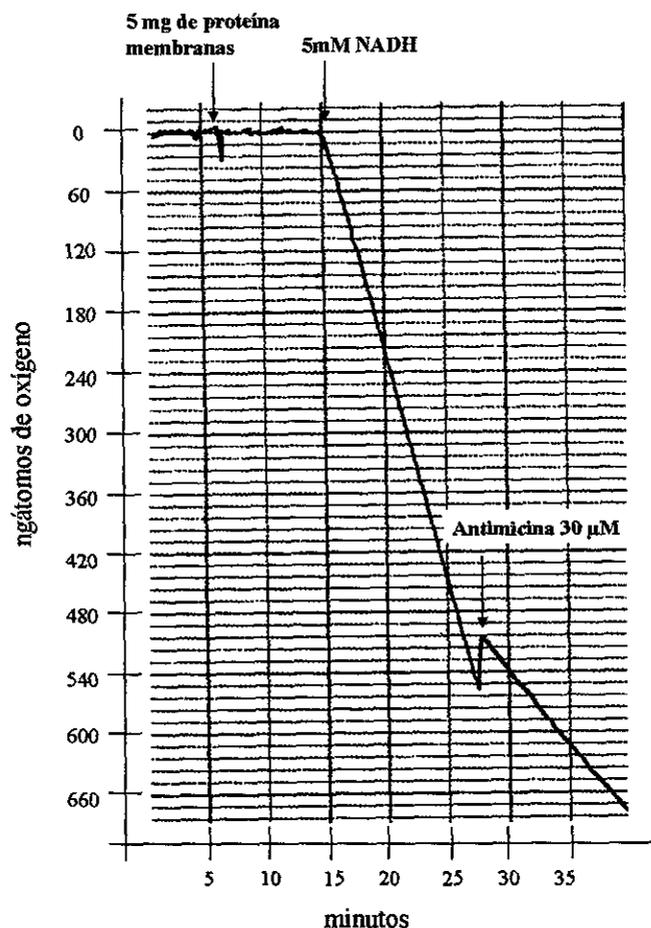


Fig. 24. Consumo de oxígeno de las membranas de *H. pylori*. Se observa la estabilización del trazo al agregar 3 ml de amortiguador sacarosa 0.25 mM, KCl 10 mM, PIPES 50 mM pH 7.5 y las membranas de *H. pylori*. Con la adición del sustrato se inicia el consumo de oxígeno y al agregar el inhibidor (antimicina en este caso) se puede apreciar el cambio en la pendiente.

Los consumos de oxígeno utilizando NADH, NADPH y succinato como donadores de electrones se muestran a continuación en la Tabla 7.

SUBSTRATOS	ngátomos O min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup>
NADH 5 mM	5.68
NADPH 5 mM	5.75
Succinato 5 mM	1.77

Tabla 7. Consumo de oxígeno en la preparación de membranas de *H. pylori* con diferentes sustratos. Las condiciones del ensayo son las descritas en la Fig. 24.

Como puede apreciarse el NADH y NADPH son mejores sustratos que el succinato para el consumo de oxígeno. Debido a que el citocromo c es una

proteína periférica en la membrana, que une al complejo III y IV, cabía la posibilidad de que durante el proceso de sonicación se desprendiera de las membranas y ésto disminuyera la tasa de respiración. Por tal razón se realizaron algunos ensayos en donde se añadió citocromo c (de corazón de caballo, tipo III, Sigma) al ensayo; sin embargo no hubo ningún cambio en la actividad con lo que se descartó esta posibilidad.

A continuación se muestra la tabla 8 comparativa de las diferencias que existen entre los consumos de oxígeno con succinato, NADH y NADPH que se reportan en otros trabajos para membranas de *H. pylori* y los obtenidos en esta tesis.

SUBSTRATOS	ngátomos O min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup>	Autor
Succinato		
5 mM	1.77	presente trabajo
2 mM	11.4	Nagata <i>et al.</i> , 1996
5 mM	32.0	Chang <i>et al.</i> , 1995
NADPH		
5 mM	5.75	presente trabajo
1 mM	66.0	Chang <i>et al.</i> , 1995
0.5 mM	9.0	Chen <i>et al.</i> , 1999
NADH		
5 mM	5.68	presente trabajo
0.5 mM	29.0	Nagata <i>et al.</i> , 1996
1 mM	11.6	Chang <i>et al.</i> , 1995
0.5 mM	2.8	Chen <i>et al.</i> , 1999

Tabla 8. Consumo de oxígeno utilizando como sustratos succinato, NADH y NADPH, tanto del presente trabajo como los reportados en la literatura.

Como se puede observar en la Tabla 8 el NADH y el NADPH son los sustratos con los que se obtiene una tasa de respiración mayor, con el succinato se obtiene el menor consumo de oxígeno entre los tres sustratos utilizados. La tasa de respiración que se obtiene con NADH y NADPH esta dentro de lo que se reporta en otros trabajos, aunque existen algunas diferencias, como las que encuentra Chang *et al.* (1995) que utiliza a NADPH y NADH y reporta un consumo de oxígeno diferente para cada uno de ellos, teniendo el NADPH una tasa de consumo de oxígeno 5 veces mayor que para el NADH. Chen *et al.* (1999)

también encuentra que para el NADH la tasa de consumo de oxígeno es aproximadamente 3 veces menor que la del NADPH. En el caso del succinato nuestras actividades de consumo de oxígeno son aproximadamente un orden de magnitud menor a los valores reportados en otros trabajos (Chang *et al.*, 1995; Nagata *et al.*, 1996). Tomando en cuenta esto, no utilizamos este sustrato para los experimentos con inhibidores. Las diferencias de consumo de oxígeno con los otros trabajos se pueden deber a que las preparaciones de membranas se obtiene de manera diferente en cada uno de ellos: variaciones en los tiempos de sonicación y centrifugación, el empleo de diferentes amortiguadores y concentraciones del sustrato empleadas en la medición del consumo de oxígeno. Otra diferencia importante en el trabajo de Chen *et al.* (1999) es que utiliza el citoplasma y las membranas combinadas al momento de medir el consumo de oxígeno, con lo que deshidrogenasas citoplásmicas pueden estar contribuyendo a la actividad. A pesar de que existen en algunos casos diferencias entre la tasa respiratoria que se obtuvo en este trabajo y los trabajos antes mencionados, nuestra preparación de membranas permitió evaluar el efecto de los inhibidores en el consumo de oxígeno. Otra variable que pudo influir fue las diferentes concentraciones de sustrato empleadas en algunos de ellos.

Se intentó medir el control respiratorio en el consumo de oxígeno, para lo cual se agregó al ensayo de oximetría 0.2 mM de ADP, con 1 mM de Pi y 2 mM de  $Mg^{2+}$ , pero no hubo ningún efecto en la tasa de consumo de oxígeno, lo que indica que las membranas están rotas, sin control respiratorio y por lo tanto no se puede medir la estequiometría que existe entre el consumo de oxígeno y la producción de ATP en la membrana. Este hecho corroboró el resultado obtenido al medir la actividad de ATPasa en presencia de desacoplantes.

### **3.6.1 Efecto de los inhibidores de la cadena respiratoria sobre el consumo de oxígeno.**

En la tabla 9 se muestran los porcentajes de inhibición máxima obtenidos utilizando como sustrato NADH y NADPH.

INHIBIDOR	% DE INHIBICIÓN	
	NADH	NADPH
Rotenona 30 $\mu$ M	28.5	31.0
Antimicina 25 $\mu$ M	85.0	77.0
KCN 5 mM	57.0	65.0

Tabla 9. Efecto de los inhibidores de la cadena respiratoria de *H. pylori* en el consumo de oxígeno

La inhibición máxima por rotenona fue de 28.5 y 31.0 %, usando como sustrato NADH y NADPH respectivamente, con 30  $\mu$ M del compuesto. Éste es el primer reporte que se tiene de inhibición por rotenona en el consumo de oxígeno en este organismo. Esta sensibilidad indica la presencia de una NADH deshidrogenasa del tipo NDH-1, que es inhibida por este compuesto (Yagi *et al.*, 1998). La concentración inhibitoria de la rotenona para otros organismos varía, por ejemplo, la NADH-quinona reductasa de *Thermus termophilus* es inhibida sólo en un 63 %, a una concentración de 25  $\mu$ M y la  $I_{50}$  para la enzima mitocondrial de corazón de bovino es de 2.3  $\mu$ M (Zollner, 1993). Con base en lo anterior se puede decir que la inhibición que se observó en las membranas de *H. pylori* estuvo dentro del intervalo de concentración que hay para otras enzimas de este tipo. En el caso de la inhibición de la actividad cuando se suministra como sustrato NADPH, la actividad no corresponde a una NADPH deshidrogenasa, ya que esta enzima es diferente a NADH deshidrogenasa tipo NDH-1 que es la que presenta sensibilidad a rotenona (Yagi *et al.*, 1998), por lo tanto, esta inhibición estaría sugiriendo que el NADPH esta siendo reducido por la NADH deshidrogenasa de alguna forma. La manera en que lo anterior podría estarse llevando a cabo es por medio de una conversión del NADPH a NADH, para que de esta manera ser usado por la NADH deshidrogenasa. Otra posibilidad es la que propuso Finel (1998), que consiste en que debido a las modificaciones que presenta la enzima NADH deshidrogenasa en *H. pylori* de no tener las dos subunidades involucradas en la unión al NADH que se encuentran conservadas en las deshidrogenasas de otros organismos, pueda ser capaz de unir también NADPH además del NADH y de esta manera llevar a cabo la transferencia de electrones, lo cual explicaría que

la inhibición por rotenona sea similar para ambos sustratos. Aún no se conoce el sitio de unión de rotenona a la NADH deshidrogenasa, pero se sabe que en presencia de este compuesto el FMN y los centros Fe/S se encuentran en forma reducida por lo que es posible que la inhibición se de a nivel de la etapa final de transferencia de electrones a la quinona (Nicholls, 1987).

En el caso de la antimicina, con 25  $\mu\text{M}$  se inhibe el consumo de oxígeno un 85% usando NADH y un 77 % para el NADPH. Nuestros resultados coinciden con los reportados por Nagata *et al.* (1996) quien encontró 90 % de inhibición en el consumo de oxígeno de las membranas con 50  $\mu\text{M}$  del compuesto. Baer *et al.* (1993) inhibe solamente 54.1 % la respiración de células completas con 23 mM de antimicina.

Desde hace algunos años se conoce que la antimicina bloquea el paso de electrones de la quinona al complejo bc1 (Trumpower y Gennis, 1994). Estudios cristalográficos confirman que el sitio de unión de la antimicina es el centro-N de la proteína (lado negativo de la membrana) donde ocurre la reducción de la quinona, bloqueando de esta manera la transferencia de electrones (Xia *et al.*, 1997). Los resultados indican la presencia de un complejo III clásico inhibible por antimicina, dato que ya había demostrado previamente Baer *et al.* (1993) y Nagata *et al.* (1996). La inhibición incompleta de la respiración de membranas de *H. pylori* por antimicina sugiere fuertemente la presencia de una quinol oxidasa, que sería alimentada directamente por la menaquinona, y esta última a su vez sería capaz de reducir a la quinol oxidasa que se ha propuesto.

Con 5 mM de KCN y usando NADH y NADPH como sustratos se inhibe el consumo de oxígeno un 57.0 % y el 64.8 % respectivamente, lo que refleja el efecto del compuesto sobre la actividad de citocromo oxidasa. El grupo de Nagata (1996 y 1999) purificó e identificó a la citocromo c oxidasa, como una oxidasa del tipo  $\text{cbb}_3$  y reportó una  $I_{50}$  para KCN de 2.6-4 $\mu\text{M}$  dependiendo del sustrato usado. Estos autores inhiben completamente a la oxidasa ya que sus resultados los obtuvieron midiendo exclusivamente a la oxidasa utilizando como sustrato

citocromo c o TMPD-ascorbato. En nuestro caso, nosotros medimos el consumo de oxígeno dando como sustrato NADH y NADPH, por lo que con 5 mM de KCN tendríamos inhibida completamente a la citocromo oxidasa  $cbb_3$ , pero solamente estaríamos inhibiendo la parte final de la cadena. El que exista una actividad remanente apoya lo sugerido por los resultados con antimicina de la presencia de oxidasas alternas, del tipo quinol oxidasa que tienen una nula o baja sensibilidad al cianuro, lo cual habían propuesto Maier *et al.* (1996), sugiriendo a la quinol oxidasa tipo bd como un posible candidato responsable de esta actividad, basándose en los primeros espectros de las membranas de *H. pylori*, hechos por Marcelli *et al.* (1996) que indicaron la presencia de citocromos del tipo b, c y d.

La inhibición por KCN en el consumo de oxígeno también ha sido reportada por Baer *et al.* (1993), que como ya se mencionó, realiza sus experimentos con células completas. En este trabajo el grado de inhibición con cianuro 5 mM es del 87.9 % y la diferencia con Baer *et al.* (1993) puede deberse al hecho de usar células completas a solamente utilizar membranas. Por último cabe señalar que el cianuro actúa al unirse a los centros binucleares de los citocromos donde también se une el oxígeno (Trumpower y Gennis, 1994).

Los resultados de oximetría en las membranas de *H. pylori* permiten corroborar parte de la información que ya existía en la literatura acerca de la fisiología de la cadena respiratoria de esta bacteria, así como aportar nuevos resultados que nos sugieren otras características: la inhibición por rotenona que se detectó en el consumo de oxígeno y que se relaciona con la presencia de una NADH deshidrogenasa en la membrana, capaz de usar tanto NADH como NADPH como sustrato. Los datos generados en el presente trabajo, así como con la información que hay en la literatura, hacen de la cadena respiratoria de *H. pylori* uno de los aspectos del metabolismo energético con más estudios hasta la fecha (Baer *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1999; Marcelli *et al.*, 1996; Maier *et al.*, 1996; Nagata *et al.*, 1996). La información en conjunto nos permitió generar un esquema de cómo puede estar constituida la cadena respiratoria en esta bacteria (Fig. 25).

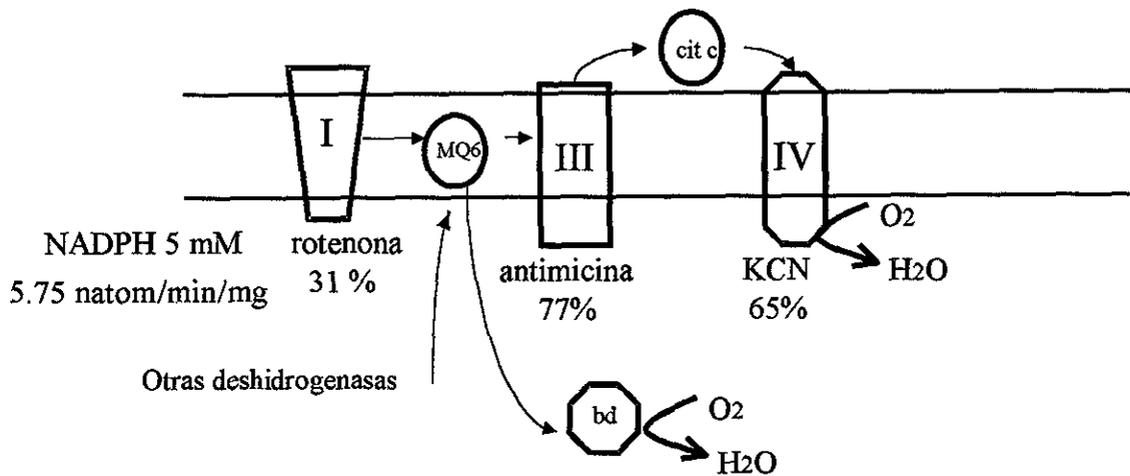


Fig. 25. Cadena respiratoria esquematizada basada en los resultados obtenidos del presente trabajo. Los números romanos indican los diferentes complejos estudiados. Los porcentajes indican la inhibición que se obtuvo con los diferentes inhibidores, para NADH y NADPH. MQ = menaquinona, b y d = quinol oxidasas de este tipo.

La cadena respiratoria de *H. pylori* estaría compuesta de diversas deshidrogenasas, capaces de tomar los electrones de diferentes sustratos, entre ellas se encontraría la NAD(P)H deshidrogenasa que se mencionó anteriormente. Posteriormente los electrones serían transportados a la menaquinona-6, punto en el cual pueden tomar dos caminos: uno sería ser transportados al complejo III, para después ser transportados al citocromo c y por último a la citocromo c oxidasa. El otro camino sería ser transportados de la menaquinona-6 a la quinol oxidasa bd. En ambos casos el aceptor final de electrones sería el oxígeno molecular.

Comparando los resultados de inhibición del crecimiento de la bacteria y el efecto de los mismos compuestos en la actividad de la enzima se puede notar que hay grandes diferencias entre ellas; en otras palabras, un compuesto que tiene un gran efecto inhibitorio en el crecimiento de la bacteria no necesariamente tiene un gran efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima blanco. El caso más representativo de lo anterior es el de la oligomicina que inhibió el crecimiento de *H. pylori* a una concentración de 30  $\mu$ M pero no inhibe la actividad de la enzima. Lo anterior probablemente se debe a que el compuesto que tradicionalmente se emplea en el estudio de la actividad de ATPasas F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub> está afectando a otra clase

de enzimas. Ésto es importante tomarlo en cuenta, sobre todo en investigaciones sobre compuestos que tienen como objetivo a largo plazo, aportar información que ayude al tratamiento de una infección, como en el caso de *H. pylori*, ya que pueden existir grandes diferencias entre el efecto del compuesto para la bacteria *in vivo* y la actividad de la enzima *in vitro*.

En el caso del fluoruro se observa que tiene un efecto significativo para el crecimiento de la bacteria y es un inhibidor potente para la pirofosfatasa y para las fosfatasas en *H. pylori*. Este es un compuesto interesante ya que se utiliza como un agente anticaries en humanos, aunque la concentración utilizada para fluorar el agua es de 0.5-1 mg / litro (0.023 mM) y la MIC que se obtuvo en este trabajo fue de 100 mM, lo cual es una gran diferencia de concentración. Sin embargo el uso de este compuesto puede tener importancia para la prevención de la enfermedad causada por *H. pylori*, ya que se ha señalado que el agua contaminada puede ser una vía de transmisión de la bacteria (Klein *et al.*, 1991) y no existen estudios del efecto que tenga el fluoruro en la prevención de la infección en donde se utiliza el agua fluorada.

## 4. CONCLUSIONES

- 1) Se logró implementar en el laboratorio cultivos reproducibles, económicos y de buen rendimiento para la bacteria *Helicobacter pylori*.
- 2) Todos los inhibidores del metabolismo energético utilizados fueron capaces de inhibir el crecimiento de la bacteria. Se pudo determinar la MIC o la concentración mínima para inhibir el crecimiento de la bacteria para cada uno de los inhibidores.
- 3) Se obtuvo una preparación membranal que se puede utilizar, tanto para el ensayo de ATPasa con una actividad de 22.6 nmol Pi/min/mg de proteína, como para los experimentos de oximetría, en que las membranas tienen una actividad máxima de 5.75 ngátomos de oxígeno/min/mg de proteína para el substrato NADH.
- 4) La bacteria *H. pylori* presenta una ATPasa F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub> membranal con una actividad hidrolítica de ATP de al menos 20% de la actividad total de ATPasa. La ATPasa F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub> es insensible a oligomicina y sensible a azida de sodio.
- 5) Aproximadamente el 80 % de la actividad de ATPasa corresponde a fosfatasas parcialmente sensibles a vanadato y molibdato, e inhibidas por completo por NaF. Estas fosfatasas podrían ser blancos de medicamentos que se diseñen en un futuro para el tratamiento contra la infección por esta bacteria, pero harían falta más estudios al respecto, teniendo los antecedentes que los resultados de este trabajo ofrecen.
- 6) En la cadena respiratoria de *H. pylori* se encontró una sensibilidad a rotenona, que aunque es pequeña, no había sido reportada y es un punto más a la discusión acerca de la existencia o no del complejo I clásico en la bacteria. El NADH y el NADPH son substratos que no tienen diferencias importantes en la

actividad de consumo de oxígeno. Se sugiere la presencia de una quinol oxidasa probablemente del tipo bd por la sensibilidad incompleta a antimicina y a cianuro que se presenta en el consumo de oxígeno.

Por último cabe señalar que el propósito de este trabajo no era encontrar un compuesto que curara la infección por *H. pylori*, sino generar más información acerca de los efectos que tienen inhibidores de enzimas que juegan un papel importante en el metabolismo de la bacteria. Los resultados obtenidos se espera que puedan ayudar a futuras investigaciones, las cuales estén encaminadas a una aplicación más práctica en el campo de la erradicación de la bacteria y la prevención de su infección.

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

## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. Alm, R., Ling, L., Moir, D., King, B., Brown, E., Doig, P., Smith, D., Noonan, B., Guild, B., deJonge, B., Carmel, G., Tummino, P., Caruso, A., Uria-Nickelsen, M., Mills, D., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S., Jiang, Q., Taylor, D., Vovis, G., Trust, T. 1999. Genomic sequence comparison of two unrelated isolates of human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 397(6715): 176-180.
2. Baer, W., Koopmann, H. y Wagner, S. 1993. Effects of substances inhibiting or uncoupling respiratory chain phosphorylation of *Helicobacter pylori*. *Zbl. Bakt.* 280: 253-258.
3. Bar, R., 1989. Cyclodextrin-aided bioconversion and fermentations. *Trends Biotechnol.* 7: 2-4.
4. Beil, W., Birkholz, C., Wagner, S. y Sewing, K. 1995. Bismuth subcitrate and omeprazole inhibit *Helicobacter pylori* F<sub>1</sub>-ATPase. *Pharmacology*. 50: 333-337.
5. Belli, W. y Fryklund, J. 1995. Partial characterization and effect of omeprazole on ATPase activity in *Helicobacter pylori* by using permeabilized cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39 (8): 1717-1720.
6. Berg, H. y Tuner, L. 1979. Movement of microorganisms in viscous environments. *Nature*. 278(5702): 349-351.
7. Blaser, M. 1993. *Helicobacter pylori*: microbiology of a "slow" bacterial infection. *Trends Microbiol.* 259: 255-259.
8. Blattner, F., Plunkett, G., Bloch, C., Perna, N., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C., Mayhew, G., Gregor, J., Davis, N., Kirkpatrick, H., Goeden, M., Rose, D., Mau B. y Shao Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. 277(5331): 1453-1462.
9. Bode, G. *et al.* 1993. The cocoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol. Infect.* 111: 483-490.
10. Bode, G., Mauch, F., Ditschuneit, H. y Malfertheiner P. 1993. Identification of structures containing polyphosphate in *Helicobacter pylori*. *Journal of General Microbiology*. 139: 3029-3033.
11. Burns, B., Hezell, S. y Mendz, G. 1993. Characterization of the glucose transport in *Helicobacter pylori*. *Acta Gastroenterol. Belg.* 56: 44
12. Burns, B., Hezell, S. y Mendz, G. 1995. Acetyl-CoA carboxylase activity in *Helicobacter pylori* and requirement of increased CO<sub>2</sub> for growth. *Microbiology*. 141, 3113-3118.
13. Cantley, L., Josephson, L., Warner, R., Yanagisawa, M., Lechene, C., Guidotti, G. 1977. Vanadate is a potent (Na,K)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. *J. Biol. Chem.* 252: 7421-7423.

14. Catrenich, C. y Makin, K. 1991. Characterisation of the morfologic conversion of *Helicobacter pylori* from bacilar to coccoid forms. Scand. J. Gastroenterol. 26(S181): 58-64
15. Chalk, P., Roberts, A. y Blows, W. 1994. Metabolism of pyruvate and glucose by intact cells of *Helicobacter pylori* studied by C-13 NMR spectroscopy. Microbiology. 140: 2085-2092.
16. Chang, H., Marcelli, S., Davison, A., Chalk, P., Poole, R., Miles, R. 1995. Kinetics of substrate oxidations by whole cells and cell membranes of *Helicobacter pylori*. FEMS Microbiol. Lett. 129: 33-38.
17. Chen, X., Correa, P., Offerhaus, J., Rodríguez, E., Jenney, F., Hoffmann, E., Fox, J., Hunter, F., Diavolitsis, S. 1986. Ultrastructure of the gastric mucosa harboring Campylobacter like organisms. Am. J. Clin. Pathol. 86, 575-582
18. Clayton, C. *et al.*, 1995. Elucidation of *Helicobacter pylori* metabolism by random genome sequencing. Gut. 37 (S1), A67.
19. Clemens, J., Albert, M., Rao, M., Qadri, F., Huda, S., Kay, B., van Loon, FP., Sack, D., Pradhan, B., Sack, R. 1995. Impact of infection by *Helicobacter pylori* on the risk and severity of endemic cholera. J. Inf. Dis. 171(6) 1653-1656.
20. Cover, T y Blaser, M. 1992. Purification and Characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. J. Biol. Chem. 267, 10570-10575.
21. Cover, T., Dooley, C. y Blaser, M. 1990. Characterisation of and human serological response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. Infect. Immun. 58: 603-610.
22. Cover, TL y Blaser, M. 1996. *Helicobacter pylori* infection, a paradigm for chronic mucosal inflammation: pathogenesis and implications for eradication and prevention. Adv. Int. Med. 41, 85-117.
23. Dawnes, E. y Senior, P. 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. Advances in Microbial Physiology. 10: 135-266.
24. Dean, G., Fishkes, H., Nelson, P., Rudnick, G. 1984. The hydrogen ion-pumping adenosine triphosphatase of platelet dense granule membrane. Differences from F1F0- and phosphoenzyme-type ATPases. J. Biol. Chem. 259(15): 9569-9574.
25. Dick, J. y Gamcsik, M. 1989. Use NMR spectroscopy in determination of *Campylobacter pylori* metabolism. Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 89: 98.
26. Dixon, M. 1991. *Helicobacter pylori* and peptic ulceration: histopathological aspects. J. Gastroenterol. Hepatol. 6: 125-130.
27. Dixon, M. 1994. Pathophysiology of *Helicobacter pylori* infection. Scand. J. Gastroenteol. 29: 7-10.
28. Doig, P. *et al.* 1999. *Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains. Microbiology and molecular biology reviews. (63) 3: 675-707.

29. Doig, P. y Trust, T. 1994. Identification of surface-exposed outer membrane antigens of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 62: 4526-4553.
30. Doolittle, R., 1997. A bug with excess gastric avidity. *Nature.* 388: 515-516
31. Downie, A., Gibson, F. y Cox, G. 1979. Membrane adenosine triphosphatases of prokaryotic cells. *Ann. Rev. Biochem.* 48: 103-131.
32. Dunn, B., Campbell, G., Pérez-Pérez, G. y Blaser, M. 1990. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 265, 9464-9469.
33. Eaton, K., Brooks, C., Morgan, D. Krakowka, S. 1991. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* 59: 2470-2475.
34. Eaton, K., y Krakowka, S. 1994. Effect of gastric pH on urease-dependent colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 62: 3604-3607.
35. Evans, D., Evans, Jr., Moulds, J. y Graham, D. 1988. N-acetylneuraminyllactose-binding fibrillar hemagglutinin of *Campylobacter pylori* : a putative colonization factor antigen. *Infect Immun.* 60: 2896-2906.
36. Finel, M. 1998. Does NADH play a central role in energy metabolism in *Helicobacter pylori*? *Trends Biochem. Sci.* 23: 412-414.
37. Fitzgibbons, P., Dooley, C., Cohen, H., Appleman, M. 1988. Prevalence of gastric metaplasia, inflammation and *Campylobacter pylori* in the duodenum of members of a normal population. *Am. J. Clin. Pathol.* 90(6): 711-714.
38. Fleischmann, R., Adams, M., White, O., Clayton, R., Kirkness, E., Kerlavage, A., Bult, C., Tomb, J., Dougherty, B., Merrick, J. *et al.*, 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science.* 269(5223): 496-512.
39. Forman, D., Newell, D., Fullerton, F., Yarnell, J., Stacey, A., Wald, N., Sitas, F. 1991. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *Br. Med. J.* 302(6788): 1302-1305.
40. Fox, J., Correa, P., Taylor, N., Zavala, D., Fontham, E., Janney, F., Rodriguez, E., Hunter, F., Diavolitsis, S. 1989. *Campylobacter pylori*-associated gastritis and immune response in a population at increased risk of gastric carcinoma. *Am J. Gastroenterol.* 84: 775-781.
41. Fox, J., Correa, P., Taylor, N., Thompson, N., Fontham, E., Janney, F., Sobhan, M., Ruiz, B., Hunter, F. 1992. High prevalence of cytotoxin-positive *Helicobacter pylori* strains in population with high prevalence of atrophic gastritis. *Am. J. Gastroenterol.* 87(11): 1554-1560.
42. Fraenkel, D. y Levisohu, S. 1967. Glucose, gluconate metabolism in *Escherichia coli* mutant lacking phosphoglucose isomerase. *J. Bacteriol.* 93: 1571-1578.

43. Futai, M. Noumi, T y Maeda, M. 1989. ATP synthetase (H<sup>+</sup> - ATPase): results by combined biochemical and molecular biological approaches. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 111-136.
44. García-Horsman, J., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J., Gennis, R. 1995. The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. *J. Bacteriol.* 176: 5587-5600.
45. Ge, Z., Hiratsuka, K. y Taylor, D. 1995. Nucleotide sequence and mutational analysis indicate that two *Helicobacter pylori* genes encode a P-type ATPase and cation-binding protein associated with copper transport. *Mol Microbiol.* 15 (1): 97-106
46. Gennis, R y Stewart, V. 1996. Respiration. 1996. In Neidhardt, F. *et al.* (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology. Washington, D.C. p. 217-261.
47. Glansdorff, N. 1996. Biosynthesis of arginine and polyamines. In Neidhardt, F. *et al.* (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology. Washington, D.C. p. 408-433.
48. Glynn, I. y Karlsh, S. 1990. Occluded cations in active transport. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 171-205.
49. Goggin, P., Northfield, T. Y Spychal, R. 1991. Factor affecting gastric mucosal hydrophobicity in man. *Scand. J. Gastroenterol.* 26: 65-73.
50. Goodwin, C., Armstrong, J., Chilvers, T., Peters, M., Collins, M., Sly, L., McConnell, W., Harper, W. 1989. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter pylori* comb. nov., respectively. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 39: 397-405.
51. Greene, R. 1996. Biosynthesis of methionine. In Neidhardt, F. *et al.* (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology. Washington, D.C. p. 542-560
52. Harold, F. 1963. Accumulation of inorganic pyrophosphate in *Aerobacter aerogenes*. *Journal of Bacteriology.* 86: 216-221.
53. Hazell, S. y Mendz, G. 1997. How *Helicobacter pylori* works: an overview of metabolism of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* (2) 1:1-12.
54. Hazell, S., Evans, Jr. y Graham, D. 1991. *Helicobacter pylori* catalase. *J. Gen Microbiol.* 137: 57-61.
55. Hazell, S.L., Lee, A., Brady, L. y Henessy, W. 1986. *Campylobacter pyloridis* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factor in colonization to gastric epithelium. *J. Infect. Dis.* 153: 658-663.
56. Hoffman, P., Goodwin, A., Johnsen, J., Magee, K., Veldhuyzen van Zanten, S. 1996. Metabolic activities of metrodinazol-sensitive and -resistant strains of *Helicobacter pylori*: repression of piruvate oxidoreductase and expression of isocitrate lyase activity correlate with resistance. *J. Bacteriol.* 178(16): 4822-4829

57. Holt, J. *et al.* 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9 ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
58. Hosking, S., Ling, T., Chung, S., Yung, M., Cheng, A., Sung, J., Li, A. 1994. Doudenal ulcer healing by eradication of *Helicobacter pylori* without anti-acid treatment: randomised controlled trial. *Lancet* 343: 508-510.
59. Hughes, N., Chalk, P., Clayton, C. and Kelly, D. *et al.* 1995. Identification of carboxylation enzymes and characterization of a novel four-subunit pyruvate-flavodoxin oxidoreductase from *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* 177, 3953-3959.
60. Imaizumi, A., Suzuki, Y., Ono, S., Sato, H. and Sato, Y. 1983. Heptakis(2,6-O-dimethyl)beta-cyclodextrin: a novel growth stimulant for *Bordetella pertussis* phase I. *J. Clin. Microbiol.* 17(5): 781.
61. Jones, D., Curry, A. and Fox, A. 1985. An ultra-structural study of gastric *Campylobacter*-like organism 'C. pyloridis'. *J. Gen. Microbiol.* 131: 2335-2341.
62. Josse, J. 1966. Constitutive inorganic pyrophosphatase of *Escherichia coli*. I. Purification and catalytic properties. *J. Biol. Chem.* 241: 1938-1947.
63. Kjeldstad, B. *et al.* 1991. Changes in polyphosphate composition and localization in *Propionibacterium acnes* after near-ultraviolet irradiation. *Canadian Journal of Microbiology.* 37: 562-567.
64. Klein, P., Graham, D., Gaillour, A. *et al.* 1991. Water source as a risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. *Lancet* 337: 1503-1506.
65. Kobayashi, H. y Unemoto, T. 1986. Streptococcal cytoplasmic pH is regulated by changes in amount and activity of a proton-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* 261: 627-630.
66. Kornberg, A. 1995. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *J. Bacteriol.* 177: 491-496.
67. Kusters, J. *et al.* 1997. Cocoids forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect. Immun.* 65: 3672-3679.
68. Lathi, R. 1983. Microbial inorganic pyrophosphatases. *Microbiol. Rev.* 47: 169-179.
69. Lee, A., Fox, J. *et al.* 1991. Transmission of *Helicobacter* spp.: a challenge to the dogma of faecal-oral spread. *Epidemiol. Infect.* 107, 99-109.
70. Lee, A., Fox, J. y Hazell, S. 1993. Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: a perspective. *Infect. Immun.* 61, 1601-1610.
71. López, G. 1993. Gastritis. *Medicine.* 2: 50-61. Cuarta edición. México.
72. MacNulty, C. y Dent, J. 1987. Rapid identificación of *Campylobacter pylori* by preformed enzymes. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1683-1686.
73. Maier, R., Fu, C., Gilbert, J. *et al.* 1996. Hydrogen uptake hydrogenase in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol. Lett.* 141: 71-76.
74. Marais, A., Mendz, G., Hazell, S., Megraud, F. 1999. Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. *Microbiology and molecular biology reviews.* 63(3): 642-674.

75. Marcelli, S., Chang, H., Chapman, T., Chalk, P., Miles, R., Poole, R. 1996. The respiratory chain of *Helicobacter pylori* - identification of cytochromes and the effects of oxygen on cytochrome and menaquinone levels. *FEMS Microbiol. Lett.* 138(1): 59-64.
76. Marshall B. y Goodwin, C. 1987. Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 37: 68.
77. Marshall, B. 1991. Virulence and pathogenicity of *Helicobacter pylori*. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 6: 121-124.
78. Marshall, B., Armstrong, J., McGeachie, D. y Glancy, R. 1985. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med. J. Aust.* 142(8): 436-439.
79. Matin, A., Zychlinsky, E., Keyhan, M., Sachs, G. 1996. Capacity of *Helicobacter pylori* to generate ionic gradients at low pH is similar to that of bacteria which grow under strongly acid conditions. *Infect. Immun.* 64: 1434-1436.
80. Mauch, F., Bode, G. y Malfertheiner, P. 1993. Identification and characterization of an ATPase system of *Helicobacter pylori* and the effect of proton pump inhibitor. Letter to the editor. *AJG.* 88:10
81. McGowan, C., Cover, T. y Blaser, M. Analysis of F1F0-ATPase from *Helicobacter pylori*. 1997. *Infect. Immun.* 65(7): 2640-2647.
82. Megraud, F., Bonnet, F., Garnier, M., and Lamouliatte. 1985. Characterization of *Campylobacter pyloridis* by culture , enzymatic profile and protein content. *J. Clin. Microbiol.* 22: 1007-1010.
83. Melchers, K., Weitzenegger, T., Buhmann, A., Steinhilber, W., Sachs, G., Schafer, K. 1996. Cloning and membrane topology of a P type ATPase from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 271(1): 446-457.
84. Mendz, G. y Hazell, S. 1993. Glucose phosphorylation in *Helicobacter pylori*. *Arch. Biochem. Biophys.* 300: 522-525
85. Mendz, G. y Hazell, S. 1995. Amino acid utilization by *Helicobacter pylori*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27: 1085-1093..
86. Mendz, G., Burns, B. y Hazell, S. 1995. The glucose transporters of *Helicobacter pylori*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1244: 269-276
87. Mendz, G., Hazell, S. Vanjorkom, L. 1994. Pyruvate metabolism in *Helicobacter pylori*. *Arch. Microbiol.* 162, 187-192.
88. Mendz, G., Hazell, S. y Burns, B. 1993. Glucose utilization and lactate production by *Helicobacter pylori*. *J. Gen. Microbiol.* 139: 3023-3028.
89. Mendz, G., Hazell, S. y Burns, B. 1994. The Entner- Doudoroff pathway in *Helicobacter pylori*. *Arch. Biochem. Biophys.* 312: 349-356.
90. Mendz, G., Hazell, S. y Srinivasan, S. 1995. Fumarate reductase - a target for therapeutic intervention against *Helicobacter pylori*. *Arch. Biochem. Biophys.* 321: 153-159.
91. Mendz, G., y Hazell, S. 1991. Evidence for a pentose phosphate pathway in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol. Letters.* 84: 331-336.

92. Mendz, G., y Hazell, S. 1994. Glucose metabolism by *Helicobacter pylori*. *Microbiology*. 140: 2179-2180.
93. Meyer-Rosberg, K., Scott, D., Rex, D., Melchers, K., Sachs, G. 1996. The environmental pH on the proton motive force of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 111(4): 886-900.
94. Mobley, H., Island, M. y Hansinger, R. 1995. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* 59: 451-480.
95. Morgan, D., Freedman, R., Depew, C., Kraft, W. 1987. Growth of *Campylobacter pylori* in liquid media. *J. Clin. Microbiol.* 25(11): 2123-2125.
96. Moss, C. y Calam, J. 1992. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer: present position. *Gut*. 33: 289-292.
97. Nagata, K., Tsukita, S y Sone, N. 1996. A cb-type cytochrome-c oxidase terminates the respiratory chain in *Helicobacter pylori*. *Microbiol.* 142: 1757-1763.
98. Nedenskov, P. 1994. Nutritional Requirements for Growth of *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(9): 3450-3453.
99. O'Connor, H. 1992. *Helicobacter pylori* and gastric cancer –a review and hypothesis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 4: 103-109
100. O'Connor, H. 1994. The role of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 29: 11-15.
101. Odum, L. y Andersen L. 1995. Investigation of *Helicobacter pylori* ascorbic acid oxidising activity. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 10: 289-294.
102. Oliva, G., Romero, I., Ayala, G., Barrios-Jacobo, I. y Celis, H. 2000. Characterization of the inorganic pyrophosphatase from the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*. *Archives of Microbiology*. (en prensa)
103. Oliver, J. 1993. Formation of viable but non-cultureable cells. In: Starvation in Bacteria. Kjellerberg, S. ed. Plenum Press. New York. 239-272 pp.
104. Olivieri, R., Bugnoli, M., Armellini, D., Bianciardi, S., Rappuoli, R., Bayeli, P., Abate, L., Esposito, E., de Gregorio, L., Aziz, J. *et al.* 1993. Growth of *Helicobacter pylori* in media containing cyclodextrins. *J. Clin. Microbiol.* 31(1): 160-162.
105. Ottlecz, A., Romero, J., Hazell, S., Graham, D., Lichtenberger, L. 1993. Phospholipase activity by *Helicobacter pylori* and its inhibition by bismuth salts - biochemical and biophysical studies. *Dig. Dis. Sci.* 38(11): 2071-2080.
106. Patte, J. 1996. Biosynthesis of threonine and lysine. In Neidhardt, F. *et al.* (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology. Washington, D.C. p. 458-484.
107. Piotrowski, J., Morita, M., Slomiany, A. y Slomiany, B. 1992. Inhibition of gastric mucosal laminin receptor by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. Effect of ebrotidine. *Biochem Int.* 27: 131-138.
108. Pitson, S., Mendz, G., Srinivasan, S., Hazell, S. 1999. The tricarboxylic acid cycle of *Helicobacter pylori*. *Eur. J. Biochem.* 260(1): 258-267.

109. Quigley, E. y Turnberg, L. 1987. pH of the microclimate lining human gastric and duodenal mucosa *in vivo*. *Gastroenterol.* 92: 1876-1883.
110. Reitzer, L. 1996. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine. In Neidhardt, F. *et al.* (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology. Washington, D.C. p. 391-407.
111. Reynolds, D. y Penn, C. 1994. Characteristics of *Helicobacter pylori* growth in a defined medium and determination of its amino acid requirements. *Microbiology.* 140: 2649-2656.
112. Romero, I. Gómez-Priego, A. y Celis, H. 1991. A membrane-bound pyrophosphatase from respiratory membranes of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2611-2616.
113. Schwarm, H-M., Vigneschow, H., Knoblock, K. 1986. Purification and properties of a soluble inorganic pyrophosphatase from *Rhodopseudomonas palustris*. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 367:119-126.
114. Shahamat *et al.* 1993. Use of autoradiography to assess viability of *Helicobacter pylori* in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1231-1235.
115. Smith, M. Y Edwards, D. 1997. Oxygen scavenging NADH oxidase and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J. Antimicrob. Chemother.* 39: 347-353.
116. Sobala, G. *et al.* 1990. Reflux gastritis in the intact stomach. *J. Clin. Pathol.* 43: 303-306.
117. Stackebrandt, E., Murray, R. y Truper. 1988. Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the purple bacteria and their relatives. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 321-325
118. Storko, R. 1989. Polyphosphate as a source of phosphoryl group in protein modification in the archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochimie.* 71: 1089-1093.
119. Sumner, J. 1944. A method for the colorimetric determination of phosphorous. *Science* 100: 413-415.
120. Sung, J., Chung, S., Ling, T., Yung, M., Leung, V., Ng, E., Li, M., Cheng, A., Li, A. 1995. Antibacterial treatment of gastric ulcers associated with *Helicobacter pylori*. *N. Engl. J. Med.* 332(3): 139-142.
121. Szejtli, J. 1988. Cyclodextrin technology. Kluwer Dordrecht: Academic. 450 p.
122. Tomb, J., *et al.* 1997. The complete genome of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* 388, 539-547.
123. Trumpower, B. y Gennis, R. 1994. Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: The enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation.. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 675-716.

124. Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Nagano, K., Ito, T., Hayashi, N., Fusamoto, H., Kamada, T., Tamura, K. 1992. Ammonia –a possible promoter in *Helicobacter pylori*-related gastric carcinogenesis. *Cancer Lett.* 65(1): 15-18.
125. Tsukita, S., Koyanagi, S., Nagata, K., Koizuka, H., Akashi, H., Shimoyama, T., Tamura, T., Sone, N. 1999. Characterization of a cb-type cytochrome c oxidase from *Helicobacter pylori*. *J. Biochem.* 125(1): 194-201
126. Vaira, D., Ferron, P., Negrini, R. *et al.* 1992. Detection of *Helicobacter pylori*-like organisms in the stomach of some food-source animals using a monoclonal antibody. *Ital. J. Gastroenterol.* 24, 181-184.
127. van Alebeek G-JWM, Keltjens JT, van der Drift C (1994) Purification and characterization of inorganic pyrophosphatase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain  $\Delta$ H) *Biochem Biophys Acta* 1206: 231-239.
128. van Dyke, R. *et al.* 1985. Identification and characterization of ATP-dependent proton transport by rat liver multivesicular bodies. *J. Biol. Chem.* 26: 11021-11026.
129. Warren, JR. y Marshall, BJ. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet.* 2: 1273-1275
130. Winkler, M. 1996. Biosynthesis of histidine. In Neidhardt, F. *et al.* (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology. Washington, D.C. p. 485-505.
131. Woese, C., *et al.* 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4576-4579.
132. Wotherspoon, A. *et al.* 1993. *Lancet.* 342: 575-577
133. Wyatt, J. *et al.* 1987. *Campilobacter piloridis* and acid-induced metaplasia in the pathogenesis of duodenitis. *J. Clin. Pathol.* 40: 841-848.
134. Wyatt, J. Y Dixon, M. 1988. Chronic gastritis –a pathogenic approach. *J. Pathol.* 154: 113-124.
135. Xia, D., Yu, C., Kim, H., Xia, J., Kachurin, A., Zhang, L., Yu, L., Deisenhofer, J. 1997. Crystal structure of cytochrome bc<sub>1</sub> complex from bovine heart mitochondria. *Science.* 277(5322): 60-66.
136. Yagi, T., Yano, T., Di Bernardo, S., Matsuno-Yagi, A. 1998. Prokaryotic complex I (NDH-1), an overview. *Biochim. Biophys. Acta.* 1364(2): 125-133.
137. Zollner, H. 1993. Handbook of enzyme inhibitors. 2da. VCH. Alemania. 1065 pp.