



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA
CONTRA *Helicobacter pylori* DE NUEVOS DERIVADOS DEL
ÁCIDO CARBÁMICO Y EN COMBINACIÓN CON
NITAZOXAMIDA, AMOXICILINA Y METRONIDAZOL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

XOCHITL RIVAS ROSALES

ASESORES: DR. ANDRÉS ROMERO ROJAS
M.en F.C. Ma. EUGENIA R. POSADA GALARZA
DR. ENRIQUE R. ANGELES ANGUIANO

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO.

2005

m. 344948



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

UNAM
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

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

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

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

_____ Evaluación in vitro de la actividad inhibitoria contra
_____ Helicobacter pylori de nuevos derivados del ácido
_____ carbámico y en combinación con Nitazoxamida, Amoxicilina y Metronidazol.
que presenta la pasante: Xochitl Rivas Rosales
con número de cuenta: 09853825-8 para obtener el título de :
_____ Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Abril de 2005

PRESIDENTE	<u>MVZ. Gerardo Cruz Jiménez</u>
VOCAL	<u>Dr. Andres Romero Rojas</u>
SECRETARIO	<u>MFC. Cecilia Hernández Barba</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>MFC. Beatriz de Jesús Maya Monroy</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Dra. Susana E. Mendoza Elvira</u>



i. AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Gracias a Dios que me permitió seguir estando con vida y con mis seres queridos. Soy tan feliz por haber concluido con mi Titulación Profesional que es uno de tantos sueños que tengo en la vida.

A MIS PADRES

Son mi Fortaleza, Tenacidad con su ejemplo y su perseverancia ustedes forjaron mi carácter y su imagen impulsaron mi actuar. Ustedes que entregaron día a día amor, cariño, comprensión y confianza ante la vida me permitieron obtener una profesión como Química Farmacéutica Bióloga. Gracias por el amor que siempre me han brindado y su apoyo condicional.

A LA FES-C

Los mejores momentos que recordaré con cariño serán mi estancia en la FES-Cuautitlán Campo 1 donde conviví con mis amigos aprendiendo a trabajar en equipo y bajo presión, con mis profesores donde sus conocimientos y enseñanzas dejaron huella en mí para tomar decisiones y poder resolver problemas que se presenten a través de nuestra carrera profesional. Por todos aquellos momentos doy gracias de ser PUMA.

PROFESORES.

Agradezco al Dr. Andrés Romero Rojas, M. en F. C. Ma. Eugenia Posada Galarza y al Dr. Enrique Ángeles Anguiano que me brindaron su apoyo entusiasta y la motivación constante y de todos aquellos que participaron de alguna u otra manera en la realización de este Proyecto de Tesis. Por su valiosa ayuda esto no sería posible.

ADÁN

La persona más importante en mi vida eres tú porque estas a mi lado, tu amor y confianza me dan las fuerzas de seguir con mis metas. Me impulsa tu optimismo y seguridad ante la vida porque me has enseñado que debemos vivir nuestra vida como el último día de nuestra vida. Por hoy y siempre gracias.



INDICE

- i. **ÍNDICE DE FIGURAS**
- ii. **ÍNDICE DE TABLAS**
- iii. **ABREVIATURAS**
- iv. **RESUMEN**

INTRODUCCIÓN..... 1

CAPITULO 1.- GENERALIDADES

1.1 Antecedentes Históricos..... 3

1.2 Descripción de *H. pylori*..... 6

1.3 Requerimientos nutricionales de *H. pylori*..... 9

- 1.3.1 Medios de cultivo..... 9
- 1.3.2 Condiciones de transporte para *H. pylori*.....10
- 1.3.3 Distintas cepas de *Helicobacter pylori*..... 10
- 1.3.4 Microaerobiosis: un método simple.....11

1.4 Formas cocoides de *H. pylori*..... 12

- 1.4.1 Formas de resistencia Versus Formas de muerte..... 13
- 1.4.2 Proceso de formación de las formas cocoides..... 14
- 1.4.3 Susceptibilidad antibiótica de las formas cocoides..... 15

1.5 Genoma Bacteriano..... 15

- 1.5.1 Secuencia del genoma de *H. pylori*..... 18
- 1.5.2 Representación gráfica del Genoma de *H. pylori* 26695..... 18
- 1.5.3 Representación gráfica del Genoma de *H. pylori* J99..... 18

1.6 Metabolismo..... 18

1.7 Epidemiología.....19



INDICE

2. DIFERENTES TIPOS DE TRANSMISIÓN

2.1	Transmisión por <i>H. pylori</i>	
2.2	Transmisión oral-oral.....	20
2.3	Transmisión oral-gástrica.....	20
2.4	Transmisión fecal-oral.....	20
2.5	Transmisión iatrogénica.....	21
2.6	Transmisión a través de vectores.....	22

3. PATOLOGÍA DE *H. pylori*

3.1	Patogénesis.....	22
3.2	Factores de Virulencia.....	24
3.3	Mecanismos Patogénicos de la infección <i>H. Pylori</i>	25
3.3.1	Actividad Mucolítica de <i>H. pylori</i>	25
3.3.2	Ureasa.....	26
3.3.3	Adherencia a la mucosa gástrica de <i>H. pylori</i>	27
3.3.4	Hemaglutininas.....	28
3.3.5	Citotoxicidad, Factores de virulencia.....	29
3.3.6	Aspectos Inmunológicos.....	29

4. ENFERMEDADES QUE OCASIONA *H. pylori*

4.1	Gastritis.....	30
4.2	Carcinoma Gástrico.....	31
4.3	Úlceras gástricas.....	32
4.4	Enfermedades Vasculares.....	32
4.5	Enfermedades de la Piel.....	34
4.6	Otras enfermedades relacionadas con <i>H. pylori</i>	34
4.7	Complicaciones.....	34
4.8	Síntomas.....	35
4.9	Posibles causas de la infección de <i>H. pylori</i>	36



INDICE

5. METODOLOGÍA DIAGNÓSTICA

5.1	Métodos invasivos.....	38
5.2	Método No invasivo.....	39

6. TRATAMIENTO

6.1	Aspectos generales.....	40
6.2	Tratamiento farmacológico.....	43
6.3	Elección erradicadora para <i>H. pylori</i>	44

7. ANTIMICROBIANOS

7.1	Historia de los antimicrobianos.....	45
7.2	Generalidades de los antimicrobianos.....	46
7.3	Clasificación de los antimicrobianos.....	47
7.4	Mecanismo de acción posibles.....	48
7.5	Tipos de agentes antimicrobianos.....	49
7.6	Métodos para determinar la actividad antimicrobiana.....	50
7.7	Pruebas de sensibilidad bacteriana <i>in vitro</i>	51
7.8	Métodos de difusión.	
7.8.1	Método del antibiograma disco-placa.....	52
7.8.2	Método del Epsilon test.....	53
7.8.3	Método de dilución.....	53
7.8.4	Dilución en agar.....	54
7.8.5	Dilución en caldo.....	55
7.9	Resistencia Bacteriana	
7.9.1	Generalidades.....	56
7.9.2	Mecanismo de resistencia adquirida.....	57
7.9.3	Terapia con combinación de antimicrobianos.....	58
7.9.4	Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana de combinaciones medicamentosas.....	60
7.9.5	Análisis de las interacciones antimicrobianas.....	60
7.9.6	Isobogramas.....	62



INDICE

7.10	Carbamatos.....	65
7.11	Propiedades químicas-físicas de los antibióticos	
7.11.1	Metronidazol.....	67
7.11.2	Nitazoxamida.....	68
7.11.3	Amoxicilina.....	69
8.	JUSTIFICACIÓN	70
9.	HIPÓTESIS	70
CAPÍTULO 2.- OBJETIVOS		71
CAPÍTULO 3.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL		
3.1	Cepas y medio de cultivo.....	72
3.2	Prueba de solubilidad.....	72
3.3	Prueba de identificación del microorganismo.....	73
3.4	Prueba de susceptibilidad antimicrobiana	
3.4.1	Método de dilución.....	75
3.4.2	Microdilución en caldo para bacterias anaerobias.....	75
3.4.3	Combinación antimicrobiana y de los carbamatos.....	81
CAPITULO 4.- RESULTADOS		
4.1	Pruebas de solubilidad.....	85
4.2	Identificación del microorganismo.....	86
4.3	Prueba de susceptibilidad antimicrobiana.....	87
4.4	Combinación antimicrobiana.....	89
4.5	Isobologramas.....	93



INDICE

CAPÍTULO 5.-DISCUSIÓN.....	97
CAPÍTULO 6.-CONCLUSIÓN.....	103
BIBLIOGRAFÍA.....	104
ANEXO 1.....	118



i. INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía electrónica de <i>Helicobacter pylori</i>	4
Figura 2. Estímulo antigénico permanente que provoca <i>H. pylori</i>	8
Figura 3. Colonias de <i>H. pylori</i> en medio de cultivo de sangre.....	9
Figura 4. Ilustración de una microfotografía electrónica de <i>H. pylori</i>	12
Figura 5. Formación cocoide de <i>H. pylori</i>	14
Figura 6. Síntesis de la enzima ureasa de <i>H. pylori</i>	16
Figura 7. Representación gráfica del genoma de <i>H. pylori</i> 26695 y J99.....	18
Figura 8. Relación entre cáncer gástrico y la infección por <i>H. pylori</i>	22
Figura 9. Esquema sobre la patogénesis de <i>H. pylori</i>	23
Figura 10. Múltiples factores originados en la infección por <i>H. pylori</i>	31
Figura 11. Fármacos que provocan lesiones al estómago.....	37
Figura 12. Prueba de difusión de disco.....	52
Figura 13. Imagen de la técnica de expansión de difusión de disco.....	53
Figura 14. Imagen cepa inoculada de <i>Helicobacter pylori</i>	54
Figura 15. Esquema de la preparación de las diluciones de los Antimicrobianos.....	55
Figura 16. Representación isoblográfica e interacción química... ..	65
Figura 17. Descarboxilación de la monoamina del á. carbónico.....	65
Figura 18. Estructura general de los carbamatos.....	66
Figura 19. Estructura química de Metronidazol.....	67
Figura 20. Estructura química de Nitazoxamida.....	68
Figura 21. Estructura química de Amoxicilina.....	69



i. INDICE DE FIGURAS

Figura 22. Esquema del llenado de los pocillos de las microplacas con los antimicrobianos y carbamatos disueltos en Caldo Brucella...	80
Figura 23. Representación isoblográfica de combinación antimicrobiana.....	83
Figura 24. Diagrama de flujo sobre la metodología experimental.	84
Figura 25. MICs de los derivados del a. carbámico para <i>H. pylori</i> ..	89
Figura 26. Construcción de Isobogramas I.....	94
Figura 27. Construcción de Isobogramas II.....	95
Figura 28. Construcción de Isobogramas III.....	96



ii. INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de cepas de <i>Helicobacter pylori</i>	10
Tabla 2. Prueba de solubilidad a los Antimicrobianos de Control....	73
Tabla 3. Pruebas bioquímicas de <i>Helicobacter pylori</i>	74
Tabla 4. Condiciones optimas de crecimiento para <i>H. pylori</i>	74
Tabla 5. Preparación de la serie de diluciones del agente antimicrobiano.....	77
Tabla 6. Criterios de Lecturas para evaluar el crecimiento de <i>H. pylori</i>	80
Tabla 7. Evaluación del espectro de actividad de los diferentes antimicrobianos y carbamatos.....	82
Tabla 8. Prueba de solubilidad de los principios activos y compuestos derivados del ácido carbámico.....	85
Tabla 9. Resultados de Identificación y pruebas bioquímicas de <i>H. pylori</i>	86
Tabla 10. Resultados de las MICs de los Antibioticos Controles....	87
Tabla 11. Susceptibilidad a derivados de ácido carbámico de <i>H. pylori</i>	88
Tabla 12. Inhibición del Crecimiento de <i>H. pylori</i> ante la presencia de las diluciones cruzadas del LQM 932.....	90
Tabla 13. Inhibición del Crecimiento de <i>H. pylori</i> ante la presencia de las diluciones cruzadas del LQM 933.....	91
Tabla 14. Inhibición del Crecimiento de <i>H. pylori</i> ante la presencia de las diluciones cruzadas del LQM 938.....	92
Tabla 15. Valores del FIC de la Combinación Antimicrobiana.....	93



iii. ABREVIATURAS

ACT	: Acetona
AMX	: Amoxicilina
AINEs	: Antiinflamatorio no esteroideo
ATCC	: American Type Culture Collection- Rockville,
Cag A	: Gen asociado con la citotoxina
Cl ₂ Ba	: Cloruro de Bario
CMI	: Concentración mínima inhibitoria
CMH	: Complejo mayor de histocompatibilidad
CS	: Coeficiente de sinergismo
DMSO	: Dimetilsulfóxido
ELISA	: Test de enzimoimmuno absorción (enzyme linked immunosorbent assay)
FIC	: Concentración inhibitoria fraccionada
HP	: <i>Helicobacter pylori</i>
IARC	: Agencia para la Investigación en Cáncer
IBP	: Bomba de protones
IL-2	: Interleucina- 2
IL-8	: Interleucina- 8
kDA	: Kilodaltones
LPS	: Lipopolisacáridos
MALT	: Mucosal associated lymphoid tissue
MeOH	: Metanol
m.o.	: Microorganismo
µg	: Micogramos
ml	: mililitros
µL	: microlitros.
MTZ	: Metronidazol
NTZ	: Nitazoxamida



iii. ABREVIATURAS

- NCCLS : National Comitte for Clinical Laboratory Standards
- OMS : Organización Mundial de la Salud
- PAF : Factor activador plaquetario
- PAI : Isla de patogenicidad
- PNN : Polinucleares neutrófilos
- PG : Peristaltis gástrica
- BaSO₄ : Sulfato de bario
- H₂SO₄ : Ácido Sulfúrico
- TNF : Factor de necrosis tumoral
- TNF-a : Factor de necrosis tumoral alfa
- Vac A : gen asociado con la citotoxina vacuolizante



iv. RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la actividad inhibitoria contra *Helicobacter pylori* de 7 derivados del ácido carbámico mediante el método de dilución en caldo.

Se utilizó una cepa de *Helicobacter pylori* ATCC 43504 la cual se hizo crecer en agar casman para *Campylobacter* suplementado con sangre de caballo al 5%, incubando bajo condiciones microaerofilicas durante 5 días a temperatura de 37 °C.

De acuerdo con Comité Nacional para Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS), 1993 Methods for antimicrobial testing of anaerobic bacteria, 2nd ed., publication M11-A3 se utilizó el método de dilución en caldo el cual es específico para las pruebas de susceptibilidad para *Helicobacter pylori*, se observó una mayor inhibición de los compuestos LQM 932, LQM 933 y LQM 938 se presento inerte no presentaron inhibición a 72 horas ante los compuestos LQM 934, LQM 935 y LQM 936 y LQM 937.

Para evaluar las combinaciones antimicrobianas con los derivados del ácido carbámico (LQM 932, LQM 933 y LQM 938) y los antibióticos control se calculó los índices de concentración fraccionaria inhibitoria (FIC) que oscilaron entre 0.5 y 3, de acuerdo a los valores se analizó el tipo de interacción antimicrobiana y el compuesto LQM 932 en combinación con Metronidazol y Amoxicilina tubo un efecto sinérgico.



INTRODUCCIÓN

El *Helicobacter pylori* es un bacilo Gram negativo corto, helicoidal, con múltiples flagelos, microaerófilo, se adhiere a las células epiteliales superficiales de la mucosa del estómago y duodeno, sin invadir la pared.^{1,2} La bacteria segrega amoníaco, alcalinizando el medio; así se protege de la acción acídica del jugo gástrico (pH 3). El amoníaco además irrita la mucosa, ayudado por proteasas y fosfolipasas bacterianas que destruyen el moco protector. La mucosa y su lámina propia son invadidas por un denso infiltrado de células inflamatorias, especialmente neutrófilos. Se ha relacionado con el 95% de las úlceras duodenales, el 70% de las úlceras gástricas, el 100% de las gastritis crónicas activas y el 100% de las gastritis crónicas tipo B (las más frecuentes, de localización antral).³

La discusión actual se centra en erradicar a *Helicobacter pylori*, o si se debe prolongar el tratamiento antimicrobiano algunas semanas más; aunque el tema no está lo suficientemente estudiado, sí hay algunos autores como Francis Mégraud, y Raffaele Piccolomini, Giovanni Di Bonaventura, en artículos publicados en 1997 y 1998³, realizaron estudios *in vitro* donde evaluaron la resistencia o sensibilidad que presentan algunos antimicrobianos contra dicha bacteria.^{4,5}



La aparición de nuevas sustancias, como la Nitazoxamida y los compuestos de ácido carbámico, unidas a los antibióticos habituales en el tratamiento de esta infección por *Helicobacter pylori*: amoxicilina y metronidazol, la búsqueda de nuevos tratamientos farmacológicos en pacientes con úlcera péptica gástrica o duodenal infectadas por esta bacteria es necesario evaluar la susceptibilidad o resistencia que presenten con la combinación antimicrobiana de agentes antimicrobianos *in vitro* para determinar si hay sinergismo, antagonismo o diferencia para lograr tasas de erradicación similares a las clásicas, y se presentan como una alternativa eficaz de tratamiento.^{6,7}

Las combinaciones antimicrobianas con estos nuevos derivados del ácido carbámico son para hallar nuevos principios activos que erradiquen la infección por *Helicobacter pylori*, se empieza con estudios preclínicos donde se acumula la información de las características físicas-químicos, farmacológicas, toxicológicas, citotóxicas, etc. de los compuestos así como la experimentación *in vitro* e *in vivo* sobre la actividad antimicrobiana, con la finalidad de impulsar el diseño de nuevas formulaciones y formas farmacéuticas en el Mercado Farmacéutico.



CAPÍTULO 1.- GENERALIDADES

1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.

El descubrimiento de *Helicobacter* representa un moderno ejemplo de serendipia, pues luego de infortunados intentos de aislamiento, el olvido de unas cajas de cultivo en la incubadora durante las vacaciones de Semana Santa, llevaron a su aislamiento ^(9,10). Aunque originalmente se describió como un organismo similar a *Campylobacter* y luego como *Campylobacter pyloridis*; nombre de la especie que no se ajustó a las normas de nomenclatura, lo que fue enmendado como *Campylobacter pylori*.¹¹

No obstante, las diferencias morfológicas de la nueva especie con las preexistentes, su patrón de ácidos grasos y diferencias genéticas, ponía en duda su inclusión en el género *Campylobacter*, lo que llevó a la propuesta del nuevo género *Helicobacter* y ello motivó la redescipción del género *Campylobacter*^{10,11}.

También esta definición taxonómica permitió la creación de otro nuevo género: *Arcobacter*, que alojó a dos especies anteriormente denominadas como *Campylobacter* atípicos, hoy conocidos como *A. nitrofigilis* y *A. crioaerophilicus*, que junto con *A. skirrowii* y *A. butzleri* conforman el nuevo género¹². Morfológicamente los miembros de los géneros *Campylobacter* y *Arcobacter* son similares, ambos presentan extremos puntiagudos con un flagelo desnudo en cada extremo; en el caso de *Campylobacter* el flagelo nace de una concavidad (fig.1) ¹⁰ y en *Arcobacter* los extremos son más redondeados (fig.2) ¹¹

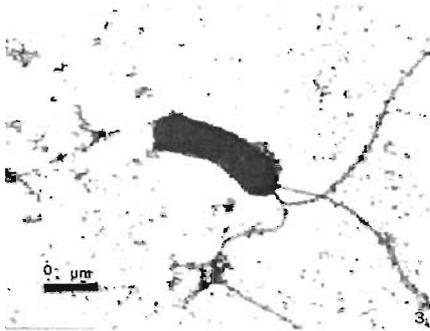


Fig. 1 Micrografía de *H. pylori*, la cual fue obtenida del de la bibliografía número 13.

En tanto, *Helicobacter* presenta extremos ramos y en uno de ellos exhibe un mechón de 3 a 8 flagelos envainados, como se muestra en la figura 1.¹³ Los primeros años de la historia de *Helicobacter* estuvieron matizados de controversias, pues unos investigadores le atribuían un papel protagónico en la patología gastroduodenal, mientras otros asumían que sólo se trataba de un saprófito.^{14, 15}

También, la respuesta efectiva del tratamiento antimicrobiano ante esas patologías, respaldaba su papel etiológico, pues la erradicación del microorganismo resulta en una remisión de los síntomas¹⁶ y su reaparición se asocia con el recrudecimiento de la sintomatología.¹⁷ Otros factores importantes, fueron los resultados de infecciones experimentales en animales, que confirmaron clínica e histológicamente la localización de la bacteria en la vecindad de las zonas afectadas.¹⁸

En 1982, Robin Warren y Barry Marshall describieron la presencia de infección por *Helicobacter pylori* (HP),^{19,20} se aisló por primera vez a partir de biopsias del epitelio gástrico, se publicó el primer estudio, con 100 casos, en el que logró establecerse que existía una significativa asociación entre la presencia de gastritis crónica y úlcera péptica.²¹



El Dr. Marshall trabajando en su proyecto de tesis, trataba de aislar los bacilos curvos que se observaban en las biopsias gástricas, las cuales procesaba como si se tratase de un *Campylobacter*.²¹ Por ello, las placas se incubaban en microaerobiosis y se leían a las 48 horas; pero siempre resultaban negativas.²³ El éxito tuvo lugar luego de una Semana Santa, cuando al regresar de las vacaciones, se encontró que las placas olvidadas en la incubadora estaban llenas de colonias de la bacteria que tantas veces había tratado de cultivar.²⁴

La diferencia radicó en que su olvido hizo que las revisara hasta cinco días más tarde; a partir de ese momento se definió que el nuevo agente era de crecimiento lento. Por lo tanto, las placas para su aislamiento deben incubarse en microaerobiosis a 37°C durante un mínimo de 5 días (aunque es posible revisarlas a los 3 días).²⁴

El redescubrimiento, por Marshall y Warren, de *Helicobacter* fue analizado con interés sólo cuando, en 1983. La prevalencia de la infección por *Helicobacter pylori* varía considerablemente según la raza, la nacionalidad y la fuente de infección. Se piensa que se transmite por vía fecal-oral y se sabe que sí lo hace por vía oral-oral, así como por instrumental médico contaminado: sondas, endoscopios, pinzas de biopsia, etc.²⁴



1.2 DESCRIPCIÓN DE *Helicobacter pylori*.

Helicobacter pylori es un bacilo curvo Gram (-), de 0,5 x 0,3 micras, con 4-6 envolturas flageladas que presenta en uno de sus extremos y un alto peso molecular de 600.000 daltons con una gran movilidad y llegar a colonizar la mucosa.^{25, 26} A su vez, los flagelos permiten a estos microorganismos moverse con mayor facilidad en un medio altamente viscoso como es la mucosa gástrica, con mayor efectividad que otros microorganismos curvados.²⁷

Las características propias del *H. pylori* son:

- Ultraestructura
- Composición de ac. grasos
- Quinonas respiratorias
- Características de crecimiento
- Secuencia de RNA
- Enzimas que produce.²⁸

El *H. pylori* es capaz de producir determinadas enzimas que le sirven para sobrevivir y colonizar la mucosa gástrica. Entre estas encontramos:

La producción de ureasa, que hidroliza la urea y origina bióxido de carbono y amoniaco, y crea un microambiente alcalino, la colonización se produce sobretodo en el antro gástrico, puede proteger a *H. pylori* de los efectos del ácido gástrico, a través de lo que se ha denominado "nube de amonio", que realizaría un efecto tampón y permitiría la supervivencia del microorganismo.²⁸



Esta y otras enzimas, como las **catalasas y las oxidasas**, son las responsables de la colonización, los efectos tóxicos y el daño epitelial superficial de la mucosa gástrica.²⁸

Se han determinado por lo menos dos genes que codifican proteínas responsables de la virulencia de este germen: el Vac A y el Cag A. Por lo que está incluido por la OMS dentro del carcinógeno tipo I. Existen dos grupos fenotípicamente distintos de *Helicobacter pylori*:²⁹

- **Las bacterias de tipo I**, que expresan el gen asociado con la citotoxina (CagA, del inglés *cytotoxin-associated gene*) y el gen asociado con la citotoxina vacuolizante (VacA, del inglés *vacuolating cytotoxin-associated gene*); Las cepas de Tipo I productoras de citotoxina y de la proteína asociada a la misma son predominantes en pacientes con úlcera y con cáncer. Las cepas de tipo I resultan más patógenas que las de tipo II e inducen una respuesta inflamatoria más intensa.^{29, 30}
- **Las bacterias de tipo II**, que no expresan estos genes. Las cepas Tipo II no son productoras de citotoxina y son capaces de producir lesión inflamatoria persistente.^{29, 30.}

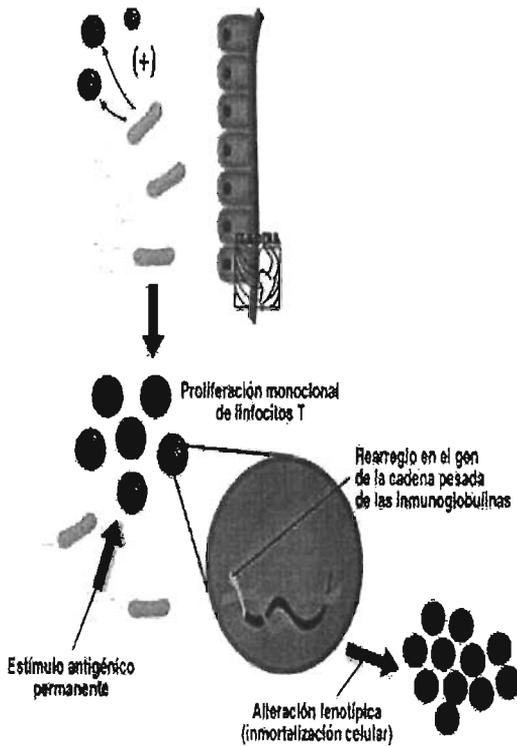


Figura 2. Estímulo antigénico permanente que provoca *H. pylori*. Muestra el estímulo antigénico constante se ha asociado con la proliferación monoclonal de linfocitos T específicos contra *H. pylori* que serían el motor de la transformación neoplásica. Tomada del artículo *Helicobacter pylori*, enfermedad ulcerosa y cáncer gástrico pag web, www.iladiba.com.³¹

La acción local de *Helicobacter pylori* sobre los vasos mesentéricos provoca migración de leucocitos como lo muestra la figura 2, los cuales una vez activados producen concentraciones citotóxicas de óxido nítrico que participa en la patogénesis de las lesiones en la mucosa, los síntomas dispépticos son 200% más elevados que la población sana.

En contraste con otras bacterias, los lipopolisacáridos del *Helicobacter pylori* poseen baja actividad inmunológica lo que explica la permanencia de la infección crónica.³¹



1.3 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE *Helicobacter pylori*.

1.3.1 MEDIOS DE CULTIVO PARA *H.pylori*.

Los medios de cultivos definidos para *H. el pylori*; es un medio basal complejo (o sólido o líquido), los medios de cultivos más empleados son agar casman³², agar mueller hinton, agar wilkins también se utilizan caldos como caldo brucella, caldo mueller Hinton, con algún formulario de adición de un suplemento como sangre de carnero, caballo o humana o productos derivados de la sangre, suero, carbón de leña, maicena, o emulsión de yema de huevo, con sales de tetrazolium.^{32, 33.}

Las condiciones de cultivo para esta bacteria bastante exigente es una atmósfera microaerofílica, con una baja concentración de oxígeno y anhídrido carbónico (5-10%). Un periodo de incubación extraordinariamente prolongado (de 7 a 10 días a 37°) comparado con el resto de las bacterias Gram negativas.³³

Cuando esta bacteria crece en los medios de cultivo se observan como colonias pequeñas, brillantes y transparentes como se puede observar en la figura 3. Se recomienda la utilización de un medio selectivo para evitar la contaminación con otros microorganismos. *H. pylori* puede conservarse en un congelador a -80°C o en nitrógeno líquido.^{33, 34}

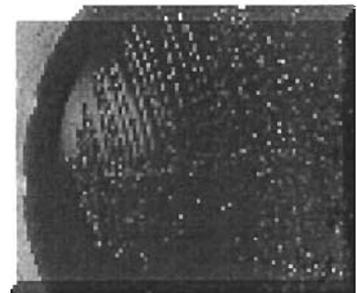


Fig. 3 Colonias de *H. pylori* en medio de cultivo agar sangre. Tomada de la página web, [www.condiciones de transporte.htm](http://www.condicionesde transporte.htm)³⁵



1.3.2 CONDICIONES DE TRANSPORTE PARA *H. pylori*.

El transporte de la biopsia desde la sala de endoscopias hasta el Servicio de Microbiología se puede realizar de dos formas:

- Se puede colocar la biopsia en la pared de un tubo estéril que contenga la solución salina para evitar la desecación. Se puede utilizar cuando el tiempo que transcurre desde que se toma la muestra hasta que se siembra es de menos de 4 horas.
- Se puede colocar la biopsia dentro de un medio de transporte que puede contener un agar semisólido y en este caso la viabilidad se mantiene por periodos más prolongados.

El transporte de los microorganismos ya crecidos entre diferentes centros, puede realizarse mediante transporte urgente sin atmósfera especial.³⁵

1.3.3 DISTINTAS CEPAS DE *Helicobacter pylori*

TIPO I
Expresa: <ul style="list-style-type: none">• Una citotoxina vacuolizante (Vac-A)• Un antígeno asociado a citotoxinas inmunodominantes (Cag-A) (Los pacientes con úlcera tienen este tipo de H.p.)
TIPO II:
<ul style="list-style-type: none">• No expresan (Vac-A) ni Cag-A• Son los responsables de muchos casos de gastritis y de colonización sin lesiones.³⁶

Tabla 1. Tipos de cepas de *Helicobacter pylori*.



1.3.4 MICROAEROBIOSIS: UN MÉTODO SIMPLE.

Se han descrito una variedad de formas para generar la atmósfera microaerofílica que requiere *Helicobacter*, desde el empleo de jarras para anaerobiosis y sobres generadores tipo GasPak[®], como el CampyPak[®] que incluye el catalizador y brinda la proporción adecuada de gases.³⁴

Sin embargo, la forma más empleada es utilizando un sobre generador de anaerobiosis, al que se le remueve el catalizador para que la atmósfera generada sea solo microaerofílica.

También existen métodos de evacuación con reemplazo, en los cuales se remueve la atmósfera de la jarra con una bomba de vacío y se repone a partir de un cilindro con la mezcla de gases apropiada.

- a) Se puede utilizar un frasco de vidrio con capacidad de 1 galón (frascos con tapa) en vez de la jarra de anaerobiosis. Para mayor seguridad, el frasco se forra con esparadrapo, para evitar la dispersión de fragmentos de vidrio en caso de que se rompa. El sello de la tapa se refuerza con un empaque de hule, el cual puede hacerse a partir de un neumático de automóvil.
- b) Se genera la atmósfera adecuada con una candela encendida y una tableta de antiácido efervescente tipo Alka-Seltzer[®], la cual se coloca en una bolsita de plástico con unos 15 ml de agua. La bolsita se adhiere con cinta engomada a la pared del frasco, para ahorrar espacio.^{34 y 37}



1.4 FORMAS COCIDES DE *Helicobacter pylori*.

Helicobacter pylori existe en dos formas:

- Una forma espiral cultivable y
- Una forma cocoide.³⁸

Ambas pueden encontrarse en el estómago y en el duodeno, aunque la mayoría presentan la morfología bacilar espiral. La forma cocoide prácticamente no se adhiere a las células epiteliales y, además, tampoco es capaz de inducir la producción de interleucina 8.

La conversión morfológica de la forma espiral a la forma cocoide se observa en la figura 4. Se ha descrito en *H. pylori* cultivado bajo diversas condiciones adversas:

- Aerobiosis,
- pH alcalino,
- Alta temperatura,
- Incubación prolongada,
- Tratamiento con inhibidor de la bomba de protones o antibiótico, óxido nítrico, etc.³⁸⁻³⁹

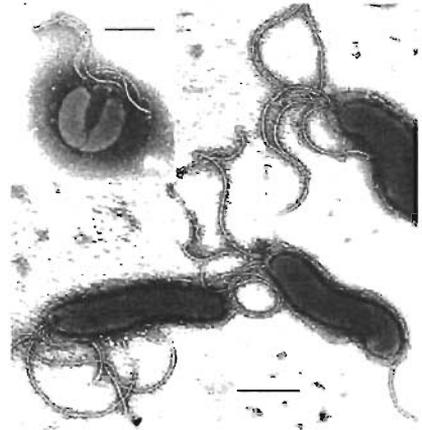


Figura 4. Ilustración de una microfotografía electrónica de *Helicobacter pylori*. Obtenida del artículo Sheri P et al. Coccoid and Spiral *Helicobacter pylori* Differ in Their Abilities to Adhere to Gastric Epithelial Cells and Induce Interleukin-8 Secretion.³⁸



Como el modo de transmisión de *H. pylori* aún se desconoce, se especula con la posibilidad de que la forma cocoide sea una forma de resistencia, capaz de soportar las condiciones adversas que encuentra *H. pylori* en el medio ambiente, y reversible a la forma espiral en el momento en que se vuelvan a dar las condiciones óptimas.³⁹

1.4.1 FORMAS DE RESISTENCIA *VERSUS* FORMAS DE MUERTE.

El hecho de que cuando *H. pylori* se encuentra en cultivo durante tiempo prolongado se produzcan cambios degradativos en su composición (baja la cantidad de ADN, ARN, ATP, proteínas inmunogénicas) y cambios en las propiedades de la superficie de la membrana (aumenta la hidrofobicidad), apuntan a que la forma cocoide es manifestación de la muerte de *H. pylori*.⁴⁰

Quizá es un problema de metodología, ya que si se somete a la forma cocoide a shock térmico y ácido y lo cultivamos en medio con nutrientes adecuados, la forma cocoide pasa a espiral y puede ser recultivada.⁴¹

Hay que tener en cuenta que la respuesta al shock ácido de la forma cocoide para pasar a forma espiral, puede estar alterada durante la incubación explicando así distintos resultados experimentales. Así, pueden existir formas cocoides reversibles (estado durmiente) o irreversibles (muerte). En contra de esto se encuentra el hecho de que sólo hay un proceso de degradación que lleve a la obtención de formas cocoides sea cual sea el estímulo por el que se produzcan.⁴²⁻⁴⁴



1.4.2 PROCESO DE FORMACIÓN DE LAS FORMAS COCOIDES.

Es un proceso pasivo que consta de una serie de etapas:

- a) La forma bacilar es la forma de la mayoría de las bacterias presentes en cultivos microaerófilos frescos.
- b) El inicio de la conversión ocurre por la formación de una burbuja en uno de los extremos del bacilo, como se observa en la figura 5.
- c) La burbuja continúa creciendo y se rellena de material denso a los electrones y el bacilo comienza a doblarse
- d) Este proceso continúa hasta llegar a tener forma de U dentro de una estructura membranosa rellena con material denso.
- e) Cada vez se acumula más y más material denso a los electrones hasta llegar a no poderse dilucidar la forma bacilar: ya tenemos la forma cocoide de *H. pylori*
- f) En este momento ya han desaparecido todas las estructuras discretas, incluyendo la membrana que rodeaba la forma bacilar curva.^{45, 46.}



Fig. 5 Formación cocoide de *H. pylori*. Obtenida del artículo, *Cocoid Forms of Helicobacter pylori* are the Morphologic Manifestation of Cell Death.⁴⁶



1.4.3 SUSCEPTIBILIDAD ANTIBIÓTICA DE LAS FORMAS COCIDES.

En un estudio realizado por Dubini comunican la sensibilidad de las formas cocoides a amoxicilina, eritromicina, gentamicina y metronidazol. Las formas cocoides no fueron inhibidas por amoxicilina, lo cual es explicado porque son formas que no se dividen.

Por el contrario fueron totalmente inhibidas con eritromicina, gentamicina y metronidazol. Esto significa que son formas que sintetizan proteínas (afectadas por gentamicina y eritromicina) y que su ADN es activo, dado que cuando es dañado (metronidazol) mueren. ⁽⁴⁶⁻⁴⁷⁾

1.5 GENOMA BACTERIANO DE *Helicobacter pylori*.

La información genética del microorganismo está contenida en un cromosoma circular que consta de 1.667.867 Mb pares de bases, las cuales codifican 1.590 proteínas diferentes. ⁴⁸

El 40% de los aislados tiene plásmidos de 1.5-23.1 kb, los cuales a la fecha no han sido reconocidos como factores de virulencia, dentro del genoma también existen 3 copias de los genes 16s y 23s RNAr. Se ha demostrado por técnicas de biología molecular que el genoma de *H. pylori* presenta alta variabilidad genética, la cual puede ser explicada por tres hipótesis:

- 1) Tiene gran variabilidad en secuencias cortas de DNA repetitivas.
- 2) Presenta una amplificación de secuencias de DNA cromosómico acompañado probablemente de la eliminación de una DNA adyacente.



3) Su DNA sufre algunos cambios en las secuencias de nucleótidos.
48,49.

La existencia de cinco moléculas de membrana que actúan como adhesinas, las cuales permiten que el organismo se fije a la mucosa gástrica. De igual manera confirmaron la presencia de los genes CagA (que codifica la proteína asociada con citotoxina) y VacA (que induce vacuolización en las células epiteliales), los cuales están relacionados con la virulencia de la bacteria.⁵⁰

Los aislados de *H. pylori* generalmente muestran secuencias genómicas muy conservadas pero llegan a presentar un cierto rango de variabilidad genética (3-7%) en el que existen pequeños cambios en las secuencias de nucleótidos de algunos genes que derivan de mutaciones puntuales (microdiversidad) o cambios en la organización de genes (macrodiversidad), la variabilidad en el orden de los genes es una característica única de *H. pylori* dentro del grupo de bacterias G (-).⁵¹

Algunas cepas de *H. pylori* poseen un fuerte mimetismo para el antígeno O, ubicado en la membrana externa, con ciertos determinantes antigénicos del grupo sanguíneo Lewis, lo cual explica uno de los mecanismos utilizados por el microorganismos para burlar los sistemas de defensa del huésped. En igual sentido funciona el lipopolisacárido de la envoltura exterior, el cual despierta una respuesta inmune mínima.⁵²

El aislamiento de ciertos genes involucrados en la síntesis y funcionamiento de la ureasa bacteriana. Dicha enzima desdobla la urea en iones amonio, generando una capa de cargas positivas alrededor de la bacteria, que rechaza los hidrogeniones del ambiente gástrico, permitiendo de esta forma, que *Helicobacter pylori* sobreviva en un medio ácido (figura 6).^{31-52.}



El análisis de las vías metabólicas demostró que la fuente casi exclusiva de energía es la glucosa y que los procesos de glucólisis y gluconeogénesis constituyen la columna vertebral del ciclo energético del microorganismo. Los resultados obtenidos por el grupo de Maryland permitirán desarrollar medicamentos contra sitios metabólicos vulnerables de la bacteria. ⁵²Así, no parece improbable que los antibióticos sean reemplazados por otro tipo de medicamentos, e incluso puede estar cerca el desarrollo de la vacuna que evitará la colonización por *Helicobacter pylori*. ⁵⁴

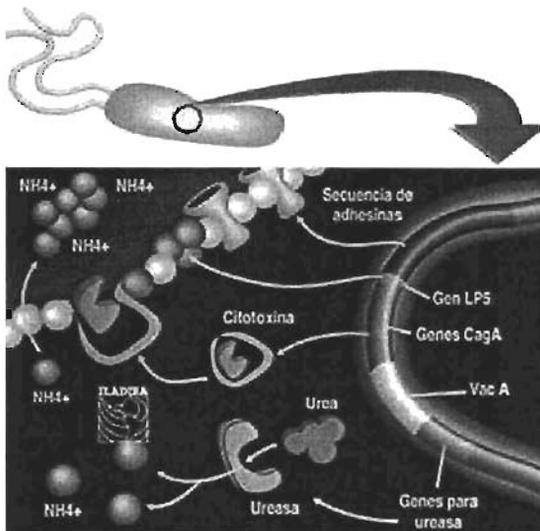


Figura 6. La síntesis de ureasa permite la elaboración del amoniaco que creará un ambiente alcalino al rededor de *H. pylori*. Fue obtenido del Artículo *Helicobacter pylori*, enfermedad ulcerosa y cáncer. ³¹

1.5.1 SECUENCIA DEL GENOMA DE *H. pylori*

En agosto de 1997 se publicó la secuencia completa del genoma de *H. pylori* 26695 (www.tigr.org), sólo 15 años después de que se cultivara por primera vez. Era el sexto genoma de procariontes secuenciado. Posteriormente en Enero de 1999, se ha secuenciado el genoma completo de J99, otra cepa de *H. pylori*, permitiendo la comparación de los genomas.



1.5.2 REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL GENOMA DE *H. pylori* 26695.

Representación gráfica del primer genoma secuenciado de *H. pylori*. Se puede observar el tamaño del genoma y los colores corresponden a regiones que codifican para proteínas con funciones diversas (Tomb et al. Nature 1997; 388: 539-547).



1.5.3 REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL GENOMA DE *H. pylori* J99.

Representación gráfica del segundo genoma de *H. pylori* secuenciado. Se puede observar el tamaño del genoma (Alm et al. Nature 1999; 397: 176-180).⁵⁶

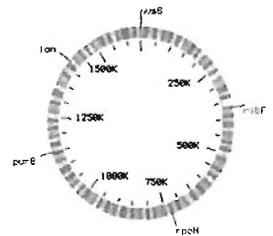


Figura 7
Representación gráfica de genoma de *H. pylori* 26695 J99,⁵⁵

1.6 METABOLISMO.

H. pylori utiliza como única fuente de energía a la glucosa, es capaz de metabolizar aminoácidos por vía fermentativa (serina, alanita, aspartato, prolina) y usar varios substratos como fuente de nitrógeno (urea, amonio, alanita, serina, glutamina) Las proteínas de membrana externa más importantes y abundantes son la ureasa y la proteína de choque térmico B (Hsp).^{57, 58}



1.7 EPIDEMIOLOGIA DE LA INFECCION POR *Helicobacter pylori*.

El *Helicobacter pylori* es una bacteria microaerófila, espiroidea, que coloniza primariamente la mucosa gástrica antral, donde produce una inflamación aguda y crónica, denominada gastritis crónica activa. La infección se ha asociado también a úlcera péptica, adenocarcinoma y linfoma gástrico.

La prevalencia de la infección varía considerablemente según:

- La edad - mayores de sesenta años
- La raza - población negra e hispana
- Países - con nivel socioeconómico bajo

La transmisión de *H. pylori* se presenta:

- Habitualmente se produce ante todo en la infancia.
- Entre jóvenes de raza negra e hispana, siendo mayor en pacientes con úlcera gástrica y duodenal.
- Oral-oral y fecal-oral.
- A través de la vía respiratoria.
- Con el consumo de mariscos y vegetales crudos⁵⁹

En países desarrollados la infección es inusual antes de los 20 años (menos del 20%) y alcanza al 40-60% de los adultos mayores de 60 años; siendo más frecuente en individuos de nivel socioeconómico bajo y en los familiares de los pacientes infectados.⁵⁹

Hasta ahora no se ha descrito la existencia de reservorios animales o ambientales, y todo hace pensar en una transmisión persona-persona, que podría estar ligada a la infectividad de la saliva o de las materias fecales. En general, parece que la incidencia de infección está ligada a la falta de higiene, el hacinamiento y la promiscuidad.⁶⁰



2. DIFERENTES TIPOS DE TRANSMISIÓN

2.1 TRANSMISIÓN POR *Helicobacter pylori*

La infección se asocia con mecanismos de transmisión directa o indirectamente relacionados con la higiene ambiental. Lo que también ha permitido explicar la alta prevalencia encontrada en individuos mayores de 50 años de países industrializados, lo cual se explica por un efecto de cohorte.

Tal patrón epidemiológico hace suponer que la vía de infección es común y muy efectiva. En tal sentido se han propuesto por lo menos tres opciones: transmisión oro-oral, gastro-oral y feco-oral.⁶¹

2.2 TRANSMISIÓN ORAL-ORAL.

La base de tal propuesta ha sido el hallazgo de *Helicobacter* en placa dental, en saliva o bien la identificación de su genoma en saliva; también se apoya en las reacciones positivas de ureasa en muestras de saliva; pero otras bacterias de la flora oral podrían dar esta prueba positiva, por lo que tal prueba no es muy aceptada.^{61, 62}

2.3 TRANSMISIÓN ORAL-GÁSTRICA.

Esta posibilidad se apoya en la ocurrencia de algunos brotes asociados con manejo y desinfección inadecuada de gastroscopios. Tal posibilidad llevaría también a relacionarle con el vómito, lo que en cierta medida podría explicar las altas tasas de infección en niños, ya que estos vomitan más frecuentemente que los adultos, además de que frecuentemente se llevan objetos a la boca.^{62, 63}



2.4 TRANSMISIÓN FECAL-ORAL.

Esta vía explica más fácilmente la marcada diferencia en la prevalencia de *H. pylori* en países en desarrollo comparada con países desarrollados, cuyo patrón guarda un cierto paralelismo con las tasas de enfermedades diarreicas en esos mismos países. A pesar de que hay informes esporádicos sobre el aislamiento de la bacteria a partir de heces, e incluso se ha descrito el método para tal aislamiento, esos hallazgos no son sistemáticos, lo que representa un escollo para la verificación de esta hipótesis.⁶¹⁻⁶⁴

La identificación del genoma de esta bacteria en agua potable, tanto en países en desarrollo como en países industrializados. Apoya la transmisión fecal de este agente. En tal sentido se ha documentado la sobrevivencia de la bacteria en moscas domésticas infestadas experimentalmente, alimentándolas con cultivos de *Helicobacter pylori* e incluso se ha hallado el genoma de la bacteria en moscas infectadas naturalmente.⁶¹⁻⁶⁵

2.5 TRANSMISIÓN IATROGÉNICA.

Se considera el tipo de transmisión menos común y se atribuye al uso de endoscopios, tubos, sondas y algunos otros instrumentos (mal lavados) que han estado en contacto con la mucosa gástrica de una persona y son introducidos en otra. La ruta iatrogénica es importante sobre todo en lugares en donde se tiene mucha demanda de atención clínica y muchos pacientes son examinados en un período muy corto de tiempo usando el mismo endoscopio y el lavado del material se realiza por métodos anuales.⁶⁵



2.6 TRANSMISIÓN A TRAVÉS DE VECTORES

Se ha reportado el aislamiento de *H. pylori* a partir de gatos, sugiriendo a éstos como posibles transmisores de la infección. También se ha reportado el aislamiento de microorganismo parecidos a *H. pylori* de moscas domésticas, sugiriendo a este organismo como otro posible vector, sin embargo ésta última posibilidad ha sido poco aceptada ⁶¹⁻⁶⁶

3. PATOLOGÍA DE *Helicobacter pylori*.

3.1 PATOGENESIS.

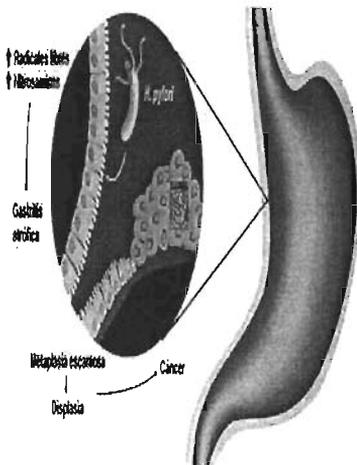


Fig. 8 Relación entre cáncer gástrico y la infección por *Helicobacter pylori*. Tomada de la pág. web. ⁶⁷

Por su estructura morfológica y genética del germen un bacilo gram negativo, microaerofílico se adhiere a las células mucosas de la superficie gástrica y reside en la capa mucosa, sin invadirla como se observa en la figura 8. Se encuentra preferentemente en el antro gástrico, donde reconoce los antígenos fucosilados de membrana del grupo sanguíneo, *H. pylori* libera distintas toxinas y enzimas, que originan una inflamación crónica (gastritis crónica activa), capaz de alterar la integridad de la membrana. ⁶⁷



H. pylori secreta proteínas que interactúan con las células epiteliales del estómago y atraen a los macrófagos y neutrófilos causando inflamación. Cuando los mecanismos reparadores no pueden curar la lesión inflamatoria, la secreción ácida destruye la barrera protectora de la mucosa.⁶⁸ Como se observa en la figura 9.

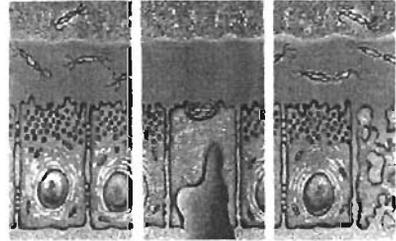


Figura 9. Esquema en el que se ilustra de forma simplificada la patogénesis de *Helicobacter pylori*. Tomada de la pág web.⁶⁷

También libera ureasa, que neutraliza el pH ácido del estómago y toxinas que contribuyen a la formación de úlceras. El aumento en la secreción de gastrina puede deberse al efecto directo de la bacteria (toxinas) o indirecto (inflamación). Posiblemente, la hipergastrinemia origina la expansión de las células parietales, lo que aumenta la secreción ácida, incluso después de erradicarse el germen.⁶⁸⁻⁷⁰

Se han postulado mecanismos gástricos, especialmente por Hipergastrinemia e hiperpepsinogenemia tipo I, inducida por el *H. pylori* que favorecerían la hipersecreción de ácido y la aparición de úlcera, cuestión que sin embargo, sigue en discusión. La formación de una úlcera duodenal puede depender de:

- La presencia o no de metaplasia gástrica
- Una respuesta inmunológica ulcerogénica
- La producción de toxinas específicas, por cepas del *H. pylori*,
- Otros factores no identificados⁷¹



3.2 FACTORES DE VIRULENCIA

Las enzimas metabólicas que posee pueden ser utilizadas por *Helicobacter pylori* para producir daño en los tejidos y para defenderse de las condiciones adversas del ambiente en el que debe sobrevivir.⁷¹⁻⁷³

Pero además, *H. pylori* posee otras características que le permiten colonizar la mucosa gástrica del estómago, inducir daños en los tejidos o liberarse de los mecanismos de defensa del huésped.⁷⁴

Entre las características de virulencia podríamos destacar:

- ❖ **Estructura espiral.** La propia estructura de la bacteria le permite introducirse a través de la capa de moco gástrico actuando de forma similar a un sacacorchos y favoreciendo por lo tanto el acercamiento a las células epiteliales gástricas.
- ❖ **Movilidad.** *H. pylori* posee de 4 a 6 flagelos polares que le confieren una gran movilidad y le permiten llegar a la mucosa y no ser eliminado por los mecanismos defensivos del huésped.
- ❖ **Adhesinas.** Posee una gran variedad de adhesinas que reconocen de forma específica a los receptores de la mucosa gástrica y se unen a ellos comenzando la colonización bacteriana.
- ❖ **Toxina vacuolizante.** Se ha descrito la presencia de una toxina que produce la formación de grandes vacuolas en las células eucarióticas. Este efecto lo producen más de la mitad de los aislamientos clínicos de *H. pylori* y aquellos que poseen la toxina se han asociado con cuadros más graves de enfermedad.
- ❖ **Actividad de la ureasa,** la cual hidroliza el amonio en urea, importante sustancia dentro del microambiente de la bacteria.



❖ **Proteína CagA.** Se ha descrito la presencia de una proteína codificada por el gen *cagA* que podría estar implicada en el proceso de activación de la toxina vacuolizante (*cagA* gen asociado a citotoxina). La presencia de esta proteína podría influir en la respuesta inflamatoria y aumentar la secreción de interleuquina. Algunos autores han observado una clara diferencia en cuanto al proceso de enfermedad que se produce cuando se trata de una cepa *cagA*⁺ o *cagA*⁻, sin embargo, para otros autores la diferencia no es tan importante. El gen *cagA* se encuentra localizado en una región del cromosoma que se conoce como Isla de patogenicidad (PAI).⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾

3.3 MECANISMOS PATOGENICOS EN LA INFECCIÓN POR *H. pylori*

La infección por *H. pylori*, depende de factores propios de la bacteria y de los mecanismos de defensa puestos en juego por el hospedero. De los numerosos factores de virulencia con que cuenta el microorganismo apenas se ha comprendido el papel de unos cuantos.⁷⁸

3.3.1 ACTIVIDAD MUCOLÍTICA DEL *H. pylori*

Como consecuencia de la actividad ureasa del *H. pylori*, el moco procedente de estómagos infectados, tiene una concentración de amoniaco unas cuatro veces superior a la del moco no infectado.



El amoníaco puede ser un lesionante directo, pero también es el causante de un aumento del pH, lo que puede alterar la interacción entre las fracciones lipídica y proteica del moco, responsable de la estabilización de la estructura micelar del mismo. Como consecuencia, se produce una alteración de la viscosidad que puede contribuir a una disminución de la capacidad para retrasar la difusión de H^+ .^{78-80, 82}

Después de 12 horas de incubación, la permeabilidad del moco a los hidrogeniones aumenta en un 10 % y en un 32 % al cabo de 48 horas. Es discutido si la infección por HP se acompaña de una actividad mucolítica apreciable. Se ha sugerido que dicha actividad podría afectar tanto a la porción carbohidratada como proteica de la cadena de mucina. Ello tendría como consecuencia la aceleración del recambio normal del moco gástrico.^{80, 82}

3.3.2 UREASA

Bajo esta denominación se incluyen los fermentos producidos por *H. pylori* que le brindan la capacidad para adaptarse al difícil y crítico medio ambiente del estómago. Este zimógeno hidroliza la urea en amoníaco y agua con una constante de disociación tan baja (alta afinidad) que le permite hidrolizar con eficiencia el sustrato, aún cuando se encuentre en concentración muy baja.

Se trata de un hexámero de 550.000 daltons cuyas subunidades, a su vez, están compuestas por péptidos de cerca de 30 kd. La presencia de ureasa no es específica para *H. pylori*, pero no es usual encontrar otro tipo de bacterias en el estómago.



Cuando se descubrió esta bacteria su localización gástrica presumía un comportamiento acidófilo; pero la confirmación de que el pH óptimo para su cultivo era cercano a la neutralidad, se transformaba en uno de los escollos importantes que se enfrentó al principio de la historia de *H. pylori*, pues a parte de aceptar que una bacteria tendría como nicho esa barrera ácida, no había una explicación para tal resistencia al pH ácido.

La clave para la adaptación al pH gástrico reside en la producción de ureasa. Esta enzima (urea amidohidrolasa) cataliza la hidrólisis de urea para proporcionar amonio y carbamato, el cual se descompone para producir otra molécula de amonio y ácido carbónico, con lo cual neutraliza el microambiente de las glándulas gástricas colonizadas.^{80,82}

3.3.3 ADHERENCIA DE *H. pylori* A MUCOSA GÁSTRICA

La colonización de la mucosa lleva implícito como paso previo la capacidad de la bacteria para adherirse al epitelio gástrico⁽⁸¹⁾, lo cual es esencial para la inducción de gastritis⁽⁸²⁾. Esta adherencia ocurre mediante la interacción entre las adhesinas bacterianas y los receptores del hospedero que están representados por algunas proteínas de la matriz extracelular.^{82,84}

Las adhesinas de *H. pylori*, están constituidas por una hemaglutinina radiante desde la superficie de la bacteria, con estructura de tipo afimbrial y un diámetro de 2 nm y perteneciente al grupo de los sialoconjugados.⁸³



La adhesión a la mucosa gástrica hace que la toxina se libere justo en el epitelio blanco. Además, estudios *in vitro* demuestran que la adherencias necesaria para la inducción y liberación de citocinas proinflamatorias; por lo tanto, la adherencia no debe ser considerada como un evento aislado más bien como parte de un proceso complejo que involucra quimiotaxis.⁸³

3.3.4 HEMAGLUTININAS.

H. pylori es capaz de aglutinar eritrocitos debido a su interacción con glucosaminas de grupos sanguíneos, algunos de los cuales también se expresan en células epiteliales, lo que indirectamente indica una función adherente.⁸⁴

Debido a que los perfiles de hemaglutinación son importantes en el proceso de adherencia de *Helicobacter* a las células de la mucosa gástrica, muchos grupos de investigadores han usado hemaglutininas para el estudio de adhesinas tipo lectinas⁽⁷¹⁻⁷⁴⁾, entre los que se mencionan la cantidad de glóbulos rojos utilizados y la cantidad de bacterias o la fracción purificada de éstas, lo cual puede afectar de manera crítica el entrecruzamiento y la aglutinación de los eritrocitos.⁷⁵ Por lo tanto, la producción de autoanticuerpos cuyos blancos estarían expresados en la mucosa gástrica, da pie para postular que un mecanismo productor de las gastritis asociadas con *Helicobacter*, es de carácter autoinmune.⁸⁴



3.3.5 CITOTOXICIDAD, FACTORES DE VIRULENCIA

Se ha detectado la producción de un factor citotóxico, en el filtrado de cultivos de *H. pylori*, capaz de producir efectos citopáticos no letales, *in vitro*, en líneas celulares de cultivo. Los estudios con microscopía electrónica han revelado vacuolización intracelular y necrosis, como respuesta a la acción de dicho factor.⁸²

Entre los factores de virulencia del *H. pylori* se cuentan las proteínas superficiales, algunas de las cuales están implicadas en los fenómenos de adhesión, y en la alteración de la arquitectura del epitelio mucoso gastroduodenal, relacionándose con la actividad endotóxica del germen. Se ha sugerido que dicha toxicidad estaría ligada a un lipopolisacárido (LPS) de la superficie del *H. pylori*.⁸⁴

3.3.6 ASPECTOS INMUNOLÓGICO

La persistencia del *H. pylori* en la mucosa gástrica es un fenómeno que se asocia con la perpetuación de los cambios histopatológicos y la presencia de infiltrado inflamatorio de tipo crónico. En la infección por *H. pylori* se produce una importante respuesta, local y general, contra la proteína de 120 kDa de la bacteria, que se asocia con la actividad citotóxica vacuolizante y con la severidad de la gastritis.⁸²

Un efecto llamativo de la infección por *H. pylori* es la activación de polinucleares neutrófilos (PNN), que se traduce en un profuso infiltrado inflamatorio de las áreas superficiales mucosas. Este efecto está mediado por la interleucina- 8 (IL-8), así como por una proteína de la propia bacteria con potente capacidad quimiotáctica.^{74,84}



La activación da lugar a la producción de citoquinas, aumento de los fenómenos oxidativos locales y de la expresión de moléculas de adhesión intercelular tipo 1 (ICAM-1). Las células mucosas gástricas también expresan ICAM-1, lo que, junto a la producción de IL-8, puede constituir el núcleo de los fenómenos inflamatorios inducidos por la infección de *H. pylori*. Aproximadamente la tercera parte de las cepas inducen fuerte actividad oxidativa mediada por PNN. ⁽⁸²⁾

La presencia de mecanismos gástricos mediados por T- linfocitos es otro factor de importancia. Se ha comprobado que, asociado a la infección por *H. pylori*, se produce un incremento pronunciado de la población linfocitaria T CD4⁺, sobre la superficie de receptores para IL2, acompañado de un aumento del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II. Proteínas bacterianas pueden estimular también, directa o indirectamente, la proliferación y diferenciación de la población CD4⁺, dando lugar el exceso de citoquinas y sustancias con toxicidad directa como el factor de necrosis tumoral (TNF). ⁸³⁻⁸⁶

4. ENFERMEDADES QUE OCASIONA *Helicobacter pylori*.

4.1 GASTRITIS

Helicobacter pylori es la causa más común de gastritis crónica inespecífica no erosiva. En la mayoría de los pacientes, la infección es asintomática. Generalmente se encuentran afectados el antro y el fundus del estómago y se observa un infiltrado inflamatorio formado por células mononucleares (liberan IL2, factor de necrosis tumoral y radicales libre de oxígeno) y/o leucocitos polimorfonucleares. La infección puede hacerse crónica y en algunos pacientes los cambios de las glándulas de la mucosa gástrica se hacen permanentes. ⁸⁸



4.2 CARCINOMA GÁSTRICO

La gastritis crónica inducida por *H. pylori* puede progresar a gastritis atrófica crónica, que es precursora del cáncer gástrico. No obstante, los mecanismos por los que se desarrolla el cáncer son multifactoriales, pues no todos los pacientes infectados lo presentan, ni todos los adenocarcinomas gástricos se asocian a la infección por *H. pylori*.³¹ Condiciones como la gastritis crónica atrófica (gastritis de tipo B) y la metaplasia intestinal son consideradas factores de riesgo para el desarrollo del tumor y factores asociados con la neoplasia.³¹

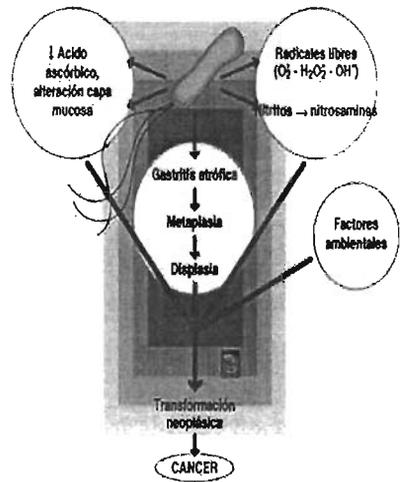


Figura 10. Múltiples factores originados en la infección por *H. pylori* influyen en el origen del cáncer gástrico. Pag web, www.iladiba.com.³¹

Aunque los mecanismos precisos responsables de la inducción neoplásica por *H. pylori* no se conocen con claridad, ha logrado establecerse que los productos derivados del germen pueden contribuir a la generación de sustancias carcinógenas, entre las que se destacan radicales libres y nitritos.^{31, 87-93}

Así mismo, la infección altera las propiedades físicas y químicas asociadas con la defensa de la mucosa, disminuyendo, por ejemplo, la producción de ácido ascórbico y permitiendo la formación de nitrosaminas, sustancias con reconocido poder carcinógeno (figura 10).^{31, 87-93}



4.3 ULCERAS GÁSTRICAS Y DUODENALES.

H. pylori se encuentra en el 85 al 100% de los pacientes con úlcera duodenal, así como en el 70 al 90% de los que presentan úlceras gástricas. La recurrencia de estos dos tipos de úlcera disminuye significativamente tras la erradicación de la bacteria con el tratamiento adecuado. El hábitat natural de *H. pylori* es la mucosa gástrica dondequiera que ésta se encuentre, ya sea en el estómago o en la metaplasia gástrica del esófago o duodeno.

La predilección que tiene la bacteria por las uniones intercelulares puede favorecer la difusión de iones de hidrógeno al interior de la mucosa. También se piensa que tiene toxinas capaces de ocasionar la inflamación de la mucosa. La prevalencia de infección por *H. pylori* en pacientes que toman AINEs (antiinflamatorios no esteroideos) oscila entre el 22 y el 63%.⁹⁵⁻⁹⁷

4.4 ENFERMEDADES VASCULARES

Entre las principales enfermedades extradigestivas relacionadas con *H. pylori* podemos destacar:⁹⁵⁻⁹⁷

Enfermedades Cardiovasculares. Se han publicado diferentes estudios de seroprevalencia que muestran un vínculo entre *H. pylori* y las enfermedades cardiovasculares. Los supuestos mecanismos engloban el desencadenamiento de mediadores inflamatorios como la proteína C reactiva y diferentes citoquinas (IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- α) y la reactividad cruzada frente a la proteína de choque térmico 60. Es importante destacar la aparición de numerosos trabajos



basados en un importante número de casos y controles que tras excluir los factores de confusión como tabaco, dieta, hábitos de vida y condiciones socioeconómicas encuentran una débil relación entre *H. pylori* y este tipo de patología.⁹⁵⁻⁹⁷

Síndrome de Raynaud. El fenómeno consiste en un desorden vascular funcional definido por vasoespasmos intermitentes de las arteriolas que ocurre preferentemente en mujeres jóvenes. Estudios serológicos han mostrado una relación entre este síndrome y *H. pylori*, así como una remisión del mismo tras la erradicación del microorganismo.⁹⁵⁻⁹⁷

Síndrome de Sjögren. Se caracteriza por una infiltración de linfocitos y células plasmáticas y una disminución progresiva en la secreción de las glándulas exocrinas, este cuadro ha sido relacionado con *H. pylori*, habiendo aparecido también trabajos que encuentran una asociación infrecuente.⁹⁵⁻⁹⁷

Púrpura de Schönlein-Henoch. Está caracterizada por una púrpura palpable, dolor abdominal, hemorragia gastrointestinal, artralgias y afectación renal y nerviosa. Se han descrito varios casos con remisión del proceso tras la erradicación del microorganismo. Otras enfermedades autoinmunes relacionadas con el microorganismo son la tiroiditis autoinmune, las arritmias idiopáticas y la enfermedad de Parkinson.⁹⁵⁻⁹⁷



4.5 ENFERMEDADES DE LA PIEL

Existen publicaciones que encuentran relación entre *H. pylori* con la producción de **urticaria idiopática, rosácea y alopecia areata**. La aparición de otros estudios que no encuentran esta relación pone en duda el vínculo de unión entre la bacteria y estos cuadros dermatológicos.⁹⁵⁻⁹⁷

4.6 TRAS ENFERMEDADES RELACIONADAS CON *H. pylori*.

Otras enfermedades extradigestivas relacionadas con *H. pylori* son: encefalopatía hepática, diabetes *mellitus*, linfoma MALT extragástrico, retraso en la menarquia, retraso en el crecimiento en niños y anemia sideropénica.⁹⁵⁻⁹⁷

4.7 COMPLICACIONES.

a) Hemorragia digestiva. Con frecuencia, es la primera manifestación de la úlcera, sobre todo en enfermos de edad avanzada y con úlcera gástrica. Los factores que predisponen a la hemorragia en la enfermedad ulcerosa son la edad avanzada, la ingestión de fármacos que erosionan la mucosa gástrica, la localización, el tamaño de la úlcera y la presencia de enfermedades asociadas.⁹⁵⁻⁹⁷



- b) Perforación.** La perforación de la úlcera gastroduodenal se produce en el 6-10% de los estómagos ulcerosos, apareciendo sobre todo en las úlceras duodenales, siendo más frecuente en los hombres que en las mujeres. La perforación puede producirse hacia la cavidad peritoneal libre o penetrar algún órgano adyacente.
- c) Estenosis pilórica.** Esta complicación es menos frecuente y su incidencia ha disminuido muy notablemente desde la introducción de los modernos tratamientos antiseoretos. Aparece en el 1 al 2% de los pacientes ulcerosos y es la consecuencia de la obstrucción del tránsito por una úlcera duodenal o pilórica. El diagnóstico puede realizarse en ocasiones con una simple radiografía de abdomen en bipedestación, que muestra un estómago dilatado con nivel hidroaéreo de retención alimentaria.⁹⁵⁻⁹⁷

El diagnóstico puede continuarse con una radiografía con contraste. El pronóstico de esta complicación es bueno y el riesgo de mortalidad es muy difícil en comparación con las otras complicaciones de la úlcera péptica.⁹⁵⁻⁹⁷

4.8 SÍNTOMAS

Lo más característico de la úlcera gastroduodenal es la aparición del dolor o de sensaciones incómodas en la región abdominal, que pueden presentar una o varias de las siguientes características:

- Dolor en la parte alta del abdomen (epigastrio) que aparece a los 30 a 60 minutos después de comer.
- Dolor de aparición nocturna (cuando el estómago está vacío).
- El dolor sordo que no se irradia.
- Períodos de dolor de semanas, con periodos libres de síntomas.



- Dolor al presionar en el epigastrio.
- Otros síntomas consecuencia de los anteriores serían pérdida de peso, pérdida de apetito, distensión abdominal, eructos, náuseas o vómitos, aunque estos últimos son poco frecuentes.⁹⁵

4.9 POSIBLES CAUSAS DE LA INFECCIÓN DE *H. pylori*.

En numerosos estudios se ha observado que no son exactamente las mismas causas las que llevan a una úlcera gástrica o a una duodenal. De hecho, parece que la úlcera de estómago se relaciona con la presencia en el duodeno de una bacteria denominada *Helicobacter pylori*, y la úlcera duodenal se relaciona con una excesiva acidez en el estómago, aunque pueda parecer paradójico. Según se ha podido determinar, que tienen diversos efectos sobre las personas infectadas:

- a) Mayor concentración de amoníaco en el moco gástrico;** unas cuatro veces más de lo normal; éste lesiona directamente la mucosa del estómago, y altera la viscosidad del moco que la recubre y protege, lo cual la hace más vulnerable al efecto del ácido con el que está en contacto permanente.⁹⁵⁻⁹⁷
- b) Elevación anormal de la gastrina,** molécula que se encarga de regular la cantidad de ácido gástrico que se libera al estómago; normalmente, la cantidad de gastrina se regula dependiendo del alimento ingerido. La gastrinemia basal aumenta en un 50 % y la postprandial en un 100 %.⁹⁵⁻⁹⁷
- c) Aumento de la secreción ácida,** El aumento de la secreción ácida parece que es la causa principal de las lesiones de la úlcera péptica duodenal. La mucosa duodenal responde al aumento de acidez con cambios en la estructura de la mucosa, que intenta hacerse más resistente a la agresión que el ácido le está suponiendo; va



cambiando su estructura y pareciéndose cada vez más a la mucosa gástrica, más preparada para resistir el ataque ácido; finalmente, se transforma totalmente en mucosa gástrica, lo cual se llama *metaplasia gástrica* del duodeno, que a su vez se infecta por el *H. pylori* con aparición de duodenitis y úlcera duodenal.

d) Consumo de Fármacos antiinflamatorios. Los antiinflamatorios realizan su acción a través de numerosas y complicadas reacciones químicas, entre las cuales se encuentra la regulación de unas moléculas denominadas **prostaglandinas**, que favorecen las defensas del estómago contra el ácido gástrico.⁹⁵⁻⁹⁷

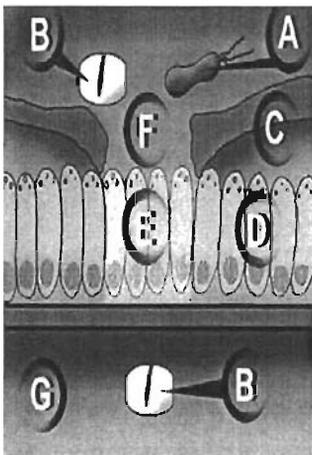


Fig. 11 Fármacos que provocan lesiones al estómago. El estómago la mucosa está perfectamente preparada para resistir un pH < 2,5. Tomado del artículo Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection.⁹⁷

Los antiinflamatorios, **B**) inhiben la síntesis de prostaglandinas PGs (ver en la figura 11, **G**), por lo cual el estómago pierde parte de su capacidad para defenderse, hasta el punto de que estos fármacos, tomados de forma continuada, sin protección gástrica y sin control, conducen muy frecuentemente a la aparición de úlceras digestivas, o manifestaciones menores de la misma etiología.⁹⁷ Para ello cuenta con varias líneas de defensa:

Capa de moco-bicarbonato (ver en la **figura, 11 C**), que mantiene un gradiente de pH de 2,5 a 7,0 entre la superficie y la capa profunda. Los propios fenómenos de cohesión intercelular ejercen de barrera mecánica (ver en la



figura 11, D).

La microcirculación está también regulada por las prostaglandinas PGs. (ver en la figura 11, G). Si esta mucosa está adaptada al medio ácido significa que para que aparezcan lesiones en la mucosa (ver en la figura E) se deben de alterar algunos de estos mecanismos defensivos.

ÚLCERA duodenal (F): Los mecanismos de lesión para producir una úlcera gástrica son:

- **Los medicamentos antiinflamatorios (B):** tanto por vía oral como por otra vía llegan a la mucosa gástrica y hacen perder los recubrimientos exteriores de protección (C).
- **La infección por la bacteria *Helicobacter pylori* (A)** que se acantona en la mucosa gástrica.⁹⁷

5. METODOLOGÍA DIAGNÓSTICA.

5.1 METODOS INVASIVOS

Los métodos directos o invasivos precisan necesariamente la realización de una endoscopia digestiva alta para obtener una serie de muestras por biopsia gástrica y objetivar la presencia del microorganismo. Existen diferentes tipos de analisis morfológico: ⁹⁸

a) Tinciones histológicas: hematoxilina-eosina, Giemsa, Gram.

Histología: es un excelente método para detectar *H. pylori* en muestras para biopsia y correlacionar el grado de infección con los resultados patológicos. ⁹⁹⁻¹⁰⁰



b) Cultivo en agar sangre a 37°C, con atmósfera microaerófila.

Cultivo Microbiano: permite conocer las características bioquímicas y morfológicas de la bacteria para hacer el diagnóstico. La incubación necesita entre 3 y 7 días. Esta prueba es necesaria si la bacteria es resistente a los antibióticos.

c) Test rápido de la ureasa "in situ"

Ureasa Tisular: esta prueba rápida permite detectar la ureasa producida por el microorganismo directamente, a partir de muestras de biopsia obtenidas por endoscopia, gracias a un detector de pH.⁹⁹⁻¹⁰⁰

d) PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa tienen la ventaja de ser rápida si se combina con un buen método de detección y altamente sensible y específica, pudiéndose obtener resultados con solo unos pocos cientos de bacterias.

El inconveniente es la presencia de falsos positivos por contaminaciones cuando se realiza un mal manejo de las muestras.⁹⁹⁻¹⁰⁰

5.2 MÉTODO NO INVASIVAS.

Los métodos indirectos o no invasivos no requieren la endoscopia y se basan en el estudio de las características de la bacteria y/o de la respuesta inmunológica del huésped frente a la infección por *H. pylori*.¹⁰¹⁻¹⁰³



a) Pruebas serológicas: test de enzimoimmuno absorción (ELISA).

b) Prueba del aliento con urea marcada (^{13}C o ^{14}C)

c) Otras técnicas de identificación para *H. pylori* son:

- 1. Citología con cepillado endoscópico:** es una buena técnica de identificación, aunque agresiva sobre la cobertura epitelial que puede llegar a romperse y exponer la acción de los jugos gástricos, lo que reduciría su sensibilidad.
- 2. Técnicas con aspirado gástrico:** no requieren estrictamente la realización de una endoscopia, aunque sí precisan la introducción de una sonda nasogástrica para obtener la muestra. Se valora la concentración de urea en jugo gástrico, siendo el nivel de urea menor en pacientes infectados mientras que el amonio sufre el efecto inverso, al aumentar en estos pacientes. ¹⁰³⁻¹⁰⁵

6. TRATAMIENTO

6.1 ASPECTOS GENERALES

El enfoque terapéutico de la infección por *Helicobacter pylori* ha tenido una actualización constante en los últimos años, habiéndose modificado sustancialmente la actitud ante la enfermedad ulcerosa gastroduodenal. ¹⁰⁶

El tratamiento erradicador se indica en casos de enfermedad ulcerosa asociada a *H. pylori* y en el linfoma gástrico tipo MALT de bajo grado, no existiendo criterios concluyentes para su recomendación en individuos infectados asintomáticos, tratamientos empíricos de sintomatología similar a la ulcerosa, situaciones de hipersecreción ácida, adenocarcinoma gástrico, enfermedad por reflujo gastroesofágico,



síndrome de Zollinger Ellison, factores de riesgo como el consumo de alcohol, antiinflamatorios no esteroides (AINE) o tabaco, gastritis específicas y cuadros de dispepsia funcional.¹⁰⁷⁻¹⁰⁸ Se han detectado distintas ventajas con la terapia erradicadora frente a la terapia antisecretora, al observarse una mayor eficacia de la terapia triple en la erradicación del *H. pylori* y en la cicatrización ulcerosa de la úlcera gástrica o duodenal de reciente diagnóstico no relacionada con ingesta de AINE.¹⁰⁹

Sin embargo, se han identificado situaciones de fracaso en la cicatrización ulcerosa en pacientes con tratamiento erradicador como la utilización de antibióticos, bismuto o inhibidores de la bomba de protones (IBP) en días previos a la endoscopia (posible negativización transitoria de la bacteria), uso de tests diagnósticos con alto porcentaje de falsos negativos, afectando la mucosa por otras infecciones (Crohn) o en un medio de hipersecreción ácida (síndrome de Zollinger Ellison) o el consumo de AINE.¹¹⁰

En lo que se refiere al tratamiento de la úlcera péptica, también se ha producido un importante cambio por el conocimiento del papel patogénico del *Helicobacter pylori* en este proceso. Anteriormente, los principales objetivos del tratamiento de la úlcera péptica eran aliviar el dolor, acelerar la curación de la úlcera y prevenir su recidiva y sus complicaciones.¹¹⁰⁻¹¹¹

Se han introducido numerosos fármacos para el tratamiento de la infección por *H. pylori*, como los compuestos de bismuto, amoxicilina, tetraciclina, claritromicina, metronidazol, omeprazol y antagonistas del receptor H₂ aislados o en diversas combinaciones. El



mismo fármaco en monoterapia posee una eficacia óptima contra el microorganismo.¹¹²

Aunque el *Helicobacter pylori* es sensible "in vitro" a la mayoría de los antibióticos, no se puede suponer que exista la misma sensibilidad "in vivo", ya que hay muchos factores que pueden disminuir su eficacia terapéutica. Actualmente, el tratamiento debe consistir en la combinación más eficaz de fármacos diseñada para aumentar al máximo la tasa de erradicación disminuyendo los efectos secundarios que supondrían asegurar el conocimiento terapéutico por parte del paciente.

En la actualidad, el tratamiento de mayor éxito contra la infección por *Helicobacter pylori* es la denominada triple terapia, que consiste en:¹¹³⁻¹¹⁴

- **Bismuto, metronidazol y amoxicilina o bien tetraciclina.** La pauta más utilizada y más eficaz es el tratamiento de dos semanas con bismuto en dosis de dos comprimidos cuatro veces al día, metronidazol 250 a 400 mg tres o cuatro veces al día y tetraciclina 500 mg cuatro veces al día. Esta pauta logra erradicar el *Helicobacter pylori* aproximadamente en el 90% de los casos. Algunos estudios recientes sugieren que una semana de triple terapia puede ser tan eficaz como la pauta de dos semanas.^{129-134.}
- **Agentes citoprotectores.** Es un grupo de medicamentos que no actúan sobre el ácido clorhídrico inhibiendo su secreción, sino protegiendo la mucosa. Los compuestos de bismuto coloidal ayudan también a la cicatrización de la úlcera formando en un medio ácido un coagulante de bismuto-proteína que protege a la úlcera de la digestión por el ácido y la pepsina. Estos compuestos de bismuto son la única clase de fármacos ulcerosos que erradican



el *Helicobacter pylori* y curan la gastritis asociada a la colonización por este microorganismo.¹¹⁵

- **Prostaglandinas.** Diversas prostaglandinas, en especial las de la serie E, han demostrado ser eficaces en el tratamiento de la úlcera péptica en el mismo conjunto de ensayos clínicos.¹¹⁵
- **Inhibidores de la bomba de protones.** En este grupo se describen los medicamentos omeprazol y lanzoprazol, que son inhibidores específicos de la bomba de protones que intercambia el hidrógeno por potasio y son muy potentes en la disminución de la secreción de ácido gástrico.¹¹⁵⁻¹¹⁶

Los preparados antiácidos más usados son mezclas de hidróxido aluminio e hidróxido magnésico que neutralizan el ácido clorhídrico. El carbonato cálcico es otro antiácido potente y barato que se convierte en el estómago en cloruro cálcico. El bicarbonato sódico es un antiácido potente y de acción rápida que tiene tendencia a inducir alcalosis sistémica.¹¹⁶

6.2 TRATAMIENTO FARMACÓLOGICO.

En primer lugar debe recordarse la distinta sensibilidad y actividad *in vitro* e *in vivo* del *H. pylori* frente a distintos antibióticos, observándose en la mayoría de los antibióticos disponibles una actividad frente a *H. pylori in vitro*.¹¹⁷

Aunque la disponibilidad de fármacos utilizados para la infección por *Helicobacter pylori* es amplia, destacan principalmente el bismuto, los inhibidores de la bomba de protones, la amoxicilina, la tetraciclina, el metronidazol, el tinidazol y la claritromicina.¹¹⁷



Sin embargo, la multiplicidad de fármacos, pautas, dosificación y duración empleados para el tratamiento erradicador del *H. pylori* es tan diversa que la decisión sobre unos u otros ha sido en ocasiones bastante difícil. Los tratamientos basados en la monoterapia con un sólo antibiótico han fracasado de manera reiterada, por lo que las terapias combinadas han sido las más desarrolladas.¹¹⁷⁻¹¹⁸

6.3 ELECCIÓN ERRADICADORA PARA *H. pylori*.

La elección inicialmente viene determinada por la prevalencia local en las resistencias antimicrobianas a metronidazol y claritromicina. Estas resistencias no sólo varían entre países sino también entre distintas zonas geográficas dentro de un mismo país.¹¹⁸

La asistencia primaria y en pacientes con úlcera no complicada es evitar el empecinamiento terapéutico y esperar la introducción de nuevas alternativas erradicadoras, siendo necesario en estos pacientes pautar un tratamiento antisecretor clásico de mantenimiento para evitar las recidivas ulcerosas.¹¹⁸

En los pacientes alérgicos a la penicilina, se inicia con la asociación de un IBP con metronidazol y claritromicina, pudiéndose utilizar también la combinación de ranitidina-citrato de bismuto con claritromicina. Se deben utilizar tratamientos combinados ya que la monoterapia no ha demostrado utilidad clínica.

Se pueden emplear dobles, triples o incluso cuádruples combinaciones terapéuticas. Las dobles alcanzan porcentajes de erradicación más bajos y generalmente se recomienda triple combinaciones.¹¹⁸



- Las dobles incluyen un antibiótico y un agente antiulceroso.
- Las triples asocian dos antibióticos y un agente antiulceroso.
- En las cuádruples se administran dos antibióticos y dos agentes antiulcerosos.¹¹⁸

Para el tratamiento de la infección producida por *H. pylori* se pueden citar:

- Inhibidor de la bomba de protones + Macrólido (Azitromicina, Claritromicina, Roxitromicina)
- Ranitidina citrato de bismuto + Macrólido
- Inhibidor de la bomba de protones + Amoxicilina + Macrólido
- Subsalicilato de bismuto + Metronidazol + Tetraciclina + Antagonista de los receptores H₂
- Subcitrato de bismuto + Amoxicilina + Metronidazol
- Estas pautas se recomiendan a las dosis habituales y durante un periodo de 7 a 10 días de tratamiento.¹¹⁸⁻¹¹⁹

7. ANTIMICROBIANOS

7.1 HISTORIA DE LOS ANTIBIÓTICOS.

El mecanismo de acción de los antibióticos no ha sido conocido de forma científica hasta el siglo XX; sin embargo, la utilización de compuestos orgánicos en el tratamiento de la infección se conoce desde la antigüedad.¹²⁰⁻¹²² Este descubrimiento permitió el desarrollo de posteriores compuestos antibacterianos producidos por organismos vivos. Howard Florey y Ernst Chain, en 1940, fueron los primeros en utilizar la penicilina en seres humanos.¹²³



Desde la generalización del empleo de los antibióticos en la década de 1950, ha cambiado de forma radical el panorama de las enfermedades. Enfermedades infecciosas que habían sido la primera causa de muerte, como la tuberculosis, la neumonía o la septicemia, son mucho menos graves en la actualidad.¹²⁴⁻¹²⁵

7.2 GENERALIDADES DE LOS ANTIMICROBIANOS

Se denomina Antibiótico (del griego, anti, 'contra'; bios, 'vida'). Los antibióticos se pueden definir como un producto del metabolismo microbiano que es capaz de matar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos y además es efectivo a bajas concentraciones.¹²⁶

Un quimioterápico se define como una sustancia química sintética, obtenida para tratar infecciones mediante la destrucción de los microorganismos infectantes, cuando se administra al huésped, sin dañar sus tejidos.¹²⁶⁻¹²⁷

Agentes antimicrobianos son sustancias químicas sintetizadas parcial o totalmente en laboratorio que son capaces de inhibir el crecimiento y/o destruir microorganismos. Agente Bacteriostático: aquél que tiene la propiedad de inhibir la multiplicación bacteriana, misma que se reanuda cuando se retira el agente.¹²⁸⁻¹²⁹

Los fármacos antimicrobianos se dividen en dos grupos: las drogas sintéticas o quimioterápicas y los antibióticos. Los quimioterápicas son obtenidos por la mano del hombre, en el laboratorio, y los antibióticos son elaborados, en su metabolismo propio, por seres vivos: plantas, animales, bacterias y hongos.¹³⁰⁻¹³²



7.3 CLASIFICACION DE LOS ANTIMICROBIANOS

Agente Bactericida: Es aquél que tiene la propiedad de matar a las bacterias. La acción bactericida difiere de la bacteriostásis únicamente en que es irreversible; es decir, el microorganismo "muerto" no puede reproducirse más, aún cuando sea retirado del contacto con el agente.^{32, 133-134}

El uso de agentes antimicrobianos en combinación constituye en la actualidad un proceder de uso común. La aparición de nuevos antibióticos, conjuntamente con las especificidades del huésped y la resistencia que desarrollan los gérmenes, han obligado a modificar la estrategia a seguir en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Basados en su estructura química, los agentes antimicrobianos de uso sistémico se pueden clasificar según su origen, efecto antimicrobiano, espectro de actividad y mecanismo de acción.¹³⁵

7.3.1 ORIGEN

- **Naturales:** se obtienen a partir de microorganismos (hongos, Bacterias, etc.).
- **Sintéticos:** se obtienen totalmente por síntesis química.
- **Semisintéticos:** se obtienen por modificaciones químicas de antimicrobianos naturales, con el fin de mejorarlos.^{32, 133-139.}

7.3.2 EFECTO:

- **Bacteriostático:** la máxima concentración no tóxica que se alcanza en suero y tejidos impide el desarrollo y multiplicación de los microorganismos, sin destruirlos, pudiendo estos multiplicarse nuevamente al desaparecer el agente antimicrobiano.^{32, 133-139.}



- **Bactericida:** su acción es letal sobre los microorganismos, por lo que éstos pierden irreversiblemente su viabilidad o son lisados. ^{32, 133-139.}

7.4 MECANISMOS DE ACCIÓN POSIBLES

Inhibición de la síntesis de la pared celular.

Inhiben la síntesis de peptidoglucano mediante la inhibición de la incorporación de la D-alanina al pentapeptico, y la inhibición que dan origen a la rigidez de la pared. ^{32, 133-139.}

- Penicilinas
- Cefalosporinas
- Monobactamas
- Carbapenemes
- Peptídicos
- Otros

Alteración de la permeabilidad celular.

Altamente tóxicos, interfieren en la integridad de metabolitos y nutrientes de las bacterias. ^{32, 133-139.}

- Polienos
- Polimixinas
- Imidazoles

Inhibición de la síntesis proteica.

Inhiben a nivel de RNA polimerasa. ^{32, 133-139.}

- Tetraciclinas
- Aminoglucósidos
- Anfenicoles
- Macrólidos



Inhibición de la síntesis de DNA y RNA.

Actúan en la fase de duplicación y transcripción, que daña la multiplicación y metabolismo de la célula. ^{32, 133-139.}

- Quinolonas
- Ansamicinas
- Sulfonamidas
- Diaminopirimidinas

Espectro de actividad:

- **Amplio:** actúan sobre un gran número de especies microbianas (ej. Tetraciclina).
- **Intermedio:** actúan sobre un número limitado de microorganismos (ej. Macrólidos).
- **Reducido:** actúan sobre un pequeño número de especies microbianas (ej. Polimixina). ^{32, 133-139.}

7.5 TIPOS DE AGENTES ANTIMICROBIANOS.

Desde el punto de vista práctico existen distintos tipos de antimicrobianos:

- **Desinfección:** Proceso mediante el cual se produce la eliminación o destrucción de agentes infecciosos sólo se aplican a sistemas inanimados y eliminan la carga microbiana total, por la aplicación directa de medios físicos y químicos.
- **Esterilización:** Eliminación de todos los microorganismos (mo.)
- **Sanitizantes:** sólo se aplican a sistemas inanimados y disminuyen la carga microbiana total. ^{32, 140}



- **Antisépticos:** reducen y controlan la presencia de microorganismos potencialmente patógenos, sólo se pueden aplicar externamente en seres vivos (piel y/o mucosas).
- **Antimicrobianos de uso sistémico:** reducen y controlan la presencia de microorganismos que han invadido los tejidos. Actúan en el organismo, pudiendo ser ingeridos (vía oral), absorbidos por piel (apósitos) y/o inyectados.^{32, 140}

7.6 METODOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

Antes de llevar a cabo la actividad antimicrobiana es importante conocer al menos tres factores:

1. Naturaleza del microorganismo causante de la infección
2. Grado de sensibilidad del microorganismo a diferentes antibióticos
3. Historia del medio ambiente.¹⁴¹

Para valorar la capacidad bactericida de los antimicrobianos se pueden emplear tres métodos:

1. Cálculo de la concentración mínima bactericida (CMB),
2. Cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI)
3. La curva de letalidad y la actividad bactericida del suero.
4. Metodológicamente, en las pruebas de poder bactericida recomendamos la utilización de técnicas de macrodilución tal y como recoge el "Manual of Clinical Microbiology" de la Sociedad Americana de Microbiología.¹⁴²



Las pruebas de susceptibilidad son necesarias en aquellos grupos de bacterias que comunmente presentan resistencias. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o antibiograma, cuyo principal objetivo es evaluar la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciendo, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica.¹⁴¹⁻¹⁴²

7.7 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD BACTERIANA *IN VITRO*.

Es necesario conocer la sensibilidad *in vitro* de los diferentes antibióticos que se pueden utilizar en la erradicación de *H. pylori*, ya que la resistencia a los antimicrobianos se relaciona con un mayor fallo del tratamiento. *H. pylori* es sensible a un gran número de antibióticos *in vitro* aunque no son siempre útiles *in vivo*, debido a diversos factores como:¹⁴²

- El antibiótico no llega a las zonas profundas de la mucosa gástrica donde se encuentra *H. pylori*
- El antibiótico es inactivado por el pH ácido del estómago.
- Las condiciones en las que la bacteria se encuentra en el estómago, no son fácilmente reproducibles en el laboratorio.¹⁴¹⁻¹⁴³



7.8 MÉTODOS DE DIFUSIÓN.

7.8.1 MÉTODO DEL ANTIBIOGRAMA DISCO-PLACA.

Fundamento

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos.¹⁴³

El antibiograma disco-placa consiste en depositar en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos.¹⁴³

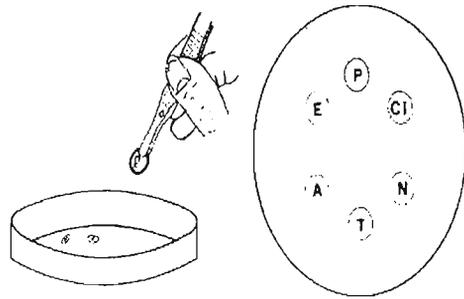


Fig. 12 Prueba de difusión con discos para determinar la sensibilidad bacteriana. Obtenida de NCCLS¹⁴¹⁻¹⁴²

Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar.^{32, 143} Como se observa en la figura 12. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo, los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI.¹⁴³



7.8.2 MÉTODO DEL EPSION TEST.

Fundamento

El principio de este método es una expansión de la técnica de difusión en disco. En el método E-test (AB Biodisk, Suecia) podemos, mediante lectura directa, determinar la concentración inhibitoria mínima (CMI).³²⁻¹⁴³

Consiste en una tira de plástico no poroso de 6 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones.¹⁴⁴

Tras la incubación de las placas, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. Como se puede ver claramente en la figura 13. Después de la incubación la CMI será el valor obtenido en el punto en el que el extremo de inhibición intersecciona con la tira.¹⁴⁴

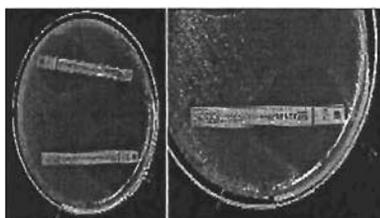


Fig. 13 Imagen de la técnica de expansión de difusión de disco. La imagen fue tomada del sitio web.¹⁴⁴

7.8.3 MÉTODOS DE DILUCIÓN.

La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar).¹⁴⁴⁻¹⁴⁵



Las técnicas de dilución en caldo y agar son utilizadas para medir semi-cuantitativamente la actividad in vitro de un agente antimicrobiano frente a un cultivo de una cepa bacteriana y permiten determinar la **Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)** que es la menor concentración de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

La reproducibilidad de estas pruebas es de ± 1 dilución y para evitar una gran variabilidad éstas deben ser estandarizadas y controladas muy cuidadosamente. Las pruebas de sensibilidad mediante dilución son muy útiles en: ¹⁴⁴⁻¹⁴⁵

- El estudio de nuevos agentes antimicrobianos.
- Confirmación de resistencia a aminoglucósidos determinada por pruebas de difusión en discos. ¹⁴⁴⁻¹⁴⁵

7.8.4 DILUCIÓN EN AGAR

En este método se incuba el microorganismo en una placa Petri con medio de cultivo solidificado sobre la que se añaden discos de papel impregnados con una cantidad conocida de antibiótico. ^{55, 146}

Después de la incubación se observan en la placa la presencia de zonas claras alrededor de los discos llamadas halos de inhibición. La ausencia de un halo significa que el microorganismo es resistente al antibiótico. ^{55, 146}

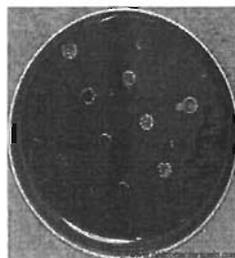


Fig. 16 Imagen cepa inoculada de *Helicobacter pylori*. Obtenida de pág. Web.¹⁴⁶



7.8.5 DILUCIÓN EN CALDO

En el método de dilución se utilizan una serie de tubos que contienen un medio de cultivo estéril y varias concentraciones de cada uno de los antibióticos que se van a ensayar. ^{143, 145}

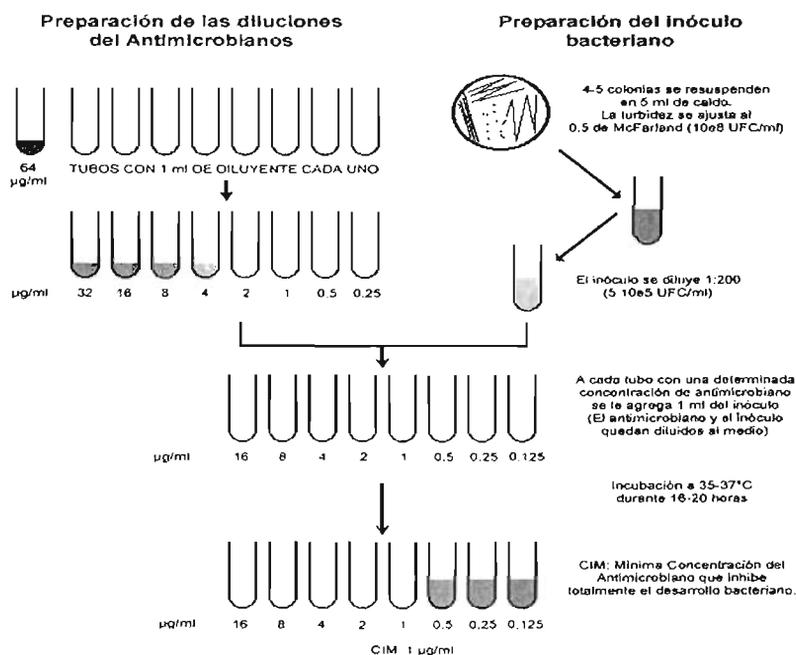


Fig.15 Preparación de las diluciones de los Antimicrobianos. Obtenida de la pág. Web¹⁴⁸

Todos los tubos se inoculan con el microorganismo que va a ser ensayado y se incuban a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo, como se observa en la **figura 15**. Se examinan los tubos para determinar en cuáles de ellos se ha inhibido el crecimiento del microorganismo. También se calcula la (CMI).¹⁴⁷



7.9 RESISTENCIA BACTERIANA

7.9.1 GENERALIDADES.

Cada antibiótico se caracteriza por un espectro natural de actividad antibacteriana. Este espectro comprende las especies bacterianas que, en su estado natural, sufren una inhibición de su crecimiento por concentraciones de su antibiótico susceptibles de ser alcanzadas *in vivo*. A estas especies bacterianas se les dice naturalmente sensibles a dicho antibiótico. Las especies bacterianas que no se encuentran incluidas dentro de dicho espectro se denominan naturalmente resistentes.¹⁵⁰

El antibiótico no crea resistencia, pero selecciona las bacterias resistentes eliminando las sensibles. Es lo que se conoce con el nombre de presión de selección. El aumento de la frecuencia de las cepas resistentes va unido casi siempre al uso intensivo del antibiótico en cuestión.¹⁵⁰

La **resistencia natural** es un carácter constante de todas las cepas de una misma especie bacteriana. El conocimiento de las resistencias naturales permite prever la inactividad de la molécula frente a bacterias identificadas (después del crecimiento) o sospechosas (en caso de antibioterapia empírica).¹⁵¹

La **resistencia adquirida** es una característica propia de ciertas cepas, dentro de una especie bacteriana naturalmente sensible, cuyo patrimonio genético ha sido modificado por mutación o adquisición de genes. Contrariamente a las resistencias naturales, las resistencias adquiridas son evolutivas, y su frecuencia depende a menudo de la utilización de los antibióticos.¹⁵¹



Una **resistencia cruzada** es cuando se debe a un mismo mecanismo de resistencia. En general, afecta a varios antibióticos dentro de una misma familia (Ejemplo: La resistencia a la oxacilina en los estafilococos se cruza con todas los β -lactámicos).¹⁵¹

Una **resistencia asociada** es cuando afecta a varios antibióticos de familias diferentes. En general, se debe a la asociación de varios mecanismos de resistencia (Ejemplo: La resistencia de los estafilococos a la oxacilina va frecuentemente asociada a las quinolonas, aminoglicósidos, macrolidos y ciclinas).¹⁵¹

7.9.2 MECANISMOS DE LA RESISTENCIA ADQUIRIDA

La definición clínica de un microorganismo resistente, a diferencia de uno sensible, está asociada con la habilidad que tenga un antimicrobiano de ser efectivo en el tratamiento de una infección específica.¹⁵²

- Alteración del sitio blanco.
- Alteraciones en la permeabilidad o transporte.
- Inactivación del antibiótico.
- Alteración del sitio blanco

El **mecanismo genético** de adquisición de una resistencia puede ser:

- La mutación de un gen implicado en el modo de acción de un antibiótico: Este mecanismo afecta preferentemente a ciertos antibióticos: quinolonas, rifampicina, ácido fusídico, fosfomicina, antituberculosos y a veces cefalosporinas.¹⁵²



- La adquisición de genes de resistencia transferidos a partir de una cepa perteneciente a una especie idéntica o diferente: Ciertos Antibióticos están particularmente afectados por este mecanismo: β -lactámicos, aminoglicósidos, tetraciclinas; cloranfenicol, sulfamidas.¹⁵²

El **mecanismo bioquímico** de la resistencia puede ser:

- Una producción por la bacteria de enzimas que inactivan el antibiótico.
- Una modificación del blanco del antibiótico.¹⁵²

7.9.3 TERAPIA CON COMBINACIONES DE ANTIMICROBIANOS.

El tratamiento con varios antimicrobianos simultáneamente es, en ocasiones, necesario por varias razones que pueden clasificarse en 5 grupos:¹⁵³

1. Garantizar cobertura de amplio espectro en simulaciones clínicas donde se desconoce el agente causal.
2. Tratamiento de las infecciones polimicrobianas.
3. Prevención de la resistencia antimicrobiana.
4. Tratar de reducir la toxicidad de determinado fármaco.
5. Obtener sinergismo antibacteriano.

Cuando el objetivo que se persigue es proporcionar una cobertura de amplio espectro y se conoce el agente causal, es necesario además de la experiencia clínica, conocer la ecología microbiana, el espectro de actividad de los diferentes antimicrobianos que pueden usarse, el mecanismo de acción, efectos tóxicos y costos.¹⁵⁴



Las siguientes leyes de Jawetz nos indican el efecto de la utilización conjunta de dos antimicrobianos:

- **SINERGISMO** (Bactericida + Bactericida): El resultado terapéutico es superior a la suma de sus efectos aislados.
- **SUMA DE EFECTOS** (Bacteriostático + Bacteriostático): El resultado terapéutico es igual a la suma de sus efectos.
- **ANTAGONISMO** (Bactericida + Bacteriostático): El resultado terapéutico es inferior a la suma de sus efectos aislados.
- **INDIFERENCIA** Es cuando la presencia de un antibiótico no modifica la actividad del otro; es decir, actúa el más activo de los dos.¹⁵²⁻¹⁵³

Cuando se combinan antimicrobianos, el sinergismo puede lograrse por varios mecanismos:

- a. Por bloqueo de una vía metabólica microbiana por 2 o más fármacos.
- b. Por incremento de la captación de un fármaco a través de la pared celular se aumenta así el efecto bactericida global; algunos inhibidores de la síntesis de la pared celular (penicilinas, cefalosporinas) pueden aumentar la penetración de los aminoglucósidos y de esta manera producen sinergismo.
- c. Cuando a través de un segundo agente puede prevenirse la inactivación de un antimicrobiano por las enzimas bacterianas, también puede lograrse un efecto sinérgico; tal es el caso del ácido clavulánico y el sulbactam capaces de inhibir la producción de betalactamasas.¹⁵²⁻¹⁵³



7.9.4 METODOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE COMBINACIONES MEDICAMENTOSAS

Se han empleado métodos que permiten predecir la posible eficacia terapéutica de combinación de antimicrobianos, para así cuantificar sus efectos en la proliferación bacteriana *in vitro*.¹⁵⁵

Se utilizan dos métodos totalmente diferentes. Con el primero se usan diluciones seriadas "al doble" de los antimicrobianos en caldo de cultivo inoculado con un número fijo o estándar del microorganismo problema, en la forma "en tablero de damas" de manera que pueda valorarse simultáneamente una gran cifra de valores de antimicrobianos a concentraciones diferentes, el método mencionado señala si disminuyó la MIC de un fármaco. O si no cambio o aumentó en presencia de otro.¹⁵⁵

El segundo método para evaluar las combinaciones antimicrobianas entraña cuantificación de su velocidad o rapidez de acción bacteriana. El operador incuba simultáneamente cultivos idénticos y agrega los antimicrobianos sólo o en combinación.¹⁵⁶

7.9.5 ANALISIS DE LAS INTERACCIONES ANTIMICROBIANAS

Para evaluar la posibilidad de establecer la presencia y características de una interacción en base a los mecanismos de acción de los antimicrobianos que se asocian, sin embargo estos mecanismos son en muchas ocasiones desconocidos lo que invalida este tipo de evaluación.^{156-157.}



Por lo que es preferible evaluar las interacciones independientemente del mecanismo de acción y hacerlo en base a lo que es cuantificable, para ello se ha de construir un modelo empírico de interacción cero y las divergencias o desviaciones con respecto al mismo se definen como interacción. Para el estudio de las interacciones en cualquier combinación de dos antimicrobianos A y B hay cuatro parámetros revelantes que fluyen en su evaluación: ¹⁵⁷

- Dosis de cada uno de los componentes que por separados son equiefectivas con la combinación de DaA y DB.
- Dosis de cada uno de ellos, da y db utilizados en combinación.
- Efecto de los dos fármacos por separado, DA Y DB.
- Efecto de la combinación, E (da, db). ¹⁵⁸

De estos cuatro parámetros dos se refieren a las dosis y otros dos a los efectos que producen estas dosis. Dependiendo si se han relacionados los parámetros de dosis entre si a los de efectos entre si, han surgido diversos métodos de cálculos de interacciones.

En el primer caso, se relacionan entre si las dosis de los constituyentes de la combinación, da y db y las dosis de los agentes que individualmente producen el mismo efecto que la combinación, DA y DB, Esta relación dio lugar al método gráfico conocido como isobogramas.

En el segundo casos, cuando se relacionan los efectos entre sí, se comparan los efectos esperados (teóricos) y los observados (experimentales). En este sentido se han realizado diversas aproximaciones de las que han seguido varios métodos de calculos de



interacciones: el método por Choun y Chou, el método basado en la media del efecto de una dosis fija de uno de los componentes sobre la curva dosis-respuesta del otro y el método que utiliza el análisis de varianza.

La mayoría de los métodos de análisis descritos en la literatura, son relativamente sencillos desde un punto de vista matemático, los índices de interacción y los isobogramas (Fig. 18), son por su sencillez, los más utilizados en la practica, aunque dependiendo del diseño experimental otros métodos de análisis tales como los coeficientes de Hill y el análisis de varianza, tambien pueden ser considerados.¹⁵⁷⁻¹⁵⁸

7.9.6 ISOBOLOGRAMAS

Los Isobolos son representaciones gráficas en un eje de cordenadas de dosis-isoefectivas (para un determinado efecto) en cada uno de los antimicrobianos utilizados individualmente (AB) y de su combinación (ab) y son válidas sólo para el primer nivel de efecto determinado.¹⁵⁹

Permite evaluar si existe sinergia o antagonismo. En el isoblograma en cada uno de los ejes se representan la dosis isoefectiva de uno de los antimicrobianos que se estudian (DA) y (DB) respectivamente. Estos dos puntos se unen mediante una línea (isobolo) que también se conoce como línea de adictividad o de no interacción. A continuación se representa el valor de dosis de la combinación de ambos (da, db) que es isoefectiva con las dosis individuales de los antimicrobianos.¹⁵⁹⁻¹⁶⁰



Los efectos se expresan en isóbolos y en índices de **concentración inhibitoria fraccionada (FIC)**, tambien se conoce como **Cálculo del coeficiente de sinergismo (CS)**, el índice FIC o CS es igual a la suma de los valores de FIC correspondientes a cada Antimicrobiano. ¹⁶⁰⁻¹⁶¹

Los resultados de la MIC en la combinación de concentraciones de las sustancias de ensayo servirán para calcular posteriormente el coeficiente de sinergismo (CS) y determinar si el efecto es sinérgico (S), indiferente (I) o antagonico (A) mediante la siguiente fórmula: ¹⁶¹⁻¹⁶²

$$\text{FIC} = \frac{(\text{MIC A+B})}{(\text{MIC A})} + \frac{(\text{MIC B+A})}{(\text{MIC B})}$$

- ❖ Donde: A + B es la menor concentración de A en presencia de B que produce inhibición del crecimiento.
- ❖ B + A es la concentración de B junto a A que produce dicha inhibición.
- ❖ A y B son las mínimas concentraciones de cada producto solo que inhiben el crecimiento.

Si: $\text{FIC} < 0.5$ existe sinergismo

$0.5 < \text{FIC} < 2$ existe indiferencia o adición

$\text{FIC} > 2$ existe antagonismo

Cuando los agentes no interaccionan (interaccion cero) los puntos que representan las dosis isoeffectivas de la combinación estan situados sobre el isobolo formando una línea recta. ¹⁵⁹⁻¹⁶²



Cada uno de los puntos de esta línea representa una combinación de A y B en la que la sustancia se comporta de modo aditivo, es decir, no se produce interacción. La ecuación se define es la siguiente: ¹⁵⁹⁻¹⁶³ (figura 16)

$$\text{Ecuación 1.- } da/DA + db/DB=1^{163}$$

Cuando la combinación es más efectiva de lo que se espera se requiere menos cantidades de da o db para producir el mismo efecto, mientras que DA y DB permanecieran inalteradas, con lo que la ecuación se transforma en una desigualdad y define un isoblograma cóncavo (sinergia), (Fig. 16) ¹⁵⁹⁻¹⁶³

La ecuación se define:

$$\text{Ecuación 2.- } da/DA + db/DB < 1^{163}$$

Por otra parte, cuando los agentes de combinación son menos efectivos que lo esperado da y/o db deberían ser incrementadas con el fin de obtener el mismo efecto (antagonismo). La ecuación en este caso describe un isobolo convexo. (Fig. 16). ¹⁵⁹⁻¹⁶³

$$\text{Ecuación 3. - } da/DA + db/DB > 1^{163}$$

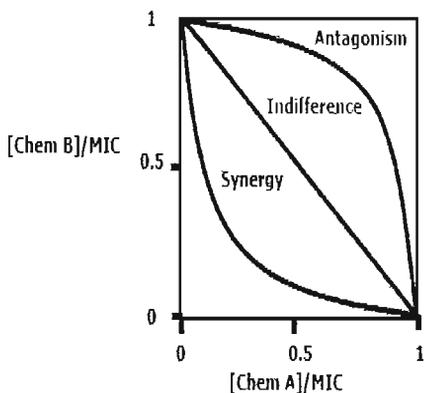


Fig. 16 Representación isobolográfica e interacción química. La línea diagonal (roja) indica indiferencia, los puntos en los isobolos concavos de color rojo indican interacción sinérgica, y los puntos en los isóbolos convexos de color verde representan antagonismo. Obtenida de la página web ¹⁶⁴

Posteriormente se ha demostrado que el isobolograma es un método validado para analizar interacciones entre agentes, independientemente de la naturaleza de sus mecanismos de acción o del tipo de curva de dosis-respuesta. Como se observa la figura 16. ¹⁶³

7.10 CARBAMATOS

Los carbamatos son compuestos orgánicos que poseen una estrecha relación funcional con los carbonatos. Normalmente se trata de la monoamina del ácido carbónico, que se descarboxila espontáneamente. Como se muestra en la figura 17. ³²

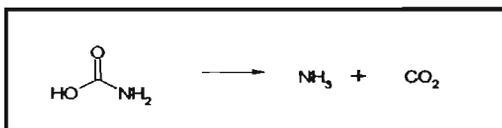


Figura 17. Descarboxilación de la monoamina del ácido carbónico.



Los derivados del ácido carbámico, llamados también carbamatos son compuestos sólidos y estables a temperatura ambiente, cuya estructura general es la mostrada en la Fig. 18 donde R1, R2 y R3, pueden ser un alquilo o un arilo.

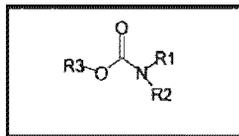


Figura 18. Estructura general de los carbamatos.

Los carbamatos han tenido importancia desde los años 50 como insecticidas, funguicidas y nematocidas; además, actualmente algunos son usados como pesticidas y productos farmacéuticos en combinación con otros compuestos.

En algunas investigaciones realizadas, los N-fenilcarbamatos con diferentes sustituyentes en el anillo bencénico y en el éster presentaron actividad antifúngica. Estudios realizados por este grupo de investigación en diferentes Instituciones Públicas en México, han mostrado que los compuestos poseen una actividad antiparasitaria de 85% al 95%, también se realizaron estudios de susceptibilidad de *Giardia lamblia*, *Helicobacter pylori* y de 13 géneros de bacterias Gram negativas ante derivados del ácido carbámico encontrándose actividad inhibitoria del crecimiento de estos microorganismos.³²



7.11 PROPIEDADES QUIMICAS-FISICAS DE LOS ANTIBIOTICOS

7.11.1 METRONIDAZOL

Descripción: Cristales o polvo cristalino blancos o amarillo claro; inodoro, estable al aire atmosférico, pero se oscurece al ponerse a la luz, se funde entre 159 y 163°C.

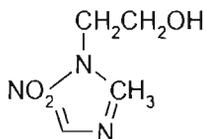
Solubilidad. Poco soluble en agua, alcohol o cloroformo, algo soluble en éter, soluble en dimetilsulfoxido.

Clasificación: Quimioterapico (antiparasitario y antibacteriano), que interactúa según el potencial redox de las bacterias anaerobias.

Indicaciones: infecciones por anaerobios, incluyendo bacterias multirresistentes como el *Bacteroides fragilis*, y el *Clostridium difficile*. El espectro antiparasitario incluye amebas, tricomonas y giardias.

Mecanismo de acción: Experimentan procesos de reducción en condiciones de anaerobiosis, transformándose en productos tóxicos para el ADN del microorganismo. Efecto bactericida.

Espectro antimicrobiano: Anaerobios (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*), *Helicobacter pylori* y protozoos (*Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia*). **Indicaciones:** El metronidazol es un antimicrobiano bactericida con actividad exclusiva frente a bacterias anaerobias. Su estructura química se observa en la figura 22. ¹⁶⁵



2-Metil-5nitromidazol-1-etanol

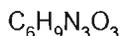
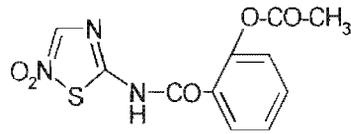


Fig.19 Estructura química de Metronidazol.

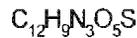


7.11.2 NITAZOXAMIDA.

Descripción: Alinia para la suspensión oral contiene el ingrediente activo, nitazoxanide, agente del antiprotozoario sintético. Nitazoxanide es un polvo del cristalino amarillo ligero. Se observa la estructura química en la figura 23.



2-acetyloxy-N - (5-nitro-2-thiazolyl) benzamide.



Solubilidad: Es pobremente soluble en etanol y prácticamente insoluble en agua.

Fig.20 Estructura química de Nitazoxamida.

Absorción; La administración oral siguiente de nitazoxanide para la suspensión oral, se observan concentraciones de plasma de máximo del tizoxanide del metabolites activo y glucuronide del tizoxanide dentro de 1-4 horas. El nitazoxanide del padre no se descubre en plasma.

Actividad in vitro y in vivo Nitazoxanide y sus metabolite, tizoxanide, son activos en vitro inhibiendo el crecimiento de:

1. El *sporozoites* y *oocysts de parvum de Cryptosporidium* y
2. El *trophozoites de lamblia de Giardia*.¹⁶⁶



7.11.3 AMOXICILINA

Descripcion: Polvo cristalino fino blanco a blanquecino; sabor amargo, la humedad elevada y la temperatura mayor de 37°C merman su estabilidad.

Solubilidad: Un gramo en 370 ml de agua o 2 ml de alcohol.

Soluble en dimetilsulfóxido.

Indicaciones: antibiótico utilizado para tratar infecciones. Tiene muchas indicaciones, entre ellas el tratamiento de infecciones respiratorias, del oído, de la piel, urinario, genital y gonorrea. La amoxicilina actúa impidiendo a las bacterias invasoras multiplicarse dentro del organismo. ¹⁶⁷

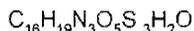
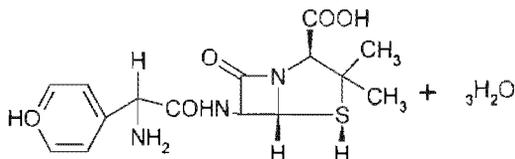


Fig. 21 Estructura química de Amoxicilina.



8. JUSTIFICACIÓN

La infección por *H. pylori* se encuentra distribuida en todo el mundo, como lo han demostrado estudios epidemiológicos, se presenta tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo, sin embargo estos últimos además de existir una mayor prevalencia la infección se adquiere a edad temprana.

En México, los problemas de desnutrición en gran parte de la población infantil son por todos conocidos, si esto se suma al hecho de que las alteraciones digestivas provocadas por *H. pylori* disminuyen la asimilación de los alimentos por parte del individuo, se esta hablando de problemas serios que causaría alteración en el desarrollo del niño.

Al existir esta problemática se realiza la investigación y la evaluación *in vitro* sobre compuestos con potencial antimicrobiano como los derivados del ácido carbámico para definir si estos pueden ser utilizados en el control y erradicar la infección gástrica causada por *H. pylori*.

9. HIPÓTESIS

Si los derivados del ácido carbámico poseen actividad potencialmente antimicrobianas entonces inhibirán el crecimiento de *Helicobacter pylori* en estudios *in vitro*.



CAPÍTULO 2.- OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- ❖ Evaluar la actividad antimicrobiana de los derivados del ácido carbámico contra *Helicobacter pylori*.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ❖ Determinar la actividad inhibitoria (MIC) de productos químicos experimentales derivados del ácido carbámico en proceso de patente mediante el uso del método de microdilución en caldo para el diseño y desarrollo de nuevos antimicrobianos.
- ❖ Realizar combinaciones antimicrobianas con metronidazol, nitazoxamida, amoxicilina y con los derivados del ácido carbámico para evaluar el sinergismo, antagonismo, suma de efectos o indiferencia bacteriana para el tratamiento infeccioso contra *Helicobacter pylori*.



CAPÍTULO 3.-METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 CEPAS Y MEDIO DE CULTIVO

- a) Se utilizó una Cepa de *Helicobacter pylori* ATCC 43504.
- b) La bacteria fue identificada realizando tinción de Gram y las pruebas bioquímicas de oxidasa, catalasa y ureasa.
- c) Se cultivo en agar Casman (Bioxon) suplementado con 5 % de sangre desfibrinada de caballo se la adiciona antibiótico Campylobacter Antimicrobic Suplemento incubando a 37°C bajo condiciones microaerofilicas utilizando para ello sobres generadores de CO₂ (Oxoid SR7), durante cinco días.
- d) Su crecimiento de *Helicobacter pylori* se realizó en caldo brucella (Bioxon) suplementado con 10% de suero de caballo estéril y 30% de glicerol.
- e) Los derivados del ácido carbámico utilizados contra *Helicobacter pylori* en este proyecto fueron proporcionados por el Laboratorio de Química Medicinal de La Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1, UNAM, a cargo del Dr. Enrique Angeles Anguiano. Los compuestos evaluados son: LQM 932, LQM 933, LQM 934, LQM 935, LQM 936, LQM 937, LQM 938.

3.2 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Todos los compuestos que se analizaron en este proyecto se encuentran mencionados en la Tabla 2. Se les realizaron pruebas cualitativas de solubilidad utilizando como disolventes Dimetilsulfóxido (DMSO), Acetona (ACT), Metanol (MeOH) y Agua.



Tabla 2. Prueba de solubilidad a los Antimicrobianos de Control

Nombre de los Antimicrobianos	DMSO	ACT	MeOH	H ₂ O
Metronidazol Proveedor:El fuerte SA de Cv Lote:030105				
Amoxicilina Proveedor: SIGMA Lote: 112K0481				
Nitazoxamida Proveedor: Nutrer SA de CV Lote : 2002052901				
Carbamatos				

INTERPRETACIÓN

++ Muy soluble

- Insoluble

+Poco soluble

3.3 PRUEBAS DE IDENTIFICACION DEL MICRROORGANISMO.

3.3.1 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE *Helicobacter pylori*.

- f) La cepa control de *Helicobacter pylori* ATCC 43504 se le realizaron las pruebas bioquímicas las cuales estan mencionadas en la tabla 3., para su verificación. La metodología experimental que se realizó en esta tesis se encuentra resumida en la Figura 24. Así como el material y reactivos empleados esta descrita en el anexo 1.



Prueba Bioquímica ⁸⁹	Resultado
Tinción de Gram	Bacilo curvo gram negativo
Oxidasa	Positiva
Ureasa	Positiva
Catalasa	Positiva

Tabla 3. Pruebas bioquímicas de *Helicobacter pylori*.

El medio de cultivo empleado fue agar casman (Bioxon) el cual fué enriquecido con 5% de sangre desfibrinada de caballo y con 1% de antibiótico Campylobacter. Se esterilizó el medio de cultivo a 121 Lb durante 15 minutos, se vació el medio de cultivo en cajas petri estériles, las cuales fueron sometieron a prueba de esterilidad durante 24 horas. Finalmente se almacenaron a 4 °C y se utilizaron dentro de los 3 días siguientes a su preparación.

Posteriormente con una micropipeta se tomo 5 µl de la cepa control de *Helicobacter pylori* ATCC 43504, con el asa esteril se realizó un sembrado masivo. Las placas fueron incubadas bajo condiciones de anaerobiosis, en una Jarra (Gas Pak) empleando para ello sobres generadores de CO₂ (Oxoid SR7), durante 5 días a temperatura de 37°C. Después de transcurrir el tiempo se realizó la identificación con las pruebas bioquímicas ver tabla 3.

BACTERIA	TIEMPO DE INCUBACIÓN	TEMPERATURA DE INCUBACIÓN
<i>H. pylori</i>	5 a 7 días	35-37°C

Tabla 4. Condiciones optimas de crecimiento para *H. pylori*.

3.4 PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA



3.4.1 MÉTODO DE DILUCIÓN

Dilución de caldo

En relación con los métodos para estudiar la sensibilidad de las bacterias anaerobias a los antimicrobianos, se han publicado muchas revisiones y hay unas recomendaciones del NCCLS aprobado, desde 1990, y revisado en 1997 (Documento M11-A4).

El NCCLS recomienda para la mayoría de los microorganismos utilizar caldo Mueller-Hinton, al que se añadirán los suplementos necesarios para asegurar el crecimiento de organismos exigentes. Pero en la parte experimental se utilizó como medio de cultivo para preparar el inóculo fue el Caldo Brucella, el cual contiene 30% de glicerina.^{143, 145.}

3.4.2 MICRODILUCIÓN EN CALDO PARA BACTERIAS ANAEROBIAS

El medio de cultivo para el crecimiento de *H. pylori*:

Para el crecimiento de *H. pylori* el medio que se utilizó fue el agar casman el cual se suplementó con 5% de sangre de caballo desfibrinada y 1% de Campylobacter. Se esterilizó el medio de cultivo a 121 Lb durante 15 minutos, se vació el medio de cultivo en cajas petri estériles, las cuales fueron sometieron a prueba de esterilidad durante 24 horas. Finalmente se almacenaron a 4 °C y se utilizaron dentro de los 3 días siguientes a su preparación.³²



La preparación de las placas con antimicrobiano se realiza de acuerdo con el procedimiento estándar de dilución en agar (NCCLS, 1993 Methods for antimicrobial testing of anaerobic bacteria, 2nd ed., publication M11-A3.)^{32, 169}

El medio de cultivo para preparar el inóculo

Caldo Brucella, enriquecido con 10% de Suero de caballo estéril y 30% de glicerina. Se esterilizó el medio de cultivo a 121 Lb durante 15 minutos, se vació el medio de cultivo en tubos de vidrio con rosca estériles, las cuales fueron sometieron a prueba de esterilidad durante 24 horas.

Finalmente se almacenaron a 4 °C y se utilizaron dentro de los 3 días siguientes a su preparación.^{32, 170}

Preparación de diluciones del agente antimicrobiano.

Para la preparación y conservación de las diluciones antimicrobianos y los ácidos carbámicos, se utilizaron viales estériles con tapón de rosca. Se pesaron 38.4 mg \pm 0.4 mg del antimicrobiano o carbamato en una balanza analítica, y se le disolverá en 3 ml de Dimetilsulfoxido (DMSO).

Se prepararon una serie de diluciones cuyo rango fue de 128 a 0.25 μ g/ ml, partiendo de un *stock* de 12800 μ g/ml. Las series de concentraciones fueron preparadas primero en DMSO.^{32,170-172.}



Para preparar 5 mL de la dilución de agente antimicrobiano, primero se tomaron 4.9 ml de medio Brucella y se colocaron en cada uno de los tubos estériles, después usando una micropipeta se colocó 0.1 ml de DMSO sin agente antimicrobiano (control positivo); después se tomo 0.1 mL de la concentración más baja en DMSO y se colocó en el siguiente tubo con medio, y se repite el procedimiento para cada una de las concentraciones siguientes en DMSO. Tabla 5.^{32,170-172.}

Tabla 5. Preparación de la serie de diluciones del agente antimicrobiano.

SOLUCIÓN ANTIMICROBIANA						
Paso	Conc. (µg/ml)	Fuente	Vol. (ml)	Solvente (DMSO) ml	Conc. intermedia (µg/ml)	Conc. final 1:50 (µg/ml)+
1	12800	stock			12800	256
2	12800	stock	0.5	0.5	6400	128
3	12800	stock	0.5	1.5	3200	64
4	12800	stock	0.5	3.5	1600	32
5	1600	Paso4	0.5	0.5	800	16
6	1600	Paso 4	0.5	1.5	400	8
7	1600	Paso 4	0.5	3.5	200	4
8	200	Paso 7	0.5	0.5	100	2
9	200	Paso 7	0.5	1.5	50	1
10	200	Paso 7	0.5	3.5	25	0.5
11	25	Paso 10	0.5	0.5	12.5	0.25
12	25	Paso 10	0.5	1.5	6.25	0.125
13	25	Paso 10	0.5	3.5	3.13	0.0625

+ Concentración 2 x



Preparación del inóculo

Después del crecimiento de *Helicobacter pylori* el cual se cultivó en un en agar casman tras 5 días de incubación en anaerobiosis. Se realizaron las pruebas bioquímicas (para su identificación y morfología). Se tomarón, con un asa de siembra, porciones de unas 5 colonias. Estas colonias se inocularon en el caldo brucella incubandose durante 72 h, incubandose bajo las condiciones de anaerobiosis, empleando una Jarra (Gas Pak) durante 3 días a temperatura de 37 °C, hasta que se observa turbidez.

Se preparó una suspensión bacteriana con solución fisiológica estéril (SSF), fue leida a una longitud de onda de 540 nm (suspensión stock) y ajustada a la turbidez visual comparable al estándar del tubo 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland (1×10^8 UFC/ml). Del inóculo stock del microorganismo se realizó una dilución de 1:50 en el medio Caldo Brucella, la cual fue utilizada para la prueba de susceptibilidad en microplacas.^{32,170-172.}

Inocular microplacas

Se trabajó en condiciones estrictamente estériles. Se tomó 0.1 ml de cada dilución de principio activo, con una micro pipeta y diferente puntilla previamente estéril.

Se colocó en cada uno de los posillos en forma ascendente (de la menor a la mayor concentración).^{32,170-172.}



1. Para los pocillos A, B, C y D de la fila 1, se colocarán 0.1 ml de caldo Brucella para el **control positivo**.
2. Para los pocillos E, F, G y H de la fila 1, se colocarán 0.1 ml de la solución blanco de caldo Brucella con DMSO, para el **control positivo**.
3. Para los pocillos A, B, C y D de la fila 12, se colocaron 0.2 ml de Caldo Brucella para el **control negativo**. (Fig. 25)
4. Para los pocillos E, F, G y H de la fila 12, se colocaron 0.1 ml de la solución del Agente Antimicrobiano de Referencia disuelto con DMSO en Caldo Brucella para el **control negativo**. (Fig. 25)
5. Al finalizar de colocar las diluciones de principio activo, se procede a colocar 0.1 ml del inóculo previamente estandarizado, excepto en los pocillos A, B, C y D de la fila 12. (Fig. 25)
6. Finalmente se taparon la microplaca y se incubaron a 37 °C verificando el crecimiento constante hasta que se observe considerablemente la diferencia en la turbidez (entre 72 horas).
7. Las lecturas de las placas se realizaron en el Detector de ELISA (TECAN, GENios) el cual mide la absorbancia del contenido de los micropozos.

Incubación

Todas las microdiluciones fueron incubadas a 37°C durante 72 horas.

Lectura de resultados.

Para facilitar la lectura del crecimiento en cada pozo, se realizó una comparación de cada uno de ellos con el crecimiento del pozo control positivo.^{32,170-172.}

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

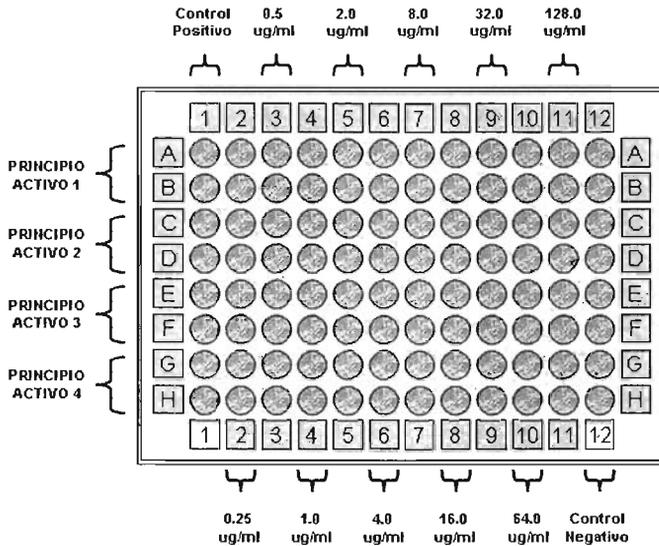


Fig. 22 Esquema del llenado de los pocillos de las microplacas con los antimicrobianos y carbamatos disueltos en Caldo Brucella.

Criterio de lectura		
Crecimiento abundante	++++	100% de crecimiento
Ligera disminución de crecimiento	+++	75% de crecimiento
Prominente reducción de crecimiento	++	50% de crecimiento
Ligero crecimiento	+	25% de crecimiento
Total ausencia de crecimiento	-	0% de crecimiento

Tabla 6. Criterios de Lecturas para evaluar el crecimiento de *H. pylori*.



3.4.3 COMBINACIÓN ANTIMICROBIANA Y DE LOS CARBAMATOS

Procedimiento.

Una vez obtenidas las respectivas MICs de los derivados del ácido carbámico se procedió a realizar una combinación con el compuesto de referencia para *H. pylori* mediante la adaptación de la técnica del Tablero de Damas. Las diluciones se realizaron con DMSO y el medio empleado fue el Caldo Brucella, obteniéndose un volumen final para cada pozo de 200 μL ; 100 μL de la dilución de antimicrobiano (50 μL de cada compuesto) y 100 μL del la "suspensión de *H. pylori* ajustada" para cada microorganismo a ser probado. ^{159-163. 169-174}

Calcular el índice de concentración inhibitoria fraccionada (FIC).

Solo se tomaron las MICs de los compuestos que habían presentado mayor actividad antimicrobiana. Todas las microdiluciones fueron incubadas a 37°C durante 72 horas.

Los resultados de la CMI en la combinación de concentraciones de los antimicrobianos de ensayo servirán para calcular el índice de concentración inhibitoria fraccionada (FIC), con la siguiente formula:

$$\text{FIC} = \frac{(\text{MIC A+B}) + (\text{MIC B+A})}{(\text{MIC A}) + (\text{MIC B})}$$



- ❖ Donde: A + B es la menor concentración de A en presencia de B que produce inhibición del crecimiento.
- ❖ B + A es la concentración de B junto a A que produce dicha inhibición.
- ❖ A y B son las mínimas concentraciones de cada producto solo que inhiben el crecimiento. ¹⁵⁹⁻¹⁶⁴

Si: $FIC < 0.5$ existe sinergismo
 $0.5 < FIC < 2$ existe indiferencia o adición
 $FIC > 2$ existe antagonismo

Construcción de Isobogramas

Para evaluar las combinaciones antimicrobianas es necesario calcular el FIC el cual se describió con anterioridad obteniendo los valores se prosigue a graficar por medio de Isobograma ver en la fig.23 donde cada uno de los ejes se representan la dosis isoeffectiva de uno de los antimicrobianos que se estudian.

Por medio de este método de análisis se evaluó si existe sinergia, antagonismo e indiferencia de acuerdo a la forma que presente el isobolo indicará tal efecto. Ver Tabla 7. ¹⁶⁴

Evaluacion de la actividad antimicrobiana	
SINERGISMO (Bactericida + Bactericida)	S
ANTAGONISMO (Bactericida + Bacteriostático)	A
INDIFERENCIA	I

Tabla 7. Evaluación del espectro de actividad de los diferentes antimicrobianos y carbamatos.

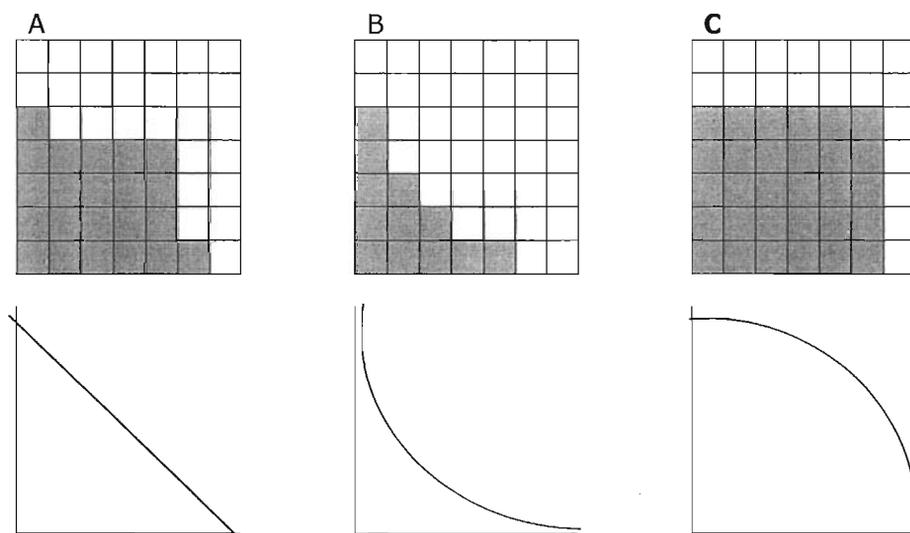


Fig. 23 Representación isobolográfica de combinación antimicrobiana, el Isobolograma A indica el efecto de adición, el isobolograma B muestra el efecto sinérgico y el isobolograma C representa el efecto antagónico. Obtenida de Goodman & Gilman, Las bases Farmacológicas de la Terapéutica "Terapéutica con Combinaciones Medicamentosas."¹⁵⁵

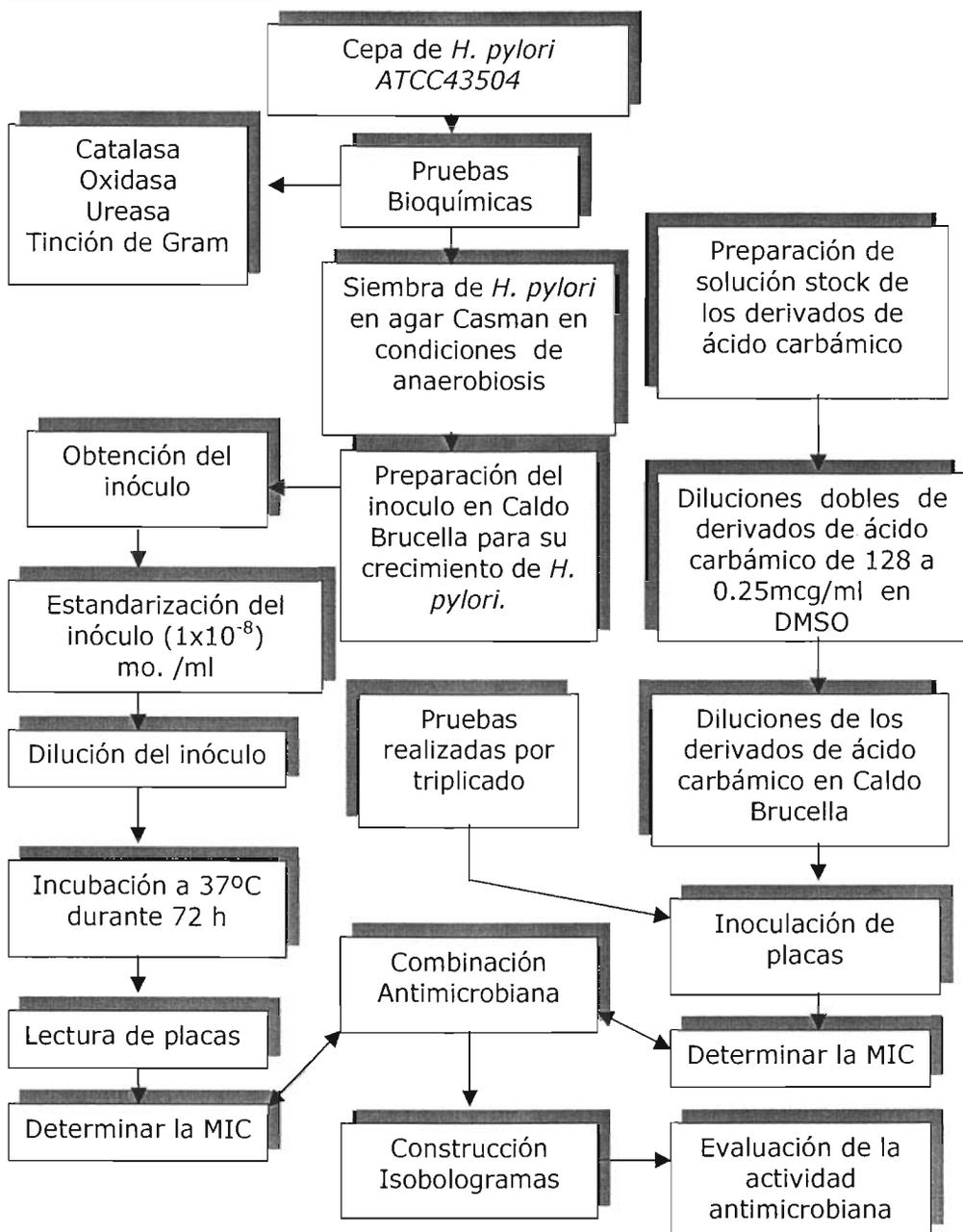


Fig. 24 Diagrama de flujo sobre la metodología experimental.



CAPÍTULO 4.- RESULTADOS

4.1 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

La prueba de solubilidad realizadas a los antimicrobianos control y los derivados del ácido carbámico se observa en la tabla número 8 que la mayoría de los compuestos son muy solubles en Dimetilsulfóxido (DMSO), poco soluble en acetona y ligeramente soluble en agua. La solubilidad se expresa como: ^{32,170-172}.

- ❖ Muy soluble (++)
- ❖ Soluble (+)
- ❖ Insoluble (-)

COMPUESTO	DMSO	ACETONA	METANOL	AGUA
Metronidazol	++	++	+	+
Amoxicilina	++	++	+	-
Nitazoxamida	++	++	+	-
LQM 932	++	++	+	-
LQM 933	++	++	+	-
LQM 934	++	++	+	-
LQM 935	++	++	+	-
LQM 936	++	++	+	-
LQM 937	++	++	+	-
LQM 938	++	++	+	-

Tabla 8. Prueba de solubilidad de los principios activos y compuestos derivados del ácido carbámico.

Con estos datos se eligió el disolvente ideal para cada compuesto el cual es el dimetilsulfóxido, el cual se utilizó para la preparación de diluciones en caldo en la prueba de microdilución en caldo para bacterias anaerobias.



4.2 IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO.

Después de 5 días de incubación a 37°C se examinaron las placas control de crecimiento y se realizaron las lecturas de las placas problemas en cada método.

Las primeras pruebas para la identificación de *H. pylori* fue la morfología colonial (colonias pequeñas translúcidas brillantes con una elevación convexa y borde entero) mediante las pruebas bioquímicas; donde catalasa, oxidasa y ureasa rápida son positivas y por tinción de Gram, cuando *H. pylori* crece en medios de cultivo pierde su estructura completamente espiral y adquiere una estructura algo más recta sigue siendo curvo. Se observa de color rosa debido a su estructura de bacilo Gram negativo. ^{32,170-172.}

Tabla. 9 Resultados de Identificación y pruebas bioquímicas de *H. pylori*.

PRUEBA BIOQUÍMICA ⁸⁹	RESULTADO
Morfología ^{32,89}	Colonias pequeñas translúcidas brillantes con una elevación convexa y borde entero
Tinción de Gram ^{32,89}	Bacilo curvo gram negativo
Oxidasa ^{32,89}	Positiva
Ureasa ^{32,89}	Positiva
Catalasa ^{32,89}	Positiva



4.3 PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.

Microdilución en caldo

En este método se considera la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano para determinar la Concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada compuesto contra *H. pylori*.^{32,168-173.}

Suspensión bacteriana.

El inóculo stock presentó una concentración bacteriana viable de (1×10^8 - 2×10^8) para *H. pylori*.^{32,168-173.}

Compuestos control

Se encontraron las respectivas MICs de los antibioticos de control utilizados en la experimentación (Amoxicilina, Metronidazol y Nitazoxamida) contra *H. pylori* ATCC 43504, por ensayos de susceptibilidad por sextuplicado que abarcaron concentraciones de 0.25 mcg/ml a 128 mcg/ml. Los resultados de las MICs de los antibióticos control se resumen en la Tabla 10.³²

Tabla 10. Resultados de las MICs de los Antibioticos Controles.

ANTIMICROBIANOS	(µg/ml)	
	MIC RANGOS DE REFERENCIA ⁽¹⁷⁵⁻¹⁷⁶⁾	MIC RANGOS EXPERIMENTAL
Amoxicilina	0.01-8	2
Metronidazol	0.25->32	2
Nitazoxamida	0.25-8	8



Resultados obtenidos para *H. pylori*.

Los resultados de la CMI contra m.o. de los derivados del ácido carbámico se resumen en la Tabla. 11 el cual de un total de 7 derivados del ácido carbámico, sólo tres compuestos presentaron actividad antibacteriana por el método de microdilución ante *H. pylori*; siendo el LQM 932, LQM 933 y LQM 938 como los más activos.

Conc. µg / mL	Derivados del ácido carbámico LQM						
	932	933	934	935	936	937	938
128	-	-	++++	++++	++++	+++	-
64	-	-	++++	++++	++++	+++	-
32	-	-	++++	++++	+++	+++	-
16	-	-	+++	++++	+++	+++	-
8	-	-	+++	++++	+++	+++	+++
4	-	+++	++++	++++	+++	++++	+++
2	-	++++	++++	+++	+++	++++	++++
1	-	++++	++++	++++	+++	++++	++++
0.5	-	++++	++++	++++	+++	++++	++++
0.25	+++	++++	++++	++++	+++	++++	++++

INTERPRETACIÓN

- ++++ indica crecimiento abundante (100% de crecimiento),
- +++ indica ligera disminución de crecimiento (75%),
- ++ indica prominente reducción de crecimiento (50%),
- + indica ligero crecimiento (25%) y
- indica total ausencia de crecimiento (0%).

Tabla 11. Susceptibilidad a derivados de ácido carbámico de *H. pylori*.



Se obtuvieron las MICs de los compuestos en investigación, que presentaron inhibición del crecimiento en la prueba de susceptibilidad a los derivados del ácido carbámico de *H. pylori*, que se muestra en la Figura 28.

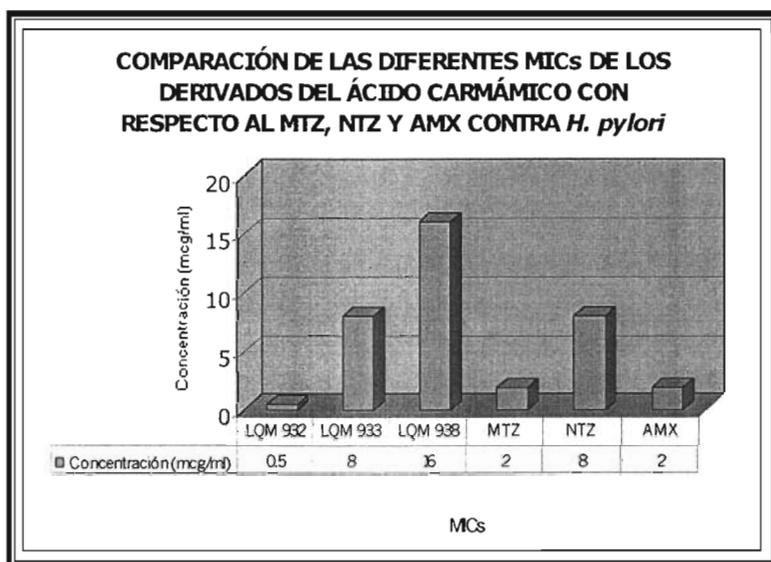


Fig. 25 MICs De los derivados del ácido carbámico para *H. pylori*.

4.4 COMBINACIÓN ANTIMICROBIANA.

La actividad de las diluciones cruzadas de los compuestos en estudio derivados de ácido carbámico con Metronidazol (MTZ), Nitazoxamida (NTZ) y Amoxicilina (AMX) se muestra en la tabla 12-14.



Tabla 12. Inhibición del Crecimiento de *H. pylori* ante la presencia de las diluciones cruzadas del LQM 932

LQM 932 $\mu\text{g/mL}$	2	++	++	-	-	-	-
	1	++	++	-	-	-	-
	0.5	++	-	-	-	-	-
	0.25	++	++	-	-	-	-
	0.125	+++	++	-	-	-	-
	0	++++	+++	+++	++	++	++
		0	0.5	1	2	4	6
		METRONIDAZOL $\mu\text{g/mL}$					

LQM 93 $\mu\text{g/mL}$	2	++	-	++	++	++	++
	1	-	++	-	++	++	++
	0.5	-	++	++	-	++	++
	0.25	+	++	++	-	++	++
	0.125	+	+	+	+	-	-
	0	++++	+++	+++	-	+++	++
		0	2	4	8	16	32
		NITAZOXAMIDA $\mu\text{g/mL}$					

LQM 932 $\mu\text{g/mL}$	2	+++	+++	-	-	-	-
	1	+++	+++	-	-	-	-
	0.5	+++	+++	-	-	-	-
	0.25	+++	+++	-	-	-	-
	0.125	+++	-	-	-	-	-
	0	++++	+++	+++	+++	+++	++
		0	0.5	1	2	4	6
		AMOXICILINA $\mu\text{g/mL}$					

++++ indica crecimiento abundante (100% de crecimiento),

+++ indica ligera disminución de crecimiento (75%),

++ indica prominente reducción de crecimiento (50%),

+ indica ligero crecimiento (25%) y

-indica total ausencia de crecimiento (0%).



Tabla 13. Inhibición del Crecimiento de *H. pylori* ante la presencia de las diluciones cruzadas del LQM 933

LQM 933 µg/mL	32	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	16	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	8	++	++	++	++	+	+
	4	++	++	++	++	++	++
	2	+++	+++	+++	++	+++	+++
	0	++++	+++	++	-	++	++
		0	0.5	1	2	4	6
		METRONIDAZOL µg/mL					

LQM 933 µg/mL	32	-	-	-	-	-	-
	16	+	-	-	-	-	-
	8	+	-	-	-	-	-
	4	++	++	++	++	++	++
	2	++	++	++	++	++	++
	0	++++	+++	++	-	+++	++ +
		0	6	4	8	16	32
		NITAZOXAMIDA µg/mL					

LQM 933 µg/mL	32	++	-	-	-	-	-
	16	++	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-
	4	++	++	++	++	++	++
	2	++	++	++	++	++	++
	0	++++	+++	++	-	+++	++ +
		0	0.5	1	2	4	6
		AMOXICILINA µg/mL					

++++ indica crecimiento abundante (100% de crecimiento),
 +++ indica ligera disminución de crecimiento (75%),
 ++ indica prominente reducción de crecimiento (50%),
 + indica ligero crecimiento (25%) y
 - indica total ausencia de crecimiento (0%).



Tabla 14. Inhibición del Crecimiento de *H. pylori* ante la presencia de las diluciones cruzadas del LQM 938

LQM 938	µg/mL	64	-	-	-	-	-	-
		32	-	-	-	-	-	-
		16	+	++	++	++	-	+
		8	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		4	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		0	++++	+++	+++	-	++	++
		0	0.5	1	2	4	6	
METRONIDAZOL µg/mL								

LQM 938	µg/mL	64	-	-	-	-	-	-
		32	-	-	-	-	-	-
		16	+++	+++	+++	+++	-	+++
		8	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		4	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		0	++++	+++	+++	-	++	++
		0	6	4	8	16	32	
NITAZOXAMIDA µg/mL								

LQM 938	µg/mL	64	-	-	-	-	-	-
		32	++	-	-	-	-	-
		16	+++	+++	+++	+++	-	+++
		8	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		4	+++	+++	+++	+++	+++	+++
		0	++++	+++	+++	-	++	++
		0	0.5	1	2	4	6	
AMOXICILINA µg/mL								

++++ indica crecimiento abundante (100% de crecimiento),
 +++ indica ligera disminución de crecimiento (75%),
 ++ indica prominente reducción de crecimiento (50%),
 + indica ligero crecimiento (25%) y
 - indica total ausencia de crecimiento (0%).



Efecto de la combinación de carbamatos con antimicrobianos

Los índices de concentración fraccionaria inhibitoria (FIC) se calcularon con respecto a los resultados obtenidos de la combinación de antimicrobianos empleando el método de diluciones seriadas o también conocida como la Técnica del "tablero de damas".

Antimicrobianos	Indice de concentración inhibitoria fraccionada (FIC)		
	LQM 932	LQM 933	LQM 938
METRONIDAZOL	0.5	3.0	3.0
NITAZOXAMIDA	2.0	1.75	3.0
AMOXICILINA		1.25	3.0

Tabla 15. Valores del FIC de la Combinación Antimicrobiana.

INTERPRETACIÓN

Si: FIC < 0.5 existe sinergismo

0.5 < FIC < 2 existe indiferencia o adición

FIC > 2 existe antagonismo

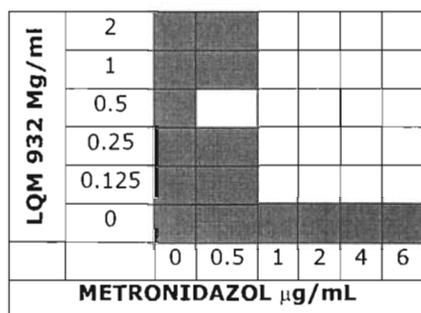
4.5 ISOBOLOGRAMAS

Por medio de gráficos se observará la eficacia terapeutica de combinación antimicrobiana en conjunción con los carbamatos, para sí cuantificar sus efectos en la proliferación bacteriana in vitro.

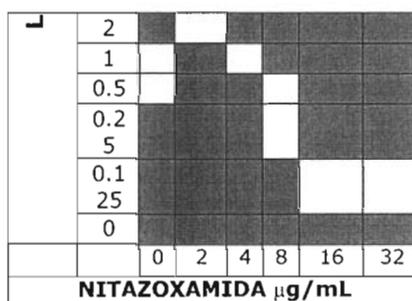


Para la construcción de los isoblogramas se utilizaron los valores obtenidos *in vitro* de las combinaciones antimicrobianas de los ácidos carbámicos en análisis (LQM 932, LQM 933, 1QM 938) como de los antimicrobianos (MTZ, NTZ, AMX) los cuales están expuestos en las tablas 12 a 14. Se prosigió a evaluar el tipo de interacción que presentan dichas combinaciones. La construcción de los isoblogramas se muestra en la figura (26-28) describe si existe el efecto es sinérgico, antagónico o indiferente según la combinación antimicrobiana.

a) Isoblograma LQM932 vs MTZ



b) Isoblograma LQM932 vs NTZ



c) Isoblograma LQM932 vs AMX

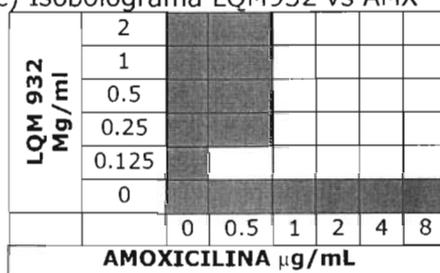
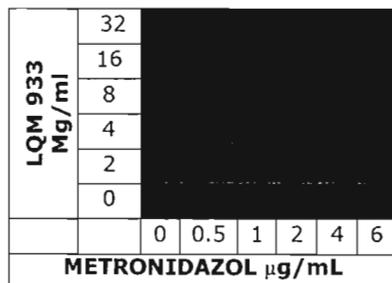


Fig. 26 Construcción de Isoblogramas I, a) y c) muestran la combinación antimicrobiana con (metronidazol, amoxicilina) y el ácido carbámico LQM 932) el isobolo indican una asociación isoefectiva obtenida con dosis inferiores a las aditivas (sinérgica) b) muestra la combinación antimicrobiana con (nitazoxamida y el ácido carbámico LQM 932) el isobolo indica una asociación isoefectivas con dosis superiores a las aditivas (antagonismo).

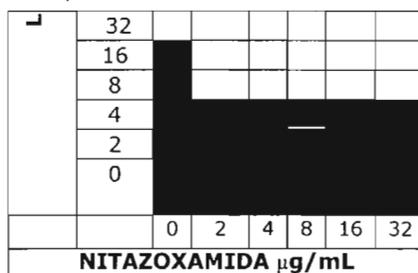


CONSTRUCCIÓN DE ISOBOLOGRAMAS II

a) Isoblograma LQM933 vs MTZ



b) Isoblograma LQM933 vs NTZ



c) Isoblograma LQM933 vs AMX

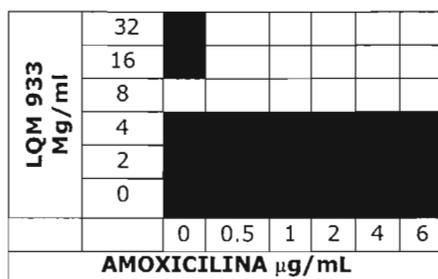
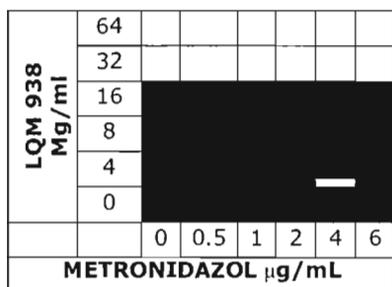


Fig. 27 El isoblograma a) muestra la combinación antimicrobiana con (metronidazol) y el ácido carbámico LQM 933) el isobolo indica una asociación isoeffectivas con dosis superiores a las aditivas (antagonismo), Los isoblogramas b) y c) muestra la combinación antimicrobiana con (nitazoxamida, amoxicilina) y el ácido carbámico LQM 933) el isobolo indica la combinación teórica aditiva o indiferencia.

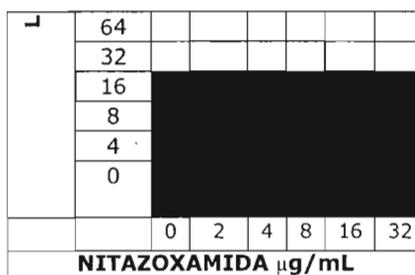


CONSTRUCCIÓN DE ISOBOLOGRAMAS III

a) Isobograma LQM938 vs MTZ



b) Isobograma LQM938 vs NTZ



c) Isobograma LQM938 vs AMX

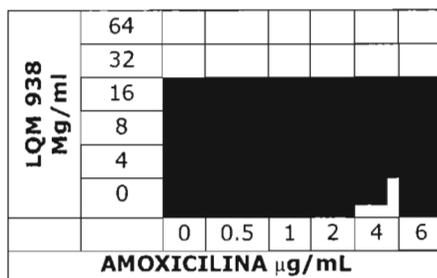


Fig. 28 Los isobogramas a), b) y c) muestran la combinación antimicrobiana con (metronidazol, nitazoxamida y amoxicilina) y el ácido carbámico LQM 933) el isobolo indica una asociación isoeffectivas con dosis superiores a las aditivas (antagonismo).



CAPITULO 5.-DISCUSIÓN.

En este estudio se muestran las primeras evaluaciones de susceptibilidad contra *Helicobacter pylori* ATCC 43504 ante 7 derivados del ácido carbámico, determinándose la Concentración mínima inhibitoria (MIC). Algunos de los compuestos de los derivados del ácido carbámico mostraron tener propiedades antibacterianas como son el LQM 932, LQM 933 y LQM 938 sin embargo, el mecanismo de acción no se conoce aún y se encuentra en estudio.¹⁹¹

Primeramente se realizaron pruebas de solubilidad con diferentes solventes como el (metanol, acetona agua y dimetilsulfóxido) para conocer el disolvente ideal como resultado se obtuvo que el Dimetilsulfóxido se utilizó para preparar las diluciones correspondientes a cada antimicrobiano¹⁷³ por el método de disolución agar en bacterias anaeróbicas.^{145, 147, 169}

La bacteria de *Helicobacter pylori* ATCC 43504 fue proporcionada por el Departamento de Microbiología Molecular de la UNAM FES Cuautitlán Campo 1, cual se encontraba en Nitrógeno líquido para su conservación y sobrevivencia, se prosiguió a sembrar en placas de agar casman durante 5 días a 37 °C en condiciones anaerobias para su identificación.³²

Se realizó las pruebas bioquímicas como catalasa, oxidasa y urea¹⁷⁷ las cuales dan positivo, se extendió la bacteria en un portaobjeto de tal manera para su descripción morfológica^{25-26, 32} con la observación de un microscopio estas pruebas se realizaron con el fin de que *Helicobacter pylori* no modificara su estructura de bacilo curvo gram



negativo a cocoide ya que crea resistencia antimicrobiana y alterar los resultados de la experimentación.

Se seleccionó Caldo brucella como medio de referencia, ya que diversos estudios han mostrado que da resultados reproducibles en las pruebas de susceptibilidad *in vitro*.^{168, 171} El medio seleccionado poseía los nutrientes adecuados para soportar el crecimiento de la bacteria sin interferir con la acción del antimicrobiano o alterar la reproducibilidad de las pruebas *in vitro* o los resultados de las MIC.^{170, 172}

Se estandarizó la concentración del inóculo 1×10^8 , con ayuda de una escala del Nefelómetro tubo de escala 0.5 de Mc Farland que consiste en una serie de patrones de turbidez previamente calibrados, los cuales fueron preparados en tubos de vidrio herméticamente cerrados que contienen {1% de Cl_2Ba + cantidades crecientes de SO_4H_2 al 1%}; por lo tanto, en cada tubo se origina un precipitado de SO_4Ba , origen de la turbidez, para medir la densidad óptica es decir la absorbancia se utilizó un espectrofotómetro (GENESYS 20, Mod. 4001/4) a una longitud de onda de 540nm.^{32, 147; 177-178}

Para determinar la MIC de los derivados del ácido carbámico se trabajo con tres agentes antimicrobianos control los cuales son (Metronidazol, Nitazoxamida y Amoxicilina). De acuerdo a los artículos de referencia consultados los compuestos empleados como la nitazoxamida tienen una MIC de 0.25-8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ¹⁷⁶, Metronidazol una MIC de 0.25->32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ¹⁶⁸ y amoxicilina de una MIC de 0.01-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.¹⁷¹



Los resultados muestran que la inhibición para *Helicobacter pylori* fue para Metronidazol y Amoxicilina con una MIC de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ seguida por una MIC de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para Nitazoxamida.¹⁶⁸

Otras variables importantes para realizar las pruebas de susceptibilidad, el tiempo de incubación para las placas de agar fue durante 5 días y el tiempo de incubación para las placas de ELISA fueron durante 3 días, incubadas bajo condiciones de anaerobiosis, en una Jarra (Gas Pak) empleando para ello sobres generadores de CO_2 de acuerdo al método empleado por los investigadores ya antes mencionados.^{32, 174 - 176.}

La temperatura es otra variable importante y fueron expuestas a 37° C en una estufa (Mapsa SIC-DGE 1798, Científicos SA, MOD: EC-445); una incubación prolongada altera los resultados de las MIC del agente antimicrobiano, debido a que esta bacteria tiene la característica de formar resistencia es decir su morfología cambia de bacilo curvo a cocoide es un mecanismo de defensa que adquiere para sobrevivir tanto al medio adverso que se encuentre.^{32, 171}

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó simultáneamente y en sextoduplicado por el método de diluciones seriadas (NCCLS, 1993 Methods for antimicrobial testing of anaerobic bacteria, 2nd ed., publication M11-A3)^{159, 163, 169} en Caldo Brucella, con un inóculo de 1×10^4 UFC/mL e incubación de anaerobiosi durante 72 horas,^{171-172, 175} los resultados muestran que la inhibición para *H. pylori* fue mayor ante el compuesto LQM 932 con una MIC de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ seguida por una MIC de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para LQM 933, una MIC de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$



para LQM 938 para LQM 934, LQM 935, LQM 936, LQM937 no presentaron inhibición a 72 horas.

Es importante mencionar que a concentraciones altas son muy tóxicos, mientras que previos estudios realizados han demostrado que los derivados del ácido carbámico poseen un potencial alto en cuanto a baja toxicidad a dosis altas.^{32, 138} Al obtener las MICs de los carbamatos se prosiguió realizar la combinación antimicrobiana con los derivados del ácido carbámicos y los antimicrobianos de control de los compuestos^{165, 173}.

Se usaron placas de ELISA para realizar las diluciones seriadas de dos diferentes antimicrobianos para producir un rango de combinaciones, las ventajas fueron el muestreo de los pozos sin crecimiento visible que permitieron identificar organismos viables persistentes, inoculando una alícuota sin antimicrobiano para determinar la MIC.

La prueba rindió información similar a la prueba del tablero estándar, dio las concentraciones de las combinaciones de los antimicrobianos necesarias para inhibir el crecimiento bacteriano. Para evitar las pequeñas cantidades de evaporación y el incremento significativo de los compuestos en estudio y no originar datos falsos de las MICs se utilizaron placas con tapa, además, controles negativos y positivos, para excluir esa posibilidad de error originado por un crecimiento abundante del microorganismo en los pozos sin antimicrobiano.



Al concluir con la combinación antimicrobiana de los antibióticos de referencia y los carbamatos fue necesario analizar el tipo de interacción. Para establecer el tipo de interacción se utilizan ampliamente el método de isobogramas este método se basa en la obtención del FIC este diseño experimental ha sido utilizado por diferentes autores¹⁶³ la construcción de isobogramas para representar el tipo de interacción.

La representación isobográfica bidimensional de las diferentes combinaciones de los derivados del ácido carbámico y los antimicrobianos control (metronidazol, nitazoxamida y amoxicilina) esta expuesta en la Tabla 25 y en las figuras 29-31, indica el efecto de dichas combinaciones para inhibir la proliferación bacteriana, los efectos se expresan en isóbolos y en índice de concentración inhibitoria fraccionada (FIC), los puntos en los isóbolos cóncavos ($FIC < 1$) indican interacción sinérgica y los isóbolos convexos ($FIC > 2$) representan antagonismo y cuando el isóbolo es lineal ($0.5 < FIC < 2$) representa indiferencia.

Los índices de concentración fraccionaria inhibitoria (FIC) de la combinación de los derivados del ácido carbámico y los antimicrobianos oscilaron entre 0.5 y 3, destacándose el compuesto LQM 932 en combinación con Metronidazol y Amoxicilina con un efecto sinérgico $FIC < 0.5$. Esto quiere decir que el efecto de la combinación no puede ser alcanzado en dosis alguna por cualquiera de los agentes utilizados en forma aislada. Loewe lo denominó "interacción coalitiva" el efecto observado es superior a la suma de efectos esperados.¹⁶³



El compuesto LQM 933 en combinación con Nitazoxamida y Amoxicilina presentó un FIC alrededor de 1.75 a 1.25 teniendo un efecto aditivo o indiferente. El resto de las combinaciones presentaron un efecto antagónico obteniendo un FIC (de 2 a 3), considerando este un efecto antagónico es cuando el efecto de la combinación es menor que el efecto de cualquiera de sus constituyentes.

Solo el compuesto LQM 932 mostró tener propiedades antimicrobianas sin embargo, el mecanismo de acción no se conoce aún y se encuentra en estudio, pero se hace alusión a las diferencias en su estructura molecular que ha sido factor importante en la relación estructura - actividad, la posición de cada uno de los sustituyentes proporciona ciertas características al compuesto, permitiéndole actuar como antimicrobiano.



CAPÍTULO 6.-CONCLUSIONES

1. Al evaluar la actividad microbiana de los derivados del ácido carbámico contra *H. pylori* ATCC 43504 se encontró que si inhiben a dicha bacteria, siendo el más activo LQM 932, LQM 933 y LQM 938.
2. Las CMI's de los carbamatos (LQM 932, LQM 933 y LQM 938) que inhibieron a *H. pylori* son, (0.5, 8, 16 mcg/ml).
3. Al determinar la actividad antimicrobiana de combinaciones antimicrobianas se analizó el tipo de interacción reveló la presencia de sinergia en combinación de metronidazol y Amoxicilina con el compuesto LQM932, obteniéndose en la mayoría de las combinaciones antimicrobianas existe un efecto antagónico y en algunos caso un efecto aditivo o indiferente, por lo que se requiere realizar estudios *in vivo* para corroborar estos resultados.
4. El estudio de la actividad antimicrobiana de combinaciones antimicrobianas de los derivados del ácido carbámico, requiere en futuros trabajos de empleo de cepas de aislados clínicos, estudios de toxicidad, farmacología y en estudios *in vivo*, que involucren el posible mecanismo de acción y grado de toxicidad.



BIBLIOGRAFÍA

1. Germán R. Aguilar, M.S., Ph.D., Guadalupe Ayala, M.S., Ph.D., *Helicobacter pylori* Recent advances in the study of its pathogenicity and prevention, vol. 43, No. 3, mayo-junio 2001
2. Nedrud J, Czinn SJ. *Helicobacter pylori*. Curr Opin Gastroenterol 1997; 13:71-78.
3. Francis Mégraud, Nitazoxanide, a Potencial Drug for Eradication of *H. pylori* with No Cross-Resistance to Metronidazole, A.Agents and Chem., Nov 1998, p 2836-2840.
4. Goodwin CS, Worsley BW. Microbiology of *Helicobacter pylori*. Gastroenterol Clin North Am 1993; 22:5-19.
5. Sainz R, Borda F, Dominguez E, Gisbert JP y Grupo Conferencia Española de Consenso. Conferencia Española de Consenso sobre la infección por *Helicobacter pylori*. Rev Esp Enferm Dig 1999; 91:777-784.
6. Cederbrandt G, Kahlmeter G, Schalen C, et al. Additive effect of clarithromycin, erithromycin, amoxycillin and metronidazole on omeprazole against *Helicobacter pylori*. J Antimicrob-Chemother 1994; 34: 1025-1029.
7. Dra. Lilliam Cordiés Jackson, Dr. Looney Andrés Machado Reyes y Dra. María Lilliam Hamilton. Terapéutica Antimicrobiana. ACTA MEDICA 1998;8(1):13-27
8. Correa P. Anatomía patológica de la infección por *Helicobacter pylori*. En: López-Brea M, ed. *Helicobacter pylori*: retos para el siglo XXI. Microbiología, clínica y tratamiento. Barcelona: Prous Science SA. 1999; 213-218.
9. Marshall BJ. History of the discovery of *C pylori*. In Blasser MJ. ed. *Campylobacter pylori* in Gastritis and Peptic Ulcer Disease. New York: Igaku-Shoin; 1989 p. 7-23.
10. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1983; i: 1311-65.
11. Goodwin CS, Armstrong JA, Shilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, et al. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. As *Helicobacter pylori* comb. Nov and *Helicobacter mustelae* comb. Nov. Int Syst Bacteriol 1989; 39:397-405.



12. Vandamme P, Falsen E, Rossau R, Hoste B, Segers P, Tytgat R, et al. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. Int J Syst Bacteriol 1991; 41:88-103. Vandamme P, Vancanneyt M, Pot B, Mels L, Hoste B, Dewettinck D, Vlaes L, Van Den Borre C, Higgins R, Hommez J, Kersters K, Butzler JP, Goosens H. Polyphasic taxonomic study to the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. Int J Syst Bacteriol 1992;42:344-356
13. Hernández F, Monge-Nájera J. Ultraestructura of the bacteria *Campylobacter* and *Helicobacter*: implications for the phylogeny of mammal gastric bacteria. Rev Biol Trop 1994; 42:85-92.
14. Jones DM, Lessells AM, Eldridge J. *Campylobacter*-like organisms on the gastric mucosa: culture, histological and serological studies. J Clin Pathol 1984; 37:1002-6.
15. Langenberg ML, Tytgat GNJ, Schipper MEI, Rictra PJGM, Zanen HC. *Campylobacter*-like organisms in the stomach of patients and healthy individuals. Lancet 1984; i: 1348.
16. Corti Rodolfo y col. *H. pylori*. *Epidemiología, diagnóstico y tratamiento*. 1ra edición. Buenos Aires; 1998.
17. Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and related organism. En: Mandell GL, Douglas R and Bennett JE. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4th edition. New York, NY: Churchill Livingstone; 1995:1956-63.
18. Dr. José Luis Gamboa Figueredo. Hospital General Docente "Vladimir Ilich Lenin", Holguín. Infección por *Helicobacter pylori* y enfermedad ulcerosa péptica
19. Nedrud J, Czinn SJ. *H. pylori*. Curr Opin Gastroenterol 1997; 13:71-78.
20. Goodwin CS, Worsley BW. Microbiology of *H. pylori*. Gastroenterol Clin North Am 1993; 22:5-19.
21. Warren JR, Marshall BJ. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet 1983; 1:1273-5. Medline.
22. Marshall BJ, Warren JR: Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1: 1311-1314, 1984.
23. Marshall BJ. *Helicobacter pylori*. Am J Gastroenterology 1994, 89:30-3.



24. Bruce E. Dunn, Hartley Cohen, and Martin J. Blaser, Clinical microbiology reviews, Oct. 1997, p. 720–741 Vol. 10, No. 4, *Helicobacter pylori* Copyright © 1997, American Society for Microbiology.
25. McNulty CMA, Watson DM. Spiral bacteria of the gastric antrum.
26. Sainz R, Borda F, Dominguez E, Gisbert JP y Grupo Conferencia Española de Consenso. Conferencia Española de Consenso sobre la infección por *Helicobacter pylori*. Rev Esp Enferm Dig 1999; 91:777-784.
27. Correa P. Anatomía patológica de la infección por *Helicobacter pylori*. En: López-Brea M, ed. *Helicobacter pylori*: retos para el siglo XXI. Microbiología, clínica y tratamiento. Barcelona: Prous Science SA. 1999; 213-218.
28. www.helicobacterpylori.htm
29. Hayat, M.A. (1987) Correlative microscopy in biology. Academic Press, Orlando, 437 pp.
30. Xiang Z, Censini S, Bayeli PF, Telford JL, Figura N, et al. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *H. pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. Infect Immun 1995; 63:94-98.
31. Artículo *Helicobacter pylori*, enfermedad ulcerosa y cáncer gástrico pagina web, www.iladiba.com. ILADIBA® ISSN 1657-5628 © Copyright EMSA 1999 – 2003.
32. Juana Guerrero, "Tesis" año 2005, Determinación de la Concentración mínima inhibitoria de Nuevos derivados del ácido carbámico contra *Helicobacter pylori*.
33. Traci I. Testerman,* David J. Mcgee,† and Harry I. T. Mobley, *Helicobacter pylori* Growth and Urease Detection in the Chemically Defined Medium Ham's F-12 Nutrient Mixture, journal of clinical microbiology, 10.1128/JCM.39.11.3842–3850.2001 Nov. 2001, p. 3842–3850.
34. Dr. Francisco Hernández-Chavarría ¹, Dra. Patricia Rivera ²Experiencias en el cultivo de bacterias microaerófilas: *Helicobacter*¹Facultad de Microbiología y Unidad de Microscopia Electrónica. Universidad de Costa Rica (hchavarr@cariari.ucr.ac.cr), y ²Servicio de Patología, Hospital Nacional de Niños, CCSS.
35. www.condiciones de transporte.htm
36. www.sepd.org/formación/pepticum/ 5-003.htm



37. Blanco, K., Rivera, P., Hernández, F., Hevia, F. y Guillén, F. (1999) Evaluación de una prueba rápida de ureasa para la detección de *Helicobacter pylori*. *Rev. Gastroent. Latinoamer.* **29**, 17-20.
38. Sheri P et al. Coccoid and Spiral *Helicobacter pylori* Differ in Their Abilities to Adhere to Gastric Epithelial Cells and Induce Interleukin-8 Secretion. *Infect Immun* 1997; 65:843-846
39. Sheri P et al. Effect of Nitric Oxide on *Helicobacter pylori* Morphology. *JID* 1999; 180:1713-7
40. Enroth H et al. In Vitro Aging of *Helicobacter pylori*: Changes in Morfology, Intracellular Composition and Surface Properties. *Helicobacter* 1999;4:7-16
41. Ren Z et al. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* can be viable. *Microbios* 1999; 97:153-63
42. Brenciaglia et al. *Helicobacter pylori*: cultivability and antibiotic susceptibilty of coccoid forms. *IJAA* 2000; 13: 237-241.
43. Kurokawa M. et al. Resuscitation from the viable but nonculturable state of *Helicobacter pylori*. *Kansenshogahu Zasshi* 1999; 73:15-9
44. Mizoguchi H. et al Evidence for viability of coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *J Gastoenterol* 1999;34 Suppl 11: 32-6
45. Hiromoto M. et al Diversity in Protein Synthesis and Viability of *Helicobacter pylori* Coccoid Forms in Response to Various Stimuli. *Infect Immun* 1998, p. 5555-5560
46. J.G. Kusters et al. Coccoid Forms of *Helicobacter pylori* Are the Morphologic Manifestation of Cell Death. *Infect Immun* 1997, 3672-3679
47. F. Sato et al. The maintenance of viability and spiral morphology of *Helicobacter pylori* in mineral water. *J.Med. Microbiol* 1999; 48: 971.
48. Nature 388: 515-516 (agosto 7), 1997 539-547 (agosto 7), 1997 www.avancesengastroenterologiaoctubre1997.htm. *Lancet* 350: 415 (agosto 9), 1997
49. www.tigr.org/tdb/mdb/hpdb/hpdb.html).
50. Adriana Reyes Leon, Tesis "Presencia de los Genes cag A, pic B E iceA en Colonias de *H. pylori* aisladas de niños y adultos con enfermedad acido peptica", año 2000, Cuautitlán Izcalli, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1.
51. Malaty HM, Evans EG, Evans DJ, Graham DY. *Helicobacter pylori* in Hispanics: Comparison with blacks and whites of similar age and socioeconomic status. *Gastroenterology* 1992; 103:813-816.
52. Graham DY, Malaty HM, Evans DG, Evans DJ, Klein PD, Adam E. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States.



53. Peterson WL. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. N Engl J Med 1991; 324; 1043-1048.
54. Año 1994, Volumen 10 n° 6 artículo Utilización de Medicamentos *Helicobacter Pylori* y nuevos tratamientos de la úlcera péptica
55. <http://www.introducción microbiología clínica tratamientos artículos comentados/representación gráfica del genoma.htm>
56. Nature 388:515-516 (agosto 7), 1997 539-547
www.avancesengastroenterologiaoctubre1997.htm. Lancet 350:415.
57. Peterson WL. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. N Engl. J. Med. 1991; 324; 1043-1048.
58. Adriana Reyes Leon, Tesis "Presencia de los Genes cagA, pic B e iceA en Colonias de *Helicobacter pylori* aisladas de niños y adultos con enfermedad ácido péptica", año 2000, Cuautitlán Izcalli, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1.
59. Hospital general docente "Vladimir Ilich Lenin", Holguín, Infección por *Helicobacter pylori* y enfermedad ulcerosa péptica, Dr. José Luis Gamboa Figueredo¹UNIV DIAG 2003; 3(1):20-4.
60. Gram. Dy, Malaty Hm, Evans Eg, Evans Dj, Klein Pd, Adam E. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States.
61. *Helicobacter pylori: Factores de virulencia, patología y diagnóstico*. Francisco Rivas-Traverso 1, Francisco Hernández 1,2 .1 Facultad de Microbiología, 2 Unidad de Microscopía Electrónica, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. *Rev Biomed* 2000; 11:187-205.
62. AMA275:622-629 (febrero 28), 1996. Scientific American (febrero), 1996 Gastroenterology 110:1244-1252 (abril), 1996.
63. Gastroentología; Importancia de la infección por *Helicobacter pylori* en la úlcero génesis, Iladibia.com
64. N, Guglielmetti P, Rossolini A, et al. Cytotoxin production by *Campylobacter pylori* strains isolated from patients with peptic ulcers and from patients with chronic gastritis only. J Clin Microbiol 1989; 27:225-6.
65. Schmitt W, Haas R. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin gene. Acta Gastroenterol Belg 1993; 56(suppl):105.
3. Tummuru MKR, Cover TL, Blaser MJ. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. Infect Immun 1993; 61:1799-809.



66. Crabtree JE, Figura N, Taylor JD, Bugnoli M, Armellini D, Tompkins DS. Expression of 120 kilodalton protein and cytotoxicity in *Helicobacter pylori*. J Clin Pathol 1992; 45:733-4.
67. www.fisiopatologia agosto 1997.htm , Microorganismos patógenos responsables de enfermedades consideradas no infecciosas, Tema ILADIBA® ISSN 1657-5628
68. Schembri MA, Lin SK, Lambert JR. Comparison of commercial diagnostic test for *Helicobacter pylori* antibodies. J Clin Microbiol 1993; 31: 2621-2624.
69. Crowe SE, Espejo R, Jin Y, et al.. The potential role of gastric epithelium in neutrophil recruitment, attachment and antigen presentation during *Helicobacter pylori* infection. J Immunol 1993; 150:10.
70. Rautelin H, Blomberg B, Fredlund H, Jarnerot G, Danielsson D. Incidence of *Helicobacter pylori* strains activating neutrophils in patients with peptic ulcer disease. Gut 1993; 34:599-603.
71. Moss SF, Legon S, Bishop AE, Polak JM, and Calam J. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric somatostatin in duodenal ulcer disease. Lancet 1992; 340:930-2.
72. Kang JY, Wee A. *Helicobacter pylori* and gastric acid output in peptic ulcer disease. Dig Dis Sci 1991; 36:5-9.
12. El-Omar E, Penman I, Dorrian CA, Ardiil JES, McColl KEL. Eradicating *Helicobacter pylori* infection lowers gastrin mediated acid secretion by two thirds in patients with duodenal ulcer. Gut 1993; 34:1060-5
73. Queiroz DMM, Mendes EN, Rocha GA, et al. Histamine content of the oxyntic mucosa from duodenal ulcer patients: effect of *Helicobacter pylori* eradication. Am J Gastroenterol 1993; 88:1228-1232.
74. Crabtree JE, Peich P, Wyatt JI, Stachl U, Lindley IJD. Gastric interleukin-8 and IgA IL-8 autoantibodies in *Helicobacter pylori* infection. Scand J Immunol 1993; 37:65-70.
75. Mai UEH, Perez-Perez GI, Allen JB, Wahl SM, Blaser MJ. Surface proteins from *Helicobacter pylori* exhibit chemotactic activity for human leukocytes and are present in gastric mucosa. J Exp Med 1992; 175:517-25.
76. Delgado, J.D, Rivera, F, Ríos, J.J., Herrerías, J.M. Optical and electronic findings in *Helicobacter pylori* infection of the antral mucosa. En: *Helicobacter pylori* and Gastroduodenal Pathology. Pp. 82-89(1992), Berlín Heidelberg (Alemania).



77. J. D. Delgado, M. Casas, J. Martín, P. Hergueta, F. Rivera y J. M. Herrerías. Infección por *H. pylori* y úlceras: niveles séricos de gastrina. Rev. Esp. Enf. Digest. 1996; 88(Supl. I):62-63
78. www.Untitled.htm *Helicobacter pylori*: una bacteria relacionada con la patología gastroduodenal
79. Martín de Argila C, Boixeda de Miquel D, Gisbert JP. Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*. En: Boixeda de Miquel D, Gisbert JP, Martín de Argila C, ed. Infección por *Helicobacter pylori* ¿Dónde está el límite? Barcelona: JR Prous SA, 1996; 75-91.
80. <http://www.articulo de fondo - noviembre 1995.htm>
81. Banatvala N, Mayo K, Mégraud F, Jennings R, Deeks JJ, Feldman RA. The cohort effect and *Helicobacter pylori*. J Infect Dis 1993; 168: 219-221.
82. Carballo F. Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*. En: Club Español para el estudio del *Helicobacter pylori*. Patología Gastroduodenal (gastritis, úlcera y cáncer gástrico) y su relación con *Helicobacter pylori*. IV Reunión del Club Español del *Helicobacter pylori*. Barcelona: Lab LACER, 1996; 5-11.
83. Graham DY, Malaty HM, Evans DJ, Klein PD, Adam E. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. Effect of age, race and socioeconomic status. Gastroenterology 1991; 100: 1495-1501.
84. Martín C, Boixeda D, Gisbert JP. Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*. Gastroenterol Hepatol 1995; 18 (suppl 2): 23-34.
85. Boixeda D, Martín C, Gisbert JP. Patogenia de la infección por *Helicobacter pylori*. En: Boixeda de Miquel D, Gisbert JP, Martín de Argila C, ed. Infección por *Helicobacter pylori* ¿Dónde está el límite? Barcelona: JR Prous SA, 1996; 35-47.
86. www.patologia molecular en la citopatologia del aparato respiratorio y de la pleura j. Fariña gonzalez y mc. Millana de ynes.
87. Gisbert JP, Boixeda de Miquel D, Martín de Argila C. *Helicobacter pylori* y fisiopatología gástrica: gastrina, pepsinógeno y secreción ácida. En: Boixeda de Miquel D, Gisbert JP, Martín de Argila C, ed. Infección por *Helicobacter pylori* ¿Dónde está el límite? Barcelona: JR Prous SA, 1996; 49-74.
88. Moss S, Calam J. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer: the present position. Gut 1992; 33: 289-292.



89. Jeam F. MacFaddin, ed. Panamericana, Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica, Tercera Edición, Impreso en Buenos Aires, Argentina, Pag.73-83, 344-353, 393-409.
90. Recursos Didácticos para Biología, José A. Cortés
91. International Agency for Research on Cancer: schistosomes, liver flukes and helicobacter pylori. Lyon: IARC, 1994; 61: 177-241.
92. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. N Engl J Med 1991; 325: 1127-1131.
93. Hansson LE, Engstrand L, Nyren O, Evans DJ, Lindgren A, Bergstrom R et al. *Helicobacter pylori* infection: independent risk indicator of gastric adenocarcinoma. Gastroenterology 1993; 105: 1098-1103.
94. The Eurogast Study Group. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. The Lancet 1993; 341: 1359-1362.
95. Sainz Saenz Torre S. Úlcera, gastritis y cáncer gástrico. En: Club español para el estudio del *Helicobacter pylori*. Patología gastroduodenal (gastritis, úlcera y cáncer gástrico) y su relación con *Helicobacter pylori*. IV Reunión del Club Español del *Helicobacter pylori*. Barcelona: LACER, 1996; 25-31.
96. Martín de Argila C, Boixeda de Miquel D, Gisbert JP. Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori*. En: Boixeda de Miquel D, Gisbert JP, Martín de Argila C, ed. Infección por *Helicobacter pylori* ¿Dónde está el límite? Barcelona: JR Prous SA, 1996; 93-114.
97. Mégraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. Scand J Gastroenterol 1996; 31 (suppl 214): 44-46.
98. Mégraud F. Advantages and disadvantages of current diagnostic tests for the detection of *Helicobacter pylori*. Scand J Gastroenterol 1996; 215(5): 57-62.
99. Rune SJ. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. When to use which test and why. Scand J Gastroenterol 1996; 31 Suppl 215: 63-65.
100. Trevisani, L.; Sartor, S.; Galvani, F.; Rossi, M. R.; Ruina, M. and Caselli, M.: Two Unusual Techniques for Diagnosing *Helicobacter pylori* infection. II International Meeting Developing Knowledge on Helicobacter pylori. Ferrara, December 12-13, 1997.
101. Loffeld RJLH, Stobberingh E, Arends JW. A review of diagnostic techniques for *Helicobacter pylori*. Dig Dis 1993; 11: 173-180.



102. Glupczynski Y. The diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: A microbiologist's perspective. *Reviews Medical Microbiology* 1994; 5: 199-208.
103. Ansorg R, Von Recklinghausen G, Pomarius R, Schmid EN. Evaluation of techniques for isolation, subcultivation and preservation of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 51-53.
104. Schell GA, Schubert IT. Usefulness of culture, histology and urease testing in the detection of *Campylobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1989; 84: 133-137
105. Marshall BJ. *Helicobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: s116-s128.
106. Lee J, O' Morain C. Who should be treated for *Helicobacter pylori* infection? A Review of Consensus Conferences and Guidelines. *Gastroenterology* 1997; 113: s99-s106.
107. The European *Helicobacter pylori* Study Group. Current European concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht Consensus Report. *Gut* 1997; 41: 8-13.
108. Gisbert JP, Boixeda de Miquel D, Martín de Argila C. ¿Por qué y cuando debemos tratar la infección por *Helicobacter pylori*? En: Boixeda de Miquel D, Gisbert JP, Martín de Argila C, ed. *Infección por Helicobacter pylori ¿Dónde está el límite?* Barcelona: JR Prous SA, 1996; 209-232.
109. Jovell AJ, Aymerich M, García-Altés A, Serra-Prat M. Guía de práctica clínica del tratamiento erradicador de la infección por *Helicobacter pylori* asociada a úlcera duodenal en la atención primaria. Barcelona: Agència d'Avaluació de Tecnologia Mèdica. Servei Català de la Salut. Departament de Sanitat i Seguretat Social. Generalitat de Catalunya. Septiembre 1998; BR98002.
110. Berkelhammer C. *Helicobacter pylori* and ulcer in patients taking NSAIDs. *JAMA* 1995; 273: 376.
111. Chan FK, Sung JJ, Chun SC, Yung MY, Leung VK, Lee Y et al. Randomised trial of eradication of *Helicobacter pylori* before non-steroidal anti-inflammatory drug therapy to prevent peptic ulcers. *Lancet* 1997; 350: 975-979.
112. McCarthy CJ, Collins R, Beattie S, Hamilton H, O' Morain C. Short report: treatment of *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer. *Br Med J* 1992; 305: 71: 502-504.
113. Forbes GM, Glaser ME, Cullen JE et al. Duodenal ulcer treated with *Helicobacter pylori* eradication: seven year follow-up. *Lancet* 1994; 343: 258-260.



114. Santander C, Grávalos RG, Gómez-Cedenilla A, Cantero J, Pajares JM. Antimicrobial therapy for *Helicobacter pylori* infection versus long term maintenance antisecretion treatment in the prevention of recurrent hemorrhage from peptic ulcer: prospective nonrandomized trial on 125 patients. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 1549-1552.
115. Sonnenberg A, Townsend WF. Costs of duodenal ulcer therapy with antibiotics. *Arch Intern Med* 1995; 155: 922-928.
116. Bell GD, Powell KV, Bolton B, Richardson PDI. Clinical and pharmaeconomic evaluation of management strategies for duodenal ulcer disease. *Br J Med Econ* 1993; 6: 45-58.
117. Badía X, Segú JL, Ollé A, Brosa M, Monés J, García L. Análisis coste-efectividad de diferentes estrategias para el tratamiento de la úlcera duodenal. *Pharmaeconomics* 1997; Apr 11(4): 367-376.
118. Gisbert JP, Boixeda D, Martín C. ¿Cómo debemos tratar la infección por *Helicobacter pylori*? En: Boixeda de Miquel D, Gisbert JP, Martín de Argila C, ed. *Infección por Helicobacter pylori ¿Dónde está el límite?* Barcelona: JR Prous SA, 1996; 234-238.
119. Vondracek TG. Ranitidine bismuth citrate in the treatment of *Helicobacter pylori* infection and duodenal ulcer. *Ann Pharmacother* 1998; 32: 672-679.
120. European Study Group on Antibiotic susceptibility of *Helicobacter pylori*. Results of a multicentre European survey in 1991 on metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Microbiol Infect Dis* 1992; 11: 777-778
121. Koster E. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics. *Research & Clinical Forums* 1998; 20(2): 49-52.
122. Laine L, Estrada R, Trujillo M, Emami S. Randomized comparison of ranitidine bismuth citrate-based triple therapies for helicobacter pylori. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 2213-2215.
123. Artículo "Informacion terapeutica del Sistema Nacional de Salud " Vol. 24-N.º
124. [www. Antibióticos e historia de la industria farmacéutica.com](http://www.Antibióticos e historia de la industria farmacéutica.com)
125. Tema 20. Agentes antimicrobianos y microorganismos, Dr. Pedro F. Mateos, Departamento de Microbiología y Genética. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca.
126. Calderon JE: Consideraciones generales sobre el uso de antimicrobianos. en: *Aplicación clínica de antibióticos y quimioterápicos*. edit Méndez Cervantes. 7a. edición 53:85 1997.
127. Neu HC: Conceptos generales sobre quimioterapia de enfermedades infecciosas. *Med Clin North Am*.



128. Franklin. T.J, G.A. Snow: Biochemistry of antimicrobial action (4th edition), Chapman and Hall, Londres 1989, 305 pp.
129. Jawelz E, Melnick JL, Aldelberg EA. Quimioterapia antimicrobiana. En: Manual de microbiología, Mexico, DF: Manual Moderno, 1987:110-35.
130. Lambert HP, Grandy FW. General principles of treatment. En: Antibiotic and chemotherapy. 6 ed. New York: Churchill Livingstone, 1992:316-7.
131. La normativa NCCLS M2-A6, volumen 13, número 24.
132. http://www.danival.org/microclin/antibiot/_madre_antibiot.html
133. Bergoglio, Remo M. Antibióticos. Madrid: Editorial Médica Panamericana, 5ª ed., 1993. Obra actualizada de consulta rápida y fácil; incluye esquemas terapéuticos.
134. Flórez Beledo, Jesús. Farmacología básica. Madrid: Editorial Marbán, 3ª ed., 1997. Libro empleado por los estudiantes de medicina.
135. Goodmann-Gilman. Bases farmacológicas de la terapéutica. 2 vols. Madrid: McGraw-Hill - Interamericana de España, 9ª ed., 1996. La biblia de la farmacología, el libro de consulta y referencia más utilizado mundialmente, poco recomendable para el estudio por su extensión y profundidad.
136. Isselbacher, Kurt J. (Director de la edición). Harrison: Principios de Medicina Interna. Madrid: McGraw-Hill - Interamericana de España, 13ª ed., 1994. El clásico de los clásicos, libro de cabecera y de consulta de todo médico (existe una 14ª edición en inglés del año 1997), imprescindible.
137. Lorenzo Velázquez, Velasco. Farmacología y su proyección a la Clínica. Madrid: Editorial Oteo, 16ª ed., 1993. Interesante para revisar históricamente la evolución de los fármacos modernos.
138. Sanford, Jay P. Guía de Terapéutica Antimicrobiana. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, 1997. El minilibro de bolsillo para consultas rápidas sobre infecciones y antibióticos. Imprescindible para todo médico.
139. Biblioteca de Consulta Microsoft ® Encarta ® 2005. © 1993-2004 Microsoft Corporation. Reservados todos los derechos.
140. Wilkowske CJ, Hermans RE. General principles of antimicrobial therapy. Mayo Clin Proc 1987; 62:789
141. Agentes antimicrobianos y microorganismos, Dr. Pedro F. Mateos, Departamento de Microbiología y Genética. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca.



142. Manual of Clinical Microbiology. Edition, 1999, Patrick Murray Editor in Chief. A.S.M Press, American Society for Clinical Microbiology, Washington DC.
143. Normativa para la Puesta en Práctica de Estudios de la Sensibilidad Antimicrobiana Mediante Discos. Sexta Edición, Approved Standard NCCLS - Comité Nacional para Normas de Laboratorio Clínico. M2 – A6. Vol. 13, N°24. The National Committee for Clinical Laboratory Standard Press, Pennsylvania, USA
144. http://www.danival.org/microclin/antibiot/_madre_antibiot.html
145. Normativa para la Puesta en Práctica del Estudio de Susceptibilidad Antimicrobiana. Octavo Suplemento Informativo. NCCLS, M100 –S8, Vol. 17, N° 2 Pennsylvania, USA.
146. <http://www.helicobacterspain.com>
147. Galgiani JN, Stevens DA. Antimicrobial susceptibility testing of yeast a turbidimetric technique independent of inoculum size. Antimicrob Agents Chemoter 1976;10:721-6.
148. http://danival.org/microclin/antibiot/img/atb_tubo_m.gif
149. Inducción de resistencia a los antimicrobianos. Luis Martínez Martínez. Departamento de Microbiología. Hospital Universitario Virgen Macarena y Facultad de Medicina. Sevilla.
150. Farran EW. Bacterial resistance. En: Lambert H, O'grady P. Antibiotic and chemotherapy. 6 ed. Londres Churchill Livingstone, 1992:303-12.
151. L. Cordiés Jackson et al. Mayer KH, Opalg M, Medeiros HA. Mechanisms of antibiotic resistance. En: Mandell GL, Douglas JR, Bennetteje, eds. 3 ed. Londres, Churchill Livingstone, 1992:206-18. Medeiros A. recent increases in resistance: mechanisms and organism. CLin Infect Dis 1977; 24(Suppl 1):519-45.
152. Cordiés Jackson L, Vázquez Vigoa A. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. Revisión bibliográfica. Rev Acta Médica 1990; 4(2):165-92.
153. Lilliam Cordiés Jackson, Dr. Looney Andres Machado Reyes y Dra. María Lilliam Hamilton cordiés, Principios generales de la terapéutica antimicrobiana, Acta medica 1998;8(1):13-27
154. NEIDHART, F.C., J.L. INGRAHAM, M. SCHAECHTER (1990): Physiology bacterial cell: a molecular approach. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. Consultar el capítulo 7.
155. Goodman & Gilman, Las bases Farmacológicas de la Terapéutica "Terapéutica con Combinaciones Medicamentosas", Novena Ed. McGraw-Hill Interamericana, Pag 112-115.



156. Efecto de la combinación *in vitro* del 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno (g-1) con algunos Antimicrobianos usuales Roberto Machado, 1 Enrique A. Silveira, 1 Oraidá González, 1 Lissette Martínez, Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Cuba. Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara. Cuba.
157. Thabaut A, Meyran M. Méthodes d'études *in vitro* des associations d'antibiotiques. Press Méd. 1987, 16(43):2148-2152. Schwalbe RS. Emergency of Vancomycin resistance in coagulase-negative Staphylococci. NEJ Med 1987, 316(15):927-931. Bailey WR, Scott ES. Diagnostic Microbiology. 4th ed. 1974. pp. 313-29. The Mosby Co. St. Louis.
158. Silveira EA, González Oraidá, Lloréns F, Molina J. Micrométodo para determinar la MCI de sustancias bioactivas. Bol. Científico ISCM. 1986, 4(2):215-24. Santiago de Cuba.
159. Norden CW, Wentzel Heidi, Keleti Eva. Comparison techniques for measurement of *in vitro* antibiotic synergism. J Infect Dis 1979, 140(4):629-33.
160. Berenbaum Mc. What's synergy? Pharmacol Rev 1989; 41:93-141
161. Elashoff RM. Fears Tr., Scheneiderman MA. Statistical analysis of carcinogen mixture experiment. L. Liver carcinogens. J. Natl Cancer Inst. 1987; 79:509-26.
162. Fraser Tr., An experimental research on the antagonism between the actions of physostigma and atropia. Proc Roy Soc Edin 1870-1871; 7:506-11.
163. Antonio Montes Perez, Tratamiento del dolor agudo post operatorio utilizando combinaciones del tramadol y metamizol: análisis de interacción.
164. Identifying antimicrobials and their mechanism of action using phenotype microarrays <http://www.biolog.com/>
165. "Antibiótico," Enciclopedia Microsoft® Encarta® 2000. © 1993-1999 Microsoft Corporation. Reservados todos los derechos.
166. Amadi B, Mwiya M, Musuku J, Watuka A, Sianongo S, Ayoub A, Kelly P. Effect of nitazoxanide on morbidity and mortality in Zambian children with cryptosporidiosis: a randomized controlled trial. *Lancet*. 2002; 360:1375-80.
167. "Amoxicilina," Enciclopedia Microsoft® Encarta® 2000. © 1993-1999 Microsoft Corporation. Reservados todos los derechos.



168. Raffaele Piccolomini, Giovanni Di Bonaventura, Comparative Evaluation of the E Test, Agar Dilution, and Broth Microdilution for Testing Susceptibilities of *Helicobacter pylori* Strains to 20 Antimicrobial Agents, Journal of Clinical Microbiology, Jul 1997, p. 1842-1846.
169. Comité Nacional para Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS), 1993 Methods for antimicrobial testing of anaerobic bacteria, 2nd ed., publication M11-A3.)
170. Meyer, h.-p., o. Käppeli, a. Fiechter (1985): Growth control in microbial cultures. Ann. Rev. Microbiol
171. S. Hartvig Hartzen, L. Percival Andersen, Antimicrobial Susceptibility Testing of 230 *Helicobacter pylori* Strains: Importance of Medium, Inoculum and Incubation Time. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Dec. 1997, pp 2634-2639
172. Luc Dubreuil, Isabelle, Yves mouton, In Vitro Evaluation of activities of Nitazoxanide and Tizoxanide against Anaerobes and Aerobic Organisms. Received 1 May 1996.
173. Cindy R. Deloney and Neal L. Characterization of in vitro-Selected Amoxicillin-Resistant Strain of *H. pylori*, A. Agents and Chem., Dec 2000, 3368-3373
174. Ibrahim J. Hassan, Absence of a post-antibiotic effect (PAE) of β -lactams against.
175. Francis Mégraud, Nitazoxanide, a Potential Drug for Eradication of *H. pylori* with No Cross-Resistance to Metronidazole, A. Agents and Chem., Nov 1998, p 2836-2840.
176. Cindy R. Deloney and Neal L. Characterization of *in vitro*-Selected Amoxicillin-Resistant Strain of *H. pylori*, A. Agents and Chem., Dec 2000, 3368-3373
177. Meyer, H.-P., O. Käppeli, A. Fiechter (1985): Growth control in microbial cultures. Ann. Rev. Microbiol. *Helicobacter pylori* NCTC 11637, Journal of antimicrobial Chemotherapy (1998) 42, 661-663.
178. Tallarida R.J., Porreca F., Cowan A. Statistical analysis of drug combinations for synergism. Pain 1992; 49: 93-7



ANEXO 1.

REACTIVO

- Solución salina fisiológica al 90% (ABBO-Liter, lote .3563MCZ)
- Peroxido de Hidrógeno 30%(Sigma-Aldrich)
- NaOH 1 N (Productos químicos Monterrey, S.A de C.V).
- HCl 1, 3 N (Productos químicos Monterrey, S.A de C.V).
- Cloruro de Bario 1% (Productos químicos Monterrey, S.A de C.V).
- Dimetil Sulfóxido (Sigma-Aldrich)
- Metanol (J.T. Baker)
- Safranina (J.T. Baker)
- Cristal violeta (SI)
- Glicerina (J.T.Baker)

MATERIAL DE VIDRIO

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Tubos de 12 X 75mm or 16X 125mm
- Pipeta volumétrica de 1, 2, 5, 10ml
- Cajas petri (plástico estéril)
- Pipetas pasteur
- Triangulo de vidrio
- Jeringas estériles
- Frasco



EQUIPO DE LABORATORIO

- Autoclave
- Espectrofotómetro
- Microscopio óptico
- Estufa
- Balanza analítica
- Centrífuga
- Jarra Gaspak