

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

METABOLISMO DE MUTÁGENOS AMBIENTALES POR *Helicobacter pylori* Y SU RELACION CON CÁNCER DE ESTÓMAGO

T E S I S

QUE PARA OBTENER GRADO ACADÉMICO DE: MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A : SILVIA CABALLERO SALAZAR

DIRECTOR DE TESIS: DR. JESUS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE

MEXICO, D. F.

MAYO, 2005

m. 344644



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

Con todo mi cariño, dedico esta tesis

*A mi hija
Por su apoyo y comprensión
Silvia Lihiana*

*A mi esposo
Por su confianza y apoyo
incondicional
José Ricardo*

y

*A la memoria de mis padres
Catalina y Francisco*

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: SILVIA CABALLERO
SALAZAR

FECHA: 23/11/40/05

FIRMA: S. Caballero

AGRADECIMIENTOS

- *Al Dr. Jesús Javier Espinosa Aguirre*
Por sus consejos, orientación e invaluable ayuda para la
realización del presente trabajo.

- *Al Dr. Javier Torres, de la Unidad de Investigación en*
enfermedades Infecciosas del Instituto Mexicano del Seguro
Social, por facilitarme las cepas de Helicobacter pylori.

- *Al Instituto Nacional de Pediatría (INP), por el*
apoyo brindado para realizar el trabajo experimental de tesis

- *El apoyo recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y*
Tecnología (CONACYT), por el otorgamiento de una
beca para la realización de este posgrado

INDICE

Resumen	1
1. Introducción	2
2. Antecedentes	4
2.1. Patofisiología de la infección con <i>Helicobacter pylori</i>	4
2.2. Factores de patogenicidad de <i>Helicobacter pylori</i>	7
2.2.1. Factores invasivos	8
2.2.2. Morfología	8
2.2.3. Movilidad	8
2.2.4. Adhesión	9
2.3. Enzimas de <i>Helicobacter pylori</i> que facilitan la invasión del epitelio cutáneo-mucoso	10
2.3.1. Ureasa	10
2.3.2. Catalasa y superóxido dismutasa	11
2.4. Posibles mecanismos carcinogénicos relacionados con <i>Helicobacter pylori</i>	11
2.5. Importancia de nitroreductasas en la activación metabólica de nitrocompuestos	15
2.6. Importancia de citocromo P450 en la bioactivación de xenobióticos	18
3. Justificación	22
4. Hipótesis	22
5. Objetivo general	23
5.1. Objetivos específicos	23

6. Materiales y métodos	24
6.1. Obtención de cepas bacterianas	24
6.2. Obtención de lisados de <i>H. pylori</i>	24
6.3. Western blot de lisados de <i>Helicobacter pylori</i>	25
6.3.1. Electroforesis en gel de Poliacrilamida	25
6.3.2. Transferencia	25
6.3.3. Inmunodetección	25
6.4. Tinción de Hemoproteínas en geles de poliacrilamida de lisados de <i>H. pylori</i>	26
6.5. Inducción de citocromo P450 en cultivos de <i>Helicobacter pylori</i>	27
6.6. Determinación de actividad enzimática de diferentes familias de citocromo P450 en lisados de <i>Helicobacter pylori</i>	27
6.7. Determinación de actividad enzimática de nitroreductasa de lisados de <i>Helicobacter pylori</i>	28
6.8. Activación metabólica de 1-nitropireno por lisados de <i>Helicobacter pylori</i>	29
7. Resultados	30
8. Discusión	56
9. Conclusiones	61
10. Referencias	63

RESUMEN

Helicobacter pylori posee características altamente adaptadas al ambiente gástrico. En 1994 la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer determinó que existían suficientes evidencias en humanos para considerar que la infección con este microorganismo promueve la carcinogénesis. Dicha infección puede persistir por varios años e incluso décadas si no es diagnosticada y erradicada, en algunos pacientes esta condición puede conducir a una serie de eventos progresivos desencadenando el desarrollo de gastritis superficial crónica, gastritis atrofica, metaplasia intestinal, displasia y adenocarcinoma. El objetivo de este trabajo fué explorar la capacidad de *H. pylori* para bioactivar mutágenos y carcinógenos por las vías enzimáticas de nitrorreductasas y citocromo P450, transformándolos en moléculas electrofilicas genotóxicas. Para ello se utilizaron lisados de cepas de *H. pylori* con características de patogenicidad aisladas de pacientes con diferentes alteraciones gástricas, en los cuales se determinó la expresión y actividad de citocromo P450, así como su capacidad de inducción con fenobarbital y la identificación de hemoproteínas. Finalmente, se determinó su potencial para bioactivar diversos promutágenos mediante el sistema de AMES. En los resultados obtenidos se pudo evidenciar que los lisados de *H. pylori* poseen una proteína semejante a citocromo P4501A2, que tiene grupo "Hemo" y que es inducible con fenobarbital. También se demostró la capacidad de los lisados para bioactivar promutágenos como 1-Nitropireno con un efecto dosis-dependiente.

Palabras clave: *H. pylori*, Cáncer gástrico, metabolismo.

1. INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una de las causas más frecuentes de infecciones bacterianas crónicas en el ser humano, y afecta a la población de todas las edades, es cosmopolita y de carácter endémico. La prevalencia reportada varía del 20% al 90%, dependiendo de la situación geográfica y del nivel de desarrollo de las poblaciones (Kuipers, 1998; Pounder y Nig, 1995). En países desarrollados, la frecuencia de infección fluctúa del 20% al 40%, no siendo frecuente en la infancia, y toma importancia en la vida adulta (adquiriéndose a edades maduras). En contraste, en países en vía de desarrollo, la prevalencia reportada varía de un 50% hasta el 90%, siendo más común el desarrollo de dicha infección en edades tempranas de la vida (durante la niñez). En la mayoría de los casos la infección permanece toda la vida del individuo como una infección asintomática (Torres y col, 1998).

La colonización del estómago por *H.pylori* induce invariablemente inflamación o gastritis. Cuando la infección y la inflamación están presentes por años en un individuo, se incrementa el riesgo de que se presenten enfermedades asociadas a gastritis como úlcera duodenal, úlcera gástrica y adenocarcinoma gástrico. Del total de individuos infectados, se estima que de un 10% a un 20% presentarán úlcera péptica en algún momento, mientras que menos del 1% desarrollarán cáncer gástrico (Suerbaum y Wadstrom, 1995; McColl y El-Omar, 1996). La naturaleza exacta de la progresión de estas lesiones patológicas no está clara, aunque se sabe que cuando la infección y la inflamación predominan en el antro, ocurre una desregulación en la producción de ácido clorhídrico, lo que favorece la formación de úlcera duodenal. Por otro lado, cuando la infección es predominantemente en el cuerpo, la inflamación causa disminución en la producción de este ácido, provocando aclorhidria, lo que favorece el sobrecrecimiento bacteriano con numerosas consecuencias fisiopatológicas. Entre otras, dicha actividad bacteriana puede ser causante de un desdoblamiento de compuestos nitrogenados de la dieta y de su conversión

en nitritos y nitrosaminas, generando compuestos N-nitroso potenciales carcinógenos (Stockbrugger, 1985; Festen, 1988), aumentando el riesgo de metaplasia y cáncer (Ihamäki y col, 1978; Valle y col, 1996). Al respecto, se cree que en los países del tercer mundo esta cascada de eventos se ve intensificada por la infección por *H.pylori*; sin embargo, aún no hay una descripción detallada de dicha progresión, aunque sabemos que en el resultado final de la infección influyen otras características de la bacteria, del huésped y del medio ambiente.

En relación con la infección por *H. pylori*, todo parece indicar que el mayor riesgo de cáncer gástrico en una población concreta, se asocia con la adquisición precoz de la misma y por tanto con una elevada prevalencia en la infancia. En este sentido, teniendo en cuenta que la infección persiste a lo largo de los años y nunca cura espontáneamente, podría decirse que un factor "ambiental" importante es precisamente, la infección por *H. pylori* en la infancia (Correa, 1991).

Recientemente, la biología molecular ha permitido secuenciar el genoma de *H.pylori* y los estudios sobre los mecanismos de virulencia se han incrementado (Tomb y cols, 1997). En tanto que los factores relacionados con el huésped y más aún los del ambiente han sido poco estudiados.

2. ANTECEDENTES

2.1. Patofisiología de la infección con *Helicobacter pylori*

La infección por *H.pylori* puede causar daño grave a la mucosa gástrica. El daño celular puede ser ocasionado directamente por medio de la bacteria o indirectamente por mediadores de inflamación liberados por el estímulo de antígenos de *H.pylori* como: la adhesión bacteriana que estimula la producción de una variedad de mediadores inflamatorios, el factor de necrosis tumoral (FNT), interferón gama (γ -IFN) y las interleucinas 1, 6 y 8 (IL-1, IL-6, IL-8) que atraen y activan células inflamatorias como neutrófilos, macrófagos y células plasmáticas (Elios y col 1999, Ando y cols 1998). Esta respuesta inflamatoria provoca cambios importantes en la fisiología del estómago y duodeno, por daño directo a las células o por que algunas de estas citocinas pueden actuar sobre células que regulan la producción de ácido clorhídrico. La cronicidad, intensidad y sitio de inflamación son factores muy importantes porque pueden determinar el tipo de enfermedad que se puede presentar. Pacientes con gastritis predominantemente antral tienden a tener una secreción alta de ácido y presentan un riesgo mayor de desarrollar úlcera duodenal. El péptido denominado gastrina es una hormona producida por células G, que se localizan en el antro del estómago. La gastrina estimula la liberación de ácido clorhídrico por las células parietales que se encuentran en el cuerpo del estómago. Se ha propuesto que una prolongada hipergastrinemia, secundaria a la infección por *H.pylori*, resulta en un incremento en el número de células parietales y por lo tanto en una mayor capacidad de secreción de ácido clorhídrico. La síntesis y liberación de gastrina por células G está bajo control paracrino por somatostatina, que es producida por células D en el antro y que inhibe la liberación de gastrina. La infección por *H.pylori* en el antro disminuye la producción de somatostatina por células D, disminuyendo el control sobre la producción de gastrina, lo que resulta en niveles mayores de esta hormona (Moss y cols 1992). Por

otro lado, se ha documentado que la infección en el antro activa células cebadas que liberan histamina (kidd y cols 1997). Tanto gastrina como histamina activan células parietales para que produzcan más ácido clorhídrico. El exceso de ácido llega al duodeno donde neutraliza las sales biliares que normalmente inhiben a *H. pylori*; la carga de ácido también induce hiperplasia en el duodeno. *H.pylori* coloniza este tejido metaplásico e induce inflamación ahora en el duodeno. La inflamación y el exceso de ácido clorhídrico dañan la integridad de la mucosa duodenal y favorecen el desarrollo de úlcera.

En cambio, pacientes con gastritis predominantemente en el cuerpo del estómago, tienden a tener una producción baja de ácido clorhídrico al desarrollar atrofia gástrica, misma que puede progresar a úlcera gástrica o a cáncer gástrico distal. La gastritis crónica puede terminar en atrofia con daño a células parietales, provocando una disminución en la secreción de ácido clorhídrico y desarrollo de aclorhidria. La baja concentración de ácido, sumada al daño ocasionado por una constante inflamación, favorece metaplasia, y probablemente el desarrollo de cáncer gástrico (Correa y Miller, 1998).

Recientemente, se ha descrito un incremento de la apoptosis en la mucosa gástrica infectada con *H.pylori*, lo cual se ha propuesto como un posible mecanismo de daño epitelial (Moss y cols, 1996). Sin embargo, las diferencias metodológicas entre los estudios relacionados con la actividad de la apoptosis en las células glandulares, dificultan la interpretación del papel de este mecanismo en el daño a la mucosa gástrica. A sí mismo, se desconoce la relevancia que tienen estos mecanismos de daño para determinar si un sujeto infectado desarrolla gastritis atrófica. Se ha propuesto que la aparición de lesiones precancerosas como atrofia, proliferación desregulada y apoptosis pueden ocurrir desde edades tempranas, sobre todo en países donde la infección es común desde la niñez; aunque esta hipótesis ha sido muy poco estudiada (Jones y cols, 1997).

Se postula que la generación de atrofia es un proceso continuo donde el epitelio superficial y glandular infectado por *H.pylori* puede dañarse. El daño puede medirse por el índice de apoptosis o por citotoxicidad, mientras que la regeneración se puede medir por el índice de proliferación celular. Cuando el daño a las glándulas es continuo, se pierde la velocidad en la capacidad de regeneración y ocurre un proceso de reparación, el cual consiste en el reclutamiento de fibroblastos y depósito de matriz extracelular en los espacios de la lámina propia previamente ocupada por las glándulas, remplazándolas por tejido fibroso. El resultado de este proceso es una pérdida irreversible de la estructura funcional, la cual se conoce como atrofia (Genta, 1998). Otros mecanismos consisten en la sustitución del epitelio glandular especializado (células de la mucosa de las glándulas parietales) por epitelio intestinal, con células esféricas y células intermedias. Estos cambios hacen que el epitelio gástrico asemeje el borde de un cepillo, lo cual recibe el nombre de metaplasia intestinal. Durante la infección crónica por *H.pylori*, pueden ocurrir todos estos tipos de reparación; la proporción en la que se desarrolla cada una (apoptosis, proliferación, atrofia, metaplasia) depende probablemente de la interacción de otras causas contribuyentes como factores genéticos del huésped o de la bacteria y factores ambientales. Los estudios de seguimiento (Faller y cols, 1997; Negrini, 1991) sugieren también que *H.pylori* induce mecanismos autoinmunes en el organismo humano. Se ha observado una alta prevalencia de autoreactividad antigástrica, la cual correlaciona con diversos grados de manifestaciones histopatológicas y clínicas, haciéndose evidente el criterio de causalidad dosis-respuesta. Este criterio establece que a mayor gravedad de la gastritis del cuerpo del estómago, son mayores los cambios atróficos de la mucosa gástrica, así como también los niveles basales de gastrina y una menor relación con el pepsinógeno. Lo anterior indica que los anticuerpos anticanaliculares son también responsables del desarrollo de atrofia, o al menos, pueden ser considerados como marcadores de otros factores patogénicos que llevan a cambios atróficos de la mucosa gástrica

Otros mecanismos relacionados con la formación de anticuerpos antigástricos durante la infección crónica por *H. pylori* y la presencia de gastritis crónica, son el mimetismo molecular entre epitopes de *H. pylori* y algunos antígenos del huésped, como antígenos de Lewis expresados tanto en las células del epitelio gástrico, como por *H. pylori* (Wirth y cols, 1997).

2.2. Factores de Patogenicidad de *Helicobacter pylori*.

H. pylori es una bacteria gram negativa en forma de espiral, su genoma cuenta con 1.6 millones de pares de bases (1,590 genes) en un cromosoma circular (Tomb y cols, 1997). Se ha observado que su patogenicidad y virulencia depende del genotipo de la cepa infectante; así las cepas difieren de acuerdo a la expresión del antígeno CagA (citotoxina asociada al gen A), de la toxina VacA (toxina vacuolizante A) y del gen picB, el cual induce la liberación de citocina IL-8 que induce inflamación y daño a la mucosa (Altherton y cols, 1997; Ching y cols, 1996). El gen CagA es un marcador de cepa que tiene un grupo de genes asociados, conocidos como isla de patogenicidad (Akopyants y cols, 1998) que están involucrados en inflamación y daño a la mucosa gástrica (Hamlet y cols, 1999). Los estudios muestran que las cepas que expresan dichos factores de virulencia, están asociadas principalmente con enfermedades gastroduodenales como úlcera péptica y cáncer gástrico (Van Doorn y cols, 1998), Por consiguiente, fueron clasificadas como cepas de tipo I (Censini y cols, 1996), mientras que, las cepas que no tienen dichas características de virulencia se denominaron cepas de tipo II (Slater y cols, 1999).

Existen otros factores de virulencia que posee *Helicobacter pylori* tales como: invasivos representados por la morfología helicoidal y por los flagelos, que le permiten la movilidad y penetrar a través del mucus; factores de adherencia son de vital importancia en la colonización inicial de la mucosa gástrica del huésped y factores tóxicos como enzimas o proteínas que actúan como factores adversos para la mucosa gástrica (López-Brea, 1995).

2.2.1 Factores invasivos.

Las bacterias necesitan penetrar en el organismo y atravesar el epitelio cutáneo-mucoso. Entre los mecanismos que intervienen en la capacidad de penetración e invasión se encuentran: morfología espiral y movilidad.

2.2.2. Morfología.

Helicobacter pylori puede presentar tres tipos morfológicos principales durante su ciclo de vida: formas espirales cuando se encuentran en la mucosa gástrica; bacilos rectos en medios de cultivo o formas cocoides en cultivos viejos. La morfología espiral o helicoidal junto con su movilidad le facilita el paso a través del ambiente como el mucus (Hazell, Brady y Hennessy, 1986). Posee entre cuatro y seis flagelos polares de 2.5 μm de largo y 30 nm de diámetro, con un bulbo terminal membranoso. Son filamentos compuestos de flagelina con un gancho y una placa basal de anclaje a la célula, así como una envoltura o vaina que se continúa con la membrana de la pared celular externa, probablemente le sirve para proteger a los filamentos de flagelina contra los factores ambientales adversos, como el ácido gástrico (Geis, 1989; Jones y Curry, 1989).

2.2.3. Movilidad.

Estas bacterias se mueven más eficazmente que otros microorganismos curvados en medios altamente viscosos. La movilidad está considerada como uno de los factores de virulencia de *H. pylori* y es una de las características detectadas *in vitro* que correlacionan bien con experimentos *in vivo* en modelos animales (Suerbaum y cols, 1993). La movilidad es un factor de virulencia esencial ya que variantes no móviles o ligeramente móviles de *H. pylori* no colonizan la superficie gástrica, o son menos virulentas (Eaton y cols, 1989).

Muchas bacterias flageladas pueden expresar variación en la fase flagelar. Las cepas de *H.pylori* pueden ser poblaciones heterogéneas de variantes

móviles y no móviles o poblaciones homogéneas con diferencias en la fase flagelar (Canldwell y cols, 1985).

2.2.4. Adhesión.

La adhesión bacteriana a las células epiteliales superficiales gástricas constituye un proceso clave en la patogenia de la infección por *H. pylori*. Dicho fenómeno puede determinar el componente esencial de los factores de virulencia. Recientemente se ha constatado que los receptores antigénicos específicos de las células epiteliales superficiales gástricas para *H. pylori*, son los histoantígenos de grupo sanguíneo Lewis b y h (Boren y cols, 1993). Estos antígenos actúan protegiendo la integridad celular, de forma que los sujetos que no lo expresan en la mucosa gástrica (no secretores), presentan un mayor daño epitelial, grado mayor de atrofia y de metaplasia intestinal, en comparación con los individuos que poseen dicho histoantígenos (secretores). El conocimiento molecular de la interacción de *H. pylori* con el hospedero se ha implementado recientemente con el descubrimiento de genes bacterianos que codifican antígenos similares al Lewis-x y Lewis-y, presentes en la zona glandular de la mucosa gástrica humana (Appelmerk y cols, 1997). Estos antígenos por su similitud con los antígenos humanos, pueden actuar a modo de "camuflaje" y permiten escapar de la vigilancia del sistema inmune. Se ha demostrado que *H. pylori* puede inducir el desarrollo de autoanticuerpos contra la mucosa gástrica y pueden jugar un papel relevante en la patogenia de la atrofia y carcinogénesis gástrica.

Existen evidencias de que estos autoanticuerpos están dirigidos contra el determinante del grupo sanguíneo Lewis-x que se expresa mayoritariamente en la mucosa gástrica (Negrini y cols, 1996). La presencia y especificidad de estos autoanticuerpos de reacción cruzada contra *H. pylori* varía en los pacientes con infección por distintas cepas bacterianas, de forma que es posible que el riesgo para desarrollar atrofia gástrica y metaplasia intestinal depende de la respuesta autoinmune.

2.3. Enzimas de *Helicobacter pylori* que Facilitan la Invasión del Epitelio Cutáneo-mucoso.

2.3.1. Ureasa

La ureasa tiene un papel fundamental en la colonización de la mucosa por parte de *H.pylori*, así como en la lesión que produce (Hazell y Lee, 1986; Labigne, 1991).

Es la enzima más estudiada de las producidas por *Helicobacter pylori*. Se han encontrado enzimas similares en todas las especies de *Helicobacter sp* que colonizan la mucosa gástrica de diferentes animales, lo que sugiere que es un factor de colonización importante (Turbett y cols, 1992).

La ureasa de *H.pylori* se encuentra localizada en la membrana externa y en el espacio periplásmico (Bode y cols, 1989). Está formada por una estructura hexamérica, de seis monómeros de 88,1 kDa. Cada monómero está compuesto por dos subunidades de 26,5 y 61,6 kDa; la subunidad mayor lleva incorporada un átomo de níquel, siendo el peso molecular total del complejo de la ureasa de 528,95 kDa, incluyendo los seis átomos de níquel (Hazell, 1991; Hu y cols, 1993).

Una función crítica de la ureasa es la de catalizar la hidrólisis de urea para dar como resultado dióxido de carbono y amonio, de esta manera la bacteria se protege del ácido gástrico, creando a su alrededor un microambiente alcalino y esto le facilita la sobrevivencia en el medio ácido del estómago (Marshall, 1991). Además la ureasa puede actuar como un factor de virulencia por la producción de amonio. Primero, el equilibrio de amonio con agua genera ion hidróxido que es tóxico para las células epiteliales (Smoot y cols, 1990; Tsujii y cols, 1992) y segundo, el amonio producido por la hidrólisis de la urea rompe las uniones intercelulares facilitando la difusión del ion hidrógeno para promover la erosión del tejido y la ulceración. También se considera que la ureasa es un potente quimioatractivo para las células inflamatorias como mononucleares y polimorfonucleares (Harris y cols, 1996).

2.3.2. Catalasa y superóxido dismutasa.

La catalasa y superóxido dismutasa son dos enzimas que actúan protegiendo a la bacteria contra los efectos letales de los metabolitos tóxicos del oxígeno. Se ha sugerido que la catalasa de *H.pylori* es un factor de virulencia importante en la enfermedad gastroduodenal asociada a esta bacteria. En primer lugar la actividad de catalasa es alta comparada con la de otros microorganismos, por otra parte puede mutar al ser catalasa-negativo cuando se cultiva en laboratorio. Esto último sugiere que no necesita la Catalasa para romper el H_2O_2 generada por su metabolismo endógeno, de forma específica la catalasa puede ayudar a que la bacteria sobreviva en la mucosa gástrica inflamada, destruyendo el peróxido de hidrógeno generado por las células inflamatorias (Hazell y cols 1991; Marshal, 1991).

Algunas enzimas de oxido-reducción interaccionan con el oxígeno molecular para producir aumento de superóxido O_2^- , radicales hidroxilo ($OH\cdot$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Todos estos productos son extremadamente tóxicos para la bacteria, la enzima superóxido dismutasa elimina los radicales superóxido formando peróxido de hidrógeno, y la catalasa lo elimina formando agua y oxígeno.

2.4. Posibles Mecanismos Carcinogénicos Relacionados con *Helicobacter pylori*.

Durante los últimos años se ha concentrado más el interés sobre el posible efecto carcinogénico de *H. pylori*. Estudios epidemiológicos han demostrado una clara asociación entre la infección por *H. pylori* y el adenocarcinoma gástrico, por lo que la OMS consideró a *H. pylori* como un factor de riesgo de primer grado (carcinógeno de categoría I) para el desarrollo de este tumor. Un estudio serológico EUROGAST (1993) en el que participaron 13 países

de diversos continentes, mostró una fuerte correlación entre la incidencia de cáncer gástrico y la prevalencia de la infección, multiplicándose por 6 el riesgo de adenocarcinoma gástrico en la población infectada por *H. pylori*. Asimismo, otros estudios serológicos prospectivos (Forman y cols, 1991; Parsonett y cols, 1991; Nomura y cols, 1991) han constatado que los pacientes con infección por *H. pylori* tienen un riesgo de desarrollar adenocarcinoma gástrico 3 a 6 veces superior al de la población no infectada. El riesgo relativo medio de cáncer gástrico en estos estudios se incrementó a 8,7 en el grupo de pacientes diagnosticados 15 o más años después de la comprobación del resultado serológico positivo. Estos hallazgos son muy relevantes, pues demuestran que la colonización por *H. pylori* es un hecho previo al desarrollo de adenocarcinoma gástrico. Esta asociación se ha confirmado principalmente para el tipo intestinal de adenocarcinoma gástrico. Para explicar la asociación entre la infección por *H. pylori* y el adenocarcinoma gástrico se han propuesto diferentes hipótesis, pero la más aceptada sugiere que *H. pylori* induce la aparición de gastritis crónica atrófica y metaplasia intestinal. Esta secuencia de hechos se demostró en un estudio longitudinal (Kuipers y cols, 1995) en el que se siguieron pacientes con y sin infección durante un periodo superior a los 11 años. Al cabo de este tiempo se observó que tanto la gastritis atrófica como la metaplasia intestinal se habían desarrollado con mayor frecuencia en el grupo de pacientes infectados. Por otra parte, estudios en animales han confirmado que la colonización de la mucosa gástrica del jerbo por cepas citotóxicas de *H. pylori* induce la producción de lesiones premalignas y adenocarcinoma gástrico similares a las observadas en humanos (Watanabe y cols, 1998). Estos datos demuestran de forma inequívoca una clara relación causa-efecto entre la infección y el desarrollo del tumor. El mecanismo por el cual *H. pylori* induce el desarrollo de este tumor no es bien conocido. Existen evidencias de que el genotipo bacteriano puede condicionar el desarrollo de lesiones precancerosas y cáncer gástrico: 1) se ha observado una prevalencia aumentada de cepas productoras de

citotoxina vacuolizante (VacA-s1) en pacientes con gastritis atrofica multifocal (Fox y cols, 1992); 2) la infección por cepas que secretan citotoxina preinflamatoria CagA (Blaser y cols, 1995) o vacuolizante VacA-s1 (Cabtree y cols, 1994; Shimoyama y cols, 1998) muestran un mayor riesgo para adenocarcinoma gástrico; y 3) La actividad proliferativa celular del cuerpo gástrico se encuentra aumentada en la infección por cepas citotóxicas (Harvard y cols, 1996). Estos hallazgos sugieren que las citotoxinas producidas por *H. pylori* pueden contribuir en el proceso de carcinogénesis, bien por un efecto citotóxico directo o de forma indirecta a través de la respuesta inflamatoria o inmunológica.

H. pylori induce un marcado incremento en la apoptosis celular en pacientes con úlcera duodenal y gastritis (Moss y cols, 1996), que se logra revertir después de la erradicación de la infección. Así se ha demostrado que este es un efecto específico mediado directamente por la bacteria, que no depende del tipo de cepa y que puede potenciarse por citocinas liberadas por células inflamatorias (Wagner y cols, 1997). Por otra parte los cambios en la proliferación celular de la mucosa gástrica entrañan, con toda probabilidad, un aumento en el riesgo de cáncer gástrico. Varios estudios han confirmado que las células epiteliales gástricas proliferan más rápidamente en pacientes con infección por *H. pylori* que en los no infectados, normalizándose el índice proliferativo tras la erradicación de la infección (Cahill y cols, 1995; Lynch y cols, 1995). Es bien conocido que cuando la proliferación celular aumenta, disminuye la capacidad de reparación del ADN. De esta forma, *H. pylori* podría actuar indirectamente como un agente mutagénico, haciendo posible que alteraciones del ADN causadas por fragmentación endógena o por sustancias carcinogénicas puedan convertirse en mutaciones estables.

H. pylori también induce la migración de los leucocitos polimorfonucleares (PMN), desde los capilares hasta la lámina propia y a la zona glandular de la mucosa, especialmente en las proximidades de los cuellos glandulares, donde se encuentran las células germinales. Los PMN son activados por

factores citotóxicos de *H. pylori* y por interleucina-8 (IL-8) procedente de las propias células epiteliales mucosas tras la adhesión bacteriana. *H. pylori* también provoca directamente activación de PMN, probablemente mediante la liberación de N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (Mooney y cols, 1991). Los PMN activados liberan proteasas y metabolitos reactivos del oxígeno, provocando un estallido oxidativo, que podría dañar al ADN e inducir mutaciones en las células germinales mucosas (Correa, 1991). La alteración del ADN puede dar lugar a la inactivación de genes supresores de oncogenes. Se ha observado un mayor grado de proliferación celular en mucosa gástrica en sujetos con gastritis por *H. pylori* que en el caso de sujetos control, posiblemente por un aumento en la producción de factor de crecimiento epidérmico (O´Morain y cols, 1994)

En animales de experimentación se ha demostrado que, la administración de un carcinógeno conocido (83 mg/l de N-metil-N-nitrosoguanidina), asociado con amonio (al 0,01% en el agua de los animales) produjo un aumento significativo de la incidencia de cáncer gástrico, comparado con un grupo de ratas a cuya agua no se había añadido amonio (Tsujii y cols, 1993). La concentración de amonio a nivel del jugo gástrico en sujetos infectados por *H. pylori* es superior a la de los no infectados (0,015 % a menos de 0,005 %) (Kochlyama, 1989). Además, estudios realizados *in vitro* indican que el amonio induce alteraciones celulares, inhibiendo parte de la actividad mitocondrial de la célula, incluyendo los mecanismos de respiración y por otra parte produce citotoxicidad en las células de la mucosa gástrica, lo que se traduciría en estímulo de la proliferación celular en mucosa gástrica (Tsujii y cols, 1992 (a)). En este sentido se ha demostrado que el amonio, a concentraciones de 0,01 % produce, en animales de experimentación, una aceleración de la migración epitelial, espacialmente en el antro, que desemboca en la atrofia de la mucosa. En cualquier caso, la totalidad de los mecanismos carcinogénicos estaría estrechamente interrelacionada y posiblemente, su efectividad sería, además, interdependiente (Tsujii y cols, 1993).

Correa en su modelo propuesto para el desarrollo de cáncer gástrico implica una serie de pasos identificados por cambios histológicos en la mucosa gástrica. El primer paso es el desarrollo de gastritis crónica, seguida de gastritis atrofica y como ultimo paso el desarrollo de metaplasia, en adición con la infección de *Helicobacter pylori*, así como de muchos más factores medioambientales que representan un importante papel en el proceso de carcinogénesis (un alto consumo de sal, formación endógena de nitrosaminas, ingestión de carcinógenos en la dieta o la baja ingesta de antioxidantes) en especial con el desarrollo de cáncer gástrico. Un punto importante en dicho modelo es la presencia de mutágenos, ya sea formados endogenamente (nitrosaminas, oxido nítrico) o como moléculas preexistentes en el agua, alimentos y medicamentos (Correa, 1992).

2.5. Importancia de Nitrorreductasas en la Activación metabólica de Nitrocompuestos.

Los compuestos nitrosustituídos tal como simples compuestos nitroaromáticos y nitroheterocíclicos entre otros, se encuentran en el medio ambiente como productos de los procesos de combustión y pesticidas (Pitts y cols, 1978; Rosenkranz y Mermelstein, 1983; Tokiwa y cols, 1986; McCalla, 1983; Rodríguez y cols, 2001). Este tipo de compuestos son potencialmente mutagénicos en bacterias, en células de mamíferos y algunos de estos compuestos son carcinógenos en roedores (Rosenkranz y Mermelstein, 1983; Mullin y cols, 1987; NI y cols, 1987). La Agencia Internacional para la investigación sobre Cáncer (IARC) ha clasificado cerca de dos docenas de compuestos nitrosustituídos como posibles carcinógenos en humanos.

La mutagenicidad de compuestos nitroaromáticos en bacterias y en mamíferos depende de la reducción biológica del grupo funcional NO₂. Esta reducción se lleva a cabo por medio de enzimas llamadas nitrorreductasas

(Whitenway y cols, 1998; Carroll y cols, 2002), las cuales han mostrado influir fuertemente la genotoxicidad de compuestos nitrosustituidos.

Aunque todos los organismos vivos son capaces de reducir compuestos nitroheteroaromáticos, las nitroreductasas se han estudiado principalmente en varias especies de enterobacterias como: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Enterobacter cloacae* entre otras (Whiteway y cols, 1998; Hagiwara y cols, 1993; Watanabe y cols, 1990; Carrol y cols, 200; Navinskas y cols, 2000). Los intermediarios formados de la nitroreducción incluyen nitroso derivados e N-hydroxilaminas; protonación o acetilación de intermediarios de N-hydroxilaminas, formación de iones reactivos electrofílicos nitrenium que pueden interactuar con el ADN formando aductos (Andrews y cols, 1986; Fifer y cols, 1986). La nitroreducción de compuestos nitroheterocíclicos tal como nitrofuranos pueden también producir derivados reactivos acrilonitrilo de cadena abierta que dañan proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (McCalla, 1983; Bertenyi y Lambert, 1996; Vroomen y cols, 1998). Varios compuestos nitropoliaromáticos han sido identificados como contaminantes medioambientales que han mostrado ser significativamente genotóxicos (DeMarini y cols, 1996). Las investigaciones sobre el destino de los compuestos nitroaromáticos en eucariontes han revelado tener efectos citotóxicos y mutagénicos que son causados por la reducción de dichos compuestos y, además, la transformación de los productos de reducción (Cramer y cols, 1960; Honeycutt y cols, 1996).

Se han identificado dos clases de nitroreductasas, dependiendo de la diferencia en sensibilidad al oxígeno: tipo I o insensibles al oxígeno y tipo II o sensibles al oxígeno (Bryant y cols, 1981, Djuric y cols, 1986; Paterson y cols, 1979; Carroll, 2002). La mayoría de las nitroreductasas identificadas en tejidos de mamíferos son sensibles al oxígeno (tipo II) (Bryant y McElroy, 1991).

Las nitrorreductasas insensibles al oxígeno (tipo I), son flavoproteínas que median la transferencia de dos electrones del NAD(P)H hacia el grupo nitro

de los compuestos nitrosustituídos produciéndose intermediarios nitroso y derivados N-hidroxilamina biológicamente activos (Bryant y cols, 1981).

Las nitroreductasas tipo I, son clasificadas en dos familias, de acuerdo a la homología con NfsA y NfsB de *E.coli*. La NfsA (también conocida como MdaA), es la principal nitroreductasa en esta bacteria, usa NADPH como fuente de electrones, es codificada por el gen *nfsA* localizado a 19.2 min en el mapa genómico de *E.coli* (Zenno y cols, 1996), tiene una masa molecular de 26.8 kDa y representa un papel importante en contra del estrés oxidativo (Liochev y cols, 1999).

La NfsB se encuentra en menor proporción del total de las nitroreductasa oxígeno-insensibles de *E.coli*, es también una flavoproteína dimérica con una masa molecular de 24 kDa, y usa NADH o NADPH como cofactor (Whiteway y cols, 1998; Bryant y cols, 1981, Zenno y cols, 1996).

En *Salmonella typhimurium* (*S.typhimurium*) se han identificado dos nitroreductasas involucradas en el metabolismo reductivo de compuestos nitrosustituídos: la nitroreductasa Cnr conocida como nitroreductasa "clásica", es oxígeno-insensible. Mostró tener un 88.5% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la nitroreductasa que es codificada por el gen de *nfsB* de *E.coli*. (Mccalla 1983; Carrol y cols, 2002), además de tener propiedades cinéticas y de inducibilidad semejantes a ésta, es codificada por el gen *cnr* y tiene un papel importante en la activación metabólica de varios nitrocompuestos (Whiteway y cols, 1998). La otra nitroreductasa encontrada en *S.typhimurium* es la SrnA que comparte una alta identidad en la secuencia de aminoácidos con la NfsA de *E. coli* (Zenno y cols 1996; Watanabe y cols, 1990,1998).

Más recientemente se han identificado nitroreductasas similares en *Helicobacter pylori* (Jorgensen y cols, 2001). Mediante estudios de resistencia a metronidazol se encontró que *H.pylori* posee una nitroreductasa que activa dicho fármaco (Smith y cols, 1997; Goodwin y cols, 1998). Esta nitroreductasa se denominó RdxA y es codificada por el gen *rdxA*, es insensible al oxígeno y dependiente de NADPH. Es semejante a la

nitrorreductasa "clásica" de enterobacterias como *S.typhimurium*. Posteriormente se identificó otra nitroreductasa en *H.pylori*, la FrxA, que es codificada por el gen *frxA* y es homóloga a RdxA con una identidad del 24% en la secuencia de aminoácidos (Yong y cols, 2000),

2.6. Importancia de Citocromo P450 en la bioactivación de xenobióticos

Los citocromos P-450 (CYP) fueron identificados por primera vez en los años 1950s, como pigmentos en fracciones microsomales de hígado de mamíferos. Después de la adición de un agente reductor como ditionita de sodio, los pigmentos absorbieron la luz visible en presencia de monóxido de carbono en una longitud de onda de aproximadamente 450 nm (Garfinkel, 1958), debido a lo anterior surgió el nombre de citocromo P450 (pigment with an absorption at 450 nm), el cual se usa desde entonces para relacionar enzimas con esta característica.

Los CYP conforman una superfamilia de hemoproteínas que se caracterizan porque tienen una secuencia de aminoácidos muy conservada en el decapeptido de unión al grupo hemo FXXGXXXCXG y por mostrar un pico en el espectro de absorbencia a los 450 nm como ya se mencionó. La superfamilia de CYP es muy antigua; el gen ancestral se piensa que existió desde hace 2,500 millones de años, en un tiempo en el que no existían fármacos, productos orgánicos de combustión, ni mucho menos las interacciones planta-animal. De modo que estas enzimas han desempeñado un papel esencial en el mantenimiento del nivel estable de los ligandos endógenos, que están involucrados en la modulación de procesos como homeostasis, el crecimiento, la diferenciación y las funciones neuroendocrinas (Nebert, 1991). Se han identificado y secuenciado más de 400 isoformas de CYP a partir de bacterias, insectos, animales, plantas, y levaduras. Basándose en estas secuencias, los CYP son clasificados dentro de familias que provienen de genes que codifican secuencias de hasta un

40% de similitud en la cadena de aminoácidos y en subfamilias en donde los miembros comparten entre sí $\geq 55\%$ de identidad (Nelson y cols, 1996).

Los CYP son un grupo de hemoproteínas mediadoras del metabolismo oxidativo de esteroides y xenobióticos (fármacos, carcinógenos y contaminantes ambientales), encontrándose en todo el reino biológico desde bacterias a animales superiores y plantas (Nebert, 1991).

Las reacciones catalizadas por los CYP incluyen hidroxilaciones, epoxidaciones, O-, S- y N-dealquilaciones y N-oxidaciones (Guengerich, 1992). Estas enzimas también se requieren para la supervivencia de los organismos en medios que les son particularmente adversos, ya que contribuyen a la inactivación de muchos compuestos tóxicos. Pero, por otro lado, existe un efecto dual en el metabolismo de compuestos xenobióticos por el cual se activan diversos promutágenos (contaminantes ambientales, fármacos y otros agentes ubicuos), hacia compuestos genotóxicos. Desempeñan, por tanto, un papel muy importante en los procesos de mutagénesis y carcinogénesis (Hursting, 1999), debido a que la potencia carcinogénica de muchos de estos compuestos es dependiente de la bioactivación por CYP, dando como resultado la formación de metabolitos intermediarios electrofílicos muy reactivos como: grupos hidroxilos, radicales superóxido etc., potencialmente tóxicos (Badawi y cols, 1996; Guengerich y Shimada, 1991), los cuales pueden interactuar con biomoléculas importantes, por ejemplo formando enlaces covalente con el ADN. Los aductos así formados pueden ser reparados en forma eficiente, o bien, el proceso mismo de la reparación puede promover errores en la secuencia nucleotídica, generándose una mutación estable que se trasmite a la siguiente generación (Martínez-Cayuela, 1998).

Los CYP son clasificados también de acuerdo a los requerimientos de parejas redox durante la catálisis, clasificándose en tres tipos: **Enzimas clase I**, encontradas en mitocondrias de células de mamífero (involucradas normalmente en el metabolismo de esteroides), son proteínas intrínsecas de membrana y también se encuentra en la mayoría de las bacterias. Los CYP

de bacterias en su mayoría son enzimas solubles (con algunas excepciones), Esto ha simplificado la sobreexpresión y purificación de estas enzimas bacterianas, para entender su papel fisiológico.

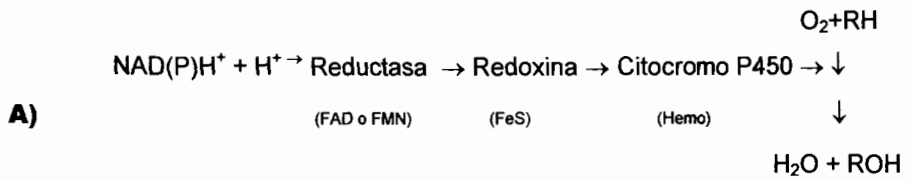
El hecho de que ambos CYP de bacterias y mitocondria son clase I, puede proveer evidencia en el origen microbiano de la mitocondria.

Requieren NAD(P)H como donador de electrones, mediada por una reductasa conteniendo FAD (acepta electrones de NAD(P)H) y otra proteína ferredoxina (una sulfo-hierro proteína) que mueve electrones de la reductasa hacia el citocromo P450 el cual se une al sustrato (Huang y Kimura, 1973), figura 1A.

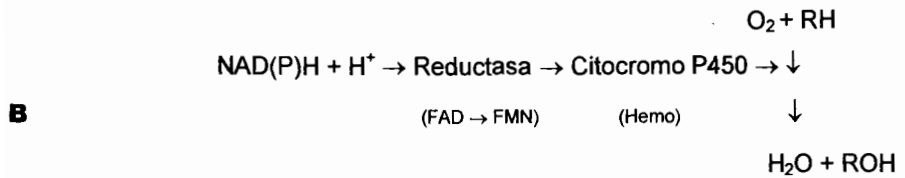
Las Enzimas clase II, son más abundantes y se localizan en retículo endoplásmico de células eucarióticas. Los llamados citocromos microsomales contienen sólo una proteína que interactúa con NADPH y transfiere directamente electrones al citocromo P450. Esta proteína oxidoreductasa NADPH-P450, contiene FAD y FMN y es una proteína integral de membrana. En esta proteína el FAD funciona como un aceptor de electrones inicial de NADPH, además, FMN puede ser considerado análogo al componente redoxina como ocurre en el sistema de tres componentes (clase II), en que éste interactúa con sitios de P450, reduciéndolo. En los mamíferos el metabolismo de xenobióticos lo efectúan este tipo de citocromos (clase II), que comprenden principalmente las familias 1, 2,3 y 4 (Wrighton y cols, 1992), Figura 1B.

En la figura 1C, se ilustra un ejemplo de citocromo P450 que contiene FAD, FMN y un grupo hemo (pero no centros Fe-S):

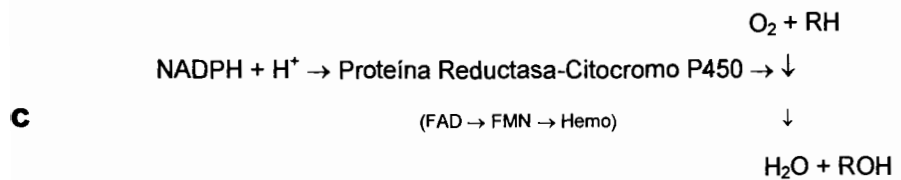
Figura.1 Comparación de Citocromo P450 mitocondrial, microsomal y bacteriano.



Citocromo P450 mitocondrial y de bacterias
(Sistema de tres proteínas)



Citocromo P450 microsomal
(Sistema de dos proteínas)



Citocromo P450_{BM-3} de *Bacillus Megaterium*
(Un sistema de una proteína)

3. JUSTIFICACIÓN

Helicobacter pylori ha adquirido gran importancia durante las últimas dos décadas, al ser reconocido como un importante patógeno que infecta una gran porción de la población humana de cualquier edad. Este microorganismo es reconocido como el principal agente que causa la gastritis crónica y úlcera duodenal, además, que se ha asociado con el subsecuente desarrollo del carcinoma gástrico. Hasta hace pocos años, las investigaciones en relación con la etiopatogenia del cáncer gástrico se habían concentrado, generalmente, en el estudio de los factores ambientales. Sin embargo, desde la identificación de dicha bacteria en los procesos inflamatorios crónicos del estómago; se ha contemplado la posibilidad de que tenga un papel importante en la carcinogénesis gástrica, por lo que resulta importante el estudio de la capacidad de *H.pylori* para metabolizar (bioactivar) compuestos promutágenos y procarcinógenos ambientales, en metabolitos capaces de causar daño genotóxico (daño al ADN provocando mutaciones). Esto último puede constituir un mecanismo alternativo que ayuda a explicar la correlación epidemiológica entre el desarrollo de cáncer gástrico y la presencia de este microorganismo.

4. HIPÓTESIS

Las cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes con alteraciones que preceden al cáncer gástrico, poseen el potencial enzimático necesario para la bioactivación de compuestos promutágenos y procarcinógenos ambientales en productos genotóxicos.

3. JUSTIFICACIÒN

Helicobacter pylori ha adquirido gran importancia durante las últimas dos décadas, al ser reconocido como un importante patógeno que infecta una gran porción de la población humana de cualquier edad. Este microorganismo es reconocido como el principal agente que causa la gastritis crónica y úlcera duodenal, además, que se ha asociado con el subsecuente desarrollo del carcinoma gástrico. Hasta hace pocos años, las investigaciones en relación con la etiopatogenia del cáncer gástrico se habían concentrado, generalmente, en el estudio de los factores ambientales. Sin embargo, desde la identificación de dicha bacteria en los procesos inflamatorios crónicos del estómago; se ha contemplado la posibilidad de que tenga un papel importante en la carcinogénesis gástrica, por lo que resulta importante el estudio de la capacidad de *H.pylori* para metabolizar (bioactivar) compuestos promutágenos y procarcinógenos ambientales, en metabolitos capaces de causar daño genotóxico (daño al ADN provocando mutaciones). Esto último puede constituir un mecanismo alternativo que ayuda a explicar la correlación epidemiológica entre el desarrollo de cáncer gástrico y la presencia de este microorganismo.

4. HIPÓTESIS

Las cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes con alteraciones que preceden al cáncer gástrico, poseen el potencial enzimático necesario para la bioactivación de compuestos promutágenos y procarcinógenos ambientales en productos genotóxicos.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el potencial de *H.pylori* para bioactivar promutágenos y procarcinógenos ambientales en derivados genotóxicos, por los caminos enzimáticos de nitroreducción y oxidación por citocromo P450.

5.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar el potencial de lisados de *H.pylori* para bioactivar promutágenos y procarcinógenos ambientales en derivados mutagénico, detectándolos por medio de la prueba de AMES.
- Determinar actividad enzimática de citocromos P450 de las familias 1A1, 1A2, 2B1,2B2. y de nitroreductasa en lisados de *H.pylori*.
- Identificar la presencia de isoformas pertenecientes a las familias de citocromos 1A1, 1A2, 2B1, 2B2 y 2E1, mediante Western blot en lisados de *H.pylori* con anticuerpos específicos contra las diferentes familias de citocromos.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Obtención de cepas bacterianas

Las cepas de *Salmonella typhimurium* YG7132 y TA98 fueron donadas por el Dr. Nohmi del Instituto Nacional de Ciencias de la Salud de Tokio Japón.

Las cepas de colección de *H.pylori* utilizadas fueron las siguientes: 84-183 (Pérez-Pérez y Blaser, 1987), fue donada por la Dra. López Vidal de la Universidad Autónoma de México de la Facultad de Medicina y 60190 (Eaton y Morgan, 1989) donada por el Dr. Rafael Coria del Instituto Nacional de Pediatría. Las cepas aisladas de pacientes con alteraciones gástricas fueron donadas por el Dr. Javier Torres del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Se cultivaron en medios especiales como: Agar y caldo de Infusión Cerebro Corazón (BHI). Agar soya tripticasa, enriquecidos con sangre de carnero o suero de caballo, según los requerimientos de cada cepa. Se incubaron en condiciones de microanaerobiosis en jarras especiales por 96 horas a 37°C, y se utilizaron sobres de Anaerocul C para lograr una atmósfera de microanaerobiosis. Se cultivaron en placa (cajas petri) y en medio líquido con agitación (frascos).

6.2. Obtención de Lisados de *Helicobacter pylori*.

Los cultivos de *H.pylori* en placa, se cosecharon mediante el raspado de las mismas con un asa bacteriológica, resuspendiéndose en amortiguador Tris HCL (50 mM) pH 7.5; ditioneitol (1mM), posteriormente se centrifugaron a 500 r.p.m. y se obtuvo el precipitado, el cual se resuspendió nuevamente en amortiguados Tris-HCl; el procedimiento anterior se realizó por dos ocasiones más, para lavar y eliminar el agar que pudo haberse arrastrado en el momento de cosechar. Posteriormente, el precipitado obtenido en la última lavada se resuspendió en 6 ml del amortiguador Tris HCL y se lisó por medio de sonicación (Labline ultrasonic system) con tres pulsos de 30 segundos con intervalos de 1 minuto de descanso entre cada pulso.

Para el caso de los cultivos de *H.pylori* en medio líquido, se cosecharon por centrifugación a 5000 r.p.m. por 10 minutos, obteniendo el precipitado y resuspendiéndolo en amortiguador Tris-HCl, para su posterior sonicación (en las mismas condiciones utilizadas para obtener los lisados de los cultivos en placa). Ya obtenidos los lisados se les determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (Lowry y col, 1951) y se guardaron en alícuotas a -70°C. Posteriormente los lisados se utilizaron para realizar western blot para la inmunodetección de citocromos P450, tinción específica de hemoproteínas, medición de actividad enzimática de citocromo P450, actividad de nitroreductasa y determinar por el método de Ames la bioactivación de 1-nitropireno.

6.3. Western blot de lisados de *Helicobacter pylori*.

6.3.1. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.

La electroforesis de los lisados de *H.pylori*, se realizaron de acuerdo al método descrito por Laemli (Laemli, 1970). Se utilizó un gel separador que consistió de acrilamida al 7.5% y bisacrilamida 0.3% en presencia de duodecil sulfato (SDS) usando un sistema de amortiguadores discontinuo. Las condiciones de corrida fueron las siguientes: 200 V por 45 minutos a una temperatura de 4°C en una cámara Mini-Protean 3 (BIO-RAD).

6.3.2. Transferencia.

Se transfirieron las proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa, de acuerdo al protocolo descrito por Towbin (Towbi y Gordon, 1979). En las siguientes condiciones: 45 minutos a 200 Voltios en un Mini Trans-Blot (BIO-RAD).

6.3.3. Inmunodetección

Las membranas de nitrocelulosa ya transferidas fueron bloqueadas toda la noche con una solución de leche descremada al 5% en amortiguador de fosfato salino (PBS) por 1 h, y enseguida se lavaron por tres veces con PBS-Tween 20 (0.05%). Posteriormente, se incubaron con los anticuerpos policlonales anti-

CYP para las diferentes familias (CYP1A, CYP2B Y CYP2E) en una solución de leche descremada al 0.5% en PBS diluidos (1:750) por 1 h. Después de este tiempo, se lavaron por tres veces con PBS-Tween 20 al 0.5% y fueron incubadas por 1 h con un segundo anticuerpo de conejo anti-IgG de rata conjugado con peroxidasa a una dilución de 1:1500. Las membranas de nitrocelulosa fueron lavadas y el inmunocomplejo fue revelado con 3',3 diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno.

6.4. Tinción de Hemoproteínas de lisados de *Helicobacter pylori* en geles de poliacrilamida.

Mediante el uso de la tinción con el compuesto 3,3', 5, 5'-tetrametilbenzidina- H_2O_2 (TMBZ) usado para la detección de bajos niveles de actividad de peroxidasa de citocromo P450 asociada al grupo hemo, en geles de poliacrilamida-SDS, se realizó la identificación de hemoproteínas en los lisados de *Helicobacter pylori* (Thomas y cols, 1976)

Antes de la electroforesis, los lisados fueron reducidos con ditioneol (80 mM). La electroforesis fue corrida en las mismas condiciones que se usaron para los Western blot. Concluida la corrida electroforética, el gel se tiñó para actividad de peroxidasa con el siguiente procedimiento:

Se preparó una mezcla de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMBZ) 6.3 mM en metanol inmediatamente antes de su uso, se tomaron 3 partes de esta solución y se mezcló con 7 partes de una solución de acetato de sodio 0.25 M, pH 5. Los geles fueron sumergidos en esta mezcla a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de 2 horas con agitación ocasional (aproximadamente cada 10 a 15 minutos), se les agregó H_2O_2 a una concentración final de 30 mM. La tinción fue visible después de los 3 minutos y se incrementó la intensidad después de los 30 minutos. Después de 2 hora, los geles fueron introducidos en otra solución de isopropanol 30 % y acetato de sodio 0.25 M, pH 5, en una proporción 3:7 respectivamente. Esta mezcla se reemplazó dos veces por solución fresca con el fin de remover el exceso de TMBZ, aclarando el fondo del gel y para aumentar la intensidad de la tinción

6. 5. Inducción de Citocromos P450 en Cultivos de *Helicobacter pylori*.

Otra de las características importantes de los citocromos P-450, incluyendo los citocromos de bacterias es que son inducibles. Por lo cual se realizaron experimentos de inducción de estos citocromos en cultivos de *H.pylori* en medio líquido y sólido. La inducción se efectuó utilizando fenobarbital, el cual es un potente inductor de citocromo P450 (CYP1A). Este se agregó a cultivos de *H.pylori* en fase estacionaria (en medio líquido), a diferentes concentraciones (200, 400, 600 y 800 μM). El tiempo de inducción fue por 48 horas, posteriormente los cultivos se centrifugaron a 5000 r.p.m. y el precipitado fue resuspendido en amortiguador de fosfato, se centrifugaron nuevamente y de igual manera el precipitado se resuspendió, y se sonicó para obtener los lisados. La inducción en medio sólido se realizó, incorporando el fenobarbital (en las mismas concentraciones usadas para los cultivos en medio líquido) al medio agar BHI antes de vaciarlo en cajas de Petri, para su posterior solidificación. Ya solidificado el medio, con un asa bacteriológica se sembró el *H.pylori* y se incubó por 72 horas en condiciones de microanaerobiosis. Transcurrido el tiempo se cosecharon y se obtuvieron los lisados para realizar los Western blot.

6.6. Determinación de Actividad Enzimática de diferentes familias de Citocromo P450 en lisados de *Helicobacter pylori*.

Se midió la actividad de 5 subfamilias de CYP: Etoxiresorrufina O-deetilasa (EROD) para CYP 1A1, Metoxiresorrufina O-deetilasa (MROD) CYP 1A2, Pentoxiresorufina O-demetilasa (PROD) CYP2B1, Beciloxiresorufina O-demetilasa (BROD) CYP 2B2, de acuerdo a la metodología descrita por Burke y cols (1985). La mezcla de reacción contenía amortiguador Tris-HCL 50 mM – MgCl_2 25 Mm pH 7.6 (1.91-1.94 ml), sustrato (10-40 μl) y lisados de *Helicobacter pylori* (10-40 μl), y se incubó a 37°C por 3 min en celdillas de cuarzo. La reacción se inició con la adición de NADPH 500 μM (20 μl de una solución de 50 mM), en un volumen de reacción total de 2 ml. Los sustratos fueron disueltos en dimetilsulfóxido en las siguientes concentraciones:

Etoxiresorufina 50 μ M; Metoxiresorufina 0.5 mM; Pentoxiresorufina 1.0 mM y Benciloxiresorufina 1.0 mM

La concentración del producto final fluorescente de la reacción (la resorufina), se midió en un espectrofluorómetro Versa Fluor^{MT}; usando un filtro de excitación y otro de emisión de longitudes de onda de 570 y 590 nm respectivamente. La actividad enzimática se expresó como nanomoles (nM) de resorufina formada por minuto (min.) por miligramo (mg) de proteína. Los valores de fluorescencia se calcularon mediante una curva estándar de resorufina de 0-250 pmol/ml.

La actividad enzimática de CYP2E1 (actividad de 4-nitrofenol-hidrolasa), se determinó mediante una modificación del método descrito por Koop (1986). Utilizando 4-nitrofenol como sustrato (0.2 mM) el cual fue disuelto en 930 μ l de amortiguador Tris-HCl 25 mM MgCl₂ (pH 7.4) con 50 μ l de lisado de *Helicobacter pylori*, esta mezcla fue incubada a 37°C por 5 min. Posteriormente, la reacción se inició al agregar NADPH 50 Mm (20 μ l) y se continuó con la incubación por otros 10 min. Después de transcurrido este tiempo, la reacción se paró al adicionar ácido perclórico 0.6 N (0.5 ml), finalmente se centrifugó y se tomó 1 ml de sobrenadante, adicionándole 0.1 ml de NaOH (10 N) para cuantificar espectrofotométricamente la formación de 4-nitrocatecol (producto final de la reacción), a una longitud de onda de 510 nm. Se realizó una curva estándar de 4-nitrocatecol (5-50 nmol/ml) para calcular la actividad.

6.7. Actividad Enzimática de Nitrorreductasa de lisados de *Helicobacter pylori*.

La actividad de nitrorreductasa, se realizó de acuerdo a la metodología espectrofotométrica descrita por Zacarías y Juchau (1974); utilizando como sustrato ácido 4-nitrobenzoico a una concentración 3.5 mg/ml en una mezcla de reacción que contenía 300 μ g de NADPH, lisado de *H.pylori* y amortiguador pH 7.5 en un volumen total de 3 ml. La mezcla se incubó a 37°C por una hora, posteriormente se acidificó con ácido tricloroacético (concentración final de

0.21%); se agregó nitrito de sodio a la mezcla hasta alcanzar una concentración final de 0.007% y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos. El nitrito de sodio en exceso se neutralizó con sulfamato de amonio. En seguida, se agregó clorhidrato de N-(1-naphtyl)ethylen diamino (NEDD) a una concentración final de 0.35%, la sal de diazinio formada a partir del ácido 4-aminobenzóico (producto de reacción del 4-nitrobenzóico), al combinarse con NEDD produce un compuesto azo color púrpura que se cuantificó en el espectrofotómetro a 450nm.

6.8. Activación metabólica de 1-nitropireno por Lisados de *H.pylori*.

Se utilizó la prueba de Ames en *S.typhimurim*, usando la cepa TA98NR carente de nitroreductasa la cual detecta mutágenos que promueven el corrimiento del marco de lectura en las bases del ADN (Yamada y cols, 1997). En un tubo de ensaye con tapón de rosca, se agregó en el siguiente orden: 0.1 ml de un cultivo de 16 horas de crecimiento de la cepa TA98NR; 20 µl de una solución de 1-nitropireno disuelto en DMSO con la concentración requerida del mutágeno; 500 µg de proteína del Lisado de *H.pylori* (cepa 18-183), para el caso de células completas se agregaron 100 µl de un cultivo en fase estacionaria de *H.pylori* (en presencia o ausencia de NADPH), en amortiguador hasta alcanzar un volumen de 620 µl. El contenido de los tubos se incubó 20 minutos a 37°C, al final de los cuales se agregaron 2 ml de agar de superficie que contiene trazas de histidina y se distribuyó en cajas de Petri con medio mínimo de Vogel-Bonner (Maron y Ames, 1983). Una vez solidificado el medio, las cajas se incubaron por 48 horas a 37°C y posteriormente se contó el número de colonias mutantes. Se utilizó la cepa TA98 de *S. Tiphimurium* como control positivo de nitroreducción. Cada punto del experimento se realizó por triplicado, obteniéndose la media de las colonias mutantes encontradas en las tres cajas. Se consideró un resultado positivo de mutagénesis cuando el número de colonias mutantes inducidas por el 1-nitropireno superó por lo menos al doble el número de colonias mutantes espontáneas (obtenidas en cajas carentes del mutágeno).

7. RESULTADOS

7.1. Western blot de lisados de *H. pylori*.

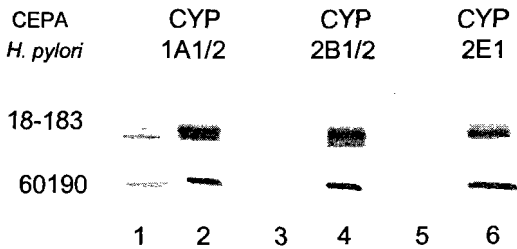
Los resultados del análisis de Western blot de los lisados de *H. pylori* para la identificación de diferentes familias de citocromos P450 (CYP), se realizaron en un principio con las cepas de colección 84-183 y 60190. En la figura 1 se muestran los resultados, en donde se encontró la expresión de una banda (muy tenue) de proteína inmunoreactiva (carril 1) en ambas cepas 84-183 (línea superior) y 60190 (línea inferior), con la misma movilidad electroforética que el citocromo P450 de la familia 1A (CYP1A), utilizado como control positivo (carril 2). Esta banda se observó específicamente a nivel del corrimiento electroforético de la subfamilia CYP1A2. En cambio, para las familias de CYP2B y CYP2E no se observaron bandas en los lisados de *H. pylori* (carriles 3 y 5 respectivamente). En los carriles 4 y 6 se observaron las bandas correspondientes a los testigos positivos de CYP2B1/2 y CYP2E1. Se usó 1 µg de proteína total por carril para los lisados, así como para los controles comerciales de las diferentes familias de CYP (1A1/2, 2B1/2 Y 2E1).

Posteriormente, para confirmar que la proteína identificada se encontraba en los lisados de *H. pylori* y que no se tratara de una inmunoreacción inespecífica, se probaron otras muestras con una mayor concentración de proteína (4 µg por carril) y se aumentó la concentración de SDS (dodecil sulfato de sodio) para los lavados de las membranas (SDS de 0.1% a 0.5%) con la finalidad de eliminar reacciones inespecíficas. Además, para descartar de igual manera que la proteína identificada no fuera una contaminación de los cultivos de *H. pylori*, se crecieron 3 cultivos de las cepas 84-183 (línea superior) y 60190 (línea inferior) en las mismas condiciones, pero en diferentes tiempos (días) y se obtuvieron los lisados, los cuales se analizaron por inmunoblot. Los resultados se muestran en la figura 2, donde nuevamente las bandas se observaron en los tres diferentes cultivos en ambas cepas (carril 2, 3 y 4). Estas bandas de proteínas mostraron la misma movilidad electroforética que el control de

CYP1A2 (carril 1), las bandas se observaron más intensas y gruesas, lo que confirma que no se trataba de una reacción inespecífica y que dependía de la concentración de proteína utilizada por carril.

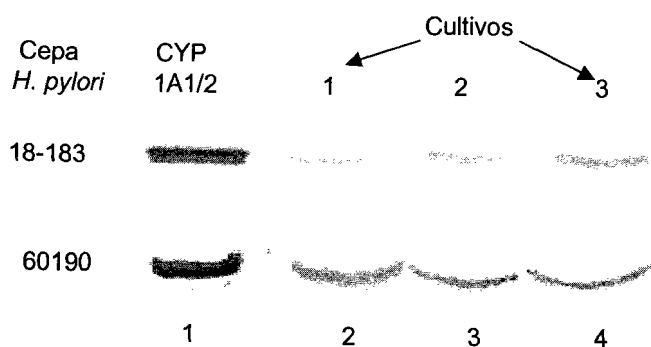
Por otra parte, para ratificar que dicha banda encontrada en los lisados de *H. pylori* no fuese un contaminante del suero de caballo (SC) o del medio de cultivo BHI (MC) utilizados para su crecimiento, también dichos medios se sometieron a un análisis de inmunoblot. En la figura 3, se observan las bandas, únicamente en los carriles 4, 5, 6, correspondientes a los lisados de *H. pylori* cepas 84-183 (línea superior) y 60190 (línea inferior), así como en el carril 1 control positivo de CYP1A1/2. No se encontró en los carriles 2 y 3 correspondientes al suero de caballo y el medio de cultivo respectivamente. Esto indica, que la banda identificada no es un componente contaminante del medio de cultivo o del suero de caballo usados para el crecimiento de la bacteria.

Fig. 1. WESTERN BLOT DE LISADOS DE *Helicobacter pylori* PARA LA IDENTIFICACIÓN DE DIFERENTES FAMILIAS DE CITOCROMO P450



Carriles 1, 3, y 5 corresponden a los lisados de *H. pylori* cepas 18-183 (línea superior) y 60190 (línea inferior). En el carril 1 se expresa una banda de proteína inmunoreactiva para anti-CYP1A en ambas cepas de *H. pylori*, y no se observa inmunoreactividad para CYP2B Y CYP2E1 carriles 3 y 5. Carril 2 control comercial de CYP1A1/2, carril 4 control comercial de CYP2B1/2 y carril 6 control comercial de CYP2E1.
Nota: concentración de proteína por carril 1 µg.

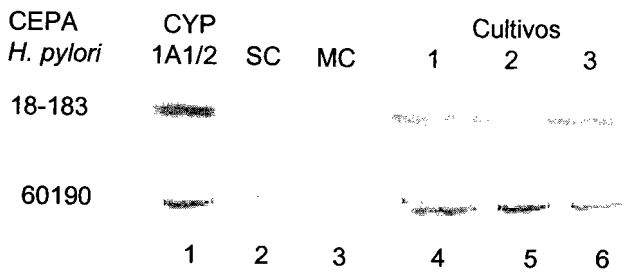
Fig. 2. WESTERN BLOT DE LISADOS DE *Helicobacter pylori* PARA LA IDENTIFICACION DE CITOCROMOS P-450 1A1



Carril 1 control comercial de CYP1A1/2, carriles 2, 3 y 4 corresponden a los cultivos (1, 2, 3) de las cepas de *H.pylori* cepas 18-183 (línea superior) y 60190(línea inferior), en donde se observan bandas de proteína inmunoreactiva para CYP1A.

Nota: concentración por carril 4 µg

Fig. 3. WESTERN BLOT DE LISADOS DE *H.pylori* PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CITOCROMOS CYP 1A

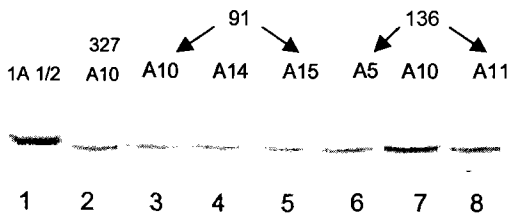


Carril 1 control comercial CYP1A1/2, carril 2 suero de caballo, carril 3 medio de cultivo, carriles 4, 5 y 6 corresponden a cultivos de *H. pylori* cepas 18-183 (línea superior) y 601013 (línea inferior)
 Nota: se corrieron 4 µg de proteína por carril.

Posteriormente, para confirmar que la proteína encontrada en los lisados de *H.pylori* no fuera exclusiva de las cepas de colección (84-183 y 60190) en donde se realizaron los análisis anteriores. Se obtuvieron cepas de *H.pylori* de aislados de pacientes (niños y adultos) con diferentes alteraciones gástricas (tabla I y II), a las cuales también se les sometió al análisis de Western blot. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: se identificó la expresión de una proteína semejante a citocromo P450 1A. Por ejemplo, en la figura 4 se pueden observar bandas de proteínas en los lisados de las cepas aisladas de dos pacientes masculinos: uno de 20 años de edad diagnosticado (Dx) con gastritis (carriles 3, 4 y 5) y el otro de 67 años de edad diagnosticado con úlcera duodenal (UD) carriles 6, 7 y 8. En la figura 5, también se observan estas bandas en los lisados obtenidos de otros dos paciente; uno masculino de 4 años de edad, diagnosticado con dolor abdominal (dar) carriles 1, 2, y 3; el otro paciente femenino de 11 años de edad, con dolor abdominal carriles 5, 6 y 7. En la figura 6, se observan la expresión de las bandas de proteína en los lisados de cepas de *H.pylori*, aislados de un paciente femenino de 48 años de edad con ulcera duodenal carriles 1, 2 y 3; otro paciente femenino de 13 años de edad con dolor abdominal carriles 4, 5 y 6. En la figura 7, también se pueden ver estas bandas en cepas de un paciente masculino de 27 años de edad diagnosticado con ulcera duodenal (carril 2 y 3) y cepas aisladas de otro paciente masculino de 49 años de edad con gastritis (carril 4 y 5). La figura 8 corresponde a lisados de cepas, de pacientes masculinos de 12 y 11 años de edad con dar carriles 2,3 y 7, 8, 9 respectivamente y un paciente femenino de 70 años de edad con úlcera duodenal carriles 4, 5 y 6; en donde también se encontró la banda de proteína semejante a CYP1A. En las tablas I y II se resúmen los resultados encontrados en todas las cepas de *H. pylori* aisladas de los pacientes niños y adultos analizadas. De esta manera se confirma que esta banda de proteína identificada se encuentra en varios aislados de pacientes. Por lo general, en las cepas aisladas de niños con dolor abdominal, si se encontró esta proteína con menor o mayor intensidad, dependiendo de la cepa bacteriana; por ejemplo, en las cepas 363, 365, 359, 348 y 403 la banda

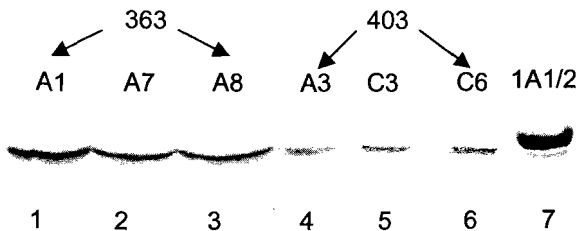
inmunoreactiva se observa más intensa. Con lo que respecta a las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes adultos con gastritis o úlcera duodenal, también se identificó dicha banda pero con mayor intensidad, por ejemplo en las cepas 91, 136, 167, 149 y 60

Fig. 4 . WESTERN BLOT PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CITOCROMO P450 1A DE CEPAS DE *Helicobacter pylori* AISLADAS DE PACIENTES CON ALGUNA ALTERACION GASTRICA



1. Testigo positivo citocromo P450 1A1/2. Carril 2 (cepa 327) aislada de un paciente masculino de 11 años de edad, diagnosticado con dolor abdominal recurrente (dar) Carriles 3, 4 y 5 (Cepas 91) aisladas de un paciente masculino de 20 años de edad con gastritis. Carriles 6, 7 y 8. (Cepas 136) aisladas de un paciente masculino de 67 años de edad con úlcera duodenal (UD).

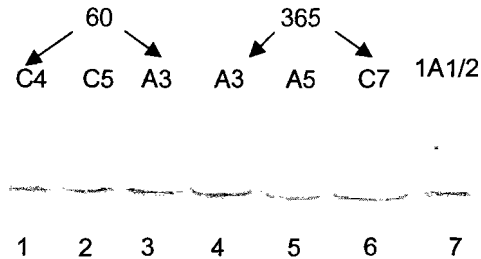
Fig. 5. WESTERN BLOT PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CITOCROMO P450 1A DE CEPAS DE *Helicobacter pylori* AISLADAS DE PACIENTES CON ALGUNA ALTERACION GASTRICA



Carriles 1, 2 y 3 (cepas 363) aisladas de un paciente masculino de 4 años de edad con dolor abdominal recurrente (dar). Carriles 4, 5 y 6 (cepas 403) aisladas de un paciente femenino de 11 años de edad con dar. Carril 7 testigo positivo citocromo P450 1A1/2.

Nota: se usaron 4µg de proteína por carril y para el control de CYP1A 1 µg de proteína

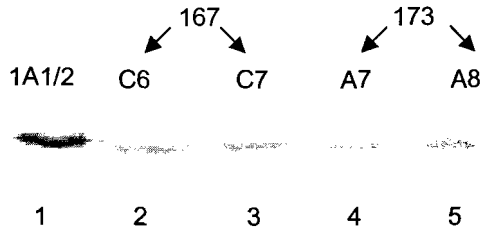
Fig. 6. WESTERN BLOT PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CITOCROMO P450 1A DE CEPAS DE *Helicobacter pylori* AISLADAS DE PACIENTES CON ALGUNA ALTERACION GASTRICA



Carriles 1, 2 y 3 (cepas 60) aisladas de un paciente femenino de 48 años de edad con ulcera duodenal (UD). Carriles 4, 5 y 6 (Cepas 365) aisladas de un paciente femenino de 13 años de edad con dolor abdominal (dar). Carril 7 testigo positivo citocromo P4501A/2.

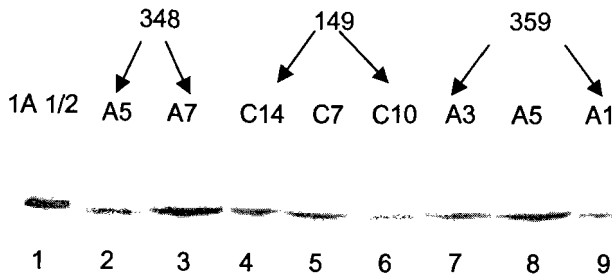
Nota: se usaron 4µg de proteína por carril y para el control de CYP1A 1 µg de proteína

Fig. 7. WESTERN BLOT PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CITOCROMO P450 1A DE CEPAS DE *Helicobacter pylori* AISLADAS DE PACIENTES CON ALGUNA ALTERACION GASTRICA



Carril 1, testigo positivo Citocromo P450 1A1/2. Carriles 2 y 3 (Cepas 167) aisladas de un paciente masculino de 27 años de edad con úlcera duodenal (UD). Carriles 4,5 (Cepas 173) aisladas de un paciente masculino de 49 años de edad con gastritis.
Nota. Se usaron 4 μ g de proteína por carril y para el control de CYP1A 1 μ g de proteína

Fig. 8. WESTERN BLOT PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CITOCROMO P450 1A DE CEPAS DE *Helicobacter pylori* AISLADAS DE PACIENTES CON ALGUNA ALTERACIÓN GÁSTRICA



Carril 1 testigo positivo Citocromo P450 1A1/2. Carriles 2 y 3 (Cepas 348) aisladas de un paciente masculino de 12 años de edad con dar. Carriles 4, 5 y 6 (cepas 149) aisladas de un paciente femenino de 70 años de edad con úlcera duodenal (UD). Carriles 7, 8 y 9 (Cepas 359) aisladas de un paciente masculino de 11 años de edad con dolor abdominal recurrente (dar).
Nota: se uso 4µg de proteína por carril y para el control CYP1A 1 µg de proteína por carril

TABLA I. CEPAS DE *Helicobacter pylori* AISLADAS DE NIÑOS CON ALGUNA ALTERACION GASTRICA

CEPAS	EDAD	SEXO	Dx	CLONAS	SITIO	PRESENCIA DE BANDA CYP1A
263	9	F	dar	A7	A	banda no hay
				A8	"	banda no hay
				A10	"	banda no hay
318	13	M	dar	C2	C	banda no hay
				C11	"	
				C12	"	banda +
327	11	M	dar	A10	A,C	banda ¿+?
				A12	"	banda ¿+?
				C2	"	banda ¿+?
329	11	M	dar	A2	A	banda ++
				A7	"	banda ++
				A15	"	banda ¿+?
331	16	F	dar	A4	A,C	banda ¿+?
				A5	"	banda +
				C4	"	banda +
345	8	M	dar	A3	A,C	banda ¿+?
				A5	"	banda ¿+?
				C1	"	banda no hay
348	12	M	dar	A5	A	banda ++
				A7	"	banda +++
359	11	M	dar	A3	A	banda +++
				A4	"	
				A5	"	banda ++++
363	4	M	dar	A1	A	banda ++++
				A7	"	banda ++++
				A8	"	banda ++++
365	13	F	dar	A3	A,C	banda +++
				A5	"	banda +
				C7	"	banda ++++
371	13	F	dar	A15	A	banda +
				A19	"	banda no hay
				C7	"	banda ¿+?
396	16	F	dar	A15	A,C	banda ++
				C33	"	banda ++
				C36	"	banda ++
398	13	F	dar	A14	A,C	banda no hay
				C14	"	banda +
				C15	"	banda no hay
403	11	F	dar	A3	C	banda +++
				C3	"	banda +++
				C6	"	banda +++
412	11	F	dar	A10	A	banda +++
				A11	"	banda no hay
				A14	"	banda no hay
415	8	F	dar	A1	A	banda +
				A2	"	banda +
				A7	"	banda +

DX= Diagnostico
 dar= Dolor abdominal recurrente
 A= Antro
 C= Cuerpo
 F= Femenino
 M= Masculino

Color de la banda de CYP
 Tenue (+)
 Medio (++)
 Intenso (+++)
 Muy intenso (++++)

TABLA II. CEPAS DE *Helicobacter pylori* AISLADAS DE ADULTOS CON ALGUNA ALTERACION GASTRICA

CEPA	EDAD	SEXO	Dx	CLONAS	SITIO	PRESENCIA DE BANDA CYP1A
7	73	M	U.D	C1 C4 C9	C " "	banda ¿+? banda ++ banda +
21	64	F	GASTRITIS	A3 A5 A13	A " "	banda ++ banda no hay banda no hay
36	50	M	U.D	A1 A5 A11	A " "	banda +++ banda +
44 V4	47	M	GASTRITIS	A3 C1 C6	A,C " "	banda ¿+? banda ¿+? banda ¿+?
60	48	F	U.D	A3 C4 C5	A,C " "	banda +++ banda ++ banda +++
63	65	M	U.D	C7 C9 C15	C " "	banda ++ banda no hay
69	40	M	U.D	A5 A6 A10	A " "	banda ++ banda ¿+? banda ++
71	52	M	GASTRITIS	A5 A7 A8	A " "	banda ¿+? banda no hay banda +
84	?	?	?	A6 C3 C4	A,C " "	banda no hay banda + banda ¿+?
87	?	?	?	A3 C5 C8	A,C " "	banda ¿+? banda ++ banda ++
91	20	M	GASTRITIS	A10 A14 A15	A " "	banda ++++ banda ++++ banda ++++
136	67	M	U.D	A5 A10 A11	A " "	banda ++++ banda ++++ banda +++
143	28	F	U.D	A2 C4 C8	A,C " "	banda ¿+? banda ++ banda ¿+?
149	70	F	U.D	C7 C10 C14	C " "	banda +++ banda + banda +++
167	27	M	U.D	C4 C6 C7	C " "	banda ++ banda ++++ banda ++++
173	49	M	GASTRITIS	A7 A8 A9	A " "	banda + banda ++ banda ++

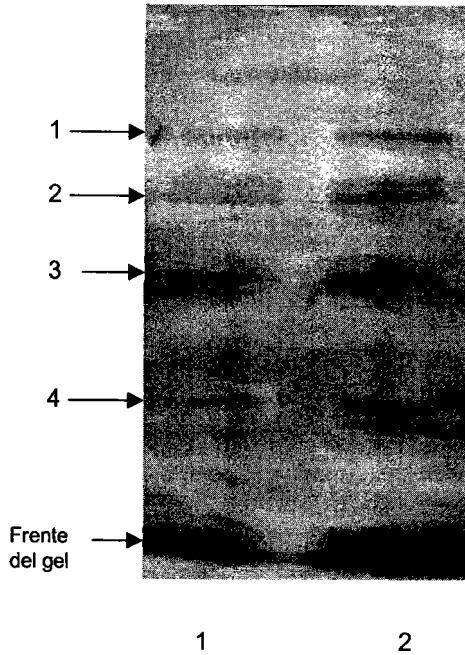
DX= Diagnostico
 UD= Úlcera duodenal
 A= Antro
 C= Cuerpo
 F= Femenino
 M= Masculino

Color de la banda de CYP
 Tenue (+)
 Medio (++)
 Intenso (+++)
 Muy intenso (++++)

7.2 Tinción de hemoproteínas de lisados de *Helicobacter pylori* en geles de poliacrilamida

Se utilizó el compuesto 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina-H₂O₂ (TMBZ) para detectar bajos niveles de actividad de peroxidasa de citocromo P450 asociada al grupo hemo, en lisados de *Helicobacter pylori* en geles de poliacrilamida-SDS. Los resultados de la identificación de hemoproteínas en los lisados de *H. pylori* cepas 18-183 (carril 1) y 60190 (carril 2) se muestran en la figura 9. Se observaron 4 bandas de proteína a lo largo del corrimiento electroforético para ambas cepas y se usaron 6 µg de proteína por carril. En la figura 10, se observan los resultados de la electroforesis en geles de poliacrilamida de los lisados de *H. pylori* (cepas 18-183 y 60190), en donde se corrieron dos geles en una misma cámara de electroforesis con las mismas muestras y cantidad de proteínas, con la finalidad de identificar el peso molecular de dichas hemoproteínas: El gel 1 se tiñó con Coomassie para ver proteínas totales e identificar el peso molecular aproximado de las proteínas totales en los lisados, en el carril 1 se observan los marcadores de peso molecular, carril 2 corresponde al control positivo de CYP1A (1 µg de proteína por carril), carriles 3 y 4 lisados de *H. pylori* cepas 18-183 y 60190 (4 µg de proteína por carril) respectivamente. El gel 2 se tiñó para identificar hemoproteínas en los lisados y ver si una de estas bandas de hemoproteínas corresponde al mismo peso molecular que el CYP control (1 µg de proteína por carril): carril 1 lisado *H. pylori* cepa 18-183, carril 2 corresponde al lisado de *H. pylori* de la cepa 60190 (4 µg de proteína por carril).

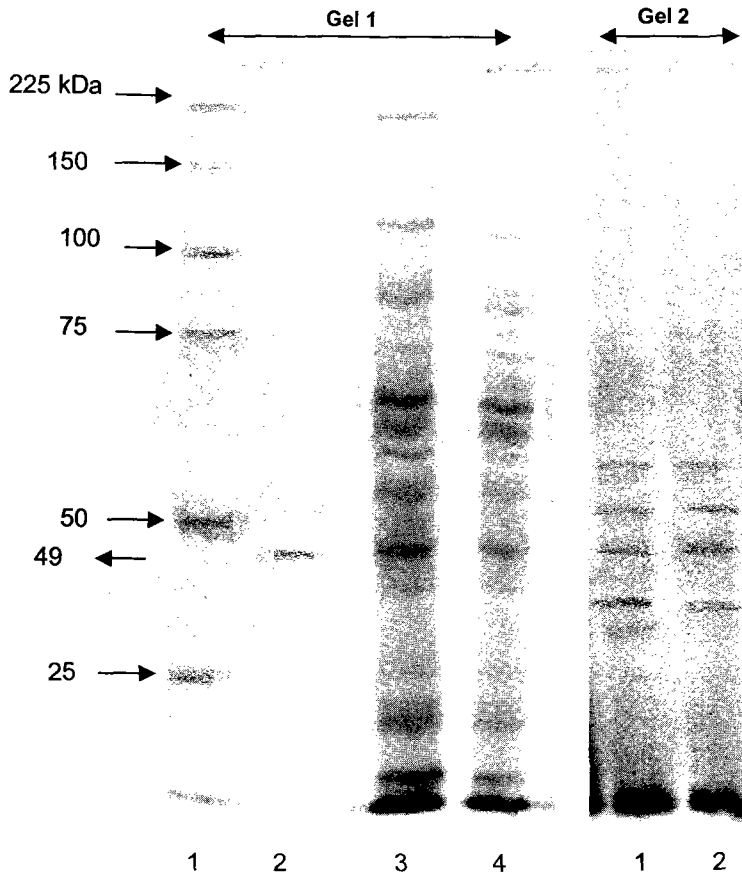
Fig. 9. TINCIÓN DE HEMOPROTEÍNAS DE LISADOS DE *Helicobacter pylori*



Carril 1 Lisado *Helicobacter pylori* cepa 18-183 y Carril 2 Lisado *Helicobacter pylori* cepa 60190. Se observaron 4 bandas de proteína teñidas de azul en ambas cepas.

Nota: Se utilizó el compuesto 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina- H_2O_2 (TMBZ) para la tinción de hemoproteínas en lisados de *H. pylori*. Se corrieron 6 μ g de proteína por carril.

Fig.10. ELECTROFORESIS DE LISADOS DE *Helicobacter pylori* PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES Y HEMOPROTEÍNAS



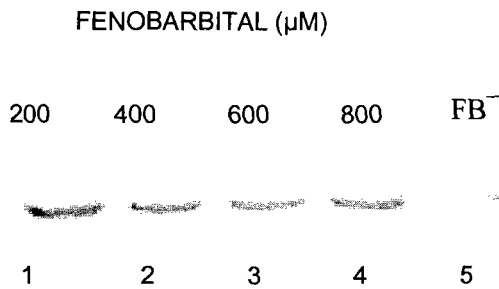
Gel 1 (teñido con coomassie para proteínas totales): carril 1 marcadores de peso molecular, carril 2 control positivo de CYP1A, carril 3 lisado *H. pylori* cepa 18-183 y carril 4 lisado *H. pylori* cepa 60190. Gel 2 (teñido para identificar hemoproteínas): carril 1 lisado *H. pylori* cepa 18-183, Carril 2 lisado de *H. pylori* cepa 60190

Nota: se corrieron 4ug de proteína por carril para los lisados de *H. pylori*, 1 ug por carril para marcadores de peso molecular y control de CYP1A..

7.3 Inducción de citocromo P450 en cultivos de *Helicobacter pylori*.

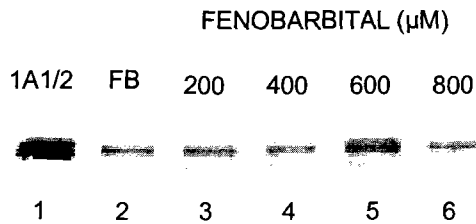
En la figura 11, se observan los resultados encontrados en los cultivos de *H. pylori* (cepa 18-183) crecidos en medio líquido (caldo Brucella) e inducido con fenobarbital. Se puede observar una inducción de la expresión de la proteína (semejante a CYP1A) con las diferentes concentraciones de fenobarbital. A pesar de que no hubo un efecto inductor dosis dependiente, se puede ver que a las diferentes dosis (200, 400, 600 y 800 μM) las bandas son más gruesa e intensa (carriles 1, 2, 3 y 4 respectivamente) en comparación con la banda del cultivo no inducido (carril 5). En la concentración de 200 μg por caja, se observa la mayor respuesta de inducción de la proteína (carril 1) en comparación con la banda del cultivo no inducido (carril 5). Para confirmar lo anterior, se crecieron cultivos de *H. pylori* (cepa 18-183) en medio sólido y se indujeron de igual manera con fenobarbital a las mismas concentraciones. En la figura 12, se observan las bandas de la proteína semejante CYP1A en los cultivos crecidos con las diferentes concentraciones de fenobarbital (carriles 3, 4, 5 y 6). No se encontró un efecto inductor dosis-dependiente, pero a la concentración de 600 μM se ve una banda más intensa y gruesa (carril 5) en comparación con el cultivo no inducido (sin fenobarbital) carril 2. A las dosis de 200, y 400 μM se muestran bandas semejantes a la banda del cultivo que no fue inducido (carril 2) y a 800 μM esta banda se ve disminuída. Esto confirma que la proteína identificada (semejante a CYP1A) en los lisados de *H. pylori* que fueron crecidos tanto en medio sólido como en medio líquido son susceptibles de inducción con fenobarbital.

Fig. 11. WESTERN BLOT PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CITOCROMO P450 1A DE *Helicobacter pylori* INDUCIDO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FENOBARBITAL EN MEDIO LÍQUIDO



H.pylori (cepa 18-183) crecido en medio líquido e inducido con diferentes concentraciones de fenobarbital; 1 (200 μM), 2 (400 μM), 3 (600 μM), 4 (800 μM), 5 *H.pylori* crecido sin fenobarbital (Testigo no inducido).
Nota: Se corrieron 4 μg de proteína por carril

Fig. 12. WESTERN BLOT PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CITOCROMO P450 1A DE *Helicobacter pylori* INDUCIDO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FENOBARBITAL EN MEDIO SÓLIDO



1 Testigo positivo citocromo P450 1A1/2, 2 *H.pylori* crecido en medio sólido sin fenobarbital FB (Testigo no inducido), *H.pylori* crecido en medio sólido e inducido con diferentes concentraciones de fenobarbital: 3 (200 μM), 4 (400 μM), 5 (600 μM), 6 (800 μM).

Nota: La cepa de *H. pylori* utilizada fue la 18-183 y se corrieron 4 μg de proteína por carril y para el control CYP1A 1 μg de proteína por carril

7.4. Determinación de actividad enzimática de diferentes familias de citocromo P450 en lisados de *Helicobacter pylori*.

Se determinó en los lisados de *H.pylori* (cepa 18-183) la actividad enzimática de CYP específica para las familias 1A1 (EROD), 1A2 (MROD), 2B1 (PROD), 2B2 (BROD) y 2E1 (tabla III). Los valores de actividad enzimática encontrados en los lisados de *H.pylori*, fueron menores cuando menos doscientos veces (ej. 0.01 pmol de resorufina/ minuto/ mg de proteína) a los valores encontrados en hígado de rata que fue utilizado como testigo positivo (CYP1A1: 9.31, CYP1A2: 7.35, CYP2B1: 3.08, CYP2B2: 2.1 y 2E1: 5.2); por lo que se puede decir que no se aprecia actividad enzimática para ninguna de las familias de estos citocromos

Tabla III. ACTIVIDAD DE CITOCROMO P450 Y NITROREDUCTASA EN LISADOS DE *Helicobacter pylori*

Actividad enzimática de citocromo P450 y de nitroreductasa						
MUESTRA	EROD CYP1A1	MROD CYP1A2	PROD CYP2B1	BROD CYP2B2	4-NITROFENOL CYP2E1	NITRORE- DUCTASA
<i>H. pylori</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 1.0
Hígado de rata	9.31	7.35	3.08	2.1	5.2	ND
<i>S. typhimurium</i>	ND	ND	ND	ND	ND	5.2

NOTA: La actividad enzimática de los CYP (EROD, MROD, PROD y BROD) se expresa como:

pmol de resorufina / mg de proteína/ minuto

La actividad de CYP2E1 se expresa en: nmol de 4-nitrocatecol / mg de proteína/ minuto

La actividad de nitroreductasa se expresa en: µg de ácido 4-aminobenzoico/ mg de proteína/ minuto

ND = no determinado

7.5. Determinación de actividad enzimática de nitroreductasa en lisados de *Helicobacter pylori*.

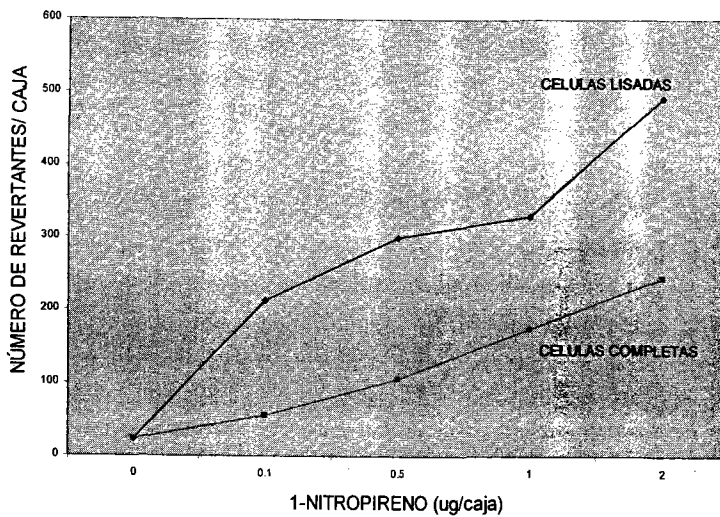
Con respecto a la actividad de nitroreductasa medida en los lisados de *H. pylori* (cepa 18-183). Los valores encontrados fueron menores de 1 µg del producto de la reacción (ácido 4-aminobemzoico) por minuto por mg de proteína, lo cual indica una mínima o nula actividad de nitroreductasa, en comparación con los lisados de *S. typhimurium* (5 µg de ácido 4-aminobemzoico /minuto/mg de proteína). Ver tabla III.

7.6. Activación de 1-nitropireno por lisados de *Helicobacter pylori*.

Otro de los objetivos de este trabajo fue buscar la capacidad de *H. pylori* para activar promutágenos por medio de nitroreductasas. Esto se realizó mediante la prueba de Ames, en donde se evaluó la capacidad de *H. pylori* (cepa 18-183) en lisados y células completas para activar 1-nitropireno a diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1 y 2 µg/caja). Se utilizó como sensor de mutagenicidad la cepa YG7132 de *S. typhimurium* deficiente en nitroreductasa. En la figura 13, se puede observar una respuesta dosis dependiente entre la concentración de 1-nitropireno (µg/caja) y el número de colonias revertantes por caja. Los lisados de *H. pylori* mostraron una mayor activación del 1-nitropireno aumentando más del doble el número de colonias (442), en comparación con células completas (207). En la tabla IV y figura 14 se observan los resultados encontrados, cuando se comparó el potencial para bioactivar 1-nitropireno entre lisados de *H. pylori* y lisados de *S. Typhimurium* (utilizado como testigo positivo). Los lisados *H. pylori* mostraron un efecto dosis-dependiente de la mutagenicidad (representada por el número de colonias revertantes por caja) con respecto a la concentración de 1-nitropireno; con una pendiente de 191, la cual significa el número de colonias mutadas por µg de 1-nitropireno (actividad mutagénica de 1-nitropireno). Este incremento fue más de 10 veces a la máxima concentración probada de 1-nitropireno (2 µg/caja) y la basal (0 µg/caja). Por otro lado, los lisados de *S. Typhimurium*

fueron más eficaces para bioactivar 1-nitropireno en comparación con lisados de *H. pylori*, aumentando más de 1000 veces la mutagenicidad (número de colonias revertantes/caja) en una respuesta dosis-dependiente (con una pendiente de 1018 colonias revertantes/caja),

Fig. 13. MUTAGENESIS DE 1-NITROPIRENO POR LA ACTIVACIÓN DE *Helicobacter pylori*



Lisados y células completas de *H. pylori* cepa 18-183
Nota: Se usaron 500 μ g de proteína de los lisados para cada concentración probada.

Tabla IV. Activación Mutagénica de 1-nitropireno por lisados de *H. pylori* y *S.typhimurium*

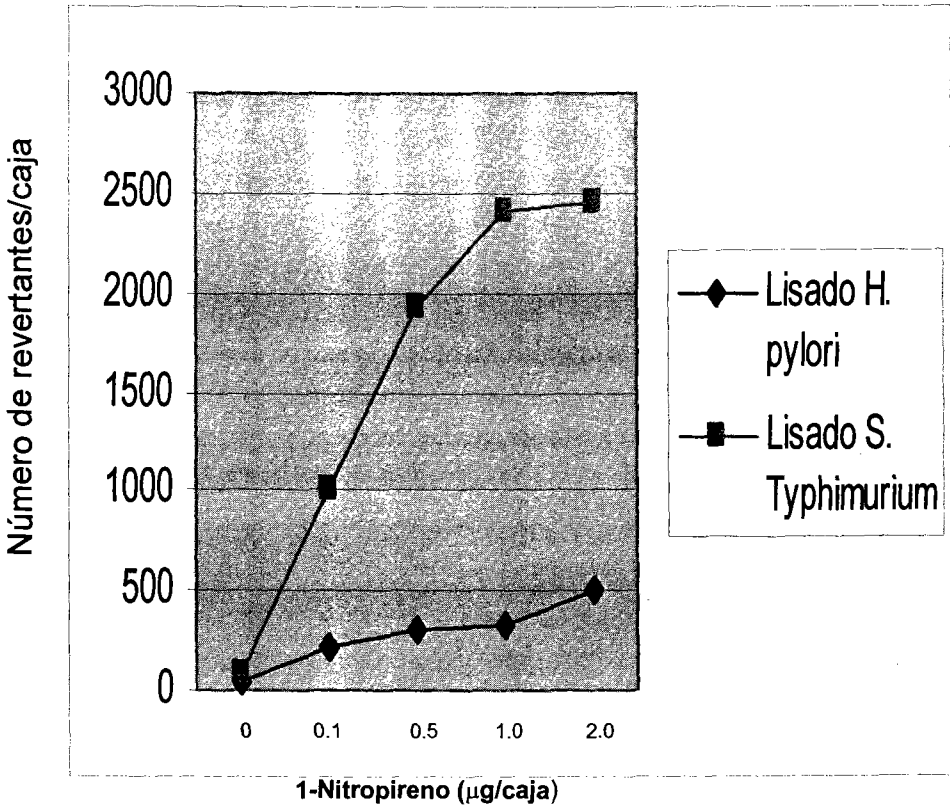
1-Nitropireno ($\mu\text{g}/\text{caja}$)	Lisados <i>H. pylori</i> (cepa 18-183) (500 $\mu\text{g}/\text{caja}$)	Lisados <i>S. Typhimurium</i> (cepa TA98) (500 $\mu\text{g}/\text{caja}$)
0	42.0	82.0
0.1	213.0	1008.0
0.5	300.0	1930
1.0	338.0	2415
2.0	493.0	2460
pendiente revertantes/ μg	191.0	1018.0

Cada valor representa la media de tres repeticiones.

La mutagenicidad esta representada por el número de colonias revertantes de *S.typhimurium*.

La pendiente representa la actividad mutagénica del compuesto 1-nitropireno.

Fig.14. MUTAGENESIS DE 1-NITROPIRENO POR LA ACTIVACIÓN DE LISADOS DE *H. pylori* Y LISADOS DE *S. typhimurium*



Se usaron lisados de *H. pylori* cepa 18-183 y lisados de *S. typhimurium* cepa TA98
Nota: Se utilizaron 500 µg de proteína para cada concentración de 1-nitropireno probada

8. DISCUSIÓN

El análisis por inmunoblot revela la expresión de una banda de proteína en los lisados de *H. pylori*, relacionada a la familia de citocromo P450 1A (CYP1A), ya que la posición de la banda corresponde a la movilidad electroforética específica para la subfamilia CYP1A2 (figuras 1 y 2). En primera instancia la proteína detectada se encontró en las cepas de colección 84-183 y 60190 de *H. pylori*, aisladas de dos pacientes con gastritis, uno de Texas y el otro de Inglaterra (Pérez-Pérez y cols 1987; Morgan y cols, 1987). Dicha banda, posteriormente fue confirmada en cepas de pacientes niños y adultos, diagnosticados con alguna alteración gástrica (Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Instituto Mexicano del Seguro Social) tabla II, III y figuras 7 a 11. Al parecer, la edad, diagnóstico y sexo de los pacientes o el sitio de aislado de las cepas no son determinantes para la expresión de dicha banda, debido a que la mayoría de las cepas de *H. pylori* probadas expresaron la banda.

Una de las características importantes de los CYP es que son hemoproteínas, por lo que para tratar de caracterizar la proteína semejante a citocromo CYP1A encontrada en los lisados de *H. pylori* de las cepas 18-183 y 60190, se utilizó una técnica específica para teñir proteínas con grupo "hemo" y determinar si se trataba de una hemoproteína como los CYP. Mediante el uso de la tinción con el compuesto 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina-H₂O₂ (TMBZ) usado para la detección de bajos niveles de actividad de peroxidasa de citocromo P450 asociada al grupo hemo, en geles de poliacrilamida-SDS, se pudieron detectar 4 bandas de proteína teñidas de azul en ambas cepas, que indican actividad de peroxidasa en los lisados de *H. pylori* (figura 9), pero solo una de estas bandas (tercera banda) se localiza a nivel del corrimiento electroforético del citocromo P450, con un peso molecular de aproximadamente 49 kDa (Figura 10), las otras bandas corresponden probablemente a otras hemoproteínas contenidas en los lisados (como citocromo "C"). El hecho de encontrar hemoproteínas en los lisados de *H. pylori*, y que una de estas proteínas corresponda al corrimiento electroforético del citocromo P450, estaría indicando que dicha proteína en primer lugar contiene grupo hemo y por lo tanto es una

hemoproteína y probablemente se trate de un citocromo P450 por sus características electroforéticas, a pesar de que no se pudo encontrar actividad enzimática de etoxiresorufina ni de metoxiresorufina asociadas a CYP1A1 y CYP1A2 respectivamente (tabla III). Adicionalmente otra evidencia que apoya la existencia de CYP en *H. pylori*: son los resultados encontrados en los experimentos de inducción de citocromos P450 con fenobarbital en cultivos de *H. pylori* (cepa 18-183). La proteína se indujo a una dosis de fenobarbital de 600 μ M en medio sólido y a partir de 200 μ M en medio líquido. El mecanismo de inducción de citocromos P450 por barbituratos en mamíferos así como en bacterias es semejante. En hígado de rata dos formas principales de citocromos P450 son inducidas coordinadamente por barbituratos: CYP 2B1 y CYP2B2 en un proceso que involucra un incremento en la tasa de síntesis de RNA_m y un aparente incremento en la tasa de transcripción inicial (González, 1989). En bacterias como *Bacillus megaterium* se han descrito tres citocromos P450 (P450_{BM-1}, P450_{BM-2} Y P450_{BM-3}) que son inducidos con barbituratos, especialmente con fenobarbital (Sen-Jian y Fulco, 1991).

Recientemente, se reportó la secuencia completa del genoma de *Campylobacter jejuni* (Parkill y cols, 2000) en donde se encontró la presencia de genes de CYP. Esto puede ser importante, ya que *C. Jejuni* y *H. pylori* están relacionados estrechamente (filogenéticamente) por el 16 S rRNA, por lo cual podemos suponer que *H. pylori* también pudiera poseer genes relacionados a CYP. Sin embargo, los datos obtenidos y el análisis de secuencias del genoma completo de *H. pylori* revelan la ausencia de dichos genes (Tomb y cols, 1997). Pero, en la actualidad se ha demostrado que aunque las cepas de *H.pylori* en apariencia son idénticas varían grandemente en su código genético, como lo prueban recientes investigaciones, en donde se determinó la secuencia genómica de dos cepas de *H.pylori* diferentes; ambas cepas mostraron tener un cromosoma pequeño de aproximadamente de 1.7 millones de nucleótidos, comprendidos en 1,550 genes individuales y una diferencia de aproximadamente 6% en el monto de sus genes y una variación significativa en la secuencia de nucleótidos (Blaser M, 2005)

Hasta el momento, las características encontradas en la proteína identificada en los lisados de *H. pylori* son las siguientes: reacciona con anticuerpos anti-CYP de rata,

presenta un perfil electroforético semejante a citocromo CYP1A, es una hemoproteína y se induce con fenobarbital, características que comparte con los citocromos P450. Sin embargo, los resultados aun no son suficientes para llegar a la conclusión de que esta proteína es un citocromo P450, por lo que es necesario hacer la purificación y la secuenciación de la misma.

Por otro lado, los compuestos nitroaromáticos son contaminantes medioambientales, producidos durante procesos de combustión incompleta. La nitroreducción es el camino más importante de toxicidad de nitroarenos y son catalizadas por enzimas llamadas nitroreductasas. Estas se clasifican en dos grupos: sensibles al oxígeno e insensibles al oxígeno; las primeras enzimas catalizan la reducción de un electrón del grupo nitro formándose radicales libres (Di y cols, 1984). Estas enzimas pueden mediar la reducción de compuestos nitroaromáticos solo en condiciones de anaerobiosis (Thornton-Manning y cols, 1991).

Las enzimas actuales, las nitroreductasa de bacterias entéricas, catalizan la reducción de dos electrones del grupo nitro para formar intermediarios nitroso para la reducción completa a compuestos amino (Bryant y Deluca, 1991). Algunos intermediarios hidroxilaminas son mutagénicos y carcinogénicos (Watanabe y cols, 1992). El papel de la nitroreductasa "clásica" codificada por el gen *nfnB* en *Salmonella typhimurium* en la activación mutagénica de varios compuestos nitroarenos ha sido descrito, pero también existe información con relación al potencial de nitroreducción de otros microorganismos relacionados con enfermedades humanas.

Dos genes llamados *rdxA* y *frxA* han sido implicados en la reducción del metronidazol en *H. pylori*, además, estas enzimas pueden convertir drogas antihelmínticas a productos como hidroxilaminas que son bactericidas y mutagénicas (Sisson y cols, 2002).

En este trabajo no se pudo demostrar la presencia de actividad de nitroreductasa en los lisados de *H. pylori*, utilizando como sustrato ácido 4-nitrobenzoico para ser reducido a 4-aminobenzoico, aunque la actividad se encontró en los lisados de *S. Typhimurium* cepa TA98 usada como testigo positivo.

Otro de los objetivos de este trabajo fue buscar la capacidad de *H.pylori* para activar promutágenos por medio de nitroreductasas. Esto se realizó mediante la prueba de Ames, en donde se evaluó la capacidad de *H. pylori* (cepa 18-183) en lisados y células completas para activar 1-nitropireno a diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1 y 2 µg/caja). Se utilizó como sensor de mutagenicidad la cepa YG7132 de *S. typhimurium* deficiente en nitroreductasa (Yamada y cols, 1997). Se encontró una respuesta dosis dependiente entre la concentración de 1-nitropireno (µg/caja) y la mutagénesis inducida (representada por el número de colonias revertantes por caja). Los lisados de *H. pylori* mostraron una mayor activación del 1-nitropireno en comparación con células completas.

Para comparar el potencial de nitroreductasa de *H. pylori* con otros microorganismos, se incluyó en los experimentos lisados de *S. typhimurium* cepa TA98 como testigo positivo (tabla IV y figura 14), en donde se observa que *S. typhimurium* es más eficiente para la activación de 1-nitropireno a derivados mutagénicos. Estos resultados pueden deberse a la presencia de diferentes nitroreductasas con diferentes especificidades de sustrato en estos dos microorganismos. Se han identificado dos nitroreductasas en *S. typhimurium* involucradas en el metabolismo reductivo de compuestos nitrosustituidos, la nitroreductasa Cnr que es homóloga a NfsB de *E. coli*. (Watanabe y cols, 1990; Zenno y cols, 1990a) y SraA que comparte una alta identidad en la secuencia de aminoácidos con NfsA de *E. coli* (Nokhbe y cols, 2002; Zenno y cols, 1996b). Por otro lado, se han identificado tres nitroreductasas en *H. pylori*: piruvato ferredoxin oxidoreductasa (POR), RdxA, una nitroreductasa NADPH oxígeno-insensible y FrxA otra nitroreductasa flavin NADPH oxígeno-insensible son ambas responsables de la nitrorreducción del fármaco nitazoxanida (Sisson y cols, 2002).

La posibilidad de liberar mutágenos a la mucosa gástrica por *H.pylori*, debido a la reducción de compuestos nitroaromáticos puede ser de importancia para la salud pública, debido que a que la infección con *H.pylori* es crónica y es un factor de riesgo para cáncer gástrico. Los resultados reportados en este trabajo muestran que nitroreductasas oxígeno insensible de *H.pylori* convierten 1-Nitropireno a metabolitos intermediarios genotóxicos con una respuesta dosis dependiente, pero

en menor grado que las nitroreductasas homólogas de *S. Typhumurium*. Un punto importante en este aspecto, es que se tienen que probar otros compuestos nitroaromáticos medioambientales para caracterizar el riesgo potencial de la nitroreducción por *H.pylori* y su posible relación con cáncer gástrico.

En la actualidad la infección de *Helicobacter pylori* en países desarrollados tiene una tendencia hacia la baja, lo cual esta estrechamente relacionado con el grado de sanidad y el uso correcto de los antibióticos; bloqueando de esta manera la transmisión de la bacteria. La baja en la tasa de infección con *H.pylori*, también esta relacionada con el descenso de úlceras pépticas y cáncer de estómago. Pero por otro lado, las enfermedades del esófago como: reflujo y cáncer de esófago han incrementado dramáticamente con la desaparición de dicha infección. La posibilidad de que esta bacteria pueda proteger a la gente contra enfermedades del esófago ha tenido implicaciones significativas. Por lo que se tiene que reconsiderar el papel de la bacteria en la salud pública.

9. CONCLUSIONES

- características electroforéticas semejantes al citocromo P450 de la familia CYP1A. Se identificó una proteína en los lisados de *Helicobacter pylori*, con 1A (específicamente con la subfamilia CYP1A2).
- La proteína semejante a CYP 1A se pudo identificar en lisados de las cepas de colección 84-183 y 60190, así como en lisados de cepas aisladas de pacientes con alguna alteración gástrica, del Instituto Mexicano del Seguro Social.
- Se encontró que los lisados poseen una hemoproteína con características electroforéticas semejantes a CYP1A y con un peso molecular aproximado de 49 kDa.
- Con la metodología utilizada en este trabajo para medir actividad enzimática de citocromo P450 (1A1, 1A2, 2B1, 2B2, 2E1), no se encontró dicha actividad en los lisados de *Helicobacter pylori*.
- Se encontró que la proteína identificada (semejante a CYP1A) en los lisados de *H. pylori* (cepas de colección 18-183 y 60190) que fueron crecidos tanto en medio sólido como en medio líquido son susceptibles de inducción con fenobarbital.
- No se encontró actividad de nitroreductasa en lisados de *Helicobacter pylori*, utilizando como sustrato al 4-nitrobenzoico.

- Mediante la prueba de AMES, se determinó que lisados de *Helicobacter pylori* tienen la capacidad para bioactivar promutágenos como 1-Nitropireno a compuestos mutagénicos.
- Las cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes con alteraciones que preceden al cáncer gástrico, poseen el potencial enzimático necesario para la bioactivación de compuestos mutagénicos y carcinógenos ambientales en productos genotóxicos.

10. REFERENCIAS

- Akopyans N**, Clifton SW, Kersolyte D, Crabtree JE, Youree BE, Reece AC, Bukanov NO, Drazek ES, Bruce AR y Berg DE. Analyses of the cag pathogenecity island of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiology* 1998; 28:37-53
- Ando T**, Kusugami K, Ohsuga M, Ina K, Ichiyama S, Nada T y Ohta M. Mucosal macrophage inflammatory protein-1 alpha levels are increased in *Helicobacter pylori* infection. *J clin Gastroentero* 1998; 27 (suppl 1): S144-S149.
- Andrews PJ**, Quillian MA, McCarry BE, Bryant DW y McCalla DR. Identification of the DNA adduct formed by metabolisms of 1,8-dinitropyrene in *Salmonella typhimurium*. *Carcinogenesis* 1986; 7: 105-110.
- Appelmerk BJ**, Negrini R, Moran AP y Kuipers EJ. Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* and the host. *Trends in Microbiology* 1997; 5 (2): 70-73.
- Atherton JC**, Peek RM, Tham KT, Cover TL y Blaser MJ. Clinical and pathogenic importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1997; 112:92
- Badawi A**, Stern SJ, Lang NP y Kadlubar FF. Cytochrome P450 and acetyltransferase expression as biomarker of carcinogen-DNA adduct levels and human cancer susceptibility. *Prog Clin.Biol Res* 1996; 395: 109-140
- Bertenyi KA** y Lambert IB. The mutational specificity of furazolidone in *lacI* gene of *Escherichia coli*. *Mutat Res* 1996;357:199-208
- Blaser MJ**, Pérez-Peréz GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM y Chyou PHI. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995; 55: 211-2115.
- Blaser M**. An Endangered Species in the Stomach. *Scientific American* 2005; Febrero: 24-31.
- Bode G**, Malfertheiner P, Nilius M, Lehnhat G y Ditschuneit H. Ultrastructural localisation of urease in outer membrane and periplasm of *Campylobacter pyliti*. *J Clin Pathol* 1989; 42 (7): 778-9
- Boren T**, Falk P, Roth K A, Larson G y Normark L. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* 1993; 262: 1892-1895
- Bryant DW**, McCalla DR, Leeksma M y Laneuville P. Type I nitroreductase of *Escherichia coli*. *J Microbio* 1981; 27: 81-86.
- Brynt C y Deluca M**. Purification and characterization of an oxygen insensitive NADP(H) nitroreductase from *Enterobacter cloacae*. *Journal of Biological Chemistry* 1991;266: 4119-41125.
- Brynt C y McElroy**. Nitroreductases, p291- 304. En F Muller (ed), *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes*, vo, II. CRC Press, Boca Raton. 1991.
- Buke MD**, Thompson S, Elcombe CR, Halpert J, Haparanta T y Mayer RT. Ethoxy-, pentoxy-, benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P450. *Biochem Pharmacol* 1985; 34: 3337-5.

- Cahill RJ**, Xia H, Kilgallen C, Beatties S, Hamilton H y O'Morain C. Effect of Eradication of *Helicobacter pylori* infection on gastric epithelial cell proliferation. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 1627-1631.
- Canlidwell MB**, Guerry P, Lee EC, Burans JP y Walker RL. Reversible expression of flagellar in *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 1985; 50:941-943.
- Carroll CC**, Warnakulasuriyarachchi D, Nokhbeh MR y Lambert IB. Salmonella typhimurium mutagenicity tester strains that overexpress oxygen-insensitive nitroreductase *nfsA* and *nfsB*. *Mutat Res* 2002; 501: 79-98.
- Censini S**, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodouski M, Rappuoli R y Covacci A. CagA pathogenicity island *Helicobacter pylori* encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad* 1996; 93: 14648-14653.
- Ching CK**, Wong BC, Kwok E, Ong L, Covacci A y Lam SK. Prevalence of CagA-bearing *Helicobacter pylori* strains detected by the anti CagA assay in patients with peptic ulcer disease and in controls.. *Am.J Gastroenterol* 1996; 911 949.
- Correa P**. Is gastric carcinoma an infectious disease?. *N Engl J Med* 1991; 325: 1170- 71.
- Correa P**. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process-first American Cancer Society Award lecture on Cancer Epideniology and Prevention. *Cancer Res* 1992; 52:6735-40.
- Correa P** y Miller MJS. Carcinogenesis, apoptosis and cell proliferation. *Br Med Bull* 1998; 54: 151-162.
- Crabtree JE**, Farmery SM, Lindley IJD, Figura N y Peichl P, Tompkins DS. CagA/cytotoxic strains of *Helicobacter pylori* interleukina-8 in gastric epithelial cell lines. *J Clin Phathol* 1994; 47:954-50.
- Cramer J W**, Miller y Miller E C. Anew metabolic reaction observed in the rat the carcinogen 2-AAF. *J Biol Chem* 1960; 235: 885-888.
- DeMarini DM**, Shelton ML y Bell DM. Mutation spectral of chemical fractions of a complex mixture: role of nitroarenes in the mutagenic specificity of municipal waste incinerator emissions. *Mutat Res* 1996; 349: 1-20.
- Di M D**, Ross D, Bellomo G, Eklow L, y Orrenius S. Alterations in intracellular thiol homeostasis during the metabolism of menadione by isolated rat hepatocytes. *Arch. Biochem Biophys* 1984; 235: 334-342.
- Djuric Z**, Potter DW, Heflich RH y Beland FA. Aerobic and anaerobic reduction of nitrated pyrenes in vitro. *Chem Biol Interact* 1986; 59:309-324.
- Eaton KA**, Morgan DK y Krakowka S. *Campylobacter pylori* virulence factors in Gnotobiotic Piglet. *Infect Immu* 1989; 57(4):1119-1125.
- Eurogast**. Study Group. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Lancet* 1993; 341: 1356-62.
- Faller G**, Steininger H, Kranzlein J, Maul H, Kerkau T, Hensen J, Halhn EG y Kirchner T. Antigastric autoantibodies in *Helicobacter pylori* infection: implications of histological and clinical parameters of gastritis. *Gut* 1997; 41: 619-623.
- Festen HPM**. Profound gastric acid inhibition: advantages and potential hazards. *Res Clin For* 1988; 10: 71-77.

- Fifer EK**, Heflich RH, Djuric Z, Howard PC y Belen FA. Synthesis and mutagenicity 1-nitro-6-nitrosopyrene and 1-nitro-8-nitrosopyrene, potential intermediates in the metabolic activation of 1,6- and 1,8-dinitropyrene. *Carcinogenesis* 1986; 7: 65-70
- Forman D**, Newell DG y Fullerton F, Association between infection whit *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer. *BMJ* 1991; 302: 1302-1305.
- Fox JG**, Correa P, Taylor NS, Thompson N, Fontham E, Janner F, Sobhan M, Ruiz B y Hunter FM. High prevalence and persistence of cytotoxin-positive *Helicobacter pylori* strains in a population with high prevalence of atrophic gastritis. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 1554- 60
- Garfinkel D**. Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal funtions. *Arch Biochem Biophys* 1958; 77:493- 509
- Geis G**, Leying H, Suerbaum S, Mai U y Opferkuch W. Ultrastructure and chemical analysis of *Campylobacter pylori* flagella. *J Clin Microbio* 1989 ; 27(3): 436-441.
- Genta RM**. Review article. Gastric atrophic and atrophic gastritis nebulous concepts in search of a definition. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12 (suppl):17-23.
- González FJ**. The Molecular Biology of Citochrome P45_s. *Pharmacological Reviews* 1989; 40 (4): 243-288.
- Guengerich FP** y Shimada T. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P450 enzymes. *Chem. Res. Toxicol* 1991; 4: 391-407.
- Guengerich FP**. Human cytochrome P450 enzymes. *Life Sci* 1992.; 50: 1471-1478.
- Hagiwara Y**, Watanabe M, Oda Y, Sofuni T, Nohmi T. Specificity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity. *Mutat Res* 1993; 291: 171-180.
- Hamlet A**, Thoreson AC, Nilsson O, Suennerholm A y Olbe L. Duodenal *Helicobacter pylori*: Infection differs in *cagA* genotype between asymptomatic subjects and patients with duodenal ulcers. *Gastroenterology* 1999;116:259-268.
- Harris PR**, Mobley HL, Perez-Perez GI, Blaser MJ y Smith PD. *Helicobacter pylori* urease is apotent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflamatory cytokine production. *Gastroenterol* 1996; 111: 419-425.
- Harvard T J**, Sarsfield P, Wotherspoon A C, Steer H W. Increased gastric epithelial cell proliferation in *Helicobacter pylori*- associated follicular gastritis. *J. Clin. Pathol* 1996; 49: 68-71.
- Hazell SL**, Brady L and Hennessy W. *Campylobacter pylori* and gastritis: association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. *J Infect Dis* . 1986; 153:658-663.
- Hazell SL** y Lee A. *Campylobacter pyloridis* urease , hydrogen ion black diffusion, and gastric ulcers. *Lancet* 1986;2 (84997): 15.17
- Hazell SL**, Urease and catalase as virulence factors of *Helicobacter pylori*. En: *Helicobacter pylori* 1990; Menge H, Gregor M, Tytgat GNJ, Marshall BJ, McNulty CAM, eds. Springer-Verlag, Berlin, 1991; 3.

- Hazell SL**, Evans DJ y Graham DY. Helicobacter pylori catalase. J Gen Microbiol 1991; 137: 57
- Honeycutt M E**, Jarvis A S y McFarland V A. Cytotoxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its metabolites. Ecotoxicol Environ Saf 1996; 35: 282-287
- Hu LT**, Foxall PA, Rusell R y Mobley HL. Purification and recombinant Helicobacter pylori urease apoenzyme encoded by ureA and ureB. Infect Immun 1992; 60: 2657-66.
- Huang JJ** y Kimura T. Studies on adrenal steroid hydroxylase. Oxidation-reduction properties of adrenal iron-sulphur proteins. Biochemistry 1973 ;12: 406-409.
- Hursting SD** y Kari KW. The anti-carcinogenic effects of dietary restriction: mechanisms and future direction. Mutat Res 1999; 443:235-249.
- Ihamaki T**, Saukkonen M y Siurala M. Long-term observation of subjects with normal mucosa and with superficial gastritis: result of 23-27 years follow up examination. Scand J Gastroentero 1978; 13:771-775.
- Jones DM** y Curry A. The ultrastructure of Campylobacter pylori. En: Campylobacter pylori and gastroduodenal diseases. Rathbone BJ, Heatley RV, eds. Blackwell Scientific, Oxford, 1989:48.
- Jones NL**, Shannon PT, Cutz E, Yeger H y Sherman PM. Increase in proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells early in the natural history of Helicobacter pylori infection. Am J Pathol 1997; 151: 1695-1703.
- Jorgensen AM**, Tend AM, Hazell LS y Mendez LG. Potential involvement of several nitroreductases in metronidazole resistance in Helicobacter pylori. Archv. Biochem Biophys 2001; 392 (2): 180-191.
- Kochlyama T**. Clinical study of Campylobacter pylori in stomach disease. Gastroenterol Endosc 1989; 31: 3-13.
- Koop DR**. Hydroxylation of p-nitrophenol by rabbit ethanol-inducible cytochrome P450 isozyme. Mol Pharmacol 1986;29:399
- Kuipers EJ**, Uytendaele AM, Pena AS, Rosedal R, Pals G, Nelis GF, Festen HP and Meuwissen SG. Long-term effect of Helicobacter pylori gastritis. Lancet 1995; 345:1525-1528.
- Kuipers EJ**. Relationship between Helicobacter pylori, atrophic gastritis and gastric cancer. Aliment Pharmacol Ther 1998; 12 (suppl.1): 25-36.
- Labigne A**, Cussac V y Courcoux P. Shuttle cloning and nucleotide sequences of Helicobacter pylori genes responsible for urease activity. J Bacteriol 1991; 173:1920-1931
- Laemli UK**. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227:680-685.
- Liochev S I**, Hausladen A y Fridovich I. Nitroreductase A is regulated as a member of the soxRS regulon of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A 1999; 96: 3537-3539.
- López-Brea**. 1995. *Helicobacter pylori*. Microbiología, Clínica y tratamiento. 1ª Ed. Editorial Mosby/Doyma, p 266.
- Lowry OH**, Rosebrounht NJ, Farr AL y Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J chem 1951; 193:165-275.

- Lynch DAF**, Maptone NP y Clarke ATM. Cell proliferation in *Helicobacter pylori* associated gastritis and the effect of eradication therapy. *Gut* 1995;36: 346-350.
- Maron DM** y Ames BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 1983; 113: 173- 215.
- Marshall B**. Virulence and pathogenicity of *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol Hepatol* 1991; 6: 121-24
- Martínez-Cayueta M**. Toxicidad de Xenobióticos mediada por Radicales Libres de Oxígeno. *Ars Pharmaceutica* 1998; 39 (1): 5-18
- Matsumoto S**, Washizuka Y, Matsumoto Y, Tawara S, Ikeda F, Yakota Y, y Karita M. Induction of ulceration and severe gastritis in Mongolian gerbil by *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol* 1997;46: 391-397
- McCalla DR**. Mutagenicity of nitrofurán derivative. A review *Environ Mutagen* 1983; 5: 745-765.
- McColl KEL** y El-Omar E. *Helicobacter pylori* and of gastric function associated with duodenal ulcer disease and gastric cancer. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31 (suppl 215): 32.
- McGowan CC**, Cover TL y Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastric acid. Biological and therapeutic implicatios. *Gastroenterology* 1996; 110:926-38.
- Mooney C**, Keenan J, Munster D y cols. Neutrophil activation by *Helicobacter pylori*?. *Gut* 1991; 32:853-7.
- Morgan RD**, Freedman R, Depew EC y Kraft GW. Growth of *Campylobacter pulori* in Liquid Media. *Clin Microbiol* 1997; 25(11): 2123-2125.
- Moss SF**, Calam J, Agarwal B, Wang S y Holt PG. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut* 1998; 38: 498-501.
- Moss SF**, Calam J, Agarwal B, Wang S y Holt PR. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut* 1996; 38: 498-501
- Moss SF**, Legon S, Bishop AE y Calam J. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric somatostatin in duodenal ulcer disease. *Lancet* 1992; 340:930.
- Mullin CA**, Rashid KA y Mumma RO. Mutagenic potency of some conjugate nitroaromatic compound and its relationship to structure. *Mutat Res* 1987; 188: 267-274.
- Narhi LO** y Fulco AJ. Characterization of a catalitically self-sufficient 119000-Dalton Cytochrome P-450 monooxygenase induced by Barbiturate 30 in *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem* 1986;261: 7160-7169.
- Navinskas H**, Koder RL, Anusevicius I, Sarlauskas J, Miller A and Cenas N. Two-electron reduction of nitroaromatic compounds by *Enterobacter cloacae* NAD(P)H nitroreductase: Description of quantitative structure-activity relationships. *Acta Biochimica Polonica* 2000; 47 (4):941-949
- Nebert DW**. "Proposed role of drug-metabolizing enzymes: Regulation of steady state leves of the ligands that effect growth, homeostasis, diferentiation and neuroendocrine functions". *Mol. Edocrinol* 1991; 5: 1203- 1314.
- Negrini R**, Lisato L, Zanella I, Cavazzini L, Gullini S and Villanacci V. *Helicobacter pylori* infection induces antibodies cross-reacting with human gastric mucosa. *Gastroenterology* 1991; 101: 437-445.
- Negrini R**, Savio A, Poesi C, Appelmek BJ, Buffoll F, Parerline A, Cesari P, Graffeo M, Vaira D y Franzì G. Antigenic mimicry between *Helicobacter pylori*

and gastric mucosa in the pathogenesis of body gastritis. *Gastroenterol* 1996; 111:655-665.

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh, y cols. P-450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*;1996; 6: 1-42.

Ni YC, Heflich RH, Kadlubar FF y Fu PP. Mutagenicity of nitrofurans in *Salmonella typhimurium* TA98, TA98NR and TA 98/1,8-DNP6. *Mutat Res* 1987; 192: 15-22.

Nokhbe MR, Boroumandi S, Pokorny N, Koziarz P, Paterson ES y Lambert IB. Identification and characterization of SnrA, an inducible oxygen-sensitive nitroreductase in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* 1535. *Mutat Res* 2002; 508: 59- 70.

Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Pérez-pérez GI y Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma Japanese Americans in Hawaii. *N Engl Med* 1991; 325: 1132-1136

O´ Morain C, Buckley M, Coche JC, Le cancer gastrique:une conséquence á long terme de i´infeccion á *Helicobacter pylori* . *Gastroenterol Clin Biol* 1994; 18: 187-9

Orna VM, Mason RP. Corelation of kinetic parameters of nitroreductase enzymes whith redox propertis of nitroaromatic compounds. *J Biol Chem.* 1989; 264: 12379-12384.

Parkil J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, Chillingworth T, Davies RM, Feltwell T, Holroyd S y cols. The genome sequence of the food.borne pathogen *Campylobacter jejune* reveals hypervariable sequence. *Nature* 2000; 403: 665-668.

Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP,Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N y cols. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric adenocarcinoma. *N Engl Med* 1991; 325: 1127-1131

Pérez-Pérez GI y Blaser M Conservation and Diversity of *Campylobacter pyloridis*. *Infection and Immunity* 1987;55 (5): 1256-1263.

Peterson FJ, Mason RP, Hovsepian J y Holtzman JL. Oxygen-sensitive and oxigen-insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat microsomes. *J.Biol Chem* 1979; 254: 4009-4014.

Pitts JN, Cauwenberghe KAV, Grosjean D, Scmid JP, Fitz DR, Belser WL, Knudson GB y Hynds PM. Atmosphetic reaction of polycyclic aromatic hydrocarbons: formatio of mutagenic nitro derivatives. *Science* 1978; 202: 515-519.

Pounder RE y Nig D. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; 9 (suppl 2); 33: 1094-101.

Rodríguez FG, Cancino BL, Prieto GE y Espinosa AJ. Tinidazol: una droga antimicrobiana con actividad genotóxica. *Rev Cubana Invest Biomed* 2001; 20; 54-58.

Rosenkranz HS y Mermelstein M. Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes: all nitro-containing chemicals were not created equal. 1983; 101: 217-267

- Sen- Jian H** y Fulco J A. A barbiturate-regulated protein binding to a common sequence in the cytochrome P450 genes of rodents and bacteria. *J Biological Chemistry* 1991; 266 (12): 7864- 7869.
- Shimoyama TSM**, Everett M, Dixon F, Axon ATR y Crabtree JE. Chemokine mRNA expression in gastric mucosa is associated with *Helicobacter pylori* cagA positivity and severity of gastritis. *J Clin Pathol* 1998; 51:765-770.
- Sisson G**, Goodwing A, Hughes NJ, Mukhopadhyay AK, Berg DE y Hoffman PS. Enzymes associated with reductive activation and action of nitazoxanide nitrofurans and metronidazole in *Helicobacter pylori*. *Agents Chemother* 2002; 46: 2116-2123.
- Slater E**, Owen RJ, Williams M y Poounder RE. Conservation of the caA pathogenicity island of *Helicobacter pylori*: Association with vacuolating cytotoxin allele and IS605 diversity. *Gastroenterology* 1999; 117:1308-1315.
- Smith MA** y Edwards DI. Oxygen scavenging, NADH oxidase and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39:347-352.
- Smoot DT**, Mobley HTL, Chippendale GR, Lewinson JF y Resau JH. *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. 1990. *Infect Immun*; 58: 1992-4.
- Stockbrugger RW**. Bacterial overgrowth as a consequence of reduced gastric acidity. *Scand J Gastroenterol* 1985; 20: 7-16.
- Suerbaum S** y Wadstrom T. Bacterial pathogenic factors.. *Current Opinion in Gastroenterology* 1995; 11 (15): 11-15.
- Suerbaum S**, Josenhans C y Labigne A. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustela* flaB flagellin genes and construction of H. .*pylori* flaA- AND flaB-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J Bacteriol* 1997; 175:3278-3288.
- Thomas EP**, Ryan D y Levin W. An Unmoved Staining procedure for the Detection of the Peroxidase Activity of Cytochrome P-450 on Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochem* 1976; 75:168-176.
- Thornton- Manning**, J R, Smith B A, Beland F A y Hefrich R H. S9-mediated metabolism of 1-nitropyrene to a mutagen in Chinese hamster ovary cell by ring-oxidation under aerobic conditions and by nitroreduction under anaerobic condition. *Carcinogenesis* 1991; 12: 2317-2323.
- Tomb J F**, White O, Kerlavage A R, Clayton RA, Sutton G G, Fleischman R D, Ketchum K A, Klenk H P, Dougherty BA y cols. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; 388: 539-547.
- Tokiwa H** y Ohnishi Y. Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment. *Crit Rev Toxicol* 1986: 17: 23-60
- Tomb JF**, White O, Kerlavage AR y cols. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; 388:539-547.
- Tomb JF**, White O, Kerlavage AR, y cols. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997; 388: 539-47.
- Torres J**, Leal-Herrera Y, Pérez-Pérez G, Gomez A, Camorlinga-Ponce M, Cedilla-Rivera R, Tapia-Conyer R y Muñoz O. A community-based

seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in México. *J Infect Dis* 1998; 178:1089.

Towbi HT y Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4350-4354.

Tsuji M, Kawano S, Tsuji, Fusamoto H, Kamada T y Soto N. Mechanisms of gastric mucosal damage induced by ammonia. Impairment of energy metabolism due to ammonia. *Gastroenterology* 1992; 102:1881-8.

Tsuji M, Kawano S, Tsuji S y cols. Ammonia a possible promoter in *Helicobacter pylori* related gastric carcinogenesis. *Cancer Letters* 1992; 65:15-18

Tsuji M, Kawano S, Tsuji S y cols. Cell kinetics of mucosal atrophy in rat stomach induced by long-term administration of ammonia. *Gastroenterology* 1993, 104:7796-801.

Turbett GR, Hoj PB, Horne R, y Mee BJ. Purification and characterization of the urease enzymes of *H. pylori* from humans and animals. *Infect Immun* 1992; 60: 5259-66

Valle J, Kekki M, Sipponen P, Ihamaki T y Siurala M. Long term course and consequences of *Helicobacter pylori* gastritis. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31:31-550

Van Dorn LJ, Figaredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneegerger P, Boer W y Quint W. Clinical relevance of the *cagA*, *VacA* and *IceA* status of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1998; 115:58-66.

Vroomen LH, Berghmans MC, Groten JP, Koeman VAM y Bladeren PJ. Reversible interaction of reactive intermediate derived from furazolidone with glutathion y protein. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 95:53-60.

Wagner S, Beil W, Westermann J, Logan PHR, Block CT, Trautwein C, Bleck J y Manns M. Regulation of Gastric Epithelial Cell Growth by *Helicobacter pylori*: Evidence for a Major Role of Apoptosis. *Gastroenterol* 1997; 113:1836-1847.

Watanabe M, Ishidate M y Nohmi T. Nucleotide sequence of *Salmonella typhimurium* nitroreductase gene. *Nucl Acids Res* 1990; 18: 1059.

Watanabe M, Ishidate M, Nohmi T. Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of *Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated O-acetyltransferase. *Mut Res* 1990; 234: 337-348.

Watanabe M, Sofuni T y Nohmi T. Involvement of Cys69 residue in the catalytic mechanism of N-hydroxyaryllamine O-acetyltransferase of *Salmonella typhimurium* and higher organisms. *J Biol Chem* 1992; 267: 8429-8436.

Watanabe M, Nishino T, Takio K, Sofuni T y Nohmi T. Purification and characterization of wild-type and mutant classical nitroreductase of *Salmonella typhimurium*. L33R mutation greatly diminishes binding of FMN to the nitroreductase of *S. Typhimurium*. *J Biol Chem*.1998; 273:23922-23928.

Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S y Nakao M. *Helicobacter pylori* induces gastric cancer in Mongolian Gerbils. *Gastroenterology* 1998; 115: 642-64.

Whitenway J, Koziarz O, Veall J, Sandhu N, Kumar P, Hoecher B y Lamber IB. Oxygen-insensitive nitroreductase: analysis of roles of *nfsA* and *nfsB* in

development of resistance to 5-nitrofurans derivatives in *Escherichia coli*. 1998;180: 5529-5539.

Wirth HP, Yan M, Peek RM y Tham KT. *Helicobacter pylori* Lewis expression is related to the host Lewis phenotype. *Gastroenterology* 1997; 113:1091-98

Woodwin A, Kersulyte D, Sisson G, Voldhuyzen van Zanten SOJ, Berg DE y Hoffman PS. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutation in a gene (*rdxA*) that encodes an oxygen-insensitive NADH nitrorreductase 1998; 28: 383-393.

Wrighton SA y Stenens JC. The human hepatic cytochromes P-450 involved in drug metabolism. *Crit. Rev. Toxicol* 1992; 22: 1-21.

Yamada M, Espinosa-Aguirre JJ, Watanabe M, Matsui K, Sofoni T y Nohmi T. Targeted disruption of the gene encoding the classical nitroreductase enzyme in *Salmonella typhimurium* Ames test strains TA1535 and TA1538. *Mutat Res* 1997; 375: 9-17.

Yong JJ, Mukhopadhyay AK, Dailidienė D, Wang Y, Velpatifño B, Gilman HR, Parkinson JA, Balakrish NG. Sequential inactivation of *rdxA* (HP0954) and (HP0642) nitroreductase genes causes moderate and high-level metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Bacterio* 2001; 182 (18): 5082-5090.

Zachariah PK y Juchau MR. The role of gut flora in reduction of aromatic nitro-groups 1974; 2:74-78

Zenno S, Koike H, Tanokura M y Saigo K. Gene cloning, purification of NfsB, a minor oxygen-insensitive nitroreductase from *Escherichia coli*, similar in biochemical properties to Frase I, the major flavin reductase in *Vibrio fischeri*. *J. Biochem* 1996a; 120:736-744.

Biochemical characterization of NfsA, the *Escherichia coli* major nitroreductase exhibiting a high amino acid sequence homology to Frp, a *Vibrio harvey* flavin oxidoreductase. *J. Bacteriol* 1996b; 178: 4508-4514.

Zenno S, Koike H, Kumar AN, Jayaraman R, Tanokura M y Saigo K.