



59
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

«ACTIVIDAD CITOTOXICA VACUOLIZANTE QUE
PRESENTAN LOS SOBRENADANTES DE CEPAS DE
Helicobacter pylori OBTENIDAS DE ADULTOS CON
GASTRITIS CRONICA Y ULCERA DUODENAL»

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

CAROLINA MARIA ANTONIETA ROMO GONZALEZ

A S E S O R E S :

M. EN C. GERARDO GONZALEZ VALENCIA

DR. VICTOR ZENDEJAS BUITRON

9 83607

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO 2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Actividad citotóxica vacuolizante que presentan los sobrenadantes de cepas de Helicobacter pylori obtenidas de adultos con gastritis crónica y úlcera duodenal

que presenta la pasante Carolina María Antonieta Romo González
con número de cuenta: 90149256 para obtener el TÍTULO de.
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 14 de Diciembre de 199 9.

PRESIDENTE	Q.F.I. Andrea Becerril Osnaya	<u>Andrea A. Becerril Osnaya</u>
VOCAL	Dr. Marco Antonio Vega López	<u>Marco Antonio Vega López</u>
SECRETARIO	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	<u>Víctor Manuel Zendejas Buitrón</u>
PRIMER SUPLENTE	M.V.Z. Angel G. Martínez Sosa	<u>Angel G. Martínez Sosa</u>
SEGUNDO SUPLENTE	Q.F.B. Marcela Hernández Vargas	<u>Marcela Hernández Vargas</u>

DEDICATORIAS

A mis padres: Manuel y María Elena

Por brindarme incondicionalmente siempre su apoyo y su invaluable amor de padres, de ustedes he aprendido el verdadero valor de la vida; todas las palabras serian insuficientes para agradecer todo su esfuerzo y dedicación en mi formación, ¡son lo mas preciado que poseo!.

A mis Hermanas: Gloria y Anabell
por su compañía y comprensión, durante toda nuestra vida juntas porque ustedes son las mejores amigas que tengo.

A Roberto:

Millones de palabras me serian insuficientes para compensar toda la ayuda que me brindaste en la realizacion de mi tesis. Las metas y triunfos en la vida se comparten con la persona que uno ama, por ello quiero compartir contigo esta importante meta por que fuiste parte importante de ella, y decirte que: La razón de amar... la encontramos viviendo; el sentido de vivir... lo encontramos amando y lo he encontrado contigo ¡GRACIAS por contar con tu apoyo!.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por permitirme forjarme un futuro dentro de la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán**.

A la **Dra. Gilda Flores Rosales** de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por su enorme enseñanza y por brindarme su confianza.

Al **Dr. Javier Torres López** Jefe de la Unidad de Investigación en enfermedades infecciosas y parasitarias del Hospital de pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, por brindarme la oportunidad de realizar mi tesis de licenciatura en dicha unidad.

Al **M. en C. Gerardo González Valencia** mi asesor de tesis, las más infinitas gracias por el apoyo y paciencia que siempre me brindo al permitirme desempeñarme como profesionista.

Al **Dr. Víctor Zendejas Buitrón** asesor interno de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por su apoyo y paciencia, siempre en la mejor disposición de ayudarme, gracias.

A mis sinodales: **Dr. Marco Antonio Vega López** por su disposición y atención en mi trabajo, **M.V.Z. Angel G. Martínez Sosa** por su disposición en la revisión de mi trabajo, a la **Q.F.I. Andrea Beceril Osnaya** por su valiosa participación en la revisión de mi trabajo y a la **Q.F.B. Marcela Hernández Vargas** por su disposición incondicional en la revisión de mi trabajo, a todos ellos ¡**Gracias!**

A mis compañeros y amigos de la facultad: Eduardo López Orduña y Minerva Ortega por haber compartido conmigo muchos momentos gratos dentro de las aulas.

Adriana Reyes compañera de la FES Cuautitlán por su apoyo y compañía, así como **Araceli Torres, Yelda Leal y Othón Rojas** por su apoyo, todos ellos del laboratorio de bacteriología de la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias CMN Siglo XXI.

INDICE

Abreviaturas	i
Índice de figuras.....	iii
Índice de tablas.....	v
Resumen.....	1
1. Historia.....	2
2. Características microbiológicas	
2.1 Morfología.....	5
2.2 Genoma y plasmidos.....	5
2.3 Respiración y metabolismo.....	5
2.4 Membrana celular y lipopolisacárido.....	5
2.5 Requerimientos nutricionales.....	6
3. Epidemiología	
3.1 Transmisión.....	8
3.2 Asociación con enfermedades particulares.....	8
4. Patogénesis de la infección	
4.1 Manifestaciones clínicas.....	8
4.2 Mecanismos de daño al tejido.....	10
4.3 Adhesinas y receptores.....	21
4.4 Evasión inmunológica.....	21
5. Diagnóstico de la infección	
5.1 Métodos que requieren endoscopia.....	22
5.2 Métodos que no requieren endoscopia.....	24
5.3 Diagnóstico postratamiento.....	26
6. Tratamiento	27
Justificación.....	30

Hipótesis y Objetivos	31
7. Diseño experimental	32
7.1 Material.....	33
Diagrama de trabajo.....	36
7.2 Metodología	
7.2.1 Obtención de <i>Helicobacter pylori</i>	
7.2.1.1. Muestras.....	37
7.2.1.2. Procesamiento de muestras.....	37
7.2.1.3. Obtención de sobrenadantes.....	37
7.2.2 Ensayo citotóxico con sobrenadantes concentrados	
7.2.2.1. Cultivo de células HeLa.....	37
7.2.2.2. Tripsinización de células.....	38
7.2.2.3. Conteo de células.....	38
7.2.2.4. Preparación de microplaca.....	38
7.2.2.5. Tinción de la microplaca con Giemsa.....	39
7.2.3 Ensayo de neutralización del efecto citotóxico.....	39
7.2.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	41
7.2.5 Inmunoelectrotransferencia.....	43
Resultados	45
Discusión	58
Conclusiones	63
Anexo	64
Bibliografía	67

ABREVIATURAS

AGS COS-7 = líneas celulares de cáncer gástrico

cag A = gen asociado a la citotoxina

DT= Toxina difterica

GC= gastritis crónica

GTP= Trifosfato de guanosina

HP-NAP= proteína de adherencia neutrofilos- *H. pylori*

IET = inmunoelectrotransferencia

iNOS= óxido nítrico sintetasa

kDa = kilodaltons

LPS = lipopolisacárido

MALT = tejido linfoide asociado a la mucosa

MEM-SFB = medio mínimo esencial- suero fetal bovino

IBP's = inhibidores de la bomba de protones

PAF = factor activador de plaquetas

PCR = reacción en cadena de la polimerasa

PMN = polimorfonucleares

RT-PCR =reacción en cadena de la polimerasa- transcriptasa reversa

ROS = especies reactivas de oxígeno

SDS-PAGE = electroforesis en geles de poliacríamida- dodecil sulfato de sodio

Tox* = cepa toxigénica

Tox = cepa no toxigénica

UD = úlcera duodenal

vac A = gen de la citotoxina vacuolizante

UBT = prueba de urea en aliento

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Helicobacter pylori</i> causante de diversas enfermedades ácido-pepticas	4
Figura 2. Barry Marshall médico del Hospital australiano de Royal Perth creador de la fundación <i>Helicobacter</i>	4
Figura 3. Tinción de Gram de un aislado de <i>Helicobacter pylori</i>	7
Figura 4. Prueba de la ureasa en aliento	26
Figura 5. Células HeLa en MEM-SFB 10% en presencia de sobrenadantes después de 12 hrs de incubación	48
Figura 6. Células HeLa teñidas con Giemsa en ausencia de sobrenadante....	48
Figura 7. Efecto citotóxico vacuolizante sobre células HeLa teñidas con Giemsa después de 24 hr de incubación.....	49
Figura 8. Efecto citotóxico vacuolizante sobre células HeLa teñidas con Giemsa después de 24 hr de incubación	49
Figura 9. Grado de actividad citotóxica vacuolizante que presentan sobrenadantes positivos sobre células HeLa teñidas con Giemsa citotoxicidad alta.....	50
Figura 10. Grado de actividad citotóxica vacuolizante que presentan sobrenadantes positivos sobre células HeLa teñidas con Giemsa citotoxicidad media.....	51
Figura 11. Grado de actividad citotóxica vacuolizante que presentan sobrenadantes positivos sobre células HeLa teñidas con Giemsa citotoxicidad baja.....	51
Figura 12. Grado de actividad citotóxica vacuolizante de los sobrenadantes que presentaron efecto citotóxico sobre células HeLa	54

Figura 13. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10% correspondiente a sobrenadantes de adultos con gastritis crónica	55
Figura 14. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10% correspondiente a sobrenadantes de adultos con úlcera duodenal	55
Figura 15. Inmunoelectrotransferencia de los sobrenadantes de <i>H. pylori</i> de adultos con úlcera duodenal	56
Figura 16. Inmunoelectrotransferencia de los sobrenadantes de <i>H. pylori</i> de adultos con úlcera duodenal	56
Figura 17. Inmunoelectrotransferencia de los sobrenadantes de <i>H. pylori</i> de adultos con gastritis crónica	57
Figura 18. Inmunoelectrotransferencia de los sobrenadantes de <i>H. pylori</i> de adultos con gastritis crónica.....	57

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las gastritis	11
Tabla 2. Factores que facilitan la permanencia de <i>H. pylori</i> en el estómago.....	23
Tabla 3. Algunos genes de <i>H. pylori</i> que codifican ciertas proteínas	23
Tabla 4. Pruebas de diagnóstico para la detección de <i>H. pylori</i>	27
Tabla 5. Regímenes de tratamiento actual para pacientes con enfermedad ácido-peptica apoyados por la FDA	29
Tabla 6. Distribución de sobrenadantes para el ensayo de citotoxicidad sobre células HeLa.....	40
Tabla 7. Distribución de sobrenadantes para el ensayo de neutralización del efecto citotóxico sobre células HeLa	41
Tabla 8. Resultados del aislamiento de <i>H. pylori</i> a partir de biopsias gástricas de adultos con gastritis crónica	45
Tabla 9. Resultados del aislamiento de <i>H. pylori</i> a partir de biopsias gástricas de adultos con úlcera duodenal	46
Tabla 10. Resultados del efecto citotóxico vacuolizante presentado por los sobrenadantes de adultos con gastritis crónica y úlcera duodenal	47
Tabla 11. Resultados de los sobrenadantes obtenidos de cepas de <i>H. pylori</i> suspendidas en solución salina que presentaron efecto citotóxico sobre células HeLa.....	52
Tabla 12. Resultados de neutralización del efecto citotóxico vacuolizante de algunos sobrenadantes sobre células HeLa	54

RESUMEN

Entre la mitad y un tercio de la población mundial lleva en su estómago una bacteria «lenta», llamada *H. pylori*, que infecta la mucosa gástrica y causa úlceras y cáncer. En países desarrollados la infección en niños es rara, y la infección en adultos suele presentarse frecuentemente en personas mayores de 60 años. En cambio, en países en vías de desarrollo la infección en niños es alta y más de la mitad de los adultos mayores de 20 años se encuentran infectados. *H. pylori* es una bacteria Gram (-) de forma espiral, móvil, ureasa, catalasa y oxidasa positiva.

Para su cultivo *H. pylori* requiere de condiciones microaerofilicas y medios enriquecidos, su crecimiento es lento, aproximadamente 5-7 días. Entre sus factores de patogenicidad se incluyen, producción de ureasa, catalasa, proteína de choque térmico, movilidad, capacidad para adherirse a la mucosa gástrica, presencia de una citotoxina (VacA), una proteína denominada CagA y su lipopolisacárido entre otros. La producción de la citotoxina denominada VacA se encuentra asociada a padecimientos de úlcera y gastritis, la cual es producida por aproximadamente el 50% de las cepas de *H. pylori*. VacA produce vacuolización citoplasmática en células eucariotas.

El desarrollo del presente trabajo consistió en aislar *H. pylori* de biopsias gástricas provenientes de adultos con gastritis crónica y úlcera duodenal, para obtener sobrenadantes a partir de cepas de *H. pylori* suspendidas en solución salina y observar si dichos sobrenadantes presentan efecto citotóxico vacuolizante sobre células HeLa provocado por la toxina de *H. pylori*, que puede estar presente en los sobrenadantes y de esta manera saber si la cepa es productora o no de toxina (cepa citotóxica). Mediante un ensayo de neutralización del efecto citotóxico, así como inmunoelectrotransferencia en sobrenadantes que presentaron efecto citotóxico vacuolizante sobre el cultivo celular, se confirmó que dicho efecto es debido a la presencia de la toxina en los sobrenadantes.

Los datos obtenidos se relacionaron con el diagnóstico clínico de cada adulto, se encontró que más de la mitad de las cepas estudiadas fueron citotóxicas, los adultos con úlcera duodenal presentaron mayor número de cepas citotóxicas comparado con las cepas de adultos con gastritis crónica. Se observó neutralización del efecto citotóxico vacuolizante sobre células HeLa, y mediante IET hubo reconocimiento del anticuerpo anti VacA hacia dos bandas de aproximadamente 89 kDa y 55 kDa que se encontraban en los sobrenadantes.

1. HISTORIA

El primer aislamiento de *Helicobacter pylori* se logró en 1982, (Marshall y Warren, 1984), a partir de ese momento se creó la era de la microbiología gástrica (ver Figuras 1 y 2). Este microorganismo vive en el estómago y duodeno sin embargo, se ha observado que en la capa de la mucosa gástrica puede permanecer por décadas. En 1979 Robin Warren, patólogo del Hospital Australiano de Royal Perth observó que en las biopsias gástricas de algunos pacientes existían bacterias curvadas que se encontraban bajo la capa de la mucosa. Al investigar, encontró que ciertos anatomopatólogos habían descubierto la presencia de microorganismos semejantes tiempo atrás, pero nunca pudieron cultivarlos *in vitro* (Blaser, 1996b).

En 1981 un joven especialista en medicina interna, Barry Marshall, colaborador de Warren, estuvo interesado en estas observaciones e intentó aislar al microorganismo de las biopsias pero, no tuvo éxito ese año. Sin embargo, observando que las bacterias poseían apariencia curvada semejante a especies de *Campylobacter*, utilizó el medio de aislamiento de este género, el cual involucra la inoculación de la biopsia en un medio selectivo incubando bajo condiciones microaerofílicas. No fue sino hasta un año más tarde, cuando al dejar incubando algunas placas por más tiempo del normal, aproximadamente cinco días, por fin se observaron colonias, que por su semejanza con las bacterias del género *Campylobacter*, llamaron al nuevo microorganismo *Campylobacter pyloridis* actualmente llamado *Helicobacter pylori*.

Marshall y Warren publicaron los primeros resultados y enseguida de esta publicación, investigadores de todo el mundo rápidamente confirmaron la presencia de este microorganismo en la mucosa gástrica. Viendo que este nuevo microorganismo no encajaba dentro del género *Campylobacter* decidieron ponerle *Helicobacter*, posteriormente se confirmó el hallazgo inicial de Warren: la infección por *Helicobacter pylori* iba frecuentemente asociada a una inflamación persistente en el estómago denominada gastritis superficial crónica. En uno de los estudios que realizaron algunos voluntarios, Marshall, incluido entre ellos llegaron a ingerir *H. pylori* esperando demostrar que esta bacteria podría provocar úlcera de estómago (Blaser, 1996b).

Para 1984 se tenía claro que la infección por *H. pylori* estaba asociada fuertemente con la presencia de inflamación en la mucosa gástrica. En 1991 los primeros cuatro reportes mostraron asociación entre la infección con *H. pylori* y el desarrollo de cáncer gástrico (Telley, *et al*/1991; Wotherspoon, *et al* 1991). En 1994 el Instituto Nacional de Salud de E.U. concluyó, que *H.*

pylori es el causante principal de úlcera péptica y recomendó que los individuos fueran tratados para erradicar al microorganismo. También en ese año la agencia internacional para la investigación del cáncer en unión con la Organización Mundial de la Salud revisaron y declararon a *H. pylori* como un carcinógeno de humanos. La infección también está asociada con el desarrollo de desórdenes linfoproliferativos; como ocurre en el tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (MALT) llamado linfoma (MALToma), frecuentemente el tratamiento con antibióticos a pacientes con MALToma conduce a la regresión del tumor (Walt, 1996).

H. pylori es una bacteria que actualmente se ha asociado con muchas de las más importantes enfermedades involucradas en el tejido gastroduodenal. Actualmente es un hecho que casi todas las personas infectadas con *H. pylori* adquieren gastritis superficial crónica, la cual si no es tratada se pueden prolongar por decenios e incluso de por vida. Esta infección puede evolucionar en úlcera de estómago o duodeno, pudiendo provocar cáncer de estómago.

Hace cuarenta años los médicos sabían que la mayoría de la gente que padecía úlcera gástrica también padecía gastritis superficial crónica. Durante generaciones se pensó que el estrés provocaba que el estómago produjera más ácido, y que esto a su vez generaba úlcera, ya que se tenía por cierta la creencia de esta frase: «no hay ácido, no hay úlcera». Aunque la acidez gástrica es necesaria para que se forme una úlcera, no basta para explicar su aparición.

La relación de estrés-acidez tuvo importancia en los años sesenta, razón por la cual se empezaron a administrar antiácidos. También fueron utilizados bloqueadores del receptor H-2 de la Histamina ya que se pensaba que curaban la úlcera, pero no era así. Actualmente se sabe que estos padecimientos gastroduodenales son debidos a una infección y era difícil imaginar años atrás, que la gastritis crónica y la úlcera de estómago se tratarían con antibióticos.



Figura 1. *Helicobacter pylori*, causante de diversas enfermedades ácido-pépticas, en el estómago de un humano visto a una ampliación de 8000 aumentos. (Foto tomada de Blaser, 1996b).



Figura 2. Barry Marshall, Médico del hospital australiano de Royal Perth quien crea la «Fundación *Helicobacter*» en 1994 la cual provee a la gente con información sobre *Helicobacter pylori* y sus efectos. (Foto tomada de la página de internet wysiwyg://pylori.7/http://vianet.net.au/bjmrshll/).

2. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

2.1. Morfología: *H. pylori* es una bacteria microaerofílica Gram negativa, de forma espiral que se encuentra en biopsias gástricas, es ureasa, catalasa y oxidasa positivas. Después de prolongados cultivos en medio sólido adquiere una forma cocoide (Bode, *et al* 1993) que se sabe es metabólicamente activa aunque no puede ser cultivada *in vitro*. *H. pylori* mide 2.5 a 5.0 μm de largo y 0.5 a 1.0 μm de ancho. Para su motilidad cuenta con 4 a 6 flagelos unipolares los cuales miden aproximadamente 30 μm de largo y 2.5 μm de ancho. La morfología colonial de *H. pylori* es representada por colonias pequeñas (1-2 mm), lisas y con una ligera hemólisis (Mones, *et al* 1994; Goodwin y Armstrong, 1990).

2.2. Genoma y plasmidos: El tamaño del genoma se encuentra en un rango de 1.6 a 1.73 Mb, con un promedio de 1.67 Mb. La localización variable de múltiples genes en el mapa genómico explica el extenso rearrreglo que ocurre en el genoma de *H. pylori*. Este genoma exhibe diversidad de secuencias significativas en múltiples genes incluyendo: el que codifica para la ureasa estructural (Foxall, *et al* 1992) y proteínas, tales como la flagelina, la citotoxina vacuolizante (Cover, *et al* 1994; Garner y Cover, 1995) y CagA (Weel, *et al* 1996). Se ha estudiado la variación alelica de seis genes y se ha confirmado la diversidad de cepas de *H. pylori*. La publicación del mapa genómico de *H. pylori* es importante para conocer más sobre la variación y metabolismo de esta bacteria (Tomb, *et al* 1997).

2.3. Respiración y Metabolismo: Se ha logrado identificar bien la actividad enzimática de la vía pentosa fosfato. Posee actividad del ciclo de la urea, el cual puede servir como un buen mecanismo para eliminar el exceso de nitrógeno en la bacteria. La vía Entner-Doudoroff se tiene demostrada en *H. pylori*. La fumarato reductasa es un componente esencial para su metabolismo pudiendo constituir un blanco para la intervención terapéutica. *H. pylori* metaboliza aminoácidos por vía fermentativa, y se sabe que existen citocromos involucrados en la cadena respiratoria. El nivel elevado de CO_2 requerido para su crecimiento *in vitro* puede ser debido en parte a la actividad de la enzima acetil coenzima A carboxilasa. También contiene gránulos de polifosfato los cuales pueden funcionar como una fuente de reserva energética en bacterias asociadas con degeneración del epitelio, mientras la fuente de energía exógena puede estar ausente (Stuart, *et al* 1997).

2.4. Membrana celular y lipopolisacárido: Se tienen identificadas una variedad de proteínas de membrana externa (OMPs) cuya masa

molecular se encuentran en un rango de 31 a 80 kDa. Entre ellas se encuentran la ureasa y Hsp B, un homólogo de la proteína GroEL de *E. coli* las cuales son abundantes en preparaciones de OMP. La ureasa y HspB están localizadas normalmente en el citoplasma en cultivos de *H. pylori* cuando su crecimiento se encuentra en fase logarítmica (Phadinis, *et al* 1996). Sin embargo, después de la fase logarítmica ureasa y HspB se encuentran en la superficie de la bacteria.

El análisis de *H. pylori* en biopsias gástricas de humanos, demostraron que la adsorción a la superficie tanto de ureasa y HspB también ocurre *in vivo*. Las proteínas de membrana integral de *H. pylori* evaden la detección inmunológica contribuyendo a la persistencia de la bacteria, aún en presencia de una respuesta inmunológica humoral y celular. Una familia de cuatro moléculas llamadas porinas designadas como HopA, HopB, HopC y HopD de aproximadamente 48 a 67 kDa de peso, se tienen purificadas y caracterizadas. Cada proteína forma poros con pequeños canales conductores entre la capa lipídica de la membrana.

Una porina adicional, la HopE tiene homología a la porina p2 de *Haemophilus influenzae*, siendo antigénica en individuos infectados. Algunos de las OMPs de *H. pylori* son inhibidas con hierro; tales proteínas pueden estar involucradas en la toma del grupo hemo del hospedero. El LPS de *H. pylori* tiene baja actividad biológica, esta propiedad puede contribuir a la infección. La cadena específica O del LPS de *H. pylori* presenta mimetismo molecular con la estructura de antígenos del grupo sanguíneo Lewis (Appelmelk, *et al* 1996, Aspinall y Monteiro, 1996). El mimetismo molecular entre el LPS de *H. pylori* y el huésped pueden contribuir a la patogénesis.

2.5. Requerimientos nutricionales: *H. pylori*, requiere para su crecimiento *in vitro* un medio complejo basal (sólido o líquido) es decir un medio enriquecido como agar-sangre o con antibióticos agar-skirrow, con algunas formas de suplementación tales como, sangre completa, suero, glicerol, almidón de maíz o emulsión de yema de huevo, mientras algunos de estos suplementos sirven como sustratos nutricionales y funcionan detoxificando el medio y protegiendo al microorganismo. Los aislados crecen mejor bajo condiciones microaerofílicas (CO₂ 10%; O₂ 10%; N₂ 80%). El crecimiento en medio líquido debe llevarse a cabo por agitación e incubación en atmósfera de CO₂. El crecimiento de *H. pylori* ocurre de 30° a 37°C pero no a 25°C y puede ocurrir un crecimiento variable a 42°C (Coudron y Stratton, 1995).

Figura 3. Tinción de Gram de un aislado de *Helicobacter pylori*, el cual se observa como un bacilo curvado. (Fotografía obtenida del laboratorio de bacteriología de la UIMEIP de CMN siglo XXI, IMSS).

3. EPIDEMIOLOGÍA

En países en vías de desarrollo entre el 70-90% de la población está infectada con *H. pylori*, la mayoría adquiere la infección después de los 10 años de edad (Taylor y Darsonnet, 1994). En países desarrollados la prevalencia de infección es menor, el rango es de 25-50%. Los datos en países desarrollados también sugieren que la mayoría de las infecciones son adquiridas en la infancia. Se tiene evidencia que la incidencia de la infección por *H. pylori* está relacionada con los cambios en el desarrollo industrial (Logan y Hirschl, 1996; Pounder, 1995; Parsonnet, 1995; Parsonnet, 1992).

Varios estudios sugieren que tanto hombres como mujeres se infectan aproximadamente en la misma proporción. Sin embargo, en un estudio con un número menor de personas estudiadas, el sexo masculino es un factor significativamente más alto de riesgo para la infección (Replogue, *et al* 1995). En México, en un estudio seroepidemiológico a nivel nacional se encontró que el 20% de niños menores de un año de edad se encuentran infectados; a los 10 años el porcentaje aumenta a un 50% y a los 25 años el 80% de la población esta infectada, al igual que otros estudios, se demostró que la edad avanzada, alto grado de hacinamiento y nivel socioeconómico bajo son factores de riesgo para la infección con *H. pylori* (Torres, *et al* 1996).

3.1. Transmisión. Se han propuesto tres rutas o formas de transmisión: la primera y menos común es la *iatrogénica*, en la cual tubos endoscópicos o artefactos en contacto con la mucosa gástrica de una persona son introducidos a otra persona. La previa desinfección de estos ha reportado reducción en la incidencia de transmisión. Segunda, *transmisión fecal-oral* es quizá la más importante, ya que *H. pylori* se ha aislado de heces en un niño infectado con este microorganismo, aunque el aislamiento fecal no es común. La contaminación fecal del agua puede ser otra fuente de infección (Klein *et al* 1991), aunque el microorganismo no se ha aislado del agua, la transmisión a través de la comida no ha sido bien sustentada; finalmente la *transmisión oral-oral* se ha identificado en el caso de mujeres africanas quienes premastican la comida que dan a sus hijos (Thomas, *et al* 1992).

3.2. Asociación con enfermedades particulares. Todas las personas infectadas con *H. pylori* desarrollan inflamación gástrica que normalmente es asintomática. Sin embargo, la úlcera péptica se considera idiopática o debida a agentes tales como aspirina o drogas antiinflamatorias no esteroideas. La forma idiopática de la úlcera péptica representa entre el 60-90% de todos los casos (dependiendo del grado en el uso de drogas antiinflamatorias no esteroideas en la población). Ahora se conoce que *H. pylori* es normalmente el causante de todos estos casos en adultos, así como la fuerte asociación de riesgo a desarrollar gastritis atrófica, en los pacientes infectados la cual es precursora de la lesión para cáncer gástrico. Esta asociación es extremadamente importante, ya que el cáncer gástrico es la segunda causa principal de muerte por cáncer en el mundo (Correa, 1992).

4. PATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN

4.1. Manifestaciones clínicas de la infección. La colonización del estómago con *H. pylori* induce inflamación gástrica (Blaser, 1992; Moran y Wadstrom, 1998; Blaser, 1990). La histopatología de la infección por *H. pylori* ha sido difícil de clasificar. La inflamación de la mucosa gástrica o gastritis es una entidad de diagnóstico histológico, siendo la patología más frecuente en gastroenterología. A pesar de ello, es aún una de las más desconocidas, por alguna de estas razones: 1) Esta presente sobre todo a partir de los 50 años en un número considerable de individuos asintomáticos, 2). Aunque se relaciona con cuadros clínicos de dispepsia, es evidente que hay una importante falla de correlación clínico-patológica. 3) Los estudios clínico-patológicos son difíciles por la imprescindible práctica de endoscopia y biopsias. 4) Confusión terminológica como consecuencia de las diferentes clasificaciones.

3.1. Transmisión. Se han propuesto tres rutas o formas de transmisión: la primera y menos común es la *iatrogénica*, en la cual tubos endoscópicos o artefactos en contacto con la mucosa gástrica de una persona son introducidos a otra persona. La previa desinfección de estos ha reportado reducción en la incidencia de transmisión. Segunda, *transmisión fecal-oral* es quizá la más importante, ya que *H. pylori* se ha aislado de heces en un niño infectado con este microorganismo, aunque el aislamiento fecal no es común. La contaminación fecal del agua puede ser otra fuente de infección (Klein *et al* 1991), aunque el microorganismo no se ha aislado del agua, la transmisión a través de la comida no ha sido bien sustentada; finalmente la *transmisión oral-oral* se ha identificado en el caso de mujeres africanas quienes premastican la comida que dan a sus hijos (Thomas, *et al* 1992).

3.2. Asociación con enfermedades particulares. Todas las personas infectadas con *H. pylori* desarrollan inflamación gástrica que normalmente es asintomática. Sin embargo, la úlcera péptica se considera idiopática o debida a agentes tales como aspirina o drogas antiinflamatorias no esteroideas. La forma idiopática de la úlcera péptica representa entre el 60-90% de todos los casos (dependiendo del grado en el uso de drogas antiinflamatorias no esteroideas en la población). Ahora se conoce que *H. pylori* es normalmente el causante de todos estos casos en adultos, así como la fuerte asociación de riesgo a desarrollar gastritis atrófica, en los pacientes infectados la cual es precursora de la lesión para cáncer gástrico. Esta asociación es extremadamente importante, ya que el cáncer gástrico es la segunda causa principal de muerte por cáncer en el mundo (Correa, 1992).

4. PATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN

4.1. Manifestaciones clínicas de la infección. La colonización del estómago con *H. pylori* induce inflamación gástrica (Blaser, 1992; Moran y Wadstrom, 1998; Blaser, 1990). la histopatología de la infección por *H. pylori* ha sido difícil de clasificar. La inflamación de la mucosa gástrica o gastritis es una entidad de diagnóstico histológico, siendo la patología más frecuente en gastroenterología. A pesar de ello, es aún una de las más desconocidas, por alguna de estas razones: 1) Esta presente sobre todo a partir de los 50 años en un número considerable de individuos asintomáticos, 2). Aunque se relaciona con cuadros clínicos de dispepsia, es evidente que hay una importante falla de correlación clínico-patológica. 3) Los estudios clínico-patológicos son difíciles por la imprescindible práctica de endoscopia y biopsias. 4) Confusión terminológica como consecuencia de las diferentes clasificaciones.

Hace veinte años las gastritis se clasificaban según el grado de afectación de la mucosa: gastritis superficial o atrófica; otro autor más tarde implicaría aspectos etiológicos, clasificándolas en: gastritis A de origen autoinmune, predominante en el cuerpo y en ocasiones asociada a anemia perniciosa y gastritis B no inmunológica, predominante en el antro y de etiología no conocida.

Posteriormente se propone otra clasificación que consiste en: gastritis específicas, que son infrecuentes como la eosinofilia, enfermedad de Menetrier, gastritis por reflujo y las gastritis no específicas que se subdividen en: a) aguda, a menudo atribuida al daño de la mucosa producido por infecciones, fármacos o sustancias irritantes, b) gastritis superficial con afectación poco profunda de la mucosa que podría representar estadios iniciales de otras formas de gastritis crónica o una forma de inflamación de la mucosa parecida a la gastritis aguda, aunque de menor intensidad y más prolongada con el tiempo y c) gastritis crónica que es una inflamación persistente de la mucosa, probablemente evolutiva provocando lentamente atrofia glandular de intensidad variable (Dixon, *et al* 1997).

En 1990 se elaboró una nueva clasificación con la que se pretende unificar criterios y se denomina clasificación de Sidney, la cual es completa, simple en su concepción, aunque extensa en su descripción debido a que refleja y reúne aspectos etiológicos, endoscópicos y morfológicos (Price, 1991).

No está claro aún como la infección por *H. pylori* encuentra su hábitat ideal en el moco gástrico, el cual está en contacto con el epitelio de superficie, que constituye la primera línea de defensa contra los agentes agresivos, principalmente pH ácido y pepsina. *H. pylori* encuentra en esta barrera sus nutrientes y se defiende de los iones H⁺ hidrolizando la urea, logrando así un microentorno alcalino.

Además esta bacteria posee enzimas (proteasas y lipasas) capaces de degradar el moco gástrico, reduciendo su viscosidad y, por tanto, su capacidad defensiva. También existen evidencias de que produce una citotoxina que lesiona las microvellosidades de las células de la mucosa gástrica, interrumpiendo las uniones intercelulares, debilitando de esta manera la segunda barrera defensiva, facilitando la aparición de erosiones superficiales y úlceras, ya que la mayoría de personas con úlcera péptica están infectadas con *H. pylori*.

Después de una infección con *H. pylori* está puede progresar provocando una úlcera, aunque no es condición para desarrollarla. Se le denomina úlcera a la excavación local de un tejido u órgano que generalmente se acompaña de necrosis e inflamación.

Úlcera péptica es un término colectivo utilizado para designar a las úlceras gástricas y duodenales. La pepsina no es el único factor etiológico de la ulceración péptica, aunque el término aún se utiliza. Dentro de la clasificación de las úlceras se tiene: úlcera gástrica aguda, que es la pérdida del grosor de la mucosa con o sin penetración hacia las capas más profundas, no existir inflamación alrededor; la úlcera gástrica crónica puede aparecer en cualquier lugar del estómago, aunque generalmente se localiza en la curvatura menor o en el antro; la úlcera duodenal aparece cuando existe una ruptura de la superficie de la mucosa duodenal, que generalmente se extiende hasta abarcar la muscularis mucosa, cubriéndose el lecho ulceroso de tejido inflamatorio de granulación.

4.2. Mecanismos de daño al tejido. *H. pylori* es capaz de colonizar y persistir en el único "nicho" biológico: el lumen gástrico. Los determinantes patogénicos de esta bacteria pueden ser divididos en dos grandes grupos: 1) *factores de virulencia* y 2) *factores de mantenimiento o conservación*, los cuales permiten la colonización de la bacteria y la permanencia dentro del hospedero. A los factores de virulencia se les puede atribuir el daño que puede causar *H. pylori*, que es la inflamación gástrica, disrupción en la barrera de la mucosa gástrica y alteración de la fisiología gástrica (Mauch *et al* 1993). Sin embargo, algunos factores que se clasifican dentro de los de mantenimiento o persistencia también son considerados como de virulencia *in vivo*.

(Tabla modificada de la referencia Dixon, *et al* 1997)

Tabla 1. CLASIFICACIÓN DE LAS GASTRITIS		
Tipo de gastritis	Factor etiológico	Sinónimos de gastritis
AGUDA		
<u>Hemorragica</u>	* NSAIDs-salicilatos Alcohol Estados Shock	Erosiva
<u>Relacionado con Helicobacter</u>	<i>Helicobacter pylori</i>	Neutrofilica Aguda infecciva
CRÓNICA		
<u>No atrofica</u>	<i>Helicobacter pylori</i> Otros factores ?	Superficial gastritis difusa antral Hipersecretoria Tipo B
<u>Atrifica</u>		
<u>Autoimmune</u>	Autoinmunidad	Tipo A Difusa corporal Asociado a anemia perniciosa
<u>Multifocal</u>	<i>Helicobacter pylori</i> Dieta Factores ambientales ?	Tipo B, TipoAB Medioambiente Metaplastica
FORMAS ESPECIALES		
<u>Sustancias químicas</u>	bilis * NSAIDs Otros irritantes ?	Reactiva Reflujo Tipo C
<u>Linfocitica</u>	Idiopatica <i>Helicobacter pylori</i> Gluten ?	Crónica erosiva
<u>Granulomatosa (no infecciva)</u>	Enfermedad de Crohn's Sarcoidosis Vasculitis	
<u>Eosinofílica</u>	Sensibilidad a alimentos Otras alergias	Alergica

* fármacos antiinflamatorios no esteroideos

Inducción de inflamación gástrica. Está caracterizada por infiltración de leucocitos polimorfonucleares y/o mononucleares dentro de la mucosa gástrica los cuales se encuentran presentes en pacientes infectados con *H. pylori* y a que algunos suponen que la inflamación es importante para la sobrevivencia de la bacteria *in vivo*.

(i) *Interleucina 8*.- Es un pequeño péptido secretado por una gran variedad de células, el cual es un potente mediador inflamatorio y activador de neutrófilos, algunos estudios han demostrado que cepas de *H. pylori* son capaces de inducir la secreción de IL-8 en células de carcinoma gástrico *in vitro* (Crabtree, *et al*/1995; Huang, *et al*/1995), las cepas que son VacA+ CagA+ producen significativamente más IL-8 que las que son VacA- CagA-.

(ii) *Adherencia a neutrófilos*.- Se tiene caracterizada una proteína de 150 kDa, que incrementa la adherencia de neutrófilos a las células endoteliales, la proteína es designada como HP-NAP la cual es un polímero de 10 subunidades identificadas (Evans, *et al*. 1992).

(iii) *Factor activador de plaquetas*.- El PAF es un mediador fosfolípido el cual es conocido como un potente agente ulcerogénico. En cambio Lyso-PAF es producido por células de la mucosa gástrica bajo condiciones basales y en respuesta a gastrina en personas sanas. El PAF estimula secreción de ácido gástrico vía específica de receptores de células parietales. *H. pylori* puede metabolizar el precursor Lyso-PAF el cual no es ulcerogénico. Sin embargo, a través de la síntesis de PAF inducida por *H. pylori* puede inducir daño a la mucosa directa o indirectamente aumentando la secreción ácida (Sobhani, *et al*. 1996).

(iv) *Lipopolisacárido*.- El LPS de *H. pylori* rompe u obstruye la mucosa gástrica interfiriendo entre la interacción de mucina con su receptor en la mucosa gástrica. Sin embargo, la principal característica de este LPS es su baja actividad proinflamatoria (Moran, 1996).

(v) *Ureasa*.- *H. pylori* posee ureasa, la cual es un potente activador del sistema fagocítico mononuclear e inductor de citocinas inflamatorias. *In vitro* la actividad de ureasa también es tóxica para las células epiteliales gástricas humanas. La ureasa parece funcionar como factor de mantenimiento y virulencia (Harris, *et al* 1996; Smoot, 1990).

Daño a la mucosa gástrica:

(i) *Fosfolipasa*.- *H. pylori* daña la capa protectora fosfolipídica de la membrana apical en células de la mucosa. Sin embargo, *in vitro* algunas fosfolipasas A2 y C expresadas por *H. pylori* pueden actuar sobre las capas de fosfolípidos, estos efectos pueden ser inhibidos por sales de bismuto.

(ii) *Mucinasa*.- *H. pylori* posee un gen, que es también idéntico al gen mucinasa de *Vibrio cholerae*, la actividad de esta enzima es expresada *in vivo* y puede contribuir a la disrupción de la barrera mucosal gástrica.

(iii) *Citotoxina vacuolizante*.- En 1986 un grupo de investigadores observaron la presencia de una toxina producida por *H. pylori*, la cual producía efectos citopáticos en algunas líneas celulares (Johnson y Lior, 1986), dos años más tarde otros investigadores encontraron que aproximadamente la mitad de las cepas de *H. pylori* producen una citotoxina vacuolizante *in vitro* la cual se caracteriza por formar vacuolas ácidas en el citoplasma de células eucariotas (Figura, *et al* 1989). Estudios posteriores demostraron que sobrenadantes de *H. pylori* obtenidos de cultivos en caldo sobre células HeLa inducen un efecto citotóxico vacuolizante (Cover, 1992a).

Es así como a partir de esto surgen una infinidad de estudios sobre el modelo de la citotoxina vacuolizante de *H. pylori*. Esta citotoxina se ha asociado a la patogenicidad, porque se ha encontrado que la infección con cepas productoras de toxina (cepas citotóxicas) prevalecen más en personas con úlcera duodenal, que en personas con gastritis (Cover, *et al* 1993a; Tee, *et al* 1993; Goossens, *et al* 1992; Phadnis, *et al* 1994). Las características del gen *vacA* que codifica para esta toxina han sido estudiadas por varios investigadores, los cuales han clonado el gen (Telford, *et al* 1994; Cover, *et al* 1994; Atherton, *et al* 1995). El gen *vacA* lo poseen todas las cepas de *H. pylori*, sin embargo no todas las cepas expresan la toxina.

Esta toxina permanece en la membrana externa de la bacteria y es liberada como un monómero de aproximadamente 90 kDa de peso molecular. En medio de cultivo y probablemente también *in vivo* algunos monómeros se unen al mismo tiempo para formar un oligómero de alto peso molecular.

El fragmento C-terminal de aproximadamente 58 kDa de la toxina de *H. pylori* exhibe homología con un fragmento C-terminal de la proteasa IgA de *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae*, este fragmento se conoce, esta involucrado en la traslocación de la proteasa a través de la mem-

brana exterior (Schmitt, 1994). Es posible que la adhesión a células blanco aumente la potencia de la toxina, esto se ha observado en pruebas *in vitro* de aislados clínicos los cuales mostraron que sólo las células vacuolizadas fueron las que tenían la bacteria adherida.

La diversidad de *vacA* ha sido estudiada, encontrándose importantes correlaciones clínicas, entre los alelos de este gen, los cuales están divididos en dos familias: los de la región media, llamados m1 y m2 y la familia de alelos de la secuencia señal s1a, s1b y s2. La familia de alelos s1a y s1b están muy relacionados pero son distintos. El gen *vacA* puede tener una de las seis posibles combinaciones de genotipos, de las regiones s y m. Se ha reportado que las cepas s2/m2 no son productoras de la toxina, cepas s1/m1 son altas productoras de toxina, y s1/m2 pueden presentar o no la producción. Sea estudiado la relación entre el nivel clínico de personas con enfermedad gastroduodenal y la genotipificación, y se ha observado que más de la mitad de las personas con úlcera tienen cepas con genotipo s1 (Atherton, *et al*/1995).

La presencia de *cagA* (gene A asociado a la citotoxina) esta muy relacionada con el gen *vacA* tipo s1 pues la mayoría de las cepas productoras de la toxina son también cepas CagA+. Sin embargo, este gen (*cagA*) no esta presente en todas las cepas de *H. pylori* a diferencia de *vacA*. Se calcula que entre 40-60% de las personas con gastritis están infectadas con cepas tipo CagA+ (Weel, *et al*/1996; Xiang, *et al*/1995; Fantry, *et al*/1996). El gen *cagA* codifica para una proteína de 120 a 130 kDa, denominada CagA, sin embargo, aún no se conoce su papel, pero se sabe que las cepas CagA+ inducen la producción de IL-8 *in vitro*, posteriormente se ha relacionado con el nivel de inflamación en la mucosa gástrica. En base a la relación existente entre *vacA* y *cagA* se clasifican las cepas de *H. pylori* en cepas: **tipo I** las cuales son VacA+ y CagA+ y están más asociadas con virulencia y grado de patogenicidad, que las cepas **tipo II** que son VacA- CagA- (Weel, *et al*/1996; Cover, *et al*/1994).

La citotoxina ha sido purificada y migra electroforéticamente como una proteína de aproximadamente 87 kDa bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras (Cover y Blaser, 1992), la actividad vacuolizante de la citotoxina es neutralizada por antisuero de conejo específico, los anticuerpos neutralizantes a la citotoxina son detectables en el suero de muchos individuos infectados con *H. pylori* incluyendo los que desarrollan carcinoma gástrico (Cover, *et al*/1992b).

Para reafirmar esto se ha expresado una proteína VacA recombinante en *E. coli* y se han inmunizado conejos con esta proteína y con la proteína

nativa. La toxina recombinante de *H. pylori* no tiene actividad biológica en células *in vitro* y también no induce anticuerpos neutralizantes en conejos mientras que los anticuerpos obtenidos de la toxina nativa si neutralizan la actividad vacuolizante a títulos altos. Esto puede indicar que los epitopos protectores en la toxina nativa VacA son probablemente conformacionales y que la toxina necesita estar enrollada en estructuras heptaméricas para ser funcionalmente activa e inducir anticuerpos protectores (Cover, *et al* 1992b).

Se ha encontrado que la actividad citotóxica vacuolizante presentada por sobrenadantes de cultivos en caldo de cepas de *H. pylori* es eliminada por calentamiento a 70°C o por incubación con proteasas. La actividad vacuolizante de la toxina sobre células es distinta a la de ureasa, pero esta actividad es potenciada por la ureasa debido a la producción de amonio el cual se ha visto potencia dicho efecto.

Algunas bases débiles tales como, la trimetilamina cuya sustancia es conocida como un inductor de formación de lisosomas, pudiendo provocar la formación de vacuolas dentro del citoplasma de algunas células. Sin embargo, se han comparado las vacuolas inducidas por la toxina de *H. pylori* y las inducidas por trimetilamina presentan diferencias (Cover, *et al* 1991).

Las vacuolas inducidas por trimetilamina son más largas y carentes de una membrana limitante, por lo tanto las vacuolas inducidas por esta base surgen directamente de compartimentos endocíticos mientras que las inducidas por *H. pylori* surgen mediante un mecanismo autofágico (Cover, *et al* 1992a). Recientemente investigadores italianos han observado que la vacuolización *in vitro* inducida por VacA es potenciada por una corta exposición de la citotoxina a pH ácidos. La inducción de la activación tiene lugar a pH 5.5 comparado con el pH 2 normalmente encontrado en el estómago, el proceso de activación es completo en pocos segundos. Una vez realizada la activación de VacA, está retiene su actividad a pH neutro y comienza a generar resistencia al ataque de pepsina (De Bernard, *et al* 1995).

En su forma nativa la toxina es un complejo proteínico de 700 a 900 kDa (Figura, 1996). Estudios de microscopía electrónica han demostrado que el complejo VacA semeja una "flor" unida por estructuras oligoméricas con seis o siete "pétalos", las flores son de forma hexagonal de aproximadamente 30 nm, cada flor esta compuesta de un anillo central de aproximadamente 15 nm el cual esta rodeado por seis pétalos globulares de aproximadamente 6 nm (Cover, *et al* 1997).

Bajo exposiciones a pH ácidos, esta flor oligomérica se disocia en colecciones de 12 subunidades (monómeros) en forma de lágrima, cada una mide aproximadamente 6X14 nm y utilizando un gradiente de densidad de glicerol a pH ácidos se encontró que estas subunidades presentan un coeficiente de sedimentación de aproximadamente 5S. Mediante inmunoelectrotransferencia se observó que estas subunidades corresponden a un monómero de aproximadamente 90 kDa. Todo esto indica que el oligómero intacto de VacA consiste de 12 subunidades de aproximadamente 90kDa ensamblados de tal manera que simulan una «flor» (Molinari, *et al*/1998).

Un pequeño número de oligómeros «planos» compuestos de seis subunidades en forma de lágrima, forman parte de la «flor completa», las formas planas corresponden a superficies hexaméricas que son expuestas o intercaladas dentro del dodecámero, esta estructura de VacA difiere de un modelo previo en el cual se proponía que la flor consistía de capas de seis monómeros y que las formas planas eran flores proteolisadas. Se conoce también que la proteína de aproximadamente 90 kDa se puede dividir por proteólisis *in vitro* formando un fragmento N-terminal de aproximadamente 37 kDa y un fragmento C-terminal de aproximadamente 58 kDa (Figura,1996) se ha observado que durante prolongados almacenamientos sucede esta proteólisis (Telford, *et al*/1994; Cover, *et al*/1997).

Este tipo de división o separación es característico de toxinas bacterianas que están formadas de dos subunidades mientras una unidad es enzimática con actividad biológica, la otra es reconocida por el receptor en células blanco y mediadores de adhesión. Algunos resultados indican que la conformación de VacA en condiciones ácidas, expone en la superficie de la proteína segmentos hidrofóbicos que son capaces de interactuar con la cadena de fosfolípidos, de la membrana, estos aspectos tienen similitud con otras toxinas en que su sitio blanco es intracelular tal es el caso de la toxina DT (Manetti, *et al*/1997).

La reoligomerización parece estar relacionada con la concentración de la toxina, bajo neutralización los cambios en la estructura de VacA y monómeros reasociados en oligómeros se da con diferentes propiedades físicas y estructurales. DT, también es capaz de activarse bajo exposición a pH ácido y es capaz de penetrar dentro de la bicapa lipídica, por lo que una fuerte intoxicación celular con DT puede ser inhibida por neutralización del pH con bases débiles pero, en el caso de VacA, esto no sucede ya que la presencia de amonio induce e incrementa la actividad vacuolizante (Cover, *et al*/1991).

Para conocer el mecanismo de unión e internalización de la toxina a las células, se han realizado varias investigaciones de las cuales se sabe que la actividad de la toxina es neutralizada por anticuerpos específicos, no se conoce a través de que compartimentos la toxina es transportada dentro del citoplasma. Sin embargo, una interesante observación es que la toxina internalizada no fue encontrada dentro de las vacuolas (Garner y Cover, 1996).

Esta internalización requiere de 2 a 3 horas para completarse, también se han encontrado péptidos recombinantes de 58 kDa y 32 kDa se pueden unir a la membrana plasmática de las células y también pueden unirse a vesículas lipídicas, sin embargo, la unión de VacA puede ser inhibida con anticuerpos los cuales reaccionan exclusivamente con el fragmento de 58 kDa lo que hace pensar que la secuencia de aminoácidos en este fragmento es importante en la unión de VacA a las células, estos hallazgos pueden resumirse en que: *i*) la unión de VacA a células es mediada por secuencia de aminoácidos que están dentro del fragmento de 58 kDa, *ii*) VacA es internalizada lentamente en un proceso dependiente de temperatura y *iii*) la vacuolización celular es el resultado de la interacción de VacA con un blanco intracelular. Las vacuolas inducidas por la toxina parecen ser derivadas de compartimentos endosomales maduros en el interior de células eucarióticas (Catrenich y Chestnut, 1992; Papini, *et al* 1994).

Estos endosomas provienen de vesículas originadas de invaginaciones de la membrana, normalmente se fusionan con los lisosomas o con el aparato de Golgi. Las membranas de las vacuolas inducidas por VacA contienen rab7, una pequeña proteína que une GTP que solo se encuentra en endosomas maduros, así como una ATPasa. Recientemente, se tiene claro el mecanismo de formación de las vacuolas comenzando por las observaciones *in vitro* realizadas mediante la inhibición de la vacuolización utilizando bafilomicina A₁, un inhibidor de la ATPasa la cual regula el flujo de H⁺ a través de la membrana (Cover, *et al* 1997; Papini, *et al* 1993a; Papini, *et al* 1993b).

También se sabe que la bafilomicina A₁ puede inhibir la transición de endosoma temprano a endosoma maduro (Figura, 1996). El blanco para la actividad de VacA es la ATPasa tipo-v la cual está presente en los endosomas maduros y en donde la toxina induce la formación de vacuolas. Una vez que VacA ha reaccionado con su blanco, los endosomas maduros no se encuentran disponibles para los aparatos endocíticos, estos endosomas se fusionan unos con otros (Cover, *et al* 1997; Cover, 1998).

La bomba de hidrógeno es estimulada por la toxina y crea un ambiente ácido dentro de las vacuolas, las cuales en estado primario son muy pequeñas. Substancias básicas en el ambiente; tales como amonio, cruzan la membrana y son protonadas lo cual incrementa el pH ácido. Las moléculas protonadas permanecen dentro del organelo intracelular porque ya no son permeables a las membranas, las vacuolas atraen agua osmóticamente y se inflan. En cultivos de células *in vitro* se ha observado que las vacuolas se originan en la periferia del área nuclear y estas se incrementan en número y tamaño lo cual hace que se fusionen unas con otras, por lo que se origina un rompimiento de membrana y por consiguiente la muerte de las células. Este proceso lleva dos días para completarse. Bases débiles incluyendo amonio y nicotina pueden potenciar la actividad vacuolizante de la toxina (Cover, *et al* 1993b; Cover, *et al* 1992c).

Los niveles de nicotina en la saliva de fumadores son más bajos de lo necesario para potenciar la actividad de toxinas *in vitro*. Sin embargo, la actividad sinérgica de la nicotina puede ocurrir *in vivo* a bajas concentraciones, esta observación puede ayudar a explicar por que los fumadores son de alto riesgo para desarrollar úlcera duodenal. Los inhibidores de la bomba de protones en teoría interfieren con la ATPasa (la cual es una bomba de protones) evitando la activación de la toxina, logrando inhibir la vacuolización. Sin embargo, se ha postulado que los inhibidores de la bomba de protones no tienen efectos en la vacuolización *in vitro* inducida por la citotoxicidad de *H. pylori* en caldo de cultivo. Las ATPasas están presentes en todas las membranas de todas las células eucariotas (Figura, 1996).

Es posible que VacA pueda influir en las ATPasas de las células no epiteliales, tales como PMN, los cuales tienen una bomba de hidrógeno (semejante a otras ATPasas) en sus membranas. Las cepas de *H. pylori* activan PMN y producen estallido respiratorio. La activación de estas células genera iones superóxido y otros metabolitos reactivos, también generan iones H^+ dentro de los fagolisosomas en respuesta a la asociación de la ATPasa- H^+ estimulada. La intensidad del estímulo para la producción de metabolitos reactivos de oxígeno por los PMN inducida por *H. pylori* varía entre los diferentes aislados. Es posible que *H. pylori* altere las estructuras de la membrana celular, lo cual es importante para la opsonización o para otras ATPasas diferentes de la ATP- H^+ involucradas. La opsonización puede ser reprimida por contacto con VacA (Figura, 1996).

Recientemente se reportó una proteína en líneas celulares de cáncer gástrico humano, A2-521 y AGS y en una línea celular de mono, COS-7 que es

capaz de unirse a Vac A, esta proteína, denominada P140, la cual tiene un peso molecular de 140 kDa, podría ser crucial para la patogénesis (Yahiro, *et al* 1997).

(iv) *Especies reactivas de oxígeno*.- *H. pylori* induce la síntesis de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la mucosa gástrica *in vivo*. El consumo de cigarrillos, drogas, y alcohol es independiente de la producción de (ROS) *in vivo*. Existe un incremento significativo de 9-hidroxideoxiguanosina, el cual es un radical libre de oxígeno que induce daño en el DNA, en personas infectadas con *H. pylori* en comparación con las no infectadas. Existen evidencias de que el ácido ascórbico actúa como un "recogedor" de ROS producidos en células gástricas. Muchos medicamentos anti-úlceras funcionan como "recogedores" de ROS esto explica el porqué minimizan el daño a la mucosa (Baik, *et al*/1996).

(v) *Inducción de óxido nítrico sintetasa*.- Altos niveles de óxido nítrico están asociados a la inducción de óxido nítrico sintetasa (iNOS) la cual está relacionada con la activación del sistema inmunológico y daño al tejido. *H. pylori* induce iNOS en macrófagos *in vitro*. La erradicación de la bacteria reduce los niveles de iNOS en células epiteliales gástricas, lo cual sugiere que *H. pylori* induce la activación de esta enzima *in vivo* (Wilson *et al*/1996).

(vi) *Apoptosis*.- *H. pylori* aparentemente induce la muerte celular programada (apoptosis) en células gástricas. Estimula la oxidación del DNA afectando así la mucosa gástrica, inhibiendo la proliferación de células gástricas. Es decir, la infección por *H. pylori* puede causar daño a la mucosa gástrica de dos maneras, directa o indirectamente (Wagner, *et al* 1997).

Alteración de la homeostasis gástrica:

(i) *Motilidad*.- La motilidad es un factor esencial de colonización. Normalmente *H. pylori* posee de dos a seis flagelos polares los cuales están codificados por los genes *flaA* y *flaB* los cuales ya se tienen clonados (Lee, *et al* 1993; Moran y Wadstrom, 1998). El uso de mutaciones en ellos han demostrado que ambos son esenciales para la motilidad.

(ii) *Ureasa*.- Todos los aislados, así como cada una de la especie de *H. pylori* identificadas a la fecha producen grandes cantidades de la enzima ureasa. La ureasa nativa de *H. pylori* tiene un peso molecular de 540 kDa y contiene níquel. La ureasa contiene dos subunidades: UreA de 30 kDa y UreB de 62 kDa, así como nueve genes incluyendo los genes estructurales *ureA* y *ureB* y un regulador de genes involucrado en la síntesis y ensamblaje de la holoenzima (Moblely, 1996).

La constante de Michaelis de la ureasa es baja lo cual le permite ser catalíticamente eficiente a concentraciones milimolares de urea; la ureasa es un factor esencial de colonización en especies de *Helicobacter*. La actividad de ureasa es requerida para la producción de un microambiente de pH neutro para el microorganismo. En el lumen gástrico, hay evidencias de que la ureasa esta asociada con la membrana externa de *H. pylori*. Sin embargo, se ha observado actividad de la ureasa dentro del citoplasma, por lo tanto puede tener un papel en la asimilación de nitrógeno orgánico; la asociación entre la ureasa y la superficie bacteriana está estabilizada por cationes divalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+} aunque otros cationes pueden inhibir la actividad de la enzima.

(iv) *Proteínas de choque térmico*.- La secuencia del gen que codifica para la proteína HspB de *H. pylori* está altamente conservada comparada con otras proteínas de choque térmico de otras bacterias y humano. De acuerdo a la similitud estructural, la HspB puede funcionar como una molécula chaperona para la ureasa. El gen *hspB* es parte de un operón cistrónico (*hspA-hspB*) el cual se tiene clonado y secuenciado. La expresión de las proteínas de choque térmico aumenta la actividad de la ureasa, lo cual sugiere que el papel de gen *hspA* es la integración de níquel dentro de la molécula funcional de ureasa (Evans, *et al*, 1995; Macchia, *et al* 1993).

(v) *ATPasa*.- Las ATPasas son de interes en las investigaciones de *H. pylori*, debido a que una ATPasa es un probable blanco para la acción bactericida de los inhibidores de la bomba de protones, tales como Lansoprazol y Omeoprazol. Se tiene ya clonada y secuenciada una ATPasa type-P (Ge, *et al* 1995).

(vi) *Sideróforos*.- El hierro es un elemento esencial para el crecimiento y metabolismo bacteriano, pero estudios sobre la adquisición de hierro por *H. pylori* han producido resultados confusos, los cuales reportan que esta bacteria no produce sideróforos (sustancias que atrapan hierro) bajo condiciones limitadas de hierro. Sin embargo, algunos reportes indican que *H. pylori* puede crecer en presencia de lactoferrina humana, por lo que se piensa que esta bacteria posee en su superficie receptores para proteínas que unen hierro. En contraste, otros estudios han detectado la producción de sideroforos pero no detectan la unión de lactoferrina a proteínas de *H. pylori*. Por lo que aún no queda claro como adquiere el hierro para su crecimiento (Husson, *et al* 1993).

4.3 Adhesinas y receptores.

H. pylori se adhiere al epitelio gástrico mediante receptores con la ayuda de adhesinas específicas. Se sabe que las cepas de *H. pylori* aglutinan eritrocitos animales, las hemaglutininas producidas por *H. pylori* contribuyen con la adherencia *in vivo*. La Fosfatidiletanolamina y gangliotetradosilceramida se han identificado como receptores lipídicos en la mucosa.

La adhesina bacteriana de *H. pylori* que reconoce estos lípidos es una exoenzima de 63 kDa, la cual ha sido purificada y caracterizada. La unión específica de *H. pylori* a la superficie de las células de la mucosa parece estar mediada por estructuras fucosiladas y glicoproteínas (Lee, *et al.* 1993; Moran y Wadstrom, 1998).

Se han realizado trabajos en donde el antígeno de grupo sanguíneo Lewis^b regula la unión a las células de la mucosa. La habilidad de estos receptores para unir a la bacteria es reducida en individuos con fenotipo del grupo sanguíneo A y B comparado con individuos de grupo sanguíneo O, esto pudiera explicar por qué tienen mayor riesgo a desarrollar úlcera péptica los individuos con grupo sanguíneo O. *In vitro* *H. pylori* se une a laminina, fibronectina y varios colágenos (Boren, *et al* 1993).

4.4 Evasión inmunológica

H. pylori puede estimular el sistema inmunológico para producir anticuerpos, además posee una resistencia a la muerte por fagocitos, quizá debido al daño que genera en la membrana del fagolisosoma por la producción de amonio. Las hemaglutininas específicas para ácido siálico presentes en la superficie de la mucosa pueden retardar la adhesión e ingestión de *H. pylori*. Como se mencionó anteriormente la expresión de antígenos Lewis en la superficie de la bacteria puede ayudar al camuflaje de la bacteria entre los antígenos de la mucosa gástrica (Crabtree, 1996; Graham y Go, 1993; Blaser, 1992; Moran y Wadstrom, 1998; Blaser, 1993).

Otro mecanismo potencial de evasión de la respuesta inmunitaria que puede presentar esta bacteria es el cambio de morfología. Las formas bacilares de *H. pylori* se convierten en formas cocoides después de prolongados cultivos. La morfología, fisiología y bioquímica de las formas cocoides se tienen descritas por una variedad de investigadores (Andersen, *et al*/1997; Kusters, *et al*/1997; Bode, *et al*/1993). Se piensa que estas formas pueden representar una fase latente que utiliza la bacteria para protegerse del medio ambiente.

5.- DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN

Las pruebas para el diagnóstico de la infección con *H. pylori* no son muy viables. El examen histológico de tejido gástrico, el cultivo bacteriano, la prueba rápida de la ureasa y pruebas utilizando DNA mediante análisis por PCR, requieren de tejido gástrico, por lo tanto requieren endoscopia.

En contraste la prueba de aliento y serología, son pruebas no invasivas que no requieren endoscopia. La selección de la prueba para el diagnóstico de la infección con *H. pylori* depende de la habilidad y costo de pruebas.

5.1 Métodos que requieren endoscopia:

Cultivo.- En cultivo de *H. pylori* presenta la ventaja de que permite probar la susceptibilidad a antimicrobianos. Uno de los principios básicos para el cultivo de biopsias gástricas, es el medio de transporte, este puede ser solución salina siempre y cuando el tiempo de traslado hasta llegar al cultivo sea corto (<6h) y si el tiempo es mayor entonces el medio de transporte es más complejo por ejemplo, medio de Stuart.

Medios que contengan glicerol son recomendables para almacenamiento durante mucho tiempo. Una variedad de medios selectivos y no selectivos están disponibles comercialmente para el cultivo de *H. pylori* además, requiere de un ambiente microaerofílico, humedad alta e incubación a 37°C por un máximo de 7 a 10 días.

Los cultivos positivos son detectados después de 3 a 5 días de incubación. *H. pylori* es identificado en base a su morfología colonial (colonias translúcidas que varían de tamaño apenas detectables de aproximadamente 3 mm) estas colonias son Gram negativas de forma curvada, siendo ureasa, catalasa y oxidasa positivas (Queiroz, *et al* 1987).

Evaluación histológica.- *H. pylori* puede ser visto mediante la tinción de hematoxilina-eosina, las bacterias son localizadas en la mucosa, adherida a la superficie del epitelio y pueden ser encontradas en las criptas. Sin embargo, esta tinción puede no ser muy confiable cuando están presentes pocas bacterias pero, se pueden utilizar tinciones como la de Warthin-Starry y la tinción modificada de Giemsa. La distribución de la bacteria en el estómago no es uniforme ni tampoco se encuentra frecuentemente en áreas de metaplasia intestinal.

Tabla 2. Factores que facilitan la permanencia de *H. pylori* en el estómago

Motilidad:

- Forma espiral
- Flagelos

Enzimas y Proteínas:

- Ureasa
- Catalasa
- Superóxido dismutasa
- Proteínas de choque térmico
- ATPasa tipo-P
- Sideróforos
- Adhesinas bacterianas (receptores celulares)

Evasión inmunológica:

- Supresión de la respuesta inmunitaria
- Resistencia a muerte por PMN
- Mimetismo molecular - antígenos Lewis

(Tabla obtenida de Bruce *et al*, 1997)

Tabla 3. Algunos genes de *H. pylori* que codifican para ciertas proteínas que contribuyen en la patogenesis.

(Tabla obtenida de Bruce *et al*, 1997)

Producto	Genes	Funciones sugeridas
Ureasa ^a	<i>ure operon</i>	Neutralización ácida gástrica, fuente de nitrógeno, toxicidad mucosal
Nix A	<i>nix a</i>	N ² para función de ureasa
Flagelo	<i>fla, fla2, fla3, fla</i>	Motilidad bacterial
Adesinas	<i>hpa2 y otras</i>	Adherencia a células epiteliales gástricas
Superóxido dismutasa	<i>sod</i>	Resistencia a muerte por fagocitosis
Catalasa	<i>kata</i>	Resistencia a muerte por fagocitosis
HP-NAP	<i>napa</i>	Activación de neutrófilos
Proteína de choque térmico	<i>hspα, hspβ</i>	Moléculas chaperoninas, N ² (hspA)
VacA	<i>vacA</i>	Citotoxicidad para epitelio gástrico
CagA	<i>cagA</i>	No conocida

a. *H.p.* careciendo este producto, falla la colonización en modelos animales

b. Esencial para la supervivencia bacterial

La identificación histológica de la bacteria con las características morfológicas depende en gran parte del observador y también de factores que influyen en su identificación tales como: densidad bacteriana, tipo de tinción utilizada, entusiasmo y habilidad del laboratorista. Una técnica de tinción muy sensible, consiste en una combinación de hematoxilina-eosina, tinción de plata y azul alcian (Genta, *et al*/1994).

Pruebas de ureasa a biopsia.- Debido a que *H. pylori* posee una alta producción de ureasa se han desarrollado métodos para la detección indirecta de estos microorganismos en tejido de biopsias gástricas. La sensibilidad de todas las pruebas basadas en ureasa para la detección de *H. pylori* es dependiente de la carga bacterial en el estómago. El CLOtest desarrollado por Marshall, fue la primera prueba de ureasa comercialmente disponible designada específicamente para la detección de *H. pylori* (Cutler, *et al* 1995).

Esta prueba consiste en un gel de agar que contiene rojo de fenol y urea, en presencia de ureasa, la urea es hidrolizada en amonio lo que conduce a un cambio en el pH visto a través del indicador y se interpreta la prueba después de 24 horas de ser colocada la biopsia dentro del agar. Además del CLOtest existen dos pruebas similares comercialmente disponibles que son Hpfast y Pyloritek.

PCR.- Es una técnica altamente sensible y específica para la detección de *H. pylori*. En biopsias gástricas se tienen descritos numerosos trabajos aunque esta técnica es muy variable, debido a diversos factores afectan esta detección entre los cuales se incluyen la selección de iniciadores y el DNA blanco, preparación de la muestra, densidad bacterial y algunos pasos del PCR. Sin embargo, ya se tienen desarrollados varios PCR utilizando DNA bacterial obtenido de cultivo de cepas, dando buenos resultados por lo que puede considerarse como un gran avance la técnica de PCR para el diagnóstico de *H. pylori*, esta técnica puede servir para fluidos obtenidos por métodos no invasivos como la saliva (Ashton-Key, *et al* 1996; El Zaatari, *et al* 1995).

5.2 Métodos que no requieren endoscopia.

Detección de anticuerpos.- La infección de la mucosa gástrica con *H. pylori* provoca una respuesta inmunitaria local y sistémica que incluye la elevación de IgG específica y niveles de IgA secretoria e IgM en el estómago, esto condujo al desarrollo de pruebas serológicas. Los métodos serológicos se tienen bien valorados en estudios epidemiológicos. La mayoría de las pruebas comercialmente disponibles son ensayos de inmunoadsorción unido a enzima (EUSA). La utilidad de la prueba serológica para detectar anticuerpos específicos es dependiente de la preparación del antígeno.

En general hay tres tipos de antígenos usados que son: *i*) antígeno crudo, tal como células completas; *ii*) sonificado de células y *iii*) fracciones celulares como un extracto de glicina y antígenos termoestables y enriquecidos tales como ureasa y un antígeno CagA de 120Kda. En ausencia de

terapia los niveles de anticuerpos permanecen elevados, quizá por largo tiempo después de la erradicación de *H. pylori*, la inmunoglobulina específica IgG y los niveles de IgA tienden a decrecer, niveles bajos de IgG específica tienden a persistir por meses después de la erradicación. Otra prueba que incluye anticuerpos es la detección de IgA e IgG contra *H. pylori* en orina y saliva sin embargo, estas pruebas aún no están bien confirmadas debido a que la cantidad de estos anticuerpos es muy baja (Evans, *et al* 1989).

Prueba de la urea en aliento.- El principio de esta prueba para el diagnóstico de *H. pylori* es similar a otras pruebas basadas en ureasa. La urea es el sustrato que en este caso es ingerido: urea marcada con ^{13}C o urea marcada con ^{14}C . La ureasa de la bacteria hidroliza la urea marcada generando dióxido de carbono el cual es exhalado y recolectado como CO_2 marcado. El isótopo ^{14}C es detectado con un contador de centelleo mientras que el ^{13}C es detectado por espectrofotometría de masas. La selección entre los dos isótopos puede depender de la disponibilidad, costo y normas regulatorias. La prueba de ^{14}C no es recomendada para usarse en niños o mujeres embarazadas (Koletzko *et al*, 1995).

Otros ensayos:

CagA.- El 60% de las cepas de *H. pylori* poseen un gen llamado *cagA*. Ese gen de función desconocida es un marcador de la isla de patogenicidad de CagA de 35 Kb compuesta de aproximadamente veinte genes incluyendo *picB* un fuerte homólogo de proteínas de secreción, las cuales son requeridas por la bacteria para inducir en células epiteliales gástricas la secreción de IL-8, lo cual indica que una infección con cepas CagA+ aumenta el riesgo de desarrollar úlcera duodenal y adenocarcinoma (Xiang, *et al*, 1995).

Una variedad de técnicas pueden ser utilizadas pero, quizá la más usual es la detección por serología utilizando antígenos recombinantes de CagA reportándose que la sensibilidad de IgG es de 94.4% y una especificidad del 92.5%, la serología puede identificar si el hospedero está infectado con cepas CagA+ aún si el único aislado estudiado en la biopsia carece de CagA. Métodos basados en el uso de biopsia es decir el PCR y RT-PCR. Ambos son altamente precisos para identificar CagA en cultivos de biopsias (Peek, *et al*, 1995).

Vac A.- Esencialmente todas las cepas de *H. pylori* poseen el gen *vacA*, este gen se expresa produciendo una citotoxina *in vitro*, este tipo de cepas pueden también ser identificadas mediante PCR para lo cual es necesario realizar cultivos de biopsias gástricas (Atherton, *et al*, 1995).

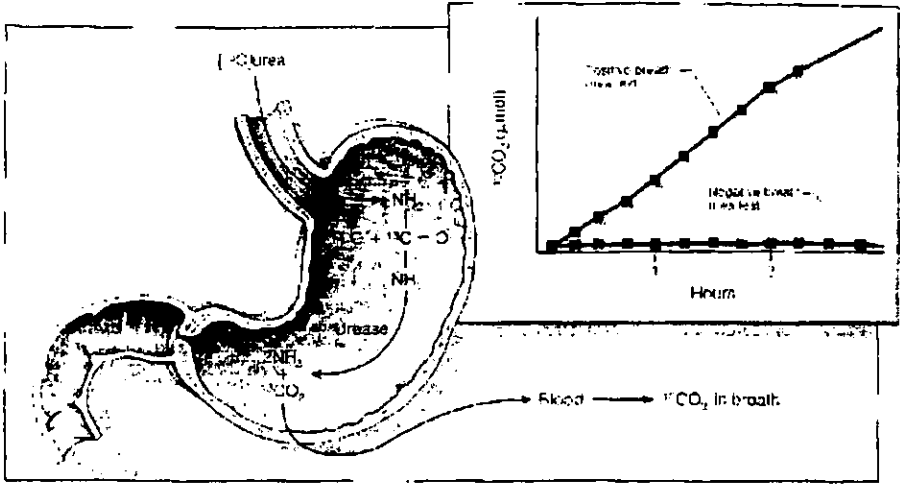


Figura 4. Prueba de la urea marcada para la detección de *H. pylori* (Obtenida de Walsh *et al* , 1995).

Antígenos Lewis.- Los antígenos Lewis son glicoconjugados fucosilados polimórficos reconocidos en la superficie del eritrocito. También están presentes en una gran variedad de células epiteliales incluyendo la mucosa gástrica. Se ha encontrado que el LPS de algunas cepas de *H. pylori* contienen Le^x y/o Le^y como parte de la cadena de su lipopolisacárido, algunos estudios han utilizado anticuerpos monoclonales para identificar estos antígenos en el LPS de las cepas de algunos pacientes. Sin embargo, su utilidad clínica aún no es clara (Sherburne y Taylor, 1995).

Otro loci polimórfico.- Se ha descrito un Locus llamado *iceA* el cual tiene dos variantes el *iceA*₁ y *iceA*₂ entre la diversidad de cepas de *H. pylori*. Se ha propuesto que la infección con una cepa *iceA*₁ está fuertemente asociada con úlcera duodenal, sin embargo aún faltan estudios para confirmar esto (Peek, *et al*, 1996).

5.3 Diagnóstico postratamiento:

A pesar de existir terapia antibacterial, no siempre es efectiva contra la infección con *H. pylori*. La mayoría de las pruebas usadas para el diagnóstico inicial de *H. pylori* pueden ser también usadas para el diagnóstico postratamiento. En general cualquier prueba para evaluar la erradicación de *H. pylori* se llevan a cabo al menos después de 4 semanas de haber concluido con el tratamiento. Las pruebas que pueden utilizarse pueden

ser: a) métodos basados en biopsias como CLOtest y cultivo; b) métodos no endoscópicos como, serología y prueba de urea en aliento (UBTs).

Tabla 4. Pruebas de diagnóstico para la detección de *Helicobacter pylori* (Tabla obtenida de Bruce *et al.* 1997).

Prueba	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Requiere endoscopia	Comentarios
Histología	93-98	95-98	Si	Biopsias
Cultivo	77-95	100	Si	Para probar susceptibilidad y detallar caracterización del aislamiento
Ureasa rápida (CLOtest)	89-98	93-98	Si	Método endoscópico de elección para el diagnóstico de infección por <i>H. pylori</i>
¹³ C-UBT	90-95	90-95	No	Carga existente de bacteria
¹⁴ C-UBT	90-95	90-95	No	Exposiciones o radiación baja ¹³ C-UBT
Serología	88-95	86-95	No	Excelente herramienta epidemiológica
Métodos PCR (muestras biopsias o fluidos corporales)	85-96	90-100	Si	DNA, no necesariamente de bacteria viable. Para probar diferencias entre cepas de <i>H. pylori</i>

6.- TRATAMIENTO

El tratamiento ideal de erradicación para *H. pylori* aún no se ha conseguido (Glupczynski y Burette, 1990; Talley, 1994; Sung, *et al.* 1995; O'Brien, *et al.* 1995). En la actualidad hay diversos regímenes utilizados que postulan que en general no se debe dar tratamiento de erradicación con un solo medicamento y que es necesaria la combinación de dos o tres fármacos en forma simultánea entre los que se incluyen antimicrobianos e inhibidores de la acidez gástrica es decir inhibidores de la H⁺ K⁺ ATPasa (IBP's). Los medicamentos actualmente utilizados son los siguientes:

a) Bloqueadores de la acidez

1. Benzimidazoles sustituidos

- * PANTOPRAZOL
- * LANZOPRAZOL
- * OMEOPRAZOL

2. BLOQUEADORES H₂

- * RANITIDINA
- * NIZATIDINA
- * FAMOTIDINA

b) Antimicrobianos

- * METRONIDAZOL
- * TINIDAZOL
- * BISMUTO
- * TETRACICLINAS
- * AMOXICILINA
- * CLARITROMICINA

Generalmente los tratamientos consisten en la inhibición de la acidez con un bloqueador de la bomba de protones como el pantoprazol y combinación de dos antimicrobianos. Sin embargo, estos medicamentos poseen algunos inconvenientes entre ellos: a) costo elevado, b) toma de múltiples tabletas (poco apego al tratamiento), c) resistencia a los antimicrobianos y d) posibilidad de reacciones alérgicas.

Por otro lado aunque se logre la erradicación, dado que se desconocen los mecanismos exactos de contagio y dada la alta frecuencia de la infección en nuestro medio, la posibilidad de una reinfección esta siempre latente.

Prevención y erradicación de la infección por *H. pylori* mediante vacunas: Aún no se tiene bien definido el desarrollo de alguna vacuna contra la infección con *H. pylori*. En animales una variedad de inmunógenos confieren protección, tales inmunógenos incluyen sonicados bacterianos, ureasa purificada, subunidades de ureasa, citotoxina VacA purificada, GroEL (HspB) y GroES (HspA) homólogos de proteínas de choque térmico (Telford, *et al*/1994a).

Tabla 5. Régimenes de tratamiento actual para pacientes con enfermedad de ácido-péptica apoyados por la FDA. (Tabla obtenida de Bruce *et al*, 1997).

Régimen	Dosis	Duración terapia	(%) Erradicación	Aprobado por FDA ?
Triple terapia conteniendo bismuto				
1. Tetraciclina HCL más	500 mg qid	2 semanas	85	Si
2. Metronidazol más	250 mg qid	2 semanas	85	Si
3. Subsalicilato bismuto	2 tabletas	2 semanas	85	
Terapia dual				
1. Claritromicina más	500 mg tid	2 semanas	74	Si
2. Omeoprazol ó	40 mg diario	2 semanas	74	Si
Claritromicina más	500 mg tid	2 semanas	74	Si
Ranitidina bismuto citrato	400 mg bid	2 semanas	74	Si
Régimen triple terapia				
1. Metronidazol ó	500 mg bid	1 semana (de preferencia 2 semanas)	90	No, aprobación pendiente
Amoxicilina	1 g bid	1 semana (de preferencia 2 semanas)	90	No
2. Claritromicina más	500 mg bid	1 semana (de preferencia 2 semanas)	90	No
3. Omeoprazol ó	20 mg bid	1 semana (de preferencia 2 semanas)	90	No
Lensooprazol	30 mg bid	1 semana (de preferencia 2 semanas)	90	No
1. Ranitidina bismuto citrato más	400 mg bid	2 semanas	90	No
2. Claritromicina más	500 mg bid	2 semanas	90	No
3. Amoxicilina	1 g bid	2 semanas	90	No

bid=una vez al día
 qid=dos veces al día
 tid= tres veces al día

JUSTIFICACIÓN:

La infección con *H. pylori* es un problema de salud, asociado con padecimientos gástricos tales como: gastritis crónica y úlcera duodenal, los cuales se encuentran fuertemente relacionados con la toxina producida por algunas cepas de *H. pylori*. Dicha toxina es considerada como uno de los factores de patogenicidad más importantes en la contribución del daño al tejido gástrico.

En 1988 un grupo de personas dieron a conocer que un cultivo en caldo de *H. pylori* podía inducir la formación de vacuolas en células (Cover, *et al*, 1992a), seguido de este hallazgo existen muchos trabajos utilizando sobrenadantes concentrados obtenidos de cepas de *H. pylori* en caldo brucella, los cuales son capaces de inducir vacuolización en diversas líneas celulares, lo cual nos permite conocer si una cepa es citotóxica o no (productora de toxina).

Sin embargo, un forma alternativa de saber si una cepa es citotóxica es poder utilizar sobrenadantes obtenidos a partir de cepas de *H. pylori* suspendidas en solución salina con la posibilidad de observar efecto citotóxico sobre células HeLa, y poder relacionar estos resultados con el diagnóstico clínico que presentan los adultos de quienes se obtuvieron dichas cepas.

HIPOTESIS

Los sobrenadantes de cepas de *Helicobacter pylori* provenientes de adultos con úlcera duodenal presentan efecto citotóxico vacuolizante con mayor frecuencia que lo que suele aparecer en adultos que sólo poseen gastritis.

OBJETIVOS:

1. Determinar si sobrenadantes obtenidos a partir de cepas de *H. pylori* suspendidas en solución salina pueden presentar efecto citotóxico vacuolizante, sobre células HeLa producido por la toxina de *H. pylori*, en adultos con enfermedad ácido-peptica (úlcera duodenal y gastritis crónica).
2. Comparar el efecto y grado de actividad vacuolizante de los sobrenadantes obtenidos de adultos con úlcera duodenal y gastritis crónica.
3. Realizar electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) a los sobrenadantes con actividad citotóxica, seguida de una inmunoelectrotransferencia para determinar la presencia de la toxina de *H. pylori*, mediante un anticuerpo policlonal anti-VacA.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Diseño del estudio: Descriptivo, transversal.

Población: Constó de 54 adultos con enfermedad ácido péptica, de los cuales 27 padecían gastritis crónica y 27 úlcera duodenal todos ellos provenientes del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Tipo de Muestra: Biopsias Gástricas

Criterios de Inclusión: Sólo adultos con diagnóstico clínico de Gastritis Crónica y Úlcera duodenal

Criterios de Exclusión: Adultos con otro diagnóstico como: gastritis crónica folicular, gastritis aguda, úlcera duodenal cicatrizante, úlcera gástrica entre otros.

Diseño estadístico: La asociación del efecto citotóxico vacuolizante de las cepas provenientes de adultos con gastritis crónica y úlcera duodenal se realizó por medio de la prueba de χ^2 ; considerando resultados significativos aquellos con una $p < 0.05$.

7.1 MATERIAL

Material biológico:

- * Cepas de referencia de *Helicobacter pylori* productora de citotoxina 84183 (CagA+, VacA+) y no productora 86313 (CagA-, VacA-) donadas por la Escuela de Medicina de la Universidad de Vanderbilt, Nashville Tennessee E.U.
- * Células HeLa congeladas en nitrógeno líquido.
- * Anticuerpo policlonal contra la citotoxina (VacA) obtenido en conejo, donado por la Escuela de Medicina de la Universidad de Vanderbilt, Nashville Tennessee E.U.
- * Suero de humano (paciente 44).

Medios de cultivo:

- * Agar sangre de carnero al 10%.
- * MEM-Eagle (medio mínimo esencial).

Reactivos:

a) Para aislamiento de *Helicobacter pylori*.

- * Peróxido de hidrógeno 3%.
- * Caldo urea.
- * Solución salina fisiológica 0.9% estéril.
- * Cristal violeta.
- * Solución alcohol-acetona.
- * Lugol.
- * Safranina.

b) Para cultivo celular.

- * Dulbecco phosphate buffer salina 10X (D-PBS).
- * L-Glutamina 200mM (100X).
- * Glicerol estéril.
- * Bicarbonato de sodio 7.5% estéril.
- * Regulador de pH Hepes 1M pH= 7.3.
- * Solución de tripsina 0.25% estéril.
- * Colorante de Giemsa.
- * PBS 1X estéril.
- * Formaldehído 3.7%.
- * Alcohol al 70%.
- * Trimetilamina.
- * Cloruro de amonio.
- * Suero fetal bovino.
- * Azul de tripan

c) Electroforesis en geles de poliacrilamida.

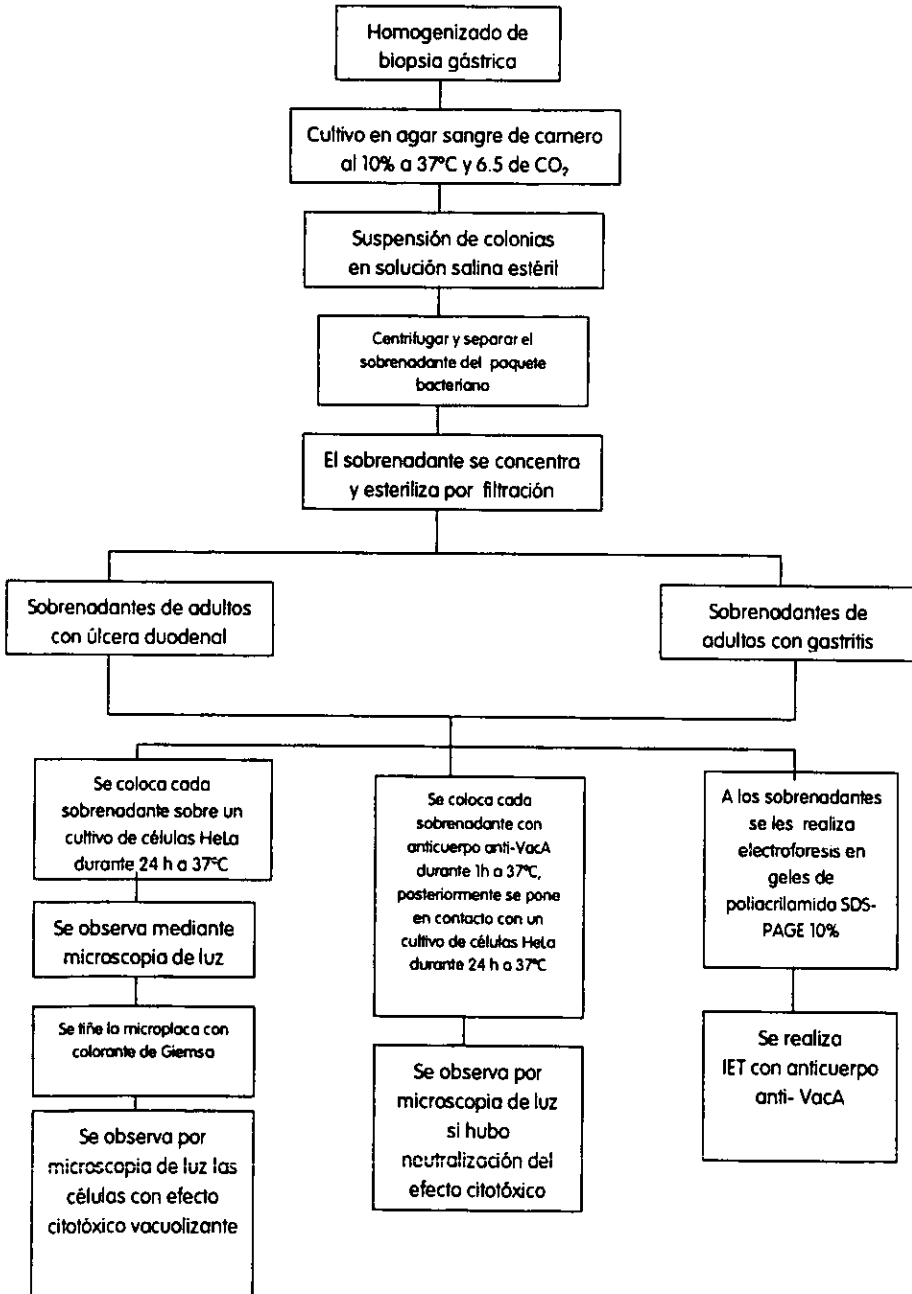
- * Solución de acrilamida.
- * Marcadores de peso molecular alto, medio y bajo.
- * Isopropanol.
- * Persulfato de amonio.
- * Metanol.
- * Solución decolorante para geles.
- * Azul de bromofenol.
- * Azul de Coomasie.
- * Solución amortiguadora para gel concentrador.
- * Solución amortiguadora para gel separador.
- * Solución amortiguadora para inmunoelectrotransferencia.
- * Solución amortiguadora para cámara.
- * Solución amortiguadora para bloqueo.
- * Solución amortiguadora TSBB (Tris Saline Blotting Buffer).
- * Solución amortiguadora de tratamiento BT (Buffer de tratamiento).
- * Avidina- Peroxidasa.
- * Conjugado biotinilado.
- * Peroxido de hidrógeno.
- * Diaminobenzidina.

Material de trabajo:

- * Cajas petri.
- * Homogenizadores estériles.
- * Asas bacteriológicas.
- * Portaobjetos.
- * Hisopos estériles.
- * Tubos eppendorf 500ml y 1000ml.
- * Pipetas estériles.
- * Botellas para cultivo celular de 50ml.
- * Pipetas Pasteur estériles.
- * Placas de 96 pozos.
- * Puntas para micropipeta estériles.
- * Unidades de concentración Amicon.
- * Minifiltros de 0.22mm.
- * Micropipetas dispensadoras.
- * Criotubos para células.
- * Cámara de Neubauer.
- * Microscopio de luz (Olympus CK2).
- * Centrífuga sorvall RT 6000D.
- * Congelador -20°C .

- * Congelador -70°C .
- * Congelador -4°C .
- * Fuente de nitrógeno líquido.
- * Rotador de placas Hoefer.
- * Cámara de electroforesis Mini-Protean II Bio-Rad.
- * Equipo de Inmuno-electrotransferencia Bio-Rad.
- * Fuente de poder.

DIAGRAMA DE TRABAJO



7.2 METODOLOGÍA

7.2.1. Obtención de *H. pylori*.

7.2.1.1 Muestras: Se recolectaron 54 biopsias gástricas de adultos con enfermedad ácido-péptica, 27 con gastritis crónica y 27 con úlcera duodenal todas ellas provenientes del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS.

7.2.1.2 Procesamiento de muestras: Las biopsias gástricas suspendidas en solución salina fisiológica de cada paciente se homogenizaron. Del homogenizado se tomaron 50 μ l y se colocaron en placas de agar sangre de carnero al 10%, se distribuyó por toda la placa con un asa bacteriológica, posteriormente se incubaron en un ambiente microaerofílico en una incubadora de CO₂ ajustada a 6.5% de CO₂ y 37°C de temperatura, esperando crecimiento de 3-7 días.

Las cepas de referencia 84183 (Tox⁺) y 86313(Tox⁻) se cultivaron de la misma manera que los homogenizados de las biopsias. Una vez obtenido el cultivo, las colonias se observaron como gotas de rocío, la identificación se realizó por tinción de Gram, pruebas bioquímicas como catalasa, oxidasa y ureasa las cuales deben ser positivas, el cultivo obtenido se suspendió en 1ml de solución salina 0.9% estéril y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Todo el trabajo de cultivo se llevo a cabo en una campana de flujo laminar.

7.2.1.3 Obtención de sobrenadantes: Se descongelaron los cultivos suspendidos en solución salina y se centrifugaron a 3000 rpm/15min, para separar el sobrenadante, el volumen del sobrenadante se concentró mediante ultrafiltración Centriprep 10 (Amicon) a 5000 g por 1 hora a 25°C, quedando aproximadamente 500 μ l de cada sobrenadante, posteriormente se esterilizaron los sobrenadantes mediante minifiltros con membranas de 0.22 μ y se almacenaron a -20°C en tubos eppendorf estériles hasta ser probados sobre células HeLa, (SDS-PAGE) e inmunoelectrotransferencia.

7.2.2 Ensayo citotóxico de sobrenadantes concentrados de *H. pylori* sobre células HeLa:

7.2.2.1 Cultivo de células HeLa.- Células HeLa en MEM-glicerol (medio para congelar) almacenadas en nitrógeno líquido, se descongelaron bruscamente, colocando el criotubo en agua a 37°C, se pipeteó el contenido y se

vació a una botella de cultivo celular de 50 ml la cual contenía 5 ml de MEM-SFB 10%, se homogenizó lentamente con la pipeta y se incubó a 37°C (incubadora para cultivo celular) hasta obtener una monocapa con crecimiento confluyente en la botella.

7.2.2.2 Tripsinización de células.- Se retiró el medio MEM-SFB 10% (medio de mantenimiento) que tenía la botella confluyente de células y se agregó 1ml de tripsina a la botella cubriendo toda la monocapa cayendo por las paredes y dejando aproximadamente 1 minuto con tripsina; se retiró la tripsina y posteriormente se despegó la monocapa agregando 1ml de MEM-SFB 10% para tener una suspensión de células homogenizada. Este procedimiento también se utilizó para congelar células sólo que con MEM-SFB glicerol al 15% y se congelan en criotubos con 1ml de suspensión celular.

7.2.2.3 Cuento de células.- Se tripsinizó una botella de células HeLa confluyente, crecidas en fase logarítmica, las cuales se suspendieron en 1ml de MEM-SFB 10%. Se tomó 200 μ l de la suspensión y se mezcló con 800 μ l de MEM-SFB (dilución 1:5) posteriormente se toma una alícuota pequeña con una pipeta Pasteur, y se determinó el número de células por ml en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y utilizando azul de tripan de acuerdo a la siguiente fórmula:

Células/ml= promedio de células por cuadro X factor de dilución X 10⁴ (cuenta de 10 cuadros) se ajustó el número de células para tener 8 x 10³ cel/pozo. Una vez calculado el volumen que se requiere para obtener esta cantidad se multiplicó por el número de ml de MEM-SFB10% necesarios para preparar cada microplaca. Una vez ajustada la cantidad de células se procedió a preparar una microplaca para el ensayo de citotoxicidad.

7.2.2.4 Preparación de una microplaca para el ensayo de citotoxicidad.

En una microplaca estéril de 96 pozos para células se colocaron 80 μ l de la suspensión celular/pozo con una micropipeta dispensadora y puntas estériles, posteriormente se incubó 24h a 37°C (incubadora de células). Después de la incubación se desechó el medio contenido en la microplaca y con la monocapa formada en cada pozo, se agregó 80 μ l de MEM-SFB 10% fresco, el cual contiene NH₄Cl 10mM estéril.

Se agregaron a cada pozo 20 μ l de cada sobrenadante concentrado obtenido de las cepas de cada muestra a una dilución 1:2 con MEM-SFB 10 (previamente se realizaron diluciones dobles seriadas de 1:2 a 1:32 para observar el título donde se observaba el efecto citotóxico). Se dejó incubando 24 horas a 37°C (incubadora de células).

Al término de la incubación se observó por microscopía de luz la microplaca completa, pozo por pozo para observar la presencia de efecto citotóxico vacuolizante. El criterio para evaluar el efecto citotóxico vacuolizante se realizó de la siguiente manera: se observaron 10 campos en los cuales se observó si hubo o no vacuolización celular.

Mediante un estudio semicuantitativo para saber el grado de actividad vacuolizante que presentaron los sobrenadantes positivos, se contó el número de células totales por campo, se obtuvo un promedio, posteriormente se contaron las células vacuolizadas y se hizo una relación en porcentaje, considerando menor o igual del 40% citotoxicidad baja, mayor del 40% pero menor o igual al 70% citotoxicidad media y mayor del 70% citotoxicidad alta.

7.2.2.5 Tinción de la microplaca con colorante de Giemsa.

Se desechó el medio que contiene la microplaca de células probadas con los sobrenadantes, a la cual se le agregó con una micropipeta dispensadora 50 μ l de formaldehído al 3.7% a cada pozo, y se dejó incubando durante 3h a temperatura ambiente con el fin de fijar las células a la microplaca. Posteriormente se desechó el formaldehído y se colocó 20 μ l de colorante Giemsa (previamente filtrado) / pozo a la microplaca y se incubó por 3min, a temperatura ambiente en agitación. En seguida se agregó 80 μ l de agua destilada y se colocó en agitación durante 1min, después se realizaron 3 lavados de 5min cada uno y finalmente se puso a secar. Esta tinción permitió la observación más clara de las células vacuolizadas.

7. 2. 3 Ensayo de neutralización del efecto citotóxico vacuolizante.

Se prepararon los sueros para la neutralización de la siguiente manera: el anticuerpo anti-VacA fue diluido en MEM-SFB al 10% (1:16) y el suero de humano (1:8) colocándose 20 μ l de cada dilución de sueros con 20 μ l de cada sobrenadante el cual se encontraba diluido en MEM-SFB al 10% (1:2) incubándose durante 1 hora a 37°C. Se adicionó esta mezcla de suero y sobrenadante, es decir 40 μ l a una microplaca con células HeLa previamente preparada como se mencionó anteriormente y se incubó a 37°C durante

24 h. Como controles se pusieron en la microplaca sobrenadante concentrado y células con MEM-SFB 10%.

Tabla 6. Distribución de sobrenadantes para el ensayo de citotoxicidad sobre células HeLa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	*Cel + 84183 Tox*	*Cel + 86313 Tox*	*Cel +SSF	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb
B	*Cel + 84183 Tox*	*Cel + 86313 Tox*	*Cel +SSF	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb
C	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb
D	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb
E	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + Csb	Cel + sb	Cel + sb
F	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb	Cel + sb
G	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB
H	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB

Cel= células HeLa, Sb= sobrenadante concentrado de cada cepa aislada de *H. p*

* pozos control

Para verificar la especificidad de la neutralización se utilizó trimetilamina 0.025M, diluida (1:2) en MEM-SFB 10% de la misma forma que los sobrenadantes problema. Al término se observó mediante microscopía de luz, siguiendo el procedimiento anterior de conteo, para saber si hubo o no neutralización. Cabe mencionar que el ensayo de neutralización solo se realizó a 10 sobrenadantes y a las dos cepas de referencia con anticuerpo Anti-VacA y con suero humano proveniente del paciente 44.

Tabla 7. Distribución de sobrenadantes para el ensayo de neutralización del efecto citotóxico vacuolizante sobre células HeLa.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Cel + Sb +Ab1	Cel + Sb +Ab1	Cel + Sb +Ab1	Cel + Sb +Ab1	Cel + Sb +Ab1	Cel + Sb +Ab1	Cel + Sb +Ab1	Cel + Sb +Ab1	Cel + Sb +Ab1	Cel + Sb +Ab1	*Cel + sb 84183 + Ab1	*Cel + sb 86313 + Ab1
B	Cel + Sb +Ab1	Cel + Sb +Ab1	Cel + Sb +Ab1	Cel + Sb +Ab1	Cel + Sb +Ab1	Cel + Sb +Ab1	Cel + Sb +Ab1	Cel + Sb +Ab1	Cel + Sb +Ab1	Cel + Sb +Ab1	*Cel + sb 84183 + Ab1	*Cel + sb 86313 + Ab1
C	Cel + Sb	Cel + Sb	Cel + Sb	Cel + Sb	Cel + Sb	Cel + Sb	Cel + Sb	Cel + Sb	Cel + Sb	Cel + Sb	*Cel + sb 84183	*Cel + sb 86313
D	Cel + Sb	Cel + Sb	Cel + Sb	Cel + Sb	Cel + Sb	Cel + Sb	Cel + Sb	Cel + Sb	Cel + Sb	Cel + Sb	*Cel + sb 84183	*Cel + sb 86313
E	Cel + Sb + Ab2	Cel + Sb + Ab2	*Cel + Trim	*Cel + Trim	*Cel + Trim + Ab1	*Cel + Trim +Ab2	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB
F	Cel + Sb + Ab2	Cel + Sb + Ab2	*Cel + Trim	*Cel + Trim	*Cel + Trim + Ab1	*Cel + Trim +Ab2	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB	Cel + MEM- SFB
G												
H												

Cel= células HeLa, MEM-SFB 10%= medio mínimo esencial 10%, Ab1= anticuerpo anti-VacA de conejo, Ab2= suero humano (paciente 44).

* pozos Control, sb= sobrenadante concentrado de cepas de *H.p* y Trim (trimetilamina) .

7. 2. 4 Electroforesis en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Electroforesis (SDS-PAGE):

Se realizó cuantificación de proteínas a los sobrenadantes, mediante un equipo comercial (Bio Rad) basado en el método de Bradford para ajustar a una concentración de 10µg de proteína/carril. Se preparó un Gel concentrador 4.5% y un Gel separador 10% de la siguiente manera:

Gel separador	Agua desionizada	Acrlamida	Buffer de separación (Tris 1.5M, SDS 4% pH 8.8)	APS 10% (persulfato de amonio)	TEMED
10%	5ml	4ml	3ml	50µl	5µl
Gel concentrador			Buffer concentrador (Tris 0.5M, SDS 4% pH 6.8)		
4.5%	6ml	1.33ml	2.5ml	50µl	20µl

Nota: Las cantidades descritas son necesarias para la preparación de dos gels.

Montaje del sistema de electroforesis en camaras Mini Protean II (Bio-Rad)

Gel separador:

- * Se utilizó una unidad para geles verticales de 10 X 10cm 0.75cm de grosor, se lavaron dos placas de vidrio con detergente neutro, se enjuagaron con agua destilada y 5% de metanol se secaron los vidrios. Posteriormente se armó el sistema de acuerdo a las instrucciones del mismo.
- * Se agregó el contenido que corresponde al gel separador dentro de las placas de vidrio hasta aproximadamente 3cm del borde superior, se colocó inmediatamente alrededor de 1ml de isopropanol sobre la superficie de la acrilamida, dejándolo caer suavemente por uno de los extremos para posteriormente se observa una interfase definida entre el isopropanol y el gel, lo cual indica la polimerización (aproximadamente 20min).
- * Se inclinaron las placas para remover el isopropanol y se lavaron las superficies con agua desionizada tres veces y se secaron.

Gel concentrador:

- * Se agregó el contenido que corresponde al gel concentrador sobre el gel separador y se colocó cuidadosamente el peine, el cual permite la formación de carriles, acomodándolo de tal manera que no se formen burbujas en la interfase entre los dos geles. Se espera a que polimerise (aproximadamente 30 min).
- * Se retira el peine cuidadosamente y se enjuagan los carriles con agua desionizada.

Corrimiento de muestras:

- * Se instalaron las placas que contienen los geles y carriles listos en la cámara de electroforesis y se observó que no haya fugas ni burbujas. Posteriormente se llenó con solución amortiguadora de corrimiento.
- * Se colocaron 10ml de c/muestra por carril, la cual fue suspendida en solución amortiguadora de tratamiento (previamente puestas en baño maria durante 10 min) y 8ml de marcadores de peso molecular preteñidos, utilizando micropipeta y puntas especiales para electroforesis.

- * Se conectaron los cables del aparato a la fuente de poder, aplicándose 150V por aproximadamente 1h, tiempo en que recorren las proteínas el gel, manteniendo el corrimiento hasta que el azul de bromofenol llegue a unos 0.5cm del final de la placa. Se desconectó el aparato y se retiró el gel.

Tinción con azul de Coomasie:

- * El gel se transfirió a un recipiente con colorante azul de Coomasie suficiente para cubrirlo y se dejó aproximadamente 4h.
- * Se removió el colorante y se adicionó decolorante, cuantos cambios fueron necesarios hasta lograr nitidez adecuada en las bandas.

7. 2. 5 Inmuno-electrotransferencia.

- * Se realizó una electroforesis con las muestras que se quieren probar exceptuando la tinción con azul de Coomasie.
- * Se cortaron pedazos de 10X10cm aproximadamente de papel de nitrocelulosa utilizando para ello guantes. Así como pedazos de igual tamaño de papel filtro, tanto el papel filtro como la nitrocelulosa se colocan en un recipiente que contenga solución amortiguadora de transferencia antes de preparar el sistema de transferencia.
- * Se utilizó un equipo de transferencia (Bio-Rad) y en un recipiente amplio con suficiente cantidad de solución amortiguadora de transferencia, se tomó un "cassette" del aparato y se colocó una esponja (previamente humedecida con solución amortiguadora de transferencia), sobre la esponja se pone un pedazo de papel filtro y sobre éste se colocó el papel de nitrocelulosa.
- * Sobre la nitrocelulosa se colocó el gel y se tiene cuidado de que no queden burbujas atrapadas entre el gel y la nitrocelulosa posteriormente se colocaron dos papeles filtro sobre el gel y enseguida se colocó la otra parte del "cassette" y se cerró. El "emparejado" queda firmemente presionado en el "cassette".
- * El "cassette" se colocó dentro de la cámara de transferencia la cual contiene solución amortiguadora de transferencia y se conectaron los electrodos de tal manera que el cátodo quede del lado del gel. Se conectó a la fuente de poder a 300 mA durante hora y media, el sistema se colocó en hielo.

Inmunodetección:

- * La nitrocelulosa con las proteínas transferidas se colocaron en un recipiente que contenía solución amortiguadora de bloqueo y se incubó a temperatura ambiente 30min. Y a 4°C toda la noche, todo esto en agitación.
- * Después de bloquear se lavaron 2 veces con Tris Saline Blotting Buffer (TSBB) durante 3min cada uno en agitación y temperatura ambiente.
- * La nitrocelulosa se incubó 2h en agitación y temperatura ambiente con una dilución 1:1000 de anticuerpo anti-VacA (anti toxina vacuolizante) diluido en amortiguador de bloqueo.
- * Realizándose 3 lavados de 5min., cada uno con TSBB.
- * Se agregó conjugado biotinilado IgG de cabra anti-IgG de conejo a una dilución 1:500 diluido en TSBB e incubar 1h en agitación y temperatura ambiente.
- * Realizándose 3 lavados de 5min., cada uno con TSBB.
- * Se agregó Avidina- Peroxidasa a una dilución 1:200 en TSBB durante 30 min en agitación y temperatura ambiente.
- * Realizándose 3 lavados de 5min cada uno con TSBB.
- * Se agregó mezcla de sustrato: 30mg de diaminobenzidina + 10ml de metanol frío agregar a 50ml de TSBB + 300ml de peróxido de hidrógeno (3%). Hasta la aparición de bandas.
- * La reacción se detiene colocando la membrana al chorro de agua.

RESULTADOS

La edad promedio de los adultos estudiados con enfermedad ácido-péptica fue de 48 años con un límite inferior de 20 y un límite superior de 82, teniendo una relación de hombres y mujeres de 74 y 26% respectivamente. De las 54 biopsias gástricas de adultos con úlcera duodenal y gastritis crónica se aisló *H. pylori*, cada aislado se consideró como una cepa. La morfología microscópica se observó mediante la tinción de Gram, presentándose en cada caso como un bacilo curvado Gram(-). Las pruebas bioquímicas (ureasa, catalasa y oxidasa) características de *H. pylori* se realizaron a cada cepa aislada, incluyendo las cepas de referencia 84183 (Tox+) y 86313 (Tox -), siendo positivas en todos los casos, (ver tablas 8 y 9).

Tabla 8. Resultados del aislamiento de *H. pylori* a partir de biopsias gástricas de adultos con gastritis crónica.

No.	Biopsia	Diagnóstico clínico	Edad	Sexo	Cepa	Gram	Ureasa	Catalasa	Oxidasa
1	4C	GC	40	F	4	-	+	+	+
2	13C	GC	37	M	13	-	+	+	+
3	52C	GC	25	M	52	-	+	+	+
4	54A	GC	48	M	54	-	+	+	+
5	57C	GC	67	F	57	-	+	+	+
6	61A	GC	68	M	61	-	+	+	+
7	62Bis	GC	75	M	62	-	+	+	+
8	70A	GC	62	M	70	-	+	+	+
9	74C	GC	47	M	74	-	+	+	+
10	75PN	GC	60	F	75	-	+	+	+
11	78A	GC	30	M	78	-	+	+	+
12	83A	GC	29	M	83	-	+	+	+
13	90C	GC	52	M	90	-	+	+	+
14	91A	GC	20	M	91	-	+	+	+
15	100C	GC	32	M	100	-	+	+	+
16	101C	GC	45	F	101	-	+	+	+
17	111C	GC	34	M	111	-	+	+	+
18	112C	GC	34	M	112	-	+	+	+
19	115A	GC	78	F	115	-	+	+	+
20	117A	GC	60	M	117	-	+	+	+
21	118A	GC	43	F	118	-	+	+	+
22	124A	GC	30	M	124	-	+	+	+
23	129C	GC	59	F	129	-	+	+	+
24	138A	GC	22	F	138	-	+	+	+
25	139C	GC	64	M	139	-	+	+	+
26	141C	GC	60	F	141	-	+	+	+
27	142A	GC	30	M	142	-	+	+	+
28					*84183	-	+	+	+

GC= gastritis crónica

* cepa de referencia Tox+

De los 56 sobrenadantes obtenidos de cada cepa de *H. pylori* incluyendo las cepas de referencia, se realizó el ensayo de citotoxicidad poniendo a cada sobrenadante en presencia de un cultivo de células HeLa y al terminó de la incubación, la microplaca se observó por microscopia de luz, resultando que algunos sobrenadantes presentaron efecto citotóxico sobre las células. Esta citotoxicidad consistió en la formación de vacuolas dentro del citoplasma de las células, estas vacuolas fueron redondas y en la mayoría de los casos pequeñas, las cuales prácticamente cubrían todo el citoplasma de la célula. Para una observación más clara de las vacuolas dentro del citoplasma de las células, la microplaca se fijó y tiñó con Giemsa. Sin embargo, aún sin la tinción, las vacuolas presentes dentro del citoplasma de las células eran evidentes. (ver figuras 5, 6, 7, 8 y 9).

Tabla 9. Resultados del aislamiento de *H. pylori* a partir de biopsias gástricas de adultos con úlcera duodenal.

No.	Biopsia	Diagnóstico clínico	Edad	Sexo	Cepa	Gram	Ureasa	Catalasa	Oxidasa
1	5	UD	30	M	5	-	+	+	+
2	8	UD	58	M	8	-	+	+	+
3	18A	UD	37	F	18	-	+	+	+
4	20A	UD	23	F	20	-	+	+	+
5	21A	UD	25	M	21	-	+	+	+
6	22A	UD	46	M	22	-	+	+	+
7	24A	UD	40	M	24	-	+	+	+
8	25A	UD	57	M	25	-	+	+	+
9	28A	UD	82	F	28	-	+	+	+
10	33A	UD	57	M	33	-	+	+	+
11	44	UD	47	M	44	-	+	+	+
12	45A	UD	72	M	45	-	+	+	+
13	54	UD	64	M	54	-	+	+	+
14	56A	UD	21	M	56	-	+	+	+
15	57A	UD	35	M	57	-	+	+	+
16	60A	UD	70	F	60	-	+	+	+
17	64	UD	58	M	64	-	+	+	+
18	68A	UD	59	M	68	-	+	+	+
19	69Vo	UD	40	M	69Vo	-	+	+	+
20	69C	UD	46	M	69	-	+	+	+
21	73A	UD	41	M	73	-	+	+	+
22	76	UD	60	M	76	-	+	+	+
23	80A	UD	52	M	80	-	+	+	+
24	84C	UD	41	M	84	-	+	+	+
25	92A	UD	49	M	92	-	+	+	+
26	96	UD	59	M	96	-	+	+	+
27	106A	UD	49	M	106	-	+	+	+
28					*8613	-	+	+	+

UD= úlcera duodenal

* cepa de referencia Tox -

De los **54** sobrenadantes, tanto de gastritis crónica como de úlcera duodenal, **29** (53.7%) presentaron efecto citotóxico vacuolizante. De los **27** sobrenadantes correspondientes a gastritis crónica **9** (33%) presentaron efecto citotóxico y de los **27** sobrenadantes de úlcera duodenal **20** (74%) también presentaron efecto citotóxico (*ver tabla 10*).

Para comprobar que dicho efecto se debe a la presencia de la toxina en los sobrenadantes de cepas citotóxicas de *H. pylori*, se realizó el ensayo de neutralización del efecto citotóxico a los sobrenadantes positivos. Al mezclar el anticuerpo anti-VacA con el sobrenadante y poniéndolo en contacto sobre células HeLa se observó ausencia de vacuolas dentro de las células en todos los casos excepto en los controles es decir en donde no se colocó anticuerpo.

Tabla 10. Resultados del efecto citotóxico vacuolizante presentado por los sobrenadantes de adultos con gastritis crónica y úlcera duodenal

No.	Sobrenadante	Efecto citotóxico	Actividad citotóxica	Diagnóstico clínico	No.	Sobrenadante	Efecto citotóxico	Actividad citotóxica	Diagnóstico clínico
1	4	+	B	GC	1	5	+	B	UD
2	13	-	ninguna	GC	2	8	+	B	UD
3	52	-	ninguna	GC	3	18	-	ninguna	UD
4	54	-	ninguna	GC	4	20	-	ninguna	UD
5	57	+	B	GC	5	21	-	ninguna	UD
6	61	-	ninguna	GC	6	22	+	B	UD
7	62	-	ninguna	GC	7	24	+	M	UD
8	70	-	ninguna	GC	8	25	+	A	UD
9	74	-	ninguna	GC	9	28	-	ninguna	UD
10	75	+	A	GC	10	33	+	A	UD
11	78	-	ninguna	GC	11	44	+	A	UD
12	83	-	ninguna	GC	12	45	+	A	UD
13	90	+	B	GC	13	54	+	M	UD
14	91	+	B	GC	14	56	+	B	UD
15	100	+	B	GC	15	57	+	M	UD
16	101	-	ninguna	GC	16	60	-	ninguna	UD
17	111	-	ninguna	GC	17	64	+	A	UD
18	112	-	ninguna	GC	18	68	+	A	UD
19	115	-	ninguna	GC	19	69Vo	+	A	UD
20	117	+	B	GC	20	69	+	B	UD
21	118	-	ninguna	GC	21	73	-	ninguna	UD
22	124	-	ninguna	GC	22	76	+	B	UD
23	129	-	ninguna	GC	23	80	+	M	UD
24	138	+	B	GC	24	84	+	A	UD
25	139	+	A	GC	25	92	+	B	UD
26	141	-	ninguna	GC	26	96	+	A	UD
27	142	-	ninguna	GC	27	106	-	ninguna	UD
28	*84183	+	A		28	*86313	-	ninguna	

Presencia del efecto citotóxico (+); Ausencia del efecto citotóxico (-). A=alta; M=media; B=bajo. UD=úlcera duodenal y GC=gastritis crónica. * cepas de referencia.



Figura 5. Células HeLa en medio MEM-SFB 10% en presencia de sobrenadante, a las 12 horas de incubación. Se puede observar la formación de vacuolas dentro de la célula (visto mediante microscopía de Luz 20X).

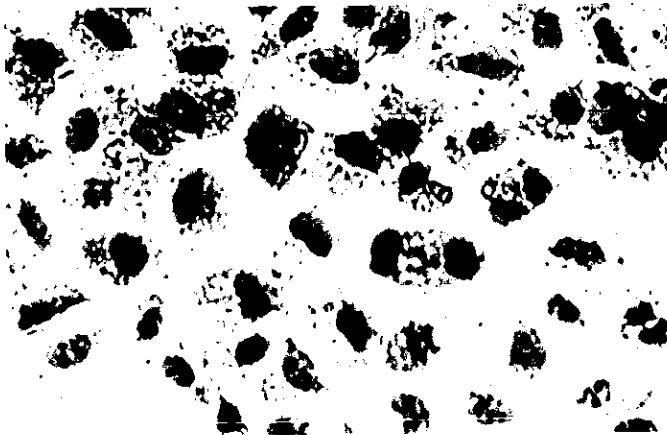


Figura 6. Células HeLa teñidas con colorante de Giemsa, en ausencia de sobrenadante (visto mediante microscopía de luz 20X).



Figura 7. Muestra la presencia del efecto citotóxico vacuolizante sobre células HeLa, teñidas con colorante de Giemsa después de 24h de incubación presentado por el sobrenadante obtenido de la cepa 84186 Tox+ (visto mediante microscopía de luz 20X).

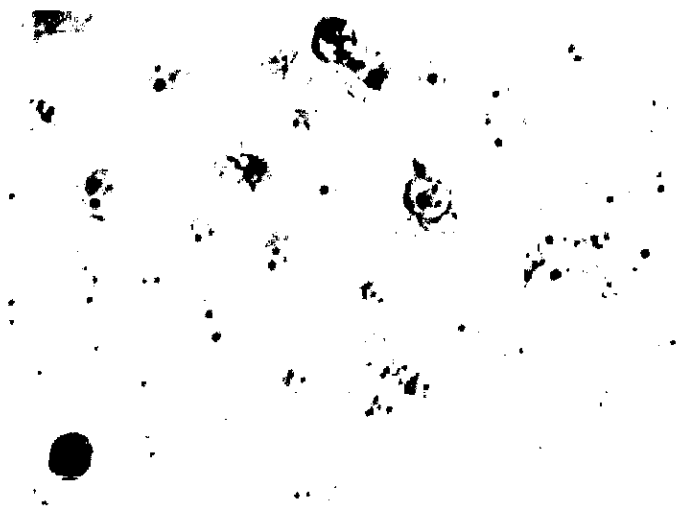


Figura 8. Muestra la presencia del efecto citotóxico vacuolizante sobre células HeLa, teñidas con colorante de Giemsa después de 24h de incubación presentado por el sobrenadante obtenido de la cepa 44 (visto mediante microscopía de luz 20X).

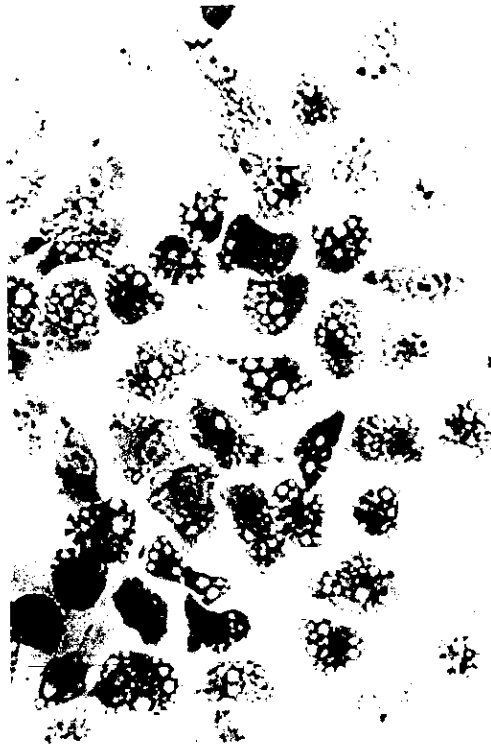


Figura 9. Muestra el grado de actividad citotóxica vacuolizante que presentaron sobrenadantes positivos sobre células HeLa teñidas con Giemsa: Citotoxicidad alta sobrenadante 139 (visto mediante microscopía de luz 20X).



Figura 10. Muestra el grado de actividad citotóxica vacuolizante que presentaron sobrenadantes positivos sobre células HeLa teñidas con Giemsa: Citotoxicidad media, sobrenadante 80 (visto mediante microscopía de luz 20X).

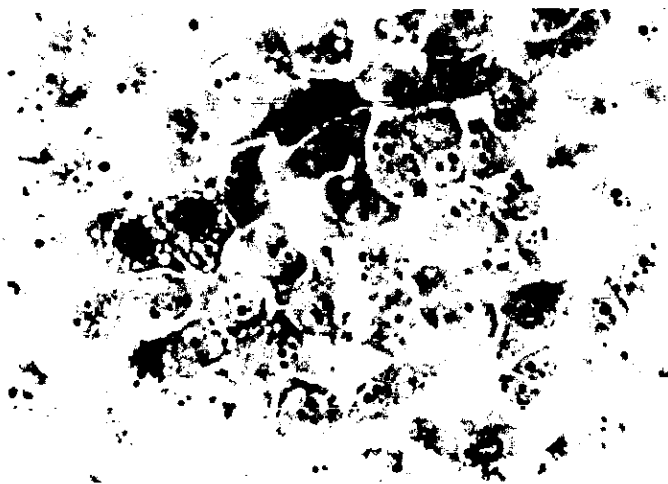


Figura 11. Muestra el grado de actividad citotóxica vacuolizante que presentaron sobrenadantes positivos sobre células HeLa teñidas con Giemsa: Citotoxicidad baja representada por sobrenadante 138 (visto mediante microscopía de luz 20X).

Para comprobar la especificidad de esta neutralización se utilizó trimetilamina (ver sección de citotoxina vacuolizante), la vacuolización que ocasiona esta base débil sobre células HeLa, no fue neutralizada con el anticuerpo anti-VacA. Al probar suero de humano proveniente de un adulto con úlcera duodenal, (cepa 44) también se observó neutralización del efecto vacuolizante sobre células, tanto con el sobrenadante proveniente de otro adulto (cepa 139) como de su homólogo (cepa 44), no siendo este el caso para la trimetilamina en donde si hubo vacuolización (ver tabla 12).

Dentro del efecto citotóxico vacuolizante presentado por algunos sobrenadantes sobre células HeLa se observaron diferentes grados de vacuolización dentro de las células, en el caso de adultos con gastritis crónica 2 de 9 (22%) presentaron actividad citotóxica alta y 7 de 9 (77.7%) actividad citotóxica baja, en adultos con úlcera duodenal presentaron lo siguiente: 9 de 20 (45%) citotóxicidad alta, 4 de 20 (20%) citotóxicidad media y 7 de 20 (35%) citotóxicidad baja.

Tabla 11. Resultados de los sobrenadantes obtenidos de cepas de *H. pylori* suspendidas en solución salina, que presentaron efecto citotóxico vacuolizante sobre células HeLa.

Diagnóstico Clínico	n	Efecto citotóxico vacuolizante	% de cepas citotóxicas
Gastritis Crónica	27	9	33
Úlcera Duodenal	27	20	74
	T=54	29	53.7

$P=0.0029$

La electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% realizada a los sobrenadantes tanto de úlcera duodenal como de gastritis crónica que presentaron efecto citotóxico, estuvieron presentes bandas de aproximadamente 101, 89, 80 y 55 kDa observándose tanto en los sobrenadantes como en la cepa de referencia (84183 Tox+) (ver figuras 11 y 12). La detección de la toxina VacA de *H. pylori* mediante inmunoelectrotransferencia se realizó utilizando un anticuerpo anti-VacA a una dilución 1:1000 en ambos sobrenadantes (UD y GC) presentándose reconocimiento hacia bandas de 89 kDa y 55 kDa aproximadamente .

Sólo a 11 de los 20 sobrenadantes de adultos con úlcera duodenal que presentaron efecto citotóxico se les realizó IET, y el resultado fue, en 9 de los 11 se detectó una banda de aproximadamente 55 kDa; en 1 de los 11 sobrenadantes se evidenciaron dos bandas una de aproximadamente 89 kDa y otra de 55 kDa, y en 1 de los 11 sobrenadantes se encontró solamente una banda de aproximadamente 89 kDa.

Ambas bandas fueron reconocidas también en el sobrenadante de la cepa de referencia (84183 Tox+) (*ver figuras 12 y 13*). En el caso de gastritis crónica, de los 9 sobrenadantes que presentaron efecto citotóxico, en 4 sobrenadantes se observaron dos bandas, una de aproximadamente 89 kDa y otra de 55 kDa, en 3 de 9 sobrenadantes se detectó sólo una banda de aproximadamente 89 kDa, y en 1 de 9 sobrenadantes se encontró una banda de aproximadamente 55 kDa y solamente en 1 de 9 sobrenadantes no se observó ninguna banda (*ver figuras 15 y 16*).

Figura 12. Representa el grado de actividad citotóxica vacuolizante de los sobrenadantes que presentaron efecto citotóxico sobre células Hela.

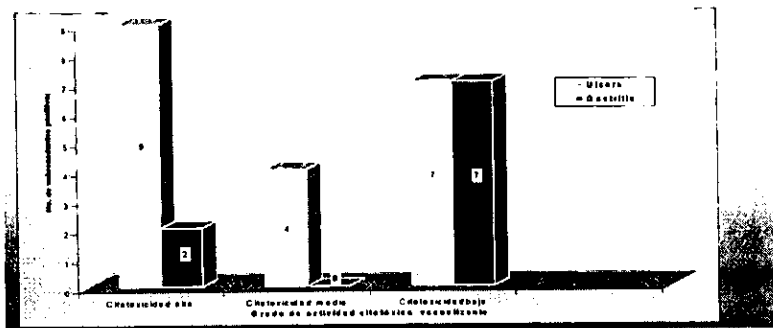


Tabla 12. Resultados de neutralización del efecto citotóxico vacuolizante de algunos sobrenadantes sobre células Hela.

Sobrenadante	Efecto -citotóxico	Anticuerpo	Presencia de neutralización
75	+	anti-VacA	+
57	+	anti-VacA	+
117	+	anti-VacA	+
91	+	anti-VacA	+
139	+	anti-VacA	+
44	+	anti-VacA	+
96	+	anti-VacA	+
69	+	anti-VacA	+
25	+	anti-VacA	+
33	+	anti-VacA	+
84183 * (Tox+)	+	anti-VacA	+
86313 * (Tox-)	-	anti-VacA	+
trimetilamina	+	anti-VacA	-
trimetilamina	+	suero adulto (U D) 44	-
44	+	suero adulto (U D) 44	+
139	+	suero adulto (U D) 44	+
* células-MEM-SFB10%	-	anti-VacA	-
* células-MEM-SFB 10%	-	-	-

* cepas de referencia

* testigos

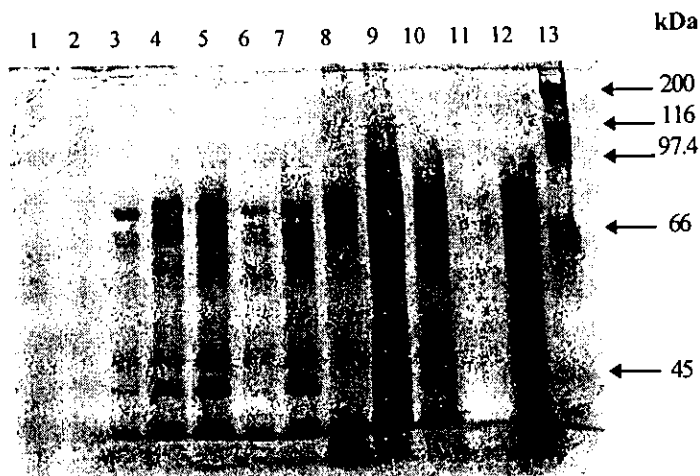


Figura 13. Electroforesis en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%. Gel correspondiente a sobrenadantes de adultos con gastritis crónica. **Marcador de peso molecular** (Linea 13). Sobrenadante de la cepa de referencia **84183 Tox+** (Linea 12), **sobrenadante 100** (Linea 11), **sobrenadante 117** (Linea 10), **sobrenadante 139** (Linea 9), **sobrenadante 91** (Linea 8) **sobrenadante 57** (Linea 7), **sobrenadante 90** (Linea 6), **sobrenadante 75** (Linea 5), **sobrenadante 138** (Linea 4) **sobrenadante 4** (Linea 3) **sobrenadante 74** (Linea 2) **sobrenadante 118** (Linea 1).

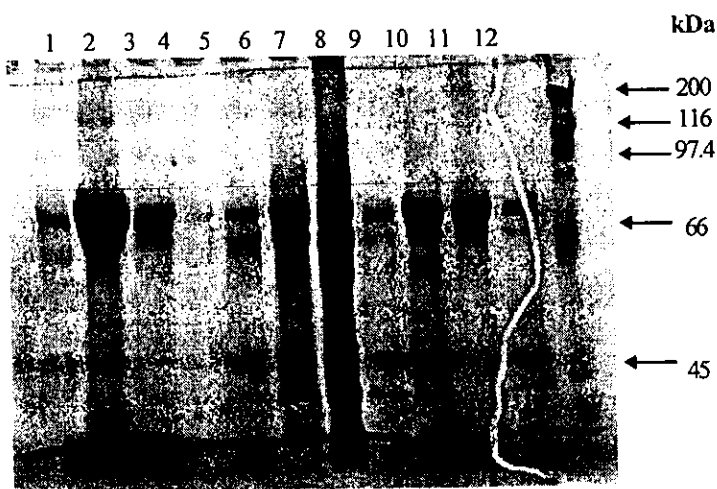


Figura 14. Electroforesis en gels de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%,. Gel correspondiente a sobrenadantes de adultos con ulcera duodenal. **Sobrenadante 80** (Linea 1), **sobrenadante 68** (Linea 2), **sobrenadante 33** (Linea 3), **sobrenadante 69** (Linea 4), **sobrenadante 96** (Linea 5), **sobrenadante 57** (Linea 6), **sobrenadante 64** (Linea 7), **sobrenadante 22** (Linea 8), **sobrenadante 45** (Linea 9), **sobrenadante 24** (Linea 10), **sobrenadante 25** (Linea 11), **Marcador de peso molecular** (Linea 12).

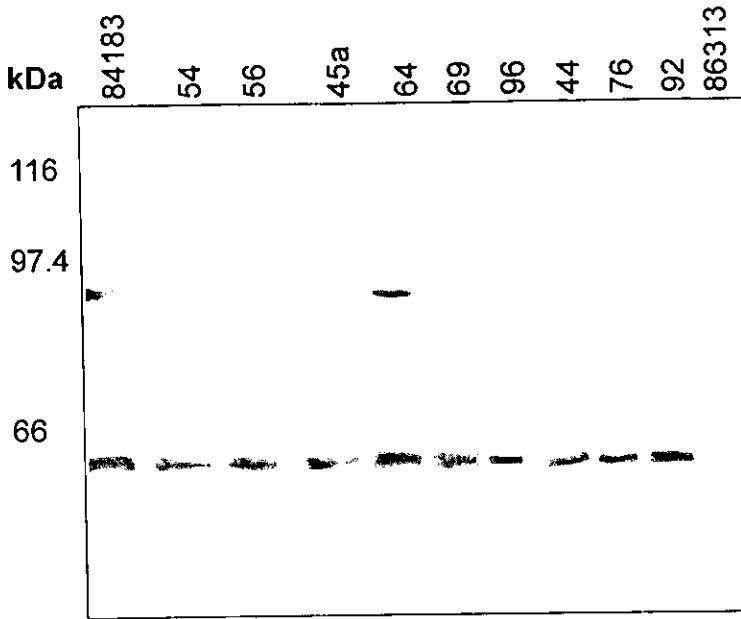


Figura 15. Inmunoelctrotransferencia de los sobrenadantes de *Helicobacter pylori*. Sobrenadante de la cepa de referencia 84183 Tox+ (Linea 1), Sobrenadantes de adultos con úlcera duodenal que presentaron citotoxicidad sobre células HeLa (Lineas 2-10), Sobrenadante de la cepa de referencia 86313 Tox-(Linea 11).

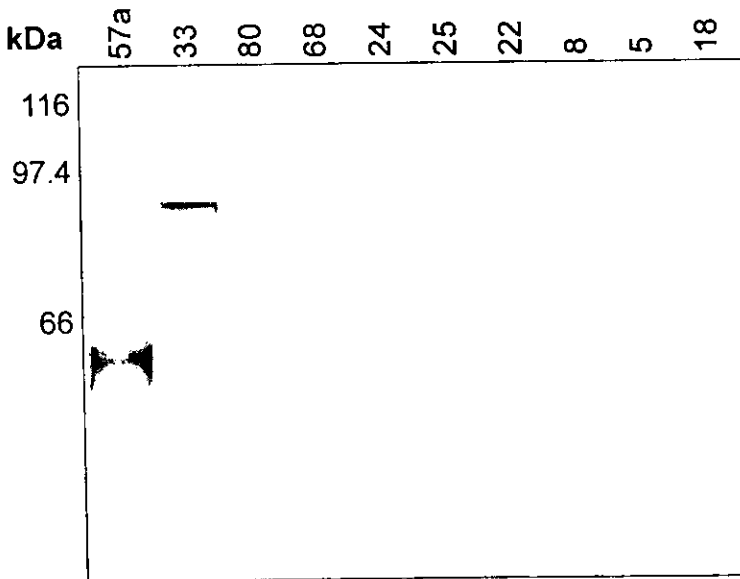


Figura 16. Inmunoelctrotransferencia de los sobrenadantes de *Helicobacter pylori*. Sobrenadantes de adultos con úlcera duodenal que presentaron citotoxicidad sobre células HeLa (Lineas 1-9), sobrenadante de adulto con úlcera duodenal que no presentó citotoxicidad sobre células HeLa (Linea 10).

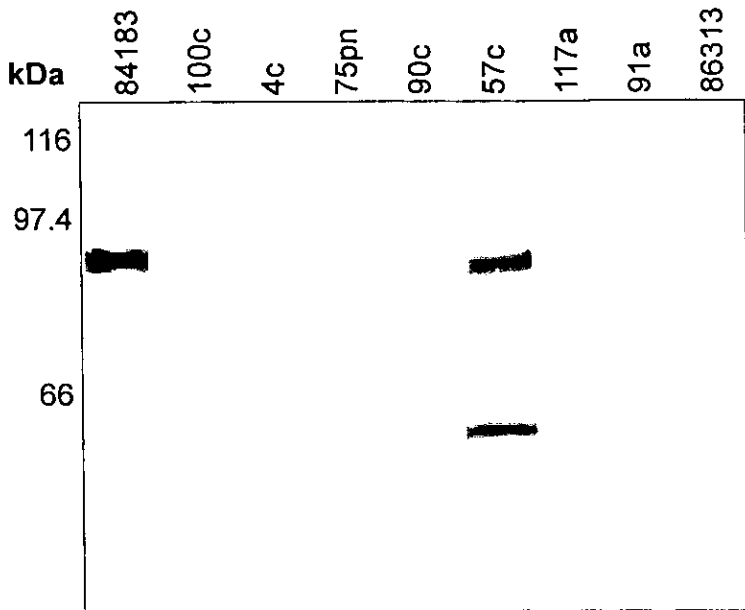


Figura 17. Inmuno-electrotransferencia de los sobrenadantes de *H. pylori*. Sobrenadante de la cepa de referencia 84183 Tox+ (Línea 1), sobrenadantes de adultos con gastritis crónica que presentaron citotoxicidad sobre células HeLa (Líneas 2-8), sobrenadante de la cepa de referencia 86313 Tox- (Línea 9).

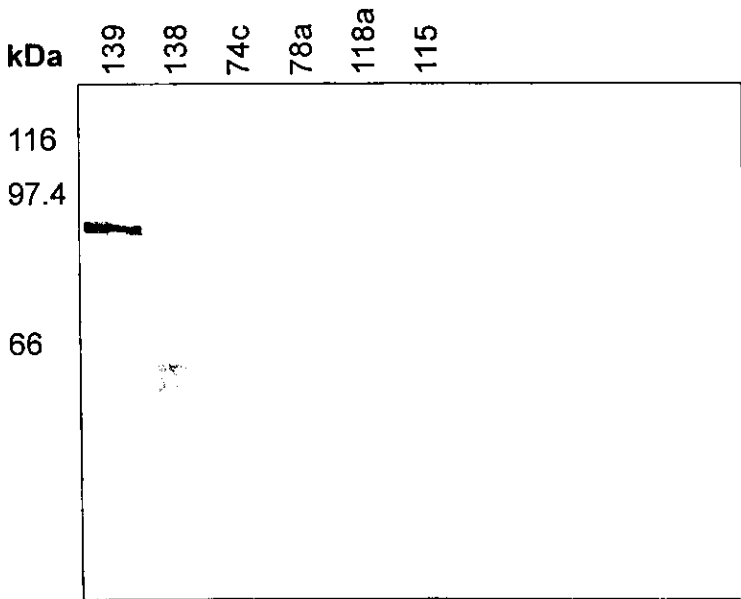


Figura 18. Inmuno-electrotransferencia de los sobrenadantes de *H. pylori*. Sobrenadantes de adultos con gastritis crónica que presentaron citotoxicidad sobre células HeLa (Líneas 1- 2), sobrenadantes adultos con gastritis crónica que no presentaron citotoxicidad sobre células HeLa (Líneas 3- 6).

DISCUSIÓN

Los criterios para seleccionar a la población estudiada fueron considerados debido a que existen muchas patologías digestivas causadas por *H. pylori*, las cuales se clasifican de acuerdo al diagnóstico clínico e histopatológico. En este caso, solamente se consideraron gastritis crónica y úlcera duodenal, debido a la relación que tiene la toxina vacuolizante (VacA) con este tipo de patologías clínicas (Blaser, 1996a).

El tamaño de muestra también se considerado, de tal manera que fuera representativa, para poder establecer estadísticamente una relación entre la presencia de cepas productoras de citotoxina y la patología. La edad promedio de los adultos estudiados fue de 48 años, edad en la que se conoce por otros estudios que más de la mitad de la población se encuentra infectada con *H. pylori*, observándose con mayor frecuencia en el sexo masculino (Reploge, *et al* 1995). Resultando en este caso que también, predominó la infección en el sexo masculino.

El ensayo de citotoxicidad sobre células HeLa, tuvo como propósito saber si los sobrenadantes obtenidos de cepas de *H. pylori* suspendidas en solución salina, pueden ocasionar citotoxicidad sobre células HeLa, debido a la presencia de la toxina VacA causante de vacuolización citoplasmática en células eucarióticas. La toxicidad de VacA sobre células HeLa ha sido descrita con sobrenadantes obtenidos de cultivos de *H. pylori* en caldo brucella, el cual permite observar el efecto citotóxico que ocasiona la toxina secretada sobre algunas células (Leunk, *et al* 1988; Cover *et al*, 1992a). Este método fue usado para la purificación de la toxina (Cover y Blaser, 1992b). El encontrar este efecto producido por sobrenadantes de *H. pylori* suspendidos en solución salina es una manera de saber si una cepa es citotóxica o no y poderlo relacionar con el diagnóstico clínico.

En el estudio se encontró que el **53.7%** del total de las cepas aisladas son citotóxicas, este dato es similar a la mayoría de los reportes, en donde más de la mitad de las cepas de *H. pylori* son productoras de la toxina. La relación entre las cepas toxigénicas y el diagnóstico clínico ya ha sido reportado (Blaser, 1996a; Phadinis, *et al* 1994), pero no en población mexicana.

La frecuencia de cepas citotóxicas fue mayor en personas con úlcera duodenal (74%) que en personas con gastritis crónica (33%) con $p=0.0029$ de acuerdo con el estudio de χ^2 lo cual señala que si hay una relación estadísticamente significativa entre las cepas productoras de citotoxina y la

patología úlcera duodenal y Gastritis crónica, en la población estudiada (*Ver tabla 11*) lo que indica es que VacA es un importante factor de patogenicidad.

Dentro de las cepas citotóxicas se encontraron diferencias en cuanto al grado citotóxico vacuolizante presentado, es decir, se encontraron casos de cepas muy citotóxicas tanto en gastritis crónica como en úlcera duodenal por ello se denominó el parámetro; grado de citotoxicidad alta, media y baja dependiendo del número de células vacuolizadas dentro del cultivo celular (*ver figura 9,10,11 y tabla 10*) ya que, algunos de los sobrenadantes de gastritis crónica presentaron vacuolización completa en todo el cultivo de células HeLa a lo que se le llamó grado de citotoxicidad alta, así como hubo sobrenadantes de úlcera duodenal que presentaron un grado de citotoxicidad bajo, es decir, no todas las células se encontraban vacuolizadas, lo cual indica que en tanto en gastritis crónica como en úlcera duodenal se puede presentar diferentes grados de citotoxicidad.

Ya que se esperaría encontrar que todos los sobrenadantes de úlcera duodenal presentarían siempre un grado de citotoxicidad alto comparado con los de gastritis. Sin embargo, estas diferencias en cuanto a la cantidad de células vacuolizadas puede depender de varios factores: descartando primero la cantidad de sobrenadante agregado en cada ensayo de citotoxicidad ya que la cantidad siempre fue constante (20µl); otro factor pudiera ser la cantidad de cultivo aislado o al tipo de cepa que se encontraba en el cultivo, debido a que existen cepas productoras de toxina (VacA) que presentan diferente genotipo por ejemplo, las S1/m1 que se ha visto son más citotóxicas que una cepa S2/m2, (Atherton, *et al*/ 1995; Figura, 1996).

Sin embargo, el grado de citotoxicidad alta si predomina más en adultos con úlcera duodenal, que en adultos con gastritis, esto también sucede con otros estudios, ya que se ha encontrado predominantemente el genotipo S1/m1 (son más citotóxicas) en personas con úlcera duodenal (Atherton, *et al*/1995; Blaser, 1996a). Se considera importante el tipo de cepa o cepas encontradas en la infección debido a que se relaciona en la mayoría de los casos con el grado de daño al tejido.

Se ha observado que la mayoría de las cepas de úlcera duodenal son tipificadas como cepas tipo I: Vac A⁺CagA⁺ teniendo que la presencia del gen *cag A* induce la secreción de IL-8 relacionada con el daño al tejido (Fantry, *et al*/1996; Weel, *et al*/1996; Crabtree, 1996).

El ensayo de neutralización permitió saber que la vacuolización dentro de las células, fue debida a la toxina de *H. pylori* presente en los sobrenadantes; debido a que al incubar la mezcla de cada sobrenadante con anticuerpo anti-VacA y ponerlo sobre el cultivo celular, hubo reconocimiento del anticuerpo hacia la toxina y por lo tanto no se presentó la vacuolización. Existen reportes donde señalan que una base débil como la trimetilamina puede ocasionar un efecto similar al que ocasiona la toxina de *H. pylori* sobre células HeLa, esta sustancia ayudó para comprobar la especificidad de la neutralización ya que en todos los ensayos con trimetilamina si hubo vacuolización, el anticuerpo no reconoció a esta molécula.

Cabe señalar que también el suero de humano proveniente de un adulto con úlcera duodenal (cepa 44) presentó neutralización del efecto citotóxico, tanto para su homólogo (sobrenadante 44) como para otro (sobrenadante 139), pero no evitó la vacuolización que ocasionó la trimetilamina, este suero tampoco reconoce a la trimetilamina. Para hacer más evidente que la presencia del efecto citotóxico sobre las células fue debida a la toxina de *H. pylori*, presente en los sobrenadantes, se realizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) e inmunoelectrotransferencia.

En el corrimiento electrofóretico se observó la presencia de bandas de aproximadamente 101 (solo en algunos), 89 y 55 kDa tanto en los sobrenadantes de gastritis crónica como en los de úlcera duodenal. En la Inmunoelectrotransferencia fueron reconocidas bandas con pesos moleculares de aproximadamente 89 kDa y 55 kDa observadas tanto en los sobrenadantes de adultos con gastritis crónica como en los de úlcera duodenal e incluyendo el sobrenadante de la cepa de referencia 84183 (Tox+) y ocurriendo lo contrario tanto en el sobrenadante de la cepa 86313 (Tox-) como en los sobrenadantes que no presentaron efecto citotóxico sobre células HeLa.

Lo anterior indica que el reconocimiento del anticuerpo anti-VacA (1:1000) fue específico hacia la toxina. Sin embargo, el reconocimiento no estuvo dirigido a una banda, sino a dos; la primera banda fue de aproximadamente 89 kDa y correspondería al peso molecular de la toxina de *H. pylori* el cual se ha reportado de aproximadamente 87-90 kDa en condiciones desnaturizantes (Cover, 1996; Cover, 1998), la segunda banda que reconoció el anticuerpo, fue de aproximadamente 55 kDa de peso, esta banda puede corresponder a uno de los dos fragmentos que conforman a la toxina VacA, las cuales se han reportado que son de 34 kDa y otro de 58 kDa aproximadamente (Cover, 1996; Cover, 1998; Garner y Cover, 1996).

En los sobrenadantes de adultos con úlcera duodenal se detectó principalmente la banda de aproximadamente 55 kDa y en los sobrenadantes de adultos con gastritis crónica en la mayoría de los casos se detectaron las dos bandas 55 kDa y 89 kDa. En la cepa de referencia 84183 (Tox+) fueron identificadas tanto la banda de 55 como la de 89 kDa y en la cepa de referencia 86313 (Tox-) no se observó reconocimiento hacia ninguna.

El hecho de encontrar la (s) bandas de aproximadamente 55 kDa y 89 kDa, nos está indicando que probablemente la toxina sufrió una separación de sus fragmentos, los cuales tienden a separarse dependiendo del medio en donde se encuentren y también cuando se encuentra almacenada durante prolongado tiempo o también cuando se pone en contacto a pH ácidos (Cover, *et al* 1997). Cabe señalar que esta técnica se realizó después del ensayo de citotoxicidad y neutralización por lo que los sobrenadantes que se probaron permanecieron por largo tiempo almacenados.

Esta separación de fragmentos que componen a la toxina pudo deberse a varios factores, como el almacenamiento, congelamiento y descongelamiento o por que simplemente la toxina tiende a separarse en sus dos fragmentos en condiciones reductoras. Sin embargo, el hecho de ser reconocidos estos fragmentos por el anticuerpo respalda más el hecho de que el efecto citotóxico presentado en células HeLa por los sobrenadantes se debe a la toxina presente.

Mucho se ha hablado de estos fragmentos ya que esta toxina está catalogada como del grupo de toxinas estructura A-B en donde el dominio A confiere actividad enzimática y el dominio B tiene que ver con la unión a las células (Cover, 1998), el fragmento de aproximadamente 34 kDa corresponde al amino terminal y el de 58 kDa corresponde al carboxi terminal y se ha visto que el fragmento de 58 kDa esta muy relacionado con la unión a células.

Existe otra clasificación sobre las toxinas bacterianas en donde señalan que: 1) Cuando entra la toxina dentro de las células, modifica enzimáticamente un blanco intracelular específico y 2) Existen toxinas que cuando actúan a nivel de membrana plasmática se alteran las señales de transducción para la permeabilidad de la membrana.

Aún no se conoce exactamente el mecanismo de internalización de la toxina de *H. pylori*. Sin embargo, se tiene postulado que probablemente: (1) La toxina se une a células vía el reconocimiento de una secuencia de aminoácidos del fragmento de aproximadamente 58 kDa. (2) La toxina se

internaliza lentamente en un proceso dependiente de temperatura y (3) La toxina interactúa con un blanco a nivel intracelular (se dice que es una ATPasa).

El presente estudio demostró que puede ser útil sustituir el cultivo de *H. pylori* para la obtención de la toxina, por una suspensión en solución salina lo cual, serviría también como método de aislamiento e identificación de la toxina, es decir, no descartando la posibilidad de ser un método alternativo para purificar la toxina, siendo esta proteína un marcador de patogenidad importante en la infección con *H. pylori*.

CONCLUSIONES

- * Los sobrenadantes obtenidos de cepas de *Helicobacter pylori* suspendidas en solución salina pueden provocar efecto citotóxico vacuolizante específico sobre células HeLa.
- * De los 54 sobrenadantes de *Helicobacter pylori*, provenientes de adultos con gastritis crónica y úlcera duodenal, 53% presentaron efecto citotóxico vacuolizante.
- * La actividad citotóxica en úlcera duodenal (74 %) y el grado de citotoxicidad alto (45 %) fue mayor comparado con la actividad citotóxica (33 %) y grado de citotoxicidad alto (22 %) presentado en gastritis crónica.
- * En los sobrenadantes que presentaron efecto citotóxico vacuolizante se identificaron mediante inmunoelectrotransferencia dos bandas las cuales presentan pesos moleculares de aproximadamente 89 kDa y 55 kDa las mismas que se identificaron en el sobrenadante de la cepa de referencia 84183 (Tox +) corresponden a la toxina y a una subunidad de la toxina (VacA) respectivamente.

ANEXO

- **Agar sangre de camero al 10%**

- Agar (Difco) 13.0g
- Sangre de camero 100ml
- Acido nalidixico 10mg
- Trimetoprim 5mg
- Vancomicina 3mg
- Anfotericina 2mg
- Agua destilada 9000ml

*Se preparan cajas petri con agar sangre de camero con y sin antibiótico

- **Preparación de medio de cultivo para células HeLa: MEM-SFB (Medio mínimo esencial de Eagle-suero fetal bovino)**

COMPONENTES	MEM 10%	MEM 2%	MEM Glicerol (para congelar)	CONC FINAL
MEM de Eagle 10X	20ml	4ml	2.5ml	1X
NaHCO ₃	3ml	0.75ml	0.375ml	0.05%
Antibióticos	2ml	0.5ml	0.25ml	
Hepes 1M	5ml	125ml	0.125ml	25mM
Glutamina 200mM	2ml	0.5ml	0.25ml	2mM
Suero fetal bovino	20ml	1ml	3.75ml	10%*
Glicerol	-	-	3.75ml	15%
DH ₂ O	148ml	41ml	14ml	
	200ml	50ml	25ml	

* 15% en el medio para congelar

El material y recipientes utilizados para preparar los medios de cultivo para células son estériles, la preparación de estos se llevó a cabo en una campana de flujo laminar. Una vez preparado el medio de cultivo para células se esterilizó mediante filtración con membranas estériles de 0.22µm el medio se guardó a 4°C, preparándose nuevamente cada vez que se requería.

- Solución de cloruro de amonio 1M

Se prepararon 50ml de NH₄Cl de la siguiente manera:

2.67g de NH₄Cl aforar a 50ml de agua destilada

- Solución de trimetilamina 0.025M

Se prepararon 10ml de trimetilamina de la siguiente manera:

14.75mg de (CH₃)₃N aforar a 10ml de agua destilada

Soluciones para electroforesis e inmunoelectrotransferencia

- Solución concentrada de acrilamida (sol N):
Acrilamida 73g
Bis acrilamida 82g
Agua desionizada a 250ml
Se almacenó en botella ámbar a 4°C
- Solución amortiguadora concentrada de separación (sol U)
(Tris 1.5M, SDS4%, pH 8.8)
Tris base 90.80
SDS 2g
Agua desionizada a 500ml
Ajustar pH con HCl y almacenar a 4°C
- Solución amortiguadora concentrada concentrador (sol.M)
(Tris 0.5M, SDS 4%, pH 6.8)
Tris base 30.3g
SDS 2g
Agua desionizada a 500ml
Ajustar el pH con HCl y almacenar a 4°C
- Solución de persulfato de amonio (APS 10%)
Persulfato de amonio 0.01g
Agua desionizada 0.1ml
*Se preparaba cada vez que se utilizaba
- Solución amortiguadora de transferencia 10X
Tris base 30g
Glicina 144g
SDS 10g
Agua desionizada a 1000ml
Para obtener concentración 1X (Diluir 100ml del concentrado con 900ml de agua desionizada)
- Solución amortiguadora de transferencia
Tris base 3.03g
Glicina 14.4g
Metanol 200ml
Agua desionizada a 1000ml
El amortiguador se almacenó a 4°C
- Solución amortiguadora de transferencia tris-salina 10X (TSBB)
Tris base (10mM)¹ 121g
NaCl (0.5M)¹ 292.2g
Tween 20 (0.5%)¹ 50ml

Agua desionizada a 1000ml

¹ Las concentraciones indicadas entre paréntesis corresponden a la concentración final del buffer 1X (Diluir 100ml del concentrado con 900ml de agua desionizada)

- SDS al 10%

SDS 10g
Agua desionizada a 100ml

- Azul de bromofenol al 1%

Azul de bromofenol 0.1g
Agua desionizada a 10ml

- Solución amortiguadora de tratamiento 2X (BT)

(Tris 0.125M pH 6.8, SDS 4%, Glicerol 20%, mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0.1% w/v)

Sol M 2.5ml
SDS (10%) 4 ml
Glicerol 2ml
2-β mercaptoetanol 1 ml
Azul de bromofenol 10μl
Agua desionizada a 10ml

Se dividieron en alícuotas y se guardaron a -20°C

- Solución para teñir

(Azul de Coomassie, metanol 40%, ácido acético 7%)

Azul de Coomassie .25g
Metanol 400ml
Agitar hasta disolver
Acido acético 70ml
Agua desionizada a 1000ml

- Solución para desteñir

(Metanol 10%, ácido acético 10%)

Metanol 100ml
Acido acético 100ml
Agua desionizada 800ml

- Solución de sustrato

- a) mezclar 300μl de H₂O₂(3%) con 50ml de TSB
- b) disolver 30mg de cromogeno en 10ml de metanol frío
Preparar minutos antes de ser utilizada y proteger de la luz.

BIBLIOGRAFIA

1. **Andersen, A., Elliott, D., Lawson, M., Barland, P., Hatcher, V., & Puszkin, E. 1997.** Growth and morphological transformations of *H. pylori* in broth media. *Journal of Clinical Microbiology*. 35: 2918-2922.
2. **Appelmek, B.J., Simoons-Smit, I., Negrini, R., Moran, A.P., Aspinall, G.O., Forte, J.G., Devries, T., Quan, H., Verboom, T, Maaskant, J.J., Ghiara, P., Kuipers, E.J., Bloemena, E., Tadema, T.M., Townsend, R.R., Tyagarajan, K., Crothers, J.M., Monteiro, M.A., Savio, A., & De Graaff, J. 1996.** Potential role of molecular mimicry between *H. Pylori* Lipopolisaccharide and host lewis blood group antigens in autoimmunity. *Infection and immunity*. 64:2031-2040.
3. **Aspinall, G.O., & Monteiro, M.A. 1996.** Lipopolisaccharides of *H.pylori*. Strains P466 and M019: structures of the O antigen and core oligosaccharide regions. *Biochemistry*. 35:2498-2504.
4. **Ashton-Key, M., Diss, T.C. & Isaacson, P.G. 1996.** Detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy and resection specimens. *J. Clin. Pathol.* 49: 107-111.
5. **Atherton, J., Cao, P., Peeck, R.M., Tummuru, M., Blaser, M.J., & Cover, T.I. 1995.** Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 270:17771-17777.
6. **Baik, S.C., Youn, H.s., Chung, M.H., Lee, W.K., Cho, M.J., Ko, G.H., Park, C.K., Kassai, H. & Rhee, K.H. 1996.** Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori* infeced human gastric mucosa. *Cancer Res.* 56: 1279-1282.
7. **Blaser, M.J. 1992.** Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *H.pylori* -induced inflammation *Gastroenterology*. 102: 720-727.
8. **Blaser, M.J. 1993** *H.pylori*. microbiology of a «slow» bacterial infection. *Trends in Microbiology* 1:255-259.
9. **Blaser, M.J. 1996a.** Role of *vac A* and *cag A* locus of *H.pylori* in human disease. *Aliment pharmacol Ther.* 10 (suppl 1): 73-77.
10. **Blaser, M.J. 1996b.** The *H.pylori* Bacteria binding ulcers. *Scientific American* 274 : 92-97.

11. **Bode, G., Mauch F., & Mal fertheiner, P. 1993.** The coccoid forms of *H.pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol Infect.* 111 : 483-490.
12. **Boren,T., Falk,P., Roth,K., Larson,G., & Normark,S. 1993.** Attachment of *H. pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* 262: 1892-1895.
13. **Bruce, E., Hartley, C., & Blaser, M.J. 1997.** *Helicobacter pylori*. *Clinical Microbiology Reviews.* 10: 720-741.
14. **Catrenich, C.B., & Chestnut, M. 1992.** Character and origin of vacuoles induced in mammalians cells by the cytotoxin *H. pylori*. *J. Med. Microbiol.* 37: 384-395.
15. **Correa,P.1992.** Human gastric carcinogenesis; a multistep and multifactorial process-first American Cancer Society Award lecture on cancer epidemiology and prevention. *Cancer Res.*52: 6735-6740.
16. **Coudron, P.E., & Stratton, C.W. 1995.** Factors affecting growth and susceptibility testing of *H.pylori* in liquid media *J.Clin. Microbiol.* 33: 1028-1030.
17. **Cover, T., Puryear, W., Perez-Perez, G.I., & Blaser, M. J. 1991.** Effect of urease on HeLa cell vacuolation induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin. *Infection and Immunity.* 59: 1264-1270.
18. **Cover, T., & Blaser, M.J. 1992.** Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *Journal of Biological Chemistry.* 267: 10570-10575.
19. **Cover, T.L., Halter, S.A., & Blaser, M.J. 1992a.** Characterization of HeLa cell vacuoles induced by *H.pylori* broth culture supernatant. *Human Pathology.* 23 : 1004-1010.
20. **Cover, T., Cao, P., Murthy, U., Sipple, M., & Blaser, M. J. 1992b.** Serum neutralizing antibody response to the vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *J. Clinical. Invest.* 90: 913-918.
21. **Cover, T.L., Vaughn, S. G., Cao, P., & Blaser, M.J. 1992c.** Potentiation of *H. pylori* vacuolating cytotoxin activity by nicotine and other weak bases. *J. Infect. Dis.* 166: 1073-1078.
22. **Cover, T. L., Cao, P., Lind, C. D., Tham, K. T., Blaser, M: J. 1993a.** Correlation

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- between vacuolating cytotoxin production by *Helicobacter pylori* isolates *in vitro* and *in vivo*. *Infection and Immunity*. J61: 5008-5012.
23. **Cover, T.L., Reddy, Y., Blaser, M.J. 1993b.** Effects of ATPase inhibitor on the response of HeLa cells to *H. pylori* cytotoxin. *Infection and Immunity*. 61: 1427-1431.
 24. **Cover, T.L., Tummuru, M.K., Cao, P., Thompson, S.A., & Blaser, M.J. 1994.** Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *H. pylori* strains. *J. Biol. Chem.* 269 : 10566-10573.
 25. **Cover, T.L. 1996.** The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Molecular Microbiology*. 20: 241-246.
 26. **Cover, T., Hanson, P., & Heuser, J.E. 1997.** Acid-induced dissociation of VacA, the *H. pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. *The Journal of Cell Biology*. 138: 759-769.
 27. **Cover, T.L. 1998.** An intracellular target for *H. pylori* vacuolating toxin. *Trends in Microbiology*. 6: 127-128.
 28. **Crabtree, J.E., Covacci, A., Farmery, S.M., Xiang, Z., Tompkins, D.S., Perry, S., Lindley, I.J., & Rauppuoli, R. 1995.** *H. pylori* induced interleukin-8-expression in gastric epithelial cells is associated with cag A positive phenotype. *J. Clin. Pathol.* 48: 41-45.
 29. **Crabtree, J.E. 1996.** Gastric mucosal inflammatory responses to *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther.* 10 (Suppl 1): 29-37.
 30. **Cutler, A.F., Haustad, S., Ma, C.K., Blaser, M.J., Perez-Perez, G.I. & Schubert, T. 1995.** Accuracy of invasive and noninvasive tests to diagnose *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. 109: 136-141.
 31. **De Bernard, M., Papini, E., Filippis, V., Gottardi, E., Telford, J., Manetti, R., Fontana, A., Rauppuoli, R., & Montecucco, C. 1995.** Low pH activates the vacuolating toxin of *Helicobacter pylori* which becomes acid and pepsin resistant. *J. Biol. Chem.* 270: 23937-23940.
 32. **El-Zaatari, F.A., Nguyen, A.M., Genta, R.M., Klein, P.D. & Graham, 1995** Determination of *Helicobacter pylori* status by reverse transcription-polymerase chain reaction compared with urea breath test. *Dig. Dis. Sci.* 40:109-113.

33. **Evans, D.J., Jr., D.G. Evans., Graham, D.Y. & Klein, P.D. 1989.** A sensitive and specific serologic test for detection of *Campylobacter pylori* infection. *Gastroenterology*. 96: 1004-1008.
34. **Evans, D.J., Jr., D.G. Evans., Engstrand, L. & Graham, D.Y. 1992.** Urease-associated heat shock protein of *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*. 60: 2125-2127.
35. **Evans, D.J., Jr., D.G. Evans., Takemura, T., Nakano, H., Lampert, H.C., Graham, D.Y., Granger, D.N. & Kietys, P.R. 1995.** Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infection and Immunity*. 63: 2213-2220
36. **Figura, N., Guglielmetti, P & Rossolini, A. 1989.** Cytotoxin production by *Campylobacter pylori* strains isolated from patient with peptic ulcers and from patients with chronic gastritis only. *J. Clin. Microbiol.* 27: 225-226.
37. **Figura, N. 1996.** *Helicobacter pylori* exotoxins and gastroduodenal diseases associated with cytotoxic strain infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 10: (Suppl 1). 79-96
38. **Fantry, G.T., Zheng, Q., Darwin, P.E., Rosenstein, A.H., & James, S. 1996.** Mixed infection with CagA positive and CagA negative strain of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 1: 98-105.
39. **Foxall, P.A., Hy, L.T. & Mobley, H.L. 1992.** Use of polymerase chain reaction-amplified *Helicobacter pylori* urease structural genes for differentiation of isolates. *J. Clin. Microbiol.* 30: 739-741.
40. **Garner, J.A & Cover, T.L. 1995.** Analysis of genetic diversity in cytotoxin-producing and no cytotoxin-producing *Helicobacter pylori* strains. *J. Infect. Dis.* 172: 290-293.
41. **Garner, J.A & Cover, T.L. 1996.** Binding and internalization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by epithelial cells. *Infection and Immunity*. 64:4197-4203.
42. **Ge, Z., Hiratsuka, K. & Taylor, D.E. 1995.** Nucleotide sequence and mutational analysis indicate that two *Helicobacter pylori* genes encode a p-type ATPase and a cation-binding protein associates with copper transport. *Mol. Microbiol.* 15: 97-106.

43. **Genta, R.M., Robason, G.O. & Graham, D.Y. 1994.** Simultaneous visualization of *Helicobacter pylori* and gastric morphology: a new stain. *Human Pathol.* 25:221-226.
44. **Glupezynski, Y. & Burette, A. 1990.** Drug therapy for *Helicobacter pylori* infection: problems and pitfalls. *The American Journal of Gastroenterology.* 85:1545-1551.
45. **Goodwin, C.S., & Armstrong, J.A. 1990.** Microbiological aspects of *H.pylori* (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. *Eur. J.Clin.Microbiol.* 9 : 1-13.
46. **Goossens, H., Glupezynsk, Y., Burette, A., & Lambert, J., Butzler, J. 1992.** Role of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of duodenal and gastric ulcer. *Med.Microbiol. Lett.* 1: 153-159.
47. **Graham, D.Y. & GO, MHEF. 1993.** *Helicobacter pylori*. Current Status. *Gastroenterology.* 105: 279-282.
48. **Harris, P.R., Mobley, H.L., Perez-Perez, G.I., Blaser, M.J. & Smith, P.D. 1996.** *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. *Gastrienterology.* 111:419-425.
49. **Huang, J., Ó Toole, P.W., Duig, P., & Trust, T.J. 1995.** Stimulation of interleukin-8 production in epithelial cell lines by *H.pylori* Infection and Immunity. 63 : 1732-1738.
50. **Hussun, M.O., Legiand, D., Spik, G. & Lecierc, H. 1993.** Iron acquisition by *Helicobacter pylori*: importance of human lactoferrin. *Infection and Immunity.* 61: 2694-2697.
51. **Johnson, W. M., & Lior, H. 1986.** Cytotoxic and cytotoxic factors produced by *Campylobacter pylori* strains isolated from patients with peptic ulcers and from patients with chronic gastritis only. *J. Clim Microbiol.* 27: 225-226.
52. **Klein, P.D., Graham. D.Y., Gaillour. A., Opekun A. R., & Smith E.O. 1991.** Water source as risk factor for H.P. infection peruvian children. *Lancet.* 337: 1503-1506.
53. **Koletzko, S.M. Haisch, M., Seeboth, I., Braden, B., Hegels, K., Koletzko, B & Henng, P. 1995.** Isotope-selective non - dispersive infrared spectrometry

- for detection of *Helicobacter pylori* infection with ^{13}C -urea breath test. *Lancet*. 345: 961-962.
54. **Kusters, J., Gerrits, M., Van Strijp., & Vandenbroucke-Grauls, C. 1997.** Coccoid forms of *H. pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infection and Immunity*. 65: 3672-3679.
55. **Lee, A., Fox, J., & Hazell, S. 1993.** Pathogenicity of *H. p.* a perspective. *Infection and immunity*. 61: 1601-1608.
56. **Leunk, R.D., Johnson, P.T., David, B.C., Kraft, W.G. & Morgan, D.R. 1988.** Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J. Mol. Microbiol.* 26: 93-99.
57. **Logan, R. & Hirschl, A. 1996.** Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Current Opinion in Gastroenterology*. 12 (Suppl 1): 1-5.
58. **Macchia, G., Massorie, A., Burroni, D., Covacci, a., Censini, S. & Rappuoli, R. 1993.** The hsp 60 protein of *Helicobacter pylori*: structure and immune response in patient with gastroduodenal diseases. *Mol. Microbiol.* 9:645-652.
59. **Manetti, R., Massari, P., Marchetti, M., Magagnoli, R., Nuti, S., et al. 1997.** Detoxification of the *H. pylori* cytotox.
60. **Marshall, B. J. & J.R. Warren. 1984.** Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1: 1311-1315.
61. **Mauch, F., Bode G., Ditschuneit, H., & Malfertheiner, P. 1993.** Demonstration of a phospholipid rich zone in the human gastric epithelium damaged by *H.pylori*. *Gastroenterology*. 105: 1698-1704.
62. **Micots, I., Augeror, C., Laboisse, C.L, Muzeau, F. & Megraud, F. 1993.** Mucin exocytosis: a major target for *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Pathol.* 46: 241-245.
63. **Mobley, H.L.T. 1996.** The role of *H. pylori* urease in the pathogenesis of gastritis and peptic ulceration. *Aliment Pharmacol Ther.* 10 (Suppl 1): 57-64.
64. **Molinari, M., Galli, C., de Bernard, M., Norais, N., Ruyschaert, J.M., Rappuoli, R., & Montecucco, C. 1998.** The Acid activation of *H. pylori* toxin VacA: structural and membrane binding studies. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 248: 334-339.

65. **Mones, J., Sainz, S., Sancho, F.J. 1994** *H.pylori* en patología digestiva. Medicina integral (medicina preventiva y asistencial). 8:435-447
66. **Moran, A.P. 1996.** The role of Lipopolisacharides in *Helicobacter pylori*. phatogenesis. Aliment.Pharmacol. Ther. 10: (Suppl 1) : 39-50.
67. **Moran, A., Wadström, T. 1998,** Pathogenesis of *H.pylori*. Current Opinion in Gastroenterology. 14 (Suppl1): S9-S14.
68. **O'Brien, B., Goeree, R., Mohamed, A., & Hunt, R.. 1995.** Cost-effectiveness of *H.pylori* eradication for the long-term management of duodenal ulcer in Canada. Arch Intern Med.155: 1958-1964.
69. **Papini, E., Bugnoli, M., de Bernard, M., Figura, N., Rappuoli., R., & Montecucco, C. 1993a.** Bafilomycin A₁-inhibits *H. pylori*induced vacuolation of HeLa cells. Mol. Microbiol. 7: 323-327.
70. **Papini, E., de Bernard, M., Bugnoli, M., Milia, E., Rappuoli, R., & Montecucco, C. 1993b.** Cell vacuolization induced by *H. pylori* : inhibition by bafilomycins A1, B1, C1 and D. FEBS. Microbiol. Lett. 113: 155-160.
71. **Papini, F., de Bernard, M.,& Milla, E. 1994.** Cellular vacuoles induced by *H. pylori* originate from late endosomal compartments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 9720-9724.
72. **Parsonnet, J., Blaser, M:J., Perez-Perez, G.I., Hargrett-Bean, N., & Tauxe, R. 1992.** Symptoms and risk factor *H. pylori* infection in a cohort of epidemiologists. Gastroenterology. 102: 41-46.
73. **Parsonnet, J. 1995.** The incidence of *H. pylori* infection. Aliment Pharmacol. Ther. 9 (Suppl 2): 45-51.
74. **Phadnis, S., Janzon, D., Normark, S., & Westblom, T. U. 1994.** Phatological significance and molecular characterization of the vacuolating toxin gene of *Helicobacter pylori* . Infection and immunity. 62: 1557.1565.
75. **Phadnis, S.H., Parlow M.H., Devilver.M., Caulkins. C.M., & Connors. J., Dunn. B. E. 1996.** Surface localization of *H.pylori*. urease and heat shock protein homolog requieres bacterial autolysis. Infection and Immunity. 64 : 905-912.
76. **Peek, R.m., Jr., G.G. Miller., Tham, K.T. , Perez-Perez, G.I., Cover, T.L., Atherton,**

- J.C., Duhn, G.D. & Blaser, M. J. **1995**. Detection of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. J. Clin. Microbiol. 33: 28-32.
77. **Peek**, R.M. THOmpson, S.A., Atherton, J.C., Blaser, M.J. & Miller, G.G. **1996**. Expression of *iceA* a novel ulcer-associated *Helicobacter pylori* gene is induced by contact with gastric epithelial cells and is associated with enhanced mucosal IL-8. Gut. 39: A71
78. **Pounder**, R.E & D.NG. **1995**. The prevalence of *H. pylori* infection in different countries. Aliment Pharmacol Ther. 9 (Suppl 2): 33-39.
79. **Price**, A.B. **1991**. The Sidney Sistem: Histological divition, J. Gastroenterol Hepatol. 6: 209-222.
80. **Queiroz**, D.M., Mendes, E.N. & Rocha, G.A. **1987**. Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori* . J. Clin. Microbiol. 25: 2378-2379.
81. **Reploge**, M.L., Glaser, S.L., Hiatt, R.A. & Parsomennt, J. **1995**. Biologic sex as a risk factor *H. pylori* infection in healthy young adults. Am. J. Epidemiol. 142: 856-863.
82. **Schmitt**, W., & Haas, R. **1994**. Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. Mol. Microbiol. 12: 307-319.
83. **Sherburne**, R. & Taylor, D.E. **1995**. *Helicobacter pylori* expresses a complex surface carbohydrate Lewis X. Infection and Immunity. 63: 4564-4568.
84. **Smoot**, D.T., Mobley, H.L., Chippendale, G.R., Lewison, J.F. & Resay, j.H. **1990**. *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. Infection and Immunity. 58: 1992-1994.
85. **Sobhani**, I., Bado, A., Cherifi, Y., Moizo, L., Laigneau, J.P., Pospai, D., Mignon, M. & Lewin, M.J. **1996**. *Helicobacter pylori* stimulates gastric secretion via platelet activiaing factor. J.Physiol.Pharmacol. 47:177-185.
86. **Spiegelhalder**, C., Gerstenecker, C.B., Kersten, A., Schiltz, E. & Kist, M. **1993**. Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. Infection and Immunity. 61: 5315-5325.

- Perez, G.I. **1996**. Seroprevalence to *Helicobacter pylori* infection in México. Gut. 39: (Suppl 2). A83.
98. **Wagner, S., Beil, W., Westermann, J., Logan, R., Bock, T., Trautwein, C., Bleck, J., & Manns, M. 1997**. Regulation of gastric epithelial cell growth by *H. pylori* : evidence for a major role of apoptosis. Gastroenterology. 113: 1836-1847.
99. **Walt, R.P. 1996**. Regression of MALT lymphoma and treatment for *H.pylori*. Lancet. 348: 1041-1042.
100. **Walsh, J & Peterson, W. 1995**. The treatment of *H.pylori* infection in the management of peptic ulcer disease. The New England Journal of Medicine. 333: 984-991.
101. **Wotherspoon, A. C., Ortiz-Hidalgo, C., Falzon, M.R., & Isaacson, P.G. 1991**. *H. pylori* associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. Lancet. 338: 1175-1176.
102. **Weel, J., Vander Hulst, W.M., Gerrits, Y., Roorda, P., Feller, M., Dankert, J., Rytgat, G., & Vander Ende, A. 1996**. The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *H.pylori* - related disease. Journal of infectious Diseases. 173 : 1171-1175.
103. **Wilson, K.T., Ramanujam, K.S., Mobley, H.L., Musselman, R.F., James, S.P. & Meltzer, S.J. 1996**. *Helicobacter pylori* stimulates inducible nitric oxide synthase expression and activity in a murine macrophage cell line. Gastroenterology. 111: 1524-1533.
104. **Xiang, Z., Censini, S., Bayeli, P.F., Telford, J.L., Figura, N., Rappuoli, R., & Covacci, A. 1995**. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factor in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. Infection and Immunity. 63: 94-98.
105. **Yahiro, K., Nidome, T., Hatakeyama, T., Aoyagi, H., Kuraono, H., Padilla, P. I., Wada, A., & Hirayama, T. 1997**. *H. pylori* vacuolating cytotoxin binds to the 140 KDa protein in human gastric cancer cell lines, AZ-521 and AGS. Biochemical and Biophysical Research Communications. 238: 629-632.