



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**Heterogeneidad en los genes de la isla de patogenicidad *cag*
(*cagPAI*) en cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes
mexicanos y su asociación con actividad biológica**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A:

ADRIANA REYES LEÓN

TUTOR: Dr. Francisco Javier Torres López

Diciembre 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y todos mis amigos por su cariño y apoyo incondicional. Gracias por compartir conmigo esta etapa de mi vida.

Al Dr. Javier Torres por la confianza, la oportunidad y el apoyo brindado para lograr una meta más. G r a c i a s

A todas las personas del Laboratorio de Bacteriología (UIMEIP), por su amistad y todos esos momentos divertidos que compartimos durante mucho tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto recibió financiamiento por parte de:

CONACYT Proyecto 2002-CO1-6957

Coordinación de Investigación en Salud-IMSS (FOFOI 2002/145)

**El presente trabajo fue realizado gracias al apoyo
de la beca CONACYT con No. de Registro: 166584**

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bacteriología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMEIP) del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI – IMSS.

ÍNDICE

Resumen	7
Abreviaturas	8
Índice de figuras	10
Índice de tablas	10
I. Introducción	11
I-1 Generalidades de la bacteria	11
I-1.1 Características microbiológicas	11
I-1.2 Características genéticas	12
I-1.3 Diversidad genética en <i>Helicobacter pylori</i>	12
I-2 Epidemiología	16
I-3 Infección por <i>Helicobacter pylori</i> y enfermedad	17
I-3.1 Infección y enfermedad en niños	17
I-3.2 Infección y enfermedad en adultos	17
I-4 Factores de virulencia de <i>Helicobacter pylori</i>	19
I-4.1 Ureasa y colonización de la mucosa gástrica	21
I-4.2 Adhesina de unión a antígenos Lewis (Le) de grupos sanguíneos (BabA) y otras adhesinas	21
I-4.3 Proteína inflamatoria de membrana externa (OipA)	23
I-4.4 Proteína activadora de neutrófilos (HP-NAP)	23
I-4.5 Citotoxina vacuolizante (VacA)	24
I-4.6 Isla de patogenicidad <i>cag</i> (<i>cagPAI</i>)	25

I-5 Gen asociado a la citotoxina A (<i>cagA</i>) y mecanismo de acción de la proteína CagA	28
I-6 Respuesta inmune a <i>Helicobacter pylori</i> e inducción de interleucina 8 (IL-8)	32
II. Justificación	35
III. Hipótesis	36
IV. Objetivos	37
IV-1 Objetivo general	37
IV-2 Objetivos particulares	37
V. Material y Métodos	38
V-1 Diagrama de flujo	38
V-2 Descripción de la población de estudio	39
V-3 Aislamiento y cultivo de <i>Helicobacter pylori</i>	39
V-4 Extracción de ADN	40
V-5 Tipificación de los genes <i>cagA</i>, <i>cagE</i>, <i>cagT</i> y <i>cag10</i> de <i>cagPAI</i>	40
V-5.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	41
V-5.2 Hibridación tipo Slot blot	41
V-6 Amplificación de la región 3' variable del gen <i>cagA</i>	42
V-7 Amplificación al azar del ADN genómico (RAPD-PCR)	43

V-8 Actividad biológica en colonias de <i>Helicobacter pylori</i>	45
V-8.1 Fenotipo de elongación celular “Hummingbird”	45
V-8.2 Inducción de Interleucina 8 (IL-8) <i>in vitro</i>	46
V-8.3 Translocación y fosforilación de la proteína CagA	46
V-9 Secuenciación de la región 3’ variable del gen <i>cagA</i>	48
V-9.1 Números de acceso en el GeneBank	49
V-10 Adherencia y viabilidad de <i>Helicobacter pylori</i> durante la infección de las células AGS	50
V-11 Análisis estadístico	50
VI. Resultados	51
VI-1 Presencia de los genes <i>cagA</i>, <i>cagE</i>, <i>cagT</i> y <i>cag10</i> de <i>cagPAI</i>	51
VI-2 Diversidad en la región 3’ variable del gen <i>cagA</i>	51
VI-3 Diversidad en la secreción de IL-8 en células AGS	55
VI-4 Diversidad en el fenotipo de elongación celular hummingbird	55
VI-5 Translocación y fosforilación de CagA en células AGS	60
VI-6 Diversidad fenotípica entre colonias aisladas del mismo paciente	63
VI-7 Secuenciación del extremo 3’ variable del gen <i>cagA</i>	63
VI-8 Asociación del polimorfismo en la región 3’ variable de <i>cagA</i> y actividad en células AGS	66

VI-9 Viabilidad y adherencia de <i>Helicobacter pylori</i> durante la infección de células AGS	69
VII. Discusión	71
VIII. Conclusiones	75
IX. Bibliografía	76
X. Publicaciones	94

RESUMEN

ANTECEDENTES: La proteína CagA de *Helicobacter pylori* se transloca al interior de las células epiteliales a través del sistema de secreción tipo IV codificado por la isla de patogenicidad *cag* (*cagPAI*); en el citoplasma CagA se fosforila e interactúa con la fosfatasa SHP-2 alterando la morfología celular. La presencia de múltiples motivos EPIYA en CagA se han asociado con el incremento de su actividad en células y el desarrollo de cáncer gástrico.

OBJETIVO: Estudiar la heterogeneidad de *cagPAI* y el polimorfismo en la región 3' variable del gen *cagA* en colonias de *H. pylori* aisladas de pacientes infectados y su asociación con la inducción de actividad biológica en células epiteliales gástricas.

MÉTODOS: La presencia de los genes *cagA*, *cagE*, *cagT* y *cag10* se determinó por PCR y dot blot en 318 colonias de *H. pylori* aisladas de cultivos primarios de biopsias gástricas de antro y de cuerpo de 18 pacientes. De todas las colonias se seleccionaron 75 para infectar células epiteliales de cáncer gástrico humano (AGS) *in vitro*. Se evaluó la inducción de IL-8, los rearrreglos en el citoesqueleto de actina (fenotipo hummingbird) y la translocación y la fosforilación de la tirosina de CagA. Se determinó por PCR el tamaño de la región 3' variable del gen *cagA* y se seleccionaron 30 colonias para secuenciar el producto y determinar el número y tipo de los motivos EPIYA presentes en la proteína CagA. Se analizó la asociación entre el polimorfismo en *cagA* y la inducción de las actividades biológicas en células AGS.

RESULTADOS: La mayoría de las colonias de *H. pylori* aisladas del mismo paciente tuvieron genotipos iguales y una actividad biológica similar en células AGS (inducción de IL-8 y la inducción del fenotipo hummingbird). Sin embargo, algunas colonias aisladas del mismo paciente y las colonias aisladas de diferentes pacientes tuvieron una amplia diversidad fenotípica aun cuando los patrones EPIYA fueron similares. Esta diversidad fue mayor en aquellas colonias con patrones EPIYA-ABC, donde el rango de producción de IL-8 fue de 200 a 1,200 pg/ml y del 20 al 70% para la inducción del fenotipo hummingbird. En algunos casos, la diversidad en la secuencia de la región 3' variable de *cagA* parece explicar la falta de actividad de las proteínas CagA en células AGS, ya que colonias con un patrón EPIYA-ACC o con un motivo EPIYA-B modificado tienen bajos o nulos niveles de actividad biológica en células AGS.

CONCLUSIONES: Existe una gran diversidad fenotípica (inducción de IL-8 e inducción del fenotipo hummingbird) entre colonias de *H. pylori cagPAI*⁺ aisladas de diferentes pacientes y entre colonias aisladas del mismo paciente. La ausencia ó modificación del motivo EPIYA-B esta asociada con baja actividad biológica en células AGS. El número de motivos EPIYA-C presente en CagA no está asociado con mayor actividad biológica en células AGS.

ABREVIATURAS

a.a. Aminoácido

ADN Ácido Desoxirribonucleico

AGS Línea de células epiteliales de cáncer gástrico humano

AlpA Adhesina de *H. pylori*

AP-1 Proteína activadora 1

ARN Ácido Ribonucleico

BabA Adhesina de unión a antígenos Lewis de grupos sanguíneos

cagA Gen asociado a la citotoxina A

CagA Proteína inmunogénica de *H. pylori* codificada por el gen asociado a la citotoxina A
(*cagA*)

CagA – WSS Proteína CagA del tipo Occidental

CagA - ESS Proteína CagA del tipo Oriental

cagE Gen de *cagPAI* asociado a la inducción de citocinas

cagPAI Isla de patogenicidad *cag*

DAC Dolor abdominal crónico

DNU Dispepsia no ulcerosa

ELISA Ensayo inmunoenzimático

EPIYA Motivo de 5 a.a.: Acido Glutámico, Prolina, Isoleucina, Tirosina y Alanina

ERK Cinasas reguladoras de señales extracelulares

GC Gastritis crónica

G - C Relación en el contenido de Guanina - Citosina

glr Gen de glutamato racemasa

G (-) Gramnegativo

HP-NAP Proteína activadora de neutrófilos de *H. pylori*

H. pylori *Helicobacter pylori*

HopZ Adhesina de *H. pylori*

IgG, IgM Inmunoglobulina G y M

IL-8 Interleucina 8

IFN- γ Interferón gama

IS605 Elemento de inserción 605
Kb Kilobases
Le Antígeno Lewis
LPS Lipopolisacárido
MALT Tejido Linfoide Asociado a la Mucosa
MAPK Proteínas cinasas activadoras de mitógenos
Mb Megabases
NF- κ B Factor de transcripción nuclear
OipA Proteína de membrana externa asociada a producción de IL-8
OMP Proteínas de membrana externa
ORF Marcos de lectura abierta
pb Pares de bases
PCR Reacción en cadena de la polimerasa
PMN Polimorfonucleares
ROI Especies reactivas al oxígeno
SabA Adhesina de unión al antígeno Lewis
SFB Suero fetal bovino
SSF Solución salina fisiológica
SST-IV Sistema de secreción tipo IV
TLR Receptores tipo Toll
TNF- α Factor de necrosis tumoral alfa
UG Ulcera gástrica
UD Ulcera duodenal
 μ m Micrómetros
vacA Gen que codifica para la citotoxina vacuolizante A
VacA Citotoxina vacuolizante A

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Genomas de <i>Helicobacter pylori</i>	14
Figura 2	Prevalencia de la infección	16
Figura 3	Factores de virulencia	20
Figura 4	Isla de Patogenicidad <i>cag</i> (<i>cagPAI</i>)	26
Figura 5	Sistema de Secreción tipo IV (SST-IV)	27
Figura 6	Región variable de CagA	29
Figura 7	Asociación motivos EPIYA – Actividad biológica	30
Figura 8	Inducción de interleucina 8 en células AGS	33
Figura 9	Patrones de RAPD-PCR	54
Figura 10	Diversidad en la región 3' de <i>cagA</i>	54
Figura 11	Diversidad en la actividad biológica en células AGS	57
Figura 12	Diversidad fenotípica entre pacientes	58
Figura 13	Fenotipo de elongación celular hummingbird	59
Figura 14	Translocación y fosforilación de CagA en células AGS	61
Figura 15	Reconocimiento de CagA con sueros de pacientes	62
Figura 16	Secuencias de aminoácidos de la región variable de CagA	65
Figura 17	Relación entre patrones EPIYA y actividad biológica	68
Figura 18	Viabilidad y adherencia de <i>H. pylori</i> durante la infección de AGS	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Secuencias de oligonucleotidos	44
Tabla 2	Condiciones de amplificación	44
Tabla 3	Números de acceso en el GenBank	49
Tabla 4	Resultados de colonias de <i>H. pylori</i> estudiadas	53

I. INTRODUCCIÓN

I-1 Generalidades de la bacteria

I-1.1 Características Microbiológicas

Helicobacter pylori es una bacteria que aislaron y cultivaron Robin Warren y Barry Marshall en 1983. Esta bacteria coloniza la superficie de la mucosa gástrica de humanos en forma de parches y es capaz de sobrevivir en el ambiente ácido del estómago con la ayuda de la ureasa [87]. La ureasa hidroliza a la urea generando amonio y CO₂ que ayudan a neutralizar el pH ácido del estómago [143].

H. pylori es una bacteria Gram (-) de forma espiral que mide de 0.5 a 1 µm de diámetro y de 2.5 a 5 µm de largo; con la superficie lisa y los extremos redondeados; es móvil por la presencia de 4 a 6 flagelos polares con un extremo terminal en forma de bulbo que le permite nadar a través del moco y anclarse a la mucosa gástrica. Esta bacteria es de crecimiento lento, ya que tarda de 5 a 7 días en generar colonias y en los aislamientos primarios a partir de biopsias tarda en crecer hasta 10 días. Es una bacteria fastidiosa que crece en placas de agar base suplementado con sangre de carnero o de caballo al 5% bajo condiciones microaerofílicas de 7 a 12% de CO₂ a 37°C y gran porcentaje de humedad [21]; las colonias que crecen son pequeñas, circulares, convexas, lisas, translúcidas en forma de “gotitas de rocío” que miden de 1 a 2 mm de diámetro en cultivos jóvenes de 24 o 48 hrs [113]. En cultivos de más de 12 días, la bacteria cambia su forma espiral a formas cocoides que son metabólicamente activas pero no cultivables *in vitro*, este cambio de morfología también puede ser inducido por la falta de nutrientes; por condiciones de crecimiento no óptimas como temperatura no adecuada, baja humedad y mayor cantidad de oxígeno; por la adición de sales biliares o sales de bismuto al medio de crecimiento o por la exposición prolongada a antibióticos [90].

Las pruebas bioquímicas características para la identificación de *H. pylori* son la de la ureasa, la de catalasa y de la oxidasa todas ellas positivas [96].

I-1.2 Características genéticas

El genoma de *H. pylori* es circular y tiene un tamaño que va de 1,608 a 1,727 Kb dependiendo de las características propias de cada cepa (promedio 1.672 Mb) y el contenido de G-C es del 39% [137].

Dentro del genoma hay 5 regiones con diferente contenido de G-C en donde están presentes la mayoría de los genes específicos de cepa con funciones asociadas a: Sistemas de modificación-restricción, síntesis de envoltura celular, transferencia de ADN y proteínas, replicación de ADN, metabolismo de fosfolípidos y principalmente virulencia [139]. Tres de las cinco zonas tienen un contenido de G-C del 35% y se han denominado “Zonas de Plasticidad”; se sugiere que las zonas de plasticidad fueron adquiridas por transferencia horizontal [3, 119].

Hay tres copias de los genes *I6S* y *23S*, aparentemente no tienen un origen de replicación definido y aproximadamente el 40% de los aislados tienen plásmidos de un tamaño de 1.5 a 23.3 Kb, que no contienen factores de virulencia reconocidos, sin embargo, pueden ser los responsables de la integración y transferencia de ADN entre cepas [137]. Se sugiere que los mecanismos básicos de replicación, división celular y secreción son similares a los de *Escherichia coli* y *Haemophilus influenzae* [139].

I-1.3 Diversidad genética en *Helicobacter pylori*.

Una característica importante del genoma de *H. pylori* es la gran variabilidad genética que le da una ventaja selectiva y le permite co-evolucionar con el huésped durante décadas e incluso le facilita la colonización de nuevos huéspedes [41]. En *H. pylori* la variabilidad se debe principalmente a los rearrreglos que sufre el genoma en respuesta al estrés asociado a la colonización y a la adaptación al nuevo ambiente. [134, 135].

La diversidad genética se da a través de múltiples mecanismos dentro de los cuáles están incluidos: Las mutaciones puntuales, los eventos de recombinación y los rearrreglos genéticos; en estos últimos mecanismos la participación de los elementos de inserción (IS) y las secuencias repetidas juegan un papel fundamental.

Se ha documentado que *H. pylori* es una bacteria con altos índices de mutación y recombinación. Es capaz de generar diversidad genética por recombinación entre diferentes cepas de *H. pylori* que están colonizando el estómago del huésped al mismo tiempo (“**Infeción mixta**”) [152]. Dangeruta y colaboradores en 1999, demostraron que *H. pylori* puede llevar a cabo el intercambio de material genético por medio de eventos de recombinación inter-especie, lo que en algunos casos ocasiona la pérdida de la isla de patogenicidad *cag*, por lo tanto, el paciente tiene infección mixta y de esta manera también se puede generar plasticidad genética [41].

El genoma de *H. pylori* también contiene muchas secuencias repetidas que permiten los rearrreglos o las deleciones dentro del genoma [135], con esto se incrementa el polimorfismo en *H. pylori*. Generalmente el polimorfismo en esta bacteria se da por sustituciones sinónimas que no afectan la secuencia de aminoácidos [34].

Por otro lado, *H. pylori* es una bacteria naturalmente competente, que posee un mecanismo de conjugación muy eficiente para la transformación de ADN *in vitro*, esto le permite incorporar ADN extraño a su genoma, por medio de recombinación ó por medio de transferencia horizontal. Hasta el momento, se ha determinado experimentalmente que la presencia del locus *comB* en el genoma de la bacteria es esencial para la transformación natural [69]. Durante estos procesos se pueden perder algunos genes principalmente los que se encuentran en las zonas de plasticidad, ocasionando rearrreglos que le proporcionan cierta flexibilidad y diversidad [19, 72, 73].

Hasta el momento se han secuenciado 3 genomas de *H. pylori*:

A) La cepa 26695 (ATCC 700392) se aisló en el Reino Unido de un paciente con gastritis, tiene un genotipo *cagA*⁺/*vacA*⁺ (s1b/m1). El tamaño de su genoma es de 1,667,867 pb y el

91% está codificado en 1,590 ORF's. Se ha reportado que 117 de los genes son específicos de esta cepa (Fig. 1) [139].

B) La cepa J99 (ATCC 700824) se aisló en Estados Unidos de un paciente con úlcera duodenal, tiene un genotipo *cagA*⁺/*vacA*⁺ (s1a/m1). El tamaño de su genoma es de 1,643,831 pb y el 90.8 % está codificado en 1,495 ORF's. Hay 89 genes específicos de esta cepa (Fig. 1) [3].

C) La cepa HPAG1 se aisló en Suecia de un paciente con gastritis crónica atrófica, tiene un genotipo *cagA*⁺/*vacA*⁺ (s1b/m1). El tamaño de su genoma es de 1,596,366 pb y contiene un plásmido de 9,369 pb. Se ha reportado que 43 de los genes son específicos de esta cepa (Fig. 1) [75].

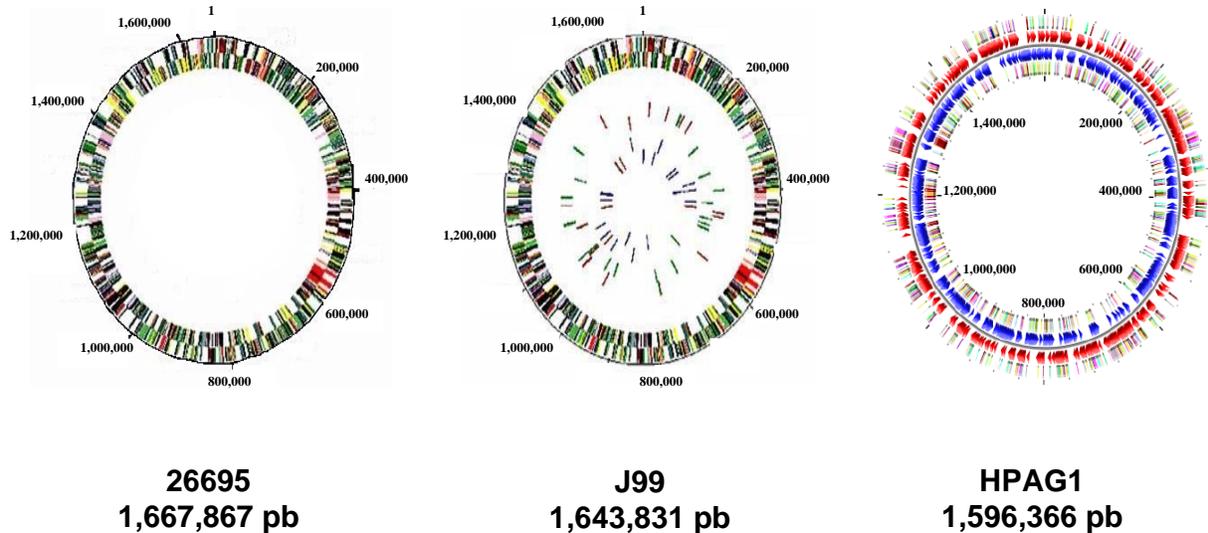


Figura 1.- Genomas de *Helicobacter pylori*. Representación circular de los 3 genomas secuenciados hasta el momento. **26695**, fue aislado de un paciente con gastritis; **J99**, fue aislado de un paciente con úlcera duodenal y **HPAG1**, fue aislado de un paciente con gastritis crónica atrófica.

La variabilidad genética entre cepas de *H. pylori* no es tan grande como se había especulado, en 1999 Alm y colaboradores analizaron dos de los tres genomas secuenciados (26695 y J99) y demostraron que sólo el 7% de los genes son específicos de cada cepa y la mayoría se encuentran en regiones variables llamadas Zonas de Plasticidad [3]; también Israel y colaboradores demostraron que 2 aislados de la cepa J99 que fueron tomados del mismo paciente en un intervalo de 6 años tienen el 3% de diferencias en su genoma [73]. Sin embargo, al analizar un número mayor de cepas algunos otros autores han reportado grandes porcentajes de variabilidad genética en *H. pylori*, este resultado probablemente está influenciado por el número de cepas en donde los cambios se van acumulando [93, 119].

De hecho, en algunas cepas la isla de patogenicidad *cag* (*cagPAI*) se pierde probablemente por eventos de recombinación homóloga que se llevan a cabo en las secuencias repetidas de 31 pb localizadas en los extremos de la isla. Como resultado de la recombinación homóloga, se pueden generar cepas *cagPAI*⁻ y *cagPAI*⁺ en el estómago del mismo paciente, originando una infección mixta [19].

También en la región variable de la proteína CagA (extremo carboxilo) se llevan a cabo mecanismos de recombinación entre secuencias repetidas directas, lo que ocasiona la duplicación o delección de los motivos EPIYA [7].

Actualmente la diversidad en *H. pylori* se define como el resultado de la acumulación de mutaciones durante la colonización por largos períodos de tiempo (décadas), lo cuál afecta el flujo genético dentro de las poblaciones bacterianas y esto a su vez ocasiona diferencias genotípicas y fenotípicas [9].

A estas variantes genéticas que están presentes dentro del estómago del mismo huésped se les ha definido como “**Quasi-especies**”. Este término se refiere a todas aquellas poblaciones que tienen diferencias genéticas inducidas por mutaciones, por recombinación o por transferencia horizontal como resultado de los procesos de selección, pero a pesar de esto tienen un origen común [81].

I-2 Epidemiología

Hasta el momento no se ha determinado claramente cuál es la vía de transmisión de *H. pylori*, aunque se han propuesto 2 posibles vías: Una, que es de persona a persona y la otra que es fecal – oral. Actualmente, más del 50% de la población mundial esta infectada con *H. pylori* y se ha descrito que la infección se adquiere principalmente durante la niñez y persiste por décadas en la mucosa gástrica [62].

La prevalencia de la infección en niños menores de 10 años es del 45 al 80% en países en vías de desarrollo y del 1 al 10% en países desarrollados [35, 97] y en adultos es del 70 al 90% y del 25 al 50% respectivamente (Fig. 2) [49, 108].

En México, el 50% de los niños a los 10 años de edad están infectados y más del 80% de los adultos también están infectados (Fig. 2) [141].

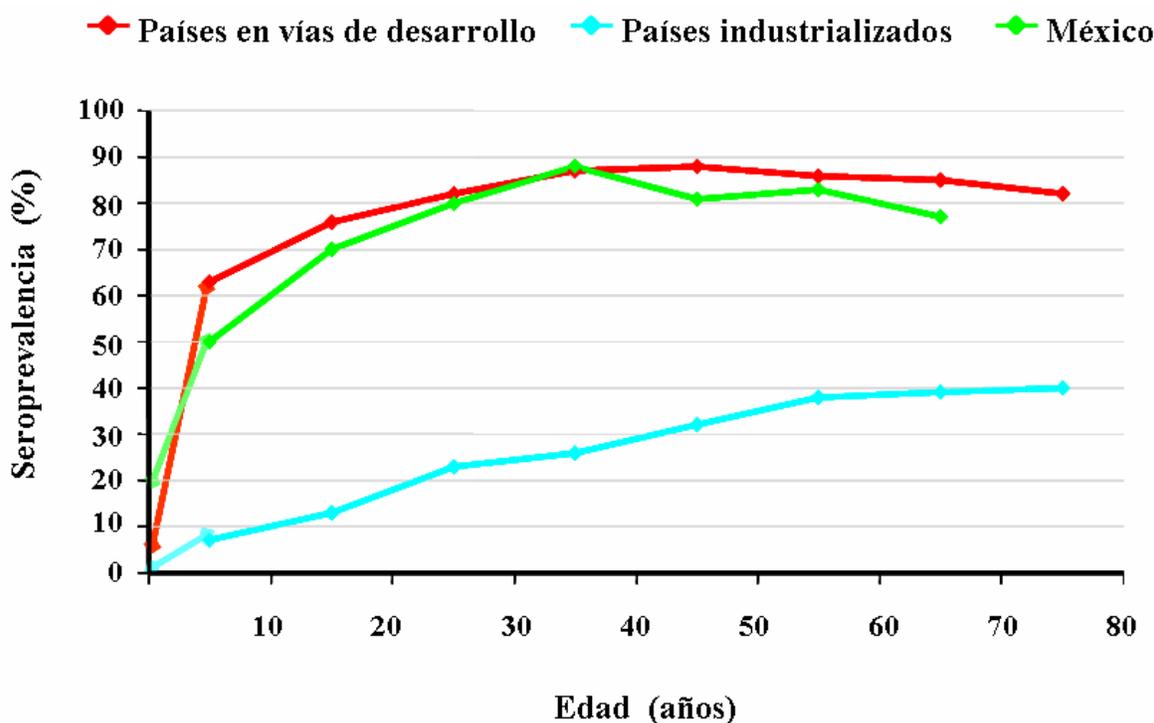


Figura 2.- Prevalencia de la infección. Seroprevalencia de la infección por *H. pylori* en países en vías de desarrollo, en países desarrollados y en México. Imagen tomada y modificada de Blaser 1996 y Torres 1998.

I-3 Infección por *Helicobacter pylori* y enfermedad

Cuando *H. pylori* coloniza la mucosa gástrica del humano hay una respuesta inflamatoria aguda y daño al epitelio gástrico ocasionado por el gran número de bacterias presentes y por la disminución del pH del estómago (aumento de acidez); esta respuesta se mantiene por semanas y si la inflamación persiste se puede progresar a etapas más severas como el desarrollo de gastritis, de úlceras, de lesiones pre-cancerosas y de cáncer gástrico.

I-3.1 Infección y enfermedad en niños

De la infección por *H. pylori* en niños se desconocen muchas cosas, lo que se sabe es que aún cuando la infección se adquiere durante la niñez muchos de ellos permanecen asintomáticos y solo una fracción desarrolla enfermedad como los adultos [33, 22, 82, 103].

La infección en niños generalmente se manifiesta como una gastritis antral severa y el grado de inflamación en el antro es más intenso en niños con úlcera que en niños con gastritis [43]. La infección en niños con *H. pylori* no se asocia con síntomas específicos; el dolor abdominal recurrente (DAR), el vómito y la diarrea no son características particulares de la infección bacteriana. El desarrollo de úlcera duodenal (UD) es poco frecuente y se desconoce el grado de incidencia ya que los síntomas que se presentan son inespecíficos, sin embargo, existe una fuerte asociación (94%) entre úlcera duodenal e infección con *H. pylori* en niños [25, 58]. Es raro el desarrollo de úlcera gástrica (UG), la incidencia es del 25% y la asociación entre infección bacteriana y enfermedad es muy débil [40, 64, 142].

I-3.2 Infección y enfermedad en adultos

La mayoría de los adultos infectados con *H. pylori* al igual que los niños, cursan la infección de manera asintomática. La infección se manifiesta como una gastritis superficial crónica caracterizada por la infiltración de células mononucleares en la mucosa.

Sólo una proporción de aproximadamente el 20% desarrollan enfermedades gastro-duodenales como: úlcera duodenal [33], úlcera gástrica, linfomas gástricos del tipo MALT (Tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica), gastritis crónica atrófica que se considera el precursor del cáncer gástrico y sólo < 3 % llega a desarrollar cáncer gástrico [22, 82, 103].

Los pacientes con un gran número de bacterias en la mucosa gástrica e inflamación severa inducen gran producción de ácido en el estómago lo que favorece el desarrollo de gastritis en el antro y estos pacientes tienen un alto riesgo para desarrollar úlcera duodenal [45, 57, 78], mientras que en otros pacientes la infección por *H. pylori* disminuye la producción de ácido produciendo gastritis en el cuerpo, lo que acelera el desarrollo de gastritis atrófica, úlcera gástrica, metaplasma, displasia y cáncer gástrico [42, 46].

La severidad y desarrollo de la enfermedad causada por la infección de *H. pylori* depende básicamente de tres factores:

- 1.- Factores del huésped como el genotipo y la respuesta inmune.
- 2.- Factores ambientales como la dieta y la región geográfica.
3. Factores de la bacteria como el genotipo, el fenotipo y la variabilidad genética

El proceso y los factores involucrados en el desarrollo de enfermedad por la infección con *H. pylori* todavía no están claros, pero hay indicios que demuestran que la respuesta fisiológica del huésped contribuye a la severidad del daño al epitelio gástrico, por lo que los factores del huésped juegan un papel importante, aunque no explican totalmente el desarrollo de enfermedad, ya que cada persona es capaz de responder de diferentes maneras ante la infección por *H. pylori*.

Con respecto al humano, se ha descrito ampliamente el polimorfismo en el grupo de genes de la interleucina 1 (IL-1A, IL-B, IL-1RN) que es una citosina pro-inflamatoria que actúa como inhibidor de la secreción de ácido en el estómago. El polimorfismo se origina por transición de bases de citosina (C) a timina (T), el cuál está asociada con el incremento de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico en pacientes infectados con *H. pylori*. Los polimorfismo reportados hasta el momento en el gen de IL-1A se encuentran en las posiciones -511 (C/T) y -31 (C/T). Cuando este tipo de polimorfismos están presente se incrementa la producción de IL-1 β creando un ambiente de hipo-clorhidria inducido

principalmente por la presencia de *H. pylori* [47, 115]. Por otro lado, el gen IL-1RN que es el receptor endógeno de la IL-1 β tiene un polimorfismo debido a la inserción de dos secuencias repetidas en el intrón 2 (IL-1RN*2), esto también afecta la respuesta a la infección con *H. pylori*, incrementando la inflamación y favoreciendo el desarrollo de atrofia gástrica [47, 70, 114].

En interleucina 10 (IL-10), también se ha encontrado un polimorfismo por transición de bases en las posiciones: -1082 (G/A), -819 (C/T) y -592 (C/A), lo que se considera como un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico; ya que en presencia de estos polimorfismos se regular negativamente la producción de IL-1 β , TNF- α e INF- γ provocando un desequilibrio en los niveles de mediadores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios, esto favorece el desarrollo de atrofia gástrica asociado a la infección. La regulación en la producción de citocinas es importante en la etapa inicial de la infección por *H. pylori* pero también en la progresión a cáncer [48, 115].

Se ha mencionado mucho que los factores ambientales juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedad en pacientes infectados con *H. pylori*; uno de ellos es la dieta, ya que al parecer el consumo de grandes cantidades de sal esta asociada con el incremento de riesgo para el desarrollo de cáncer en el 50 al 80% de los casos. Se ha sugerido que los altos niveles de NaCl pueden inhibir la apoptosis mediada por Fas que es un evento clave en la transformación celular [133]. También el origen étnico parece ser un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad después de la infección con *H. pylori* [53].

I-4 Factores de virulencia de *Helicobacter pylori*

La capacidad de la bacteria para causar enfermedad se ha asociado a la expresión de varios factores de virulencia, cada uno con una función específica (Fig. 3).

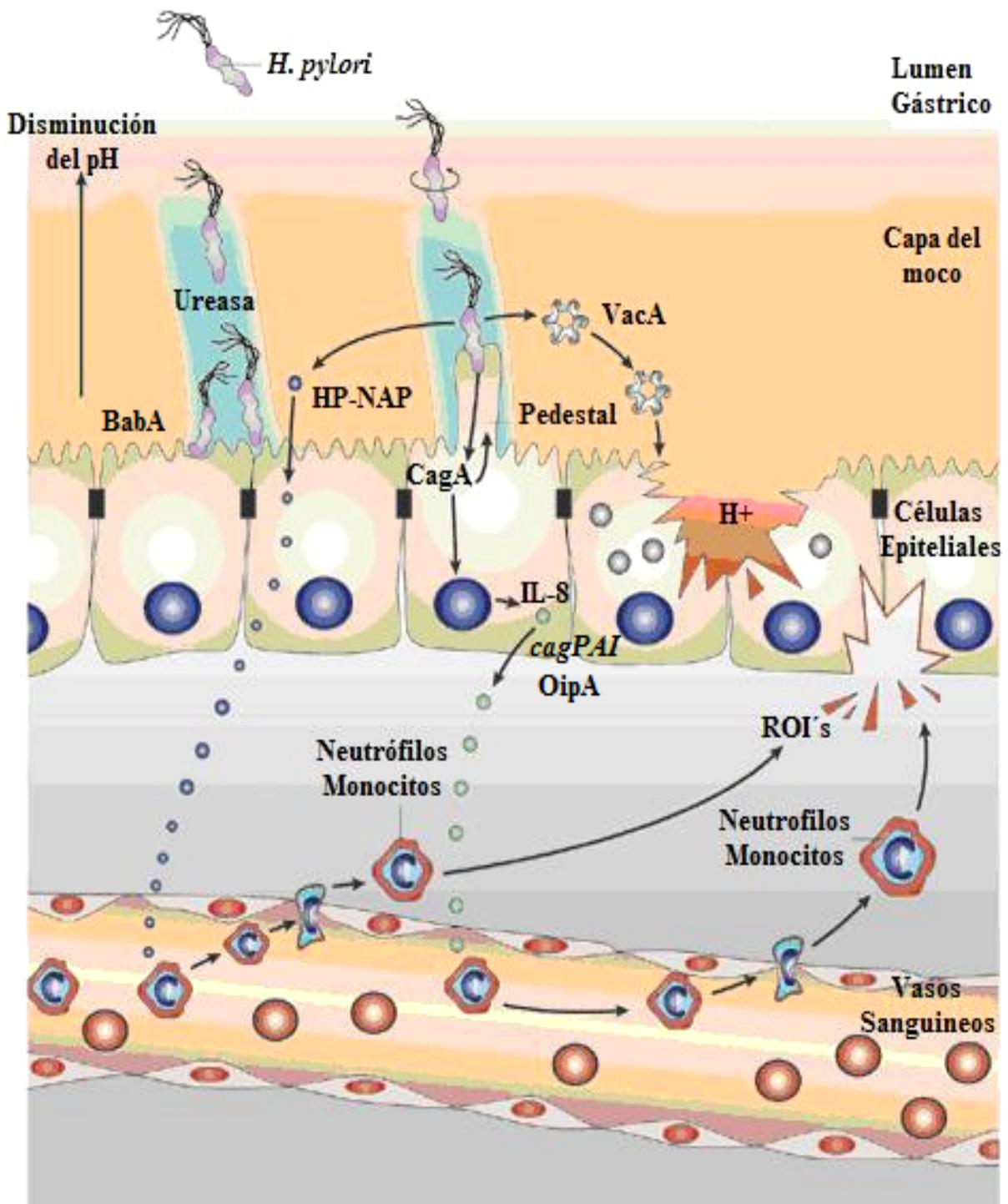


Figura 3.- Factores de virulencia. *Helicobacter pylori* es capaz de expresar diferentes factores de virulencia, los cuales contribuyen para el desarrollo de enfermedad en algunos de los pacientes infectados con esta bacteria. Tomada y modificada de Montecucco 2001.

I-4.1 Ureasa y colonización de la mucosa gástrica.

La ureasa es un factor muy importante para la colonización y la persistencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica, su actividad es indispensable para crear un microambiente menos ácido en el estómago. Mediante la degradación de urea por acción de la ureasa, se forma una capa de amonio alrededor de la bacteria, esta capa sirve de escudo para proteger a *H. pylori* del choque ácido y de esta manera la bacteria puede sobrevivir en la mucosa gástrica causando daño al epitelio [44, 94].

La ureasa también participa en el reclutamiento de los neutrófilos y los monocitos al sitio de infección, activando la producción de citocinas proinflamatorias. Se ha demostrado que la mayoría de las personas infectadas con *H. pylori* tienen una respuesta de anticuerpos contra la ureasa de la bacteria [63].

I-4.2 Adhesina de unión a antígenos Lewis (Le) de grupos sanguíneos (BabA) y otras adhesinas

En el genoma de *H. pylori* se identificó un grupo de 32 proteínas de membrana externa (Outer Membrane Proteins / OMP) [139] y algunas de ellas se han clasificado como adhesinas:

- Adhesina de unión a antígenos Lewis de grupos sanguíneos (BabA / blood group antigen-binding adhesin) [56].
- La adhesina de unión al ácido siálico de los antígenos Lewis (SabA / sialic acid-binding adhesin) [86].
- AlpA y AlpB [101].
- HopZ [109].

BabA: Participa en la adhesión de *H. pylori* a los antígenos Lewis^b (Le^b) de grupos sanguíneos en humanos [26]. Hay 2 copias del gen *babA* (*babA1* y *babA2*) y la diferencia entre ellos es la presencia de 10 pb en la región 5' del gen *babA2* lo que corresponde al

inicio de la región codificadora. En el caso de *babA1* la región de 10 pb se encuentra ausente, por lo tanto, el gen no es codificado para la adhesina.

Se ha reportado que la presencia de *babA2* está asociada a la presencia de los genes *cagA* y *vacA* tipo s1/m1 y este genotipo está relacionado con el desarrollo de la úlcera duodenal y cáncer gástrico [32, 56, 158]. Sin embargo, en poblaciones de origen asiático, la asociación del genotipo con enfermedad no existe, ya que muchas de las cepas *babA2*⁺ fueron aisladas de pacientes asintomáticos [157].

La región media de BabA es altamente variable y puede ser la responsable de la diversidad que tienen las cepas de *H. pylori* para unirse a los antígenos Lewis^b *in vitro* [51].

SabA: Participan en la unión de *H. pylori* con el ácido siálico de los antígenos Lewis^x y Lewis^y. Su expresión está regulada por la presencia de dinucleótidos repetidos CT en la región 5' del gen *sabA* justo 10 pb después del codón de inicio ATG. Dependiendo del número de repetidos presentes la proteína puede expresarse o no expresarse [86].

Se ha demostrado que el 40% de las cepas de *H. pylori* que tienen la adhesina SabA, son capaces de adherirse a los neutrófilos humanos por medio de la unión de SabA con receptores de ácido siálico expuestos en la membrana de los neutrófilos lo que desencadena la activación de neutrófilos que favorece la fagocitosis de la bacteria [148].

AlpA y AlpB: Los genes *alpA* y *alpB* que codifican para estas adhesinas forman parte de un operón llamado “alpAB”. Las cepas mutantes en estos genes son incapaces de adherirse a células AGS en cultivos *in vitro* [101].

HopZ: Es una adhesina con dos alelos I y II. La diferencia entre ambos alelos es la presencia de 20 aminoácidos en el alelo I y al igual que SabA, el gen *hopZ* está regulado por la presencia de repetidos CT en el extremo 5' variable.

Las mutantes en *hopZ* pierden su capacidad de adhesión a células epiteliales gástricas *in vitro*.

Actualmente HopZ se ha asociado al desarrollo de enfermedad gástrica en pacientes infectados con *H. pylori* [109].

I-4.3 Proteína Inflamatoria de Membrana Externa (OipA)

La proteína OipA pertenece a la familia de proteínas de la membrana externa (OMP) y se considera un factor de virulencia muy importante asociado a la inducción de secreción de IL-8 en células epiteliales gástricas.

La expresión de *oipA* al igual que *sabA* y *hopZ* está regulada por la presencia de repetidos CT en la región 5' del gen, además el número de estos repetidos ayuda a determinar el origen geográfico de las cepas de *H. pylori* [6, 154].

Las cepas de *H. pylori* que expresan la proteína OipA, están relacionadas a casos de úlcera duodenal y cáncer gástrico en el 90 y 76% de los casos respectivamente. Generalmente este tipo de cepas tienen un genotipo *cagPAI*⁺, *vacA* s1/m1 y *babA2*⁺ [155].

I-4.4 Proteína activadora de Neutrófilos (HP-NAP)

Durante el proceso de infección por *H. pylori* se produce una gran infiltración de neutrófilos y monocitos en la mucosa gástrica. Las células inflamatorias liberan especies reactivas al oxígeno (ROI) por medio de una cascada de señalización intracelular que causa daño local al tejido gástrico.

H. pylori posee una proteína activadora de neutrófilos (HP-NAP) que juega un papel fundamental en la respuesta inflamatoria a la infección por la bacteria, HP-NAP está codificada por el gen *napA* [50] y actúa como quimiotáctico de neutrófilos y monocitos a células endoteliales mediante la interacción con carbohidratos. Posteriormente, se activa el metabolismo oxidativo de células inflamatorias responsables de liberar ROI's, los cuales generan especies mutagénicas que contribuyen a la patogénesis de *H. pylori* asociada al desarrollo de cáncer gástrico [138]. También se ha observado que ratones inmunizados con HP-NAP tienen protección contra la infección por *H. pylori* en el 80% de los casos, lo que sugiere que HP-NAP podría ser un buen candidato para el desarrollo de vacunas contra la bacteria [123]. Recientemente, se ha reportado que HP-NAP es capaz de estimular células de la respuesta inmune inata para inducir la producción de IL-12 e IL-23, promoviendo una respuesta del tipo Th1 [4].

I-4.5 Citotoxina vacuolizante VacA

Uno de los factores de virulencia más importantes y ampliamente descritos en *H. pylori* es la citotoxina vacuolizante (VacA) que induce *in vitro* vacuolización en células epiteliales gástricas. El gen *vacA* codifica para una protoxina de 139 kDa que se disocia en una toxina de 87 kDa, un péptido señal y un dominio autotransportador. El péptido señal conduce a VacA a la membrana citoplasmática y el autotransportador la inserta en la membrana externa; del 40 al 60% de la citotoxina producida está asociada a la membrana externa y el resto se libera a la capa del moco y al dominio apical celular donde se activa a pH ácido y resiste la digestión con pepsina [36, 37].

Todas las cepas de *H. pylori* tienen el gen *vacA* pero solo el 60% de ellas tienen el genotipo *vacA s1/m1* por lo que son capaces de expresar la citotoxina vacuolizante activa e inducir la formación de vacuolas en células HeLa y AGS. El gen tiene dos tipos de alelos, uno para el péptido señal “s” (s1a, s1b, s1c y s2) que se asocia al grado de inflamación y otro para la región media “m” (m1 y m2) que es responsable del daño al epitelio gástrico. Las cepas con un genotipo *vacA s1/m1* producen más citotoxina y están asociadas a mayor grado de inflamación, desarrollo de úlcera péptica y cáncer gástrico, mientras que las s2/m2 son no inductoras de vacuolización [10, 11]. Además de causar vacuolización en células epiteliales, VacA es capaz de desorganizar el citoesqueleto de células epiteliales gástricas e interferir en las adhesiones focales que son indispensables para mantener la integridad celular [106]; inhibe la migración y proliferación celular impidiendo el proceso de regeneración del epitelio gástrico [107]; induce apoptosis en células epiteliales gástricas mediante la liberación del citocromo C [38]; forma canales selectivos al paso de iones [80]; inmunosuprime la respuesta adaptativa del huésped inhibiendo la proliferación de linfocitos T [136] y es capaz de formar complejos oligoméricos responsables de inducir la vacuolización de células [55].

De acuerdo al genotipo de la secuencia señal de *vacA* las cepas pueden agruparse de acuerdo a su origen geográfico. En México al igual que en España, Portugal, Centro y Sur América el genotipo predominante es *vacA - s1b* [61, 150].

I-4.6 Isla de patogenicidad *cag* (*cagPAI*)

Otro de los factores de virulencia de *H. pylori* es la Isla de Patogenicidad *cag* (*cagPAI*), que es una región de 40 Kb, adquirido de manera horizontal e insertado en la región 3' del gen de la glutamato racemasa (*glr*), la isla está flanqueada por secuencias repetidas directas de 31 pb, lo que sugiere que este fragmento fue adquirido a través de eventos de recombinación, el contenido de G-C de *cagPAI* es diferente al resto del genoma (35%); de hecho *cagPAI* se ha clasificado como una de las tres zonas de plasticidad de *H. pylori*. En algunas cepas la isla se encuentra como una sola unidad y en otras cepas está dividida en dos partes (*cagI* y *cagII*) por un elemento de inserción (IS605). La presencia del IS605 favorece la recombinación dentro de la isla lo que en algunos casos da como resultado la eliminación parcial o total de *cagPAI* [2, 28].

cagPAI esta presente en el 60 y 80% de las cepas aisladas de países occidentales y asiáticos respectivamente. Algunos estudios han demostrado que existe una asociación entre la presencia de *cagPAI* completa y el desarrollo de úlcera y cáncer gástrico, también se ha confirmado que *cagA* no es un marcador confiable de la presencia e integridad de la isla debido a la heterogeneidad en el contenido de genes encontrada en algunas cepas [17, 71, 74, 79, 85, 98, 100], sin embargo, en otros estudios, la correlación entre la presencia de una isla de patogenicidad íntegra y el desarrollo de enfermedad tampoco ha sido confirmada [12, 76, 77].

Dentro de las actividades biológicas asociadas a la presencia de *cagPAI* se pueden mencionar la secreción de IL-8 por activación de NF- κ B [130], la translocación y fosforilación de la proteína CagA a través del Sistema de Secreción Tipo IV [29] y la inducción de la apoptosis en monocitos humanos [54].

cagPAI contiene 27 genes, algunos de ellos tienen homología con genes de *Bordetella pertussis* (*ptl*), *Agrobacterium tumefaciens* (*vir*) y *Brucella suis* (Fig. 4) que codifican para proteínas involucradas en la formación de un Sistema de Secreción Tipo IV (SST-IV) mediante el cual la proteína CagA se transloca (Fig. 5) y se fosforila en el interior de la célula, *cagPAI* también participa en la inducción de IL-8 [35].

De acuerdo a lo anterior, Fischer y colaboradores estudiaron la participación de cada uno de los genes de *cagPAI* en la inducción de las actividades biológicas ya mencionadas mediante un estudio de mutantes utilizando la cepa de referencia 26695 y de acuerdo a sus resultados ellos proponen que 14 de los 27 genes de *cagPAI* son indispensables para la inducción de IL-8 en células AGS y que 18 genes son necesarios para la translocación de CagA; el resto de los genes (9 genes) no parecen tener una participación importante en estas actividades [52].

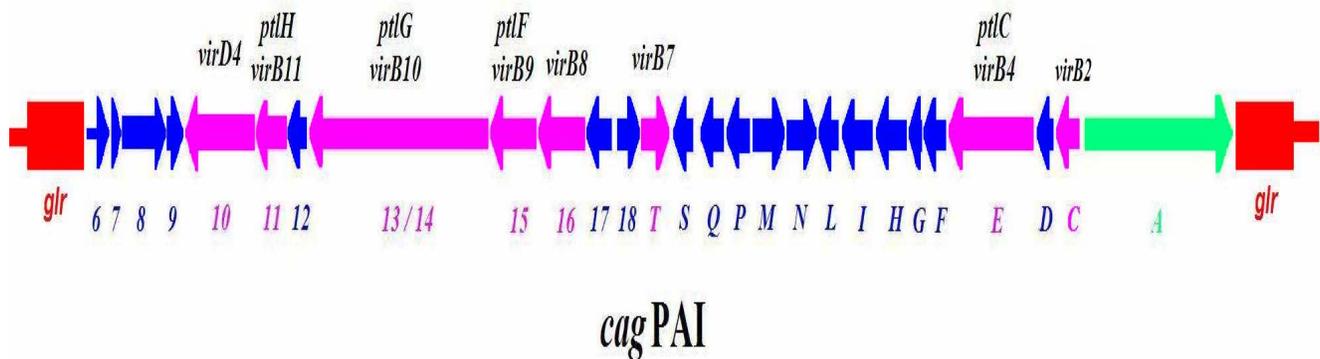


Figura 4.- Isla de Patogenicidad *cag* (*cagPAI*). Está constituida por 27 genes denominados *cag*, algunos de ellos codifican para proteínas con homología a proteínas del sistema Vir y Ptl (color rosa) involucradas en la formación del poro del Sistema de Secreción tipo IV (SST-IV), además de CagA que es la única proteína efectora (color verde) descrita para *cagPAI*.

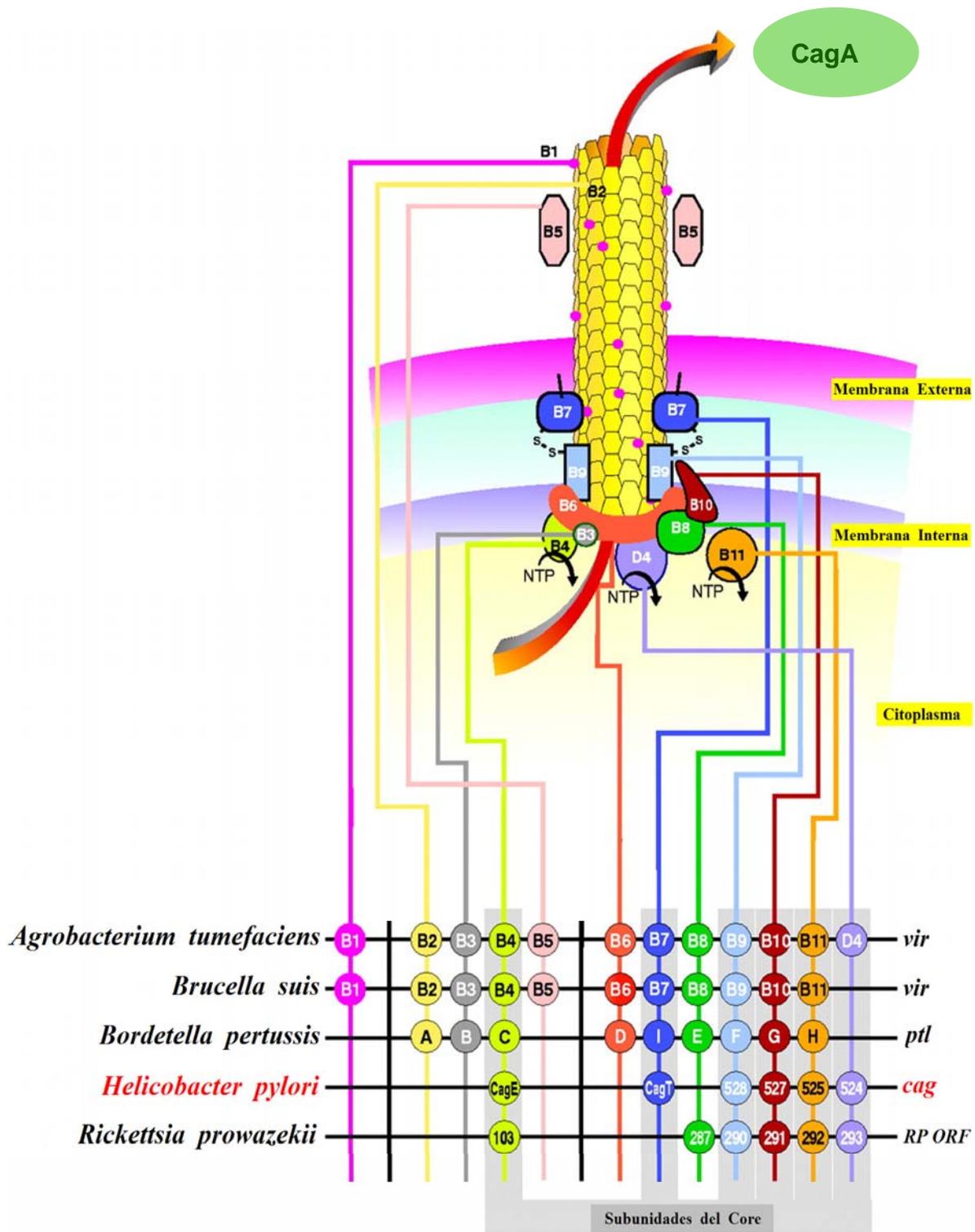


Figura 5.- Sistema de Secreción tipo IV. Después del contacto de *H. pylori* con células epiteliales gástricas se forma el SST-IV, por el cual CagA es translocada al interior de las células para activar las vías de señalización que inducen la formación del fenotipo de elongación celular “Hummingbird”. Tomada y modificada de Covacci 1999.

I-5 Gen asociado a la citotoxina A (*cagA*) y mecanismo de acción de la proteína CagA

El gen *cagA* es uno de los 27 genes de *cagPAI*, se localiza en el extremo 3' de la isla (Fig 4). Del 60 al 80% de las cepas de *H. pylori* poseen el gen y existe una fuerte correlación con el desarrollo de úlcera duodenal y del cáncer gástrico en pacientes infectados [33]. Este gen es uno de los más grandes de *cagPAI*, su tamaño oscila entre 3,500 – 3,750 pb, se caracteriza por tener una región 5' muy conservada y una región 3' altamente variable. La variabilidad en esta región se debe a la presencia de secuencias repetidas que determinan el tamaño del gen dependiendo del número de repetidos presentes [146]. Esta variabilidad ayuda a marcar una diferencia significativa en la secuencia de nucleótidos entre los aislados occidentales y los asiáticos [149]. *cagA* codifica para la proteína CagA de 120–128 kDa que es muy inmunogénica; se ha reportado que en países como Estados Unidos y Holanda la seropositividad para CagA es del 88 y del 56% en pacientes con úlcera y dispepsia, respectivamente [88]. Mientras que en países como Japón y China la seropositividad entre pacientes con úlcera, gastritis, cáncer gástrico y mucosa normal es del 90 al 94% lo que hace suponer que en estos países no existe una asociación entre la presencia de la proteína y el desarrollo de enfermedad gastroduodenal [84].

La variabilidad en el extremo carboxilo de CagA permite agrupar a las cepas de acuerdo a su origen geográfico por la presencia de un fragmento de aminoácidos específico, antes del motivo EPIYA-C “QAASGLGGVQAGFPLKRHDKVDDLKSKV” para CagA de origen occidental (WSS **W**estern CagA-**S**pecific **S**equences) y antes del motivo EPIYA-D “EATSAINRKIDRINKIASAGKGVGGFSGA” para CagA de origen asiático (ESS **E**ast CagA-**S**pecific **S**equences) [153]. En la región variable de CagA puede haber de 1 a 5 motivos EPIYA (Ácido Glutámico, Prolina, Isoleucina, Tirosina y Alanina); los cuales se han clasificado de acuerdo a la secuencia de aminoácidos alrededor de ellos: EPIYA-A, EPIYA-B y EPIYA-C para los aislados occidentales y EPIYA-A, EPIYA-B y EPIYA-D para los aislados asiáticos (Fig. 6) [67].

motivos C ó D correlacionan directamente con el nivel de fosforilación, la actividad de unión de SHP-2 y el desarrollo del fenotipo hummingbird [67]. Sin embargo, se ha demostrado que el motivo con mayor afinidad a SHP-2 es el EPIYA-D porque conserva íntegra la secuencia de unión (EPIYATIDFD), no así el EPIYA-C en donde la secuencia esta incompleta (EPIYATIDDL) [132]; esto resultados sugieren que las cepas de *H. pylori* de origen asiático son biológicamente más activas, lo que podría explicar el alto índice de cáncer gástrico en estos países. En algunos estudios se ha demostrado que cepas con mayor número de motivos EPIYA-C se aíslan de pacientes con gastritis atrófica y cáncer gástrico, por lo que se sugiere una correlación entre el tamaño de la proteína CagA y el desarrollo de enfermedad (Fig. 7) [13, 14]. Otros autores han reportado resultados similares al estudiar cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes Sudafricanos y Chinos [8, 159].

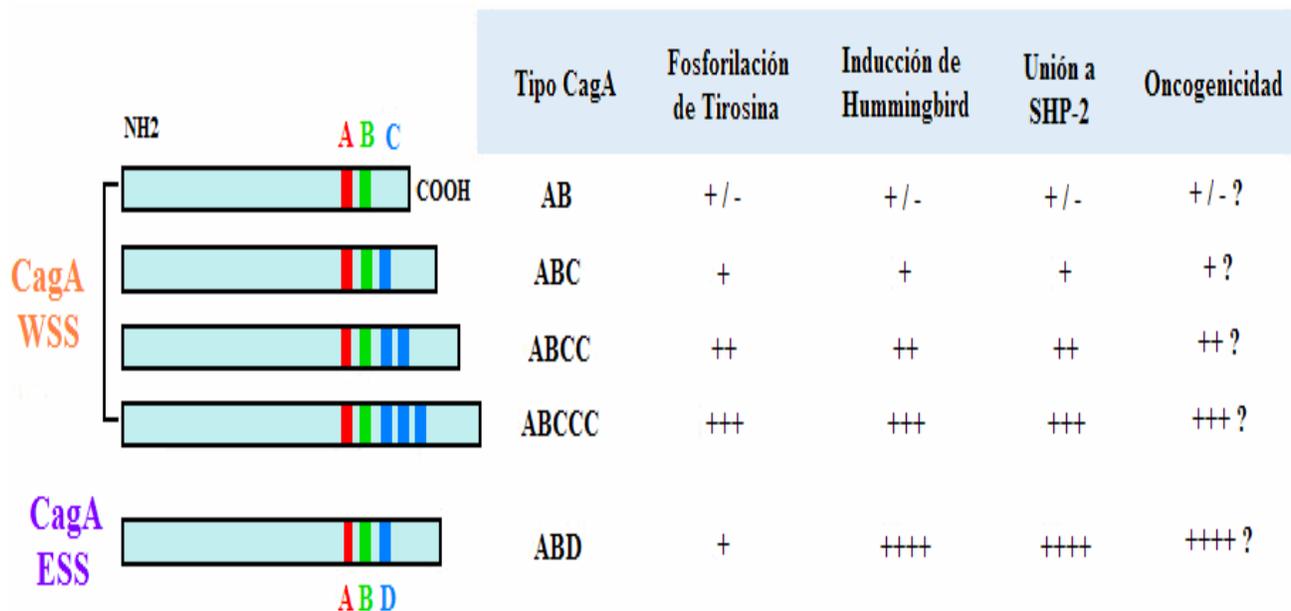


Figura 7.- Asociación motivos EPIYA – Actividad biológica. Se ha reportado una asociación entre el número de repetidos C y mayor actividad biológica en células AGS, aunque las proteínas con máxima actividad son las CagA-ESS ya que tienen motivo de unión a la fosfatasa íntegro en comparación a las CagA-WSS. Tomada y modificada de Hatakeyama 2005.

Durante la fosforilación de CagA se lleva a cabo la desfosforilación de algunas proteínas del huésped [112], como la Cortactina que es la proteína de unión a actina que regula la función del citoesqueleto. Una vez que la Cortactina se desfosforila se inicia el desarrollo del fenotipo de elongación celular causado por la infección de *H. pylori* [127].

Otra proteína es la vinculina, la cuál regula la polimerización de actina mediante la interacción con el complejo Arp2/3 para la nucleación y el ensamble de los filamentos de actina en las adhesiones focales que son fundamentales para la integridad celular. Por ello, al desfosforilarse la vinculina se inhibe la unión de células a la matriz extracelular causando daño a la mucosa gástrica. Se especula que este proceso podría ser el mecanismo por el cuál *H. pylori* causa daño a la mucosa gástrica e induce el desarrollo de enfermedad [91].

Después de la translocación, CagA interactúa con proteínas transductoras de señales en el huésped jugando un papel importante en la señalización de factores de crecimiento, de movilidad y de invasión celular durante la infección bacteriana. Todo esto de manera independiente de la fosforilación.

Una vez que se translocó, CagA se une al receptor del factor de crecimiento Grb2 para formar un complejo que induce la elongación y la proliferación celular causando hiperplasia [89]. También, interactúa con el receptor c-Met para inducir una respuesta mitogénica que podría ser el paso inicial para el desarrollo de cáncer gástrico; estimula la fosforilación de la tirosina del receptor c-Met a través de un SST-IV funcional lo que ocasiona degradación de la matriz extracelular y permite la invasión de *H. pylori* a las células epiteliales gástricas [31, 104]. Se asocia con la proteína ZO-1 de las uniones estrechas interrumpiendo el ensamble entre células epiteliales lo que afecta la permeabilidad celular [5]. Recientemente se ha descrito que CagA se adhiere a la parte interna de la membrana plasmática de células epiteliales por medio de los motivos EPIYA alterando la señalización intracelular [68].

I-6 Respuesta inmune a *Helicobacter pylori* e inducción de interleucina 8 (IL-8)

La respuesta inmune hacia patógenos bacterianos es de dos tipos:

- A) **Respuesta inmune inata:** Es la primera respuesta de defensa contra los patógenos invasores, generalmente es inespecífica pero rápida al reconocimiento de moléculas bacterianas por medio de los receptores tipo Toll (TLR). Estos receptores los expresan las células presentadoras de antígenos y al interactuar con sus ligandos inician una cascada de señalización para la transcripción y secreción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-8 y quimiocinas que ayudan a la eliminación del patógeno.

- B) **Respuesta inmune adaptativa:** Es específica pero lenta. Normalmente se rige por la respuesta inmune inata para la activación de células T o B de memoria.

En el caso de *H. pylori* hay una interacción distinta entre la bacteria y el sistema inmune; aun cuando se induce la activación de células T para la producción de TNF- α e IFN- γ la respuesta es ineficiente para erradicar la bacteria, por lo que *H. pylori* puede permanecer en el estómago humano por décadas [111]. Por otro lado, *H. pylori* es capaz de inducir una respuesta inmune de tipo Th1 que se asocia a una mayor inflamación gástrica lo que favorece la patogénesis de úlcera péptica [92].

La infección de la mucosa gástrica por *H. pylori* se caracteriza por una gran infiltración de células plasmáticas, de linfocitos, de monocitos y de neutrófilos que causan inflamación aguda y crónica en la mucosa. Hay una producción local de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-8 y una producción sistémica de anticuerpos IgM en la fase aguda e IgG en la fase crónica de la infección [39] (Fig. 8).

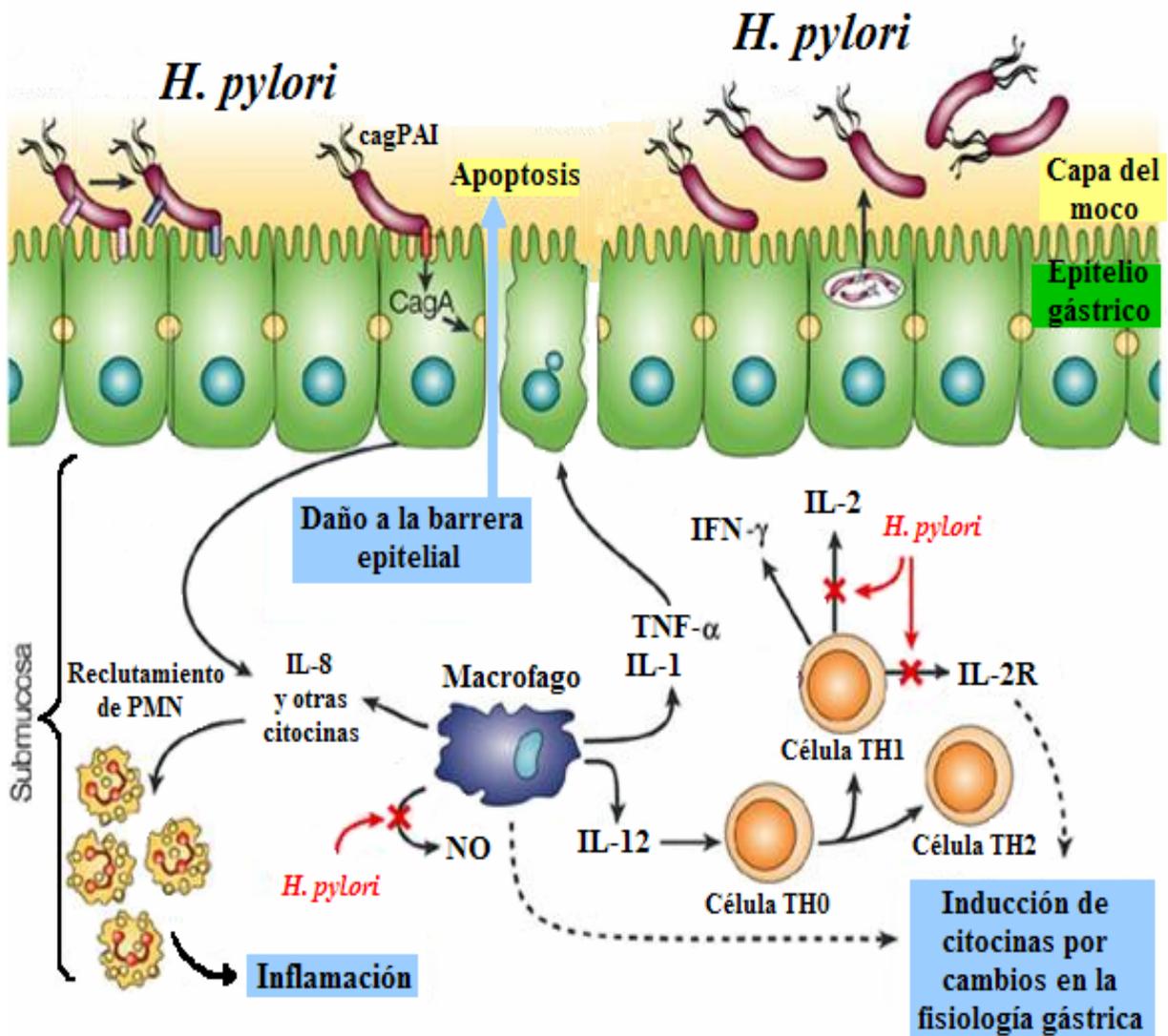


Figura 8.- Inducción de interleucina 8 en células AGS. Después del contacto directo de *H. pylori* a las células AGS se induce la producción de IL-8 con respuesta a la infección.

En experimentos *in vitro*, se ha observado que en células AGS se induce una gran producción de IL-8 después de la infección con las cepas de *H. pylori* cagPAI⁺. IL-8 es una citocina producida por los macrófagos, las células T, las células endoteliales y las

epiteliales que actúa como quimiotáctico para células T y neutrófilos además de que es un importante mediador en el desarrollo de gastritis asociada a la infección por *H. pylori* [129].

Para la inducción de IL-8 en células AGS es indispensable el contacto directo de la bacteria con la célula ya que de esta manera se regula la activación del factor de transcripción citoplasmático NF- κ B vía fosforilación, ubiquitinación y degradación proteolítica de la proteína I κ B. Una vez liberado en el citoplasma el NF κ B se transloca rápidamente al núcleo donde se activa la transcripción del gen de IL-8. Se ha observado que los genes *cagE*, *cagG*, *cagH*, *cagI*, *cagL*, *cagM*, *cag15*, *cag13/14* y *cag11* de *cagPAI* se requieren para la activación de NF- κ B y producción de IL-8 [59, 117, 130], ya que se necesita de un SST-IV funcional y de las proteínas cinasas activadoras de mitogénos (MAPK) como mediadores para la activación de NF- κ B [83]. Aunque el mecanismo de transducción de señales para la producción de IL-8 en células epiteliales gástricas después de la infección con *H. pylori* no ha sido bien definido; se han propuesto nuevas vías de señalización para la activación de NF- κ B y la secreción de IL-8 en las que se involucra al Calcio, a la cascada ERK de las tirosin cinasas [99] y a la proteína activadora 1 (AP-1) que es un factor de transcripción sensible a la oxidación, que regula la expresión de factores de crecimiento y es muy importante para la ulceración y la carcinogenesis [122].

No obstante, *H. pylori* tiene la capacidad de suprimir o de evadir la respuesta inmune del huésped utilizando algunas estrategias muy efectivas; una de ellas es la poca actividad antigénica de su LPS y de sus flagelos que son poco reconocidos por los receptores TLR-4 y TLR-5. El TLR-9 tampoco puede actuar para reconocer ADN no metilado ya que el material genético de *H. pylori* se encuentra metilado, por lo tanto, se minimiza el reconocimiento [18, 24, 110, 131], además de que previene la producción de óxido nítrico que es un elemento fundamental para la respuesta inmune inata [60]. Sin embargo, se ha demostrado que la expresión de TLR-2 y TLR-5 en células epiteliales gástricas se incrementa después de la infección con *H. pylori* lo que favorece el inicio de la vía de señalización para la activación de NF- κ B e inducción de IL-8, también se incrementa la señalización de MAPK cinasas río arriba de AP-1 lo que contribuye al aumento de secreción de IL-8 [140].

II. JUSTIFICACIÓN

Se ha reportado que las cepas de *H. pylori* aisladas de diferentes poblaciones tienen diversidad en el contenido de genes en *cagPAI*. Sin embargo, no existen reportes de estas variaciones en nuestra población y cómo se asocia la diversidad en *cagPAI* con las actividades biológicas relacionadas a la patogenicidad como: La liberación de IL-8, la translocación y la fosforilación de CagA y el fenotipo de elongación celular hummingbird en células epiteliales gástricas. Aunque en un estudio previo, nosotros encontramos heterogeneidad dentro de *cag PAI* en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes mexicanos; no sabemos realmente cuál es el efecto de esta diversidad con respecto a las actividades biológicas. Por lo que consideramos que hacen falta estudios que documenten esta asociación durante la infección, lo que contribuirá a entender mejor los padecimientos ocasionados por *H. pylori* en nuestra población.

III. HIPÓTESIS

Una proporción de cepas de *H. pylori* estudiadas tendrán deleciones parciales en *cagPAI* y si los genes deletados son *cagA*, *cagE*, *cagT* y *cagI0*, estas cepas serán incapaces de inducir la secreción de IL-8, la translocación y fosforilación de la proteína CagA e inducir el fenotipo de elongación celular hummingbird, en células epiteliales gástricas.

Sin embargo, habrá cepas de *H. pylori* que serán incapaces de inducir actividad biológica en las células epiteliales gástricas, a pesar de tener una *cagPAI* íntegra.

IV. OBJETIVOS

IV-1 Objetivo General

Estudiar la heterogeneidad en *cagPAI* y su asociación con la actividad biológica en células epiteliales gástricas infectadas con múltiples colonias de *H. pylori* aisladas de pacientes y la asociación del polimorfismo en *cagA* con actividad biológica en células epiteliales gástricas.

IV-2 Objetivos Particulares

- ♣ Evaluar la integridad de *cagPAI* en colonias de *H. pylori* aisladas de pacientes mexicanos.

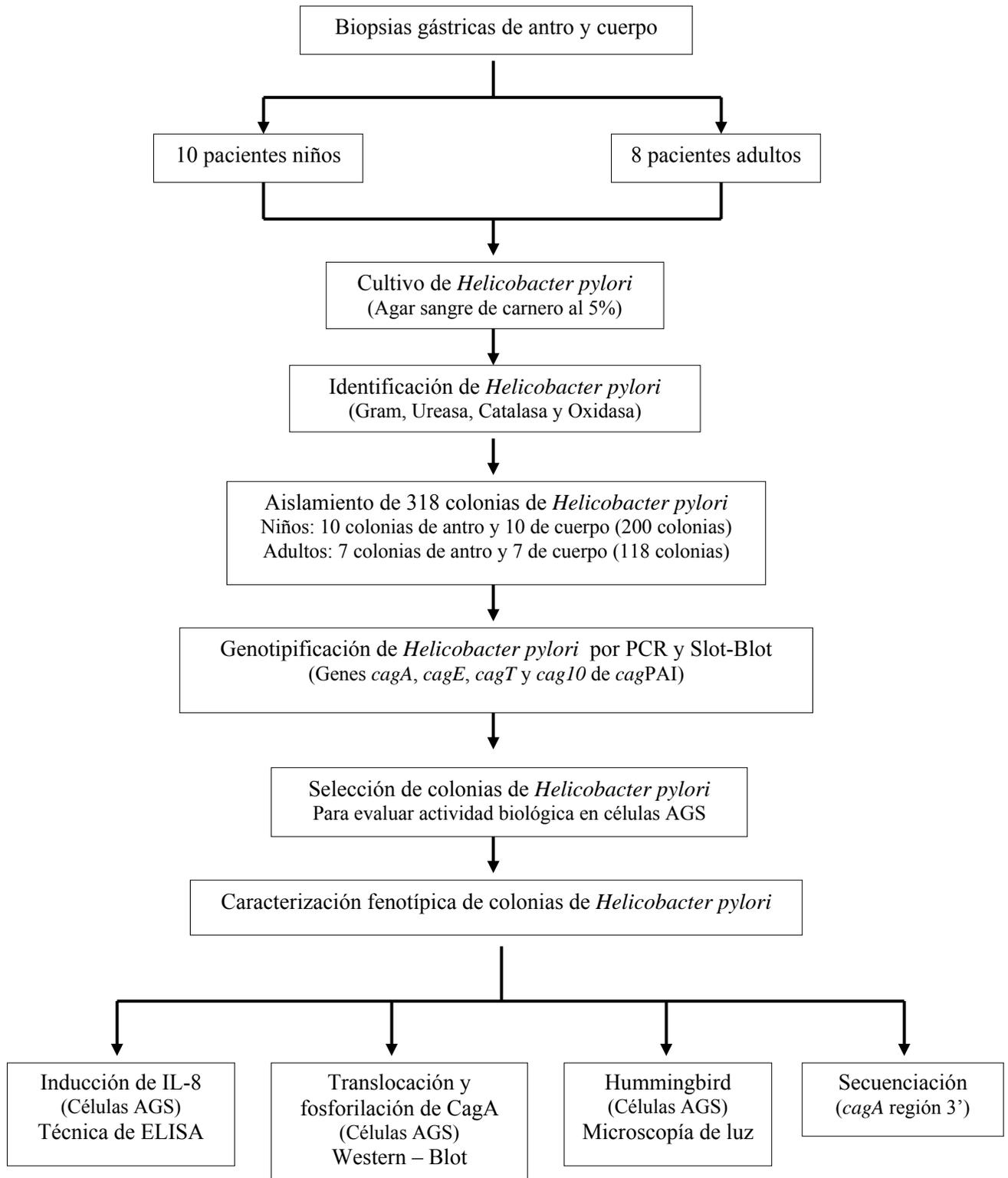
- ♣ Determinar la asociación entre la heterogeneidad en *cagPAI* y la capacidad de inducir la liberación de IL-8 en células epiteliales gástricas.

- ♣ Determinar la asociación entre la heterogeneidad en *cagPAI* y la capacidad de translocar y fosforilar CagA e inducir el fenotipo hummingbird en células epiteliales gástricas.

- ♣ Analizar el polimorfismo en la región 3' variable del gen *cagA* y determinar su asociación con las actividades biológicas antes mencionadas.

V. MATERIAL Y METODOS

V-1 Diagrama de flujo



V-2 Descripción de la población de estudio

Se estudiaron las cepas de *H. pylori* aisladas de 10 pacientes niños (7 niños y 3 niñas) con un intervalo de 7 a 16 años de edad ($x = 10.7$ años) y con dolor abdominal crónico (DAC) atendidos en el Servicio de Gastroenterología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN-SXXI), del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), en la ciudad de México; y de 8 pacientes adultos (5 hombres y 3 mujeres) con un intervalo de 28 a 88 años de edad ($x = 57.2$ años) atendidos en el Servicio de Gastroenterología del Hospital de Especialidades del mismo Centro Médico. Tres de los pacientes tenían un diagnóstico de úlcera gástrica (UG), 4 de úlcera duodenal (UD) y uno con dispepsia no ulcerosa (DNU).

Todos los pacientes se sometieron a endoscopia para obtener 2 biopsias gástricas de antro y dos de cuerpo, una de las biopsias de cada región se utilizó para el cultivo de la bacteria y la otra biopsia se utilizó para los estudios histológicos.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital de Pediatría del CMN-SXXI, IMSS. Ciudad de México.

V-3 Aislamiento y cultivo de *Helicobacter pylori*

Las biopsias gástricas de antro y de cuerpo se homogeneizaron y se tomaron 100 μ l para el cultivo de *H. pylori* en placas de agar base (BBL, MD. USA) suplementado con 5% de sangre de carnero. Las placas se incubaron bajo condiciones microaerofílicas a 37°C, 9% de CO₂ durante 5 días. El cultivo primario de *H. pylori* se identificó por morfología colonial y microscópica con tinción de Gram, por pruebas bioquímicas de ureasa, de catalasa y de oxidasa.

De los cultivos primarios se aislaron de 7 a 10 colonias de antro y de 7 a 10 colonias de cuerpo de cada uno de los pacientes, las colonias se propagaron en 2 placas de agar sangre para su crecimiento bajo condiciones microaerofílicas a 37°C, 9% de CO₂ por 48 hrs, el cultivo de una placa se cosechó en 1 ml de caldo brucella con glicerol al 15% para

congelar a -70°C y almacenar en la Colección de cepas del Laboratorio de Bacteriología de la UIMEIP-IMSS y la otra placa se cosechó para la extracción de ADN.

En total se obtuvieron 318 colonias de *H. pylori*, 200 fueron aisladas de niños con un promedio de 20 colonias por paciente (10 de antro y 10 de cuerpo) y 118 de adultos con un promedio de 15 colonias por paciente (7 a 8 de antro y 7- 8 de cuerpo).

V-4 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó con el método comercial de Wizard (Promega Corporation. MA, USA). Brevemente, se cosechó el cultivo de *H. pylori* de una placa de agar sangre en 1 ml de solución salina al 0.9%, se obtuvo el paquete celular por centrifugación (Biofuge fresco. Heraeus), las células se lisaron con Solución de Lisis de Ácidos Nucléicos (Wizard) a 80°C por 5 min, se eliminó el ARN con RNasa (10mg/ml) durante 1 hr, a 37°C , y las proteínas con la Solución de Precipitación de Proteínas (Wizard), durante 5 min, a 4°C , se precipitó el ADN con alcohol isopropílico a -20°C por 24 hrs y se lavó 2x con etanol al 70%. El ADN se resuspendió en 100 μl de agua estéril grado biología molecular, se cuantificó por espectrofotometría (NanoDrop) y se evaluó la integridad por electrofóresis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Finalmente el ADN se almacenó a -20°C hasta su uso para la genotipificación.

También se obtuvo el ADN de las cepas de referencia de *H. pylori* 84-183 (ATCC 53726) y 26695 (ATCC 700392) que se usaron como controles positivos y de la cepa Tx30a (ATCC 51932) que se utilizó como control negativo.

V-5 Tipificación de los genes *cagA*, *cagE*, *cagT* y *cagI0* de *cagPAI*

La genotipificación de *cagPAI* se realizó por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para los genes *cagE*, *cagT* y *cagI0*. Estos genes se seleccionaron porque están

distribuidos a lo largo de la isla de patogenicidad *cag* y porque codifican para proteínas con homología a proteínas del sistema Vir y Ptl que forman un SST-IV. También se estudió el gen *cagA* que codifica para la proteína que se transloca por el SST-IV y se fosforila en el interior de las células epiteliales gástricas.

V-5.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La presencia de los genes de *cagPAI* se determinó en las 318 colonias de *H. pylori* por PCR usando oligonucleótidos específicos (Tabla 1). Para *cagA*, *cagE* y *cagT* se usaron 2 juegos de oligonucleótidos (Tabla 1). Las mezclas de PCR se prepararon en un volumen final de 25 μ l con 1 μ l (100 ng/ μ l) de ADN cromosomal como templado; 1 x de buffer de PCR; 1.5 mM de MgCl₂; 0.2 mM de cada deoxinucleótido (Boehringer Mannheim, Germany); 25 pmol de cada oligonucleótido y 1.25 unidades de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, Life Technologies, Brasil).

Las reacciones de PCR se realizaron bajo condiciones específicas para cada gen (Tabla 2), en un termociclador GeneAmp PCR system 9700 (PE de Applied Biosystems). En todos los experimentos se incluyeron controles positivos (26695, 84-183) y negativos (Tx30a, H₂O) y las muestras se corrieron por duplicado.

Para determinar la ausencia de *cagPAI*, se realizó el PCR de Empty-site con los oligonucleótidos 2 y 25 (Tabla 1) que amplifican un segmento del gen de glutamato racemasa (*glr*) que es donde se inserta la isla de patogenicidad.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio y visualizados en el procesador de imágenes (GeneSnap, Syngene. Synoptics Ltd).

V-5.2 Hibridación tipo Slot blot

Para confirmar los resultados de PCR se realizó hibridación tipo Slot blot con sondas para los genes *cagA*, *cagE*, *cagT* y *cagI0* preparadas por PCR con los primers F1 y

B1; picB101 y picB102; cagT-F y cagT-R y cag10-F y cag10-R, respectivamente (Tabla 1). Como templado, se usó el ADN de la cepa de referencia 84-183, los productos de PCR se purificaron con el kit Rapid Gel Extaction Systems (Marligen Bioscience, U.S.A) de acuerdo al protocolo. La pureza y concentración de los productos purificados se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio y visualizados en el procesador de imágenes GeneSnap. Las sondas se marcaron radioactivamente con [α - 32 P]dCTP usando el método de random primer extension (Megaprime DNA labelling system kit, Amersham, Pharmacia Biotech).

La hibridación se realizó de acuerdo a los protocolos estándar [121], utilizando membranas de nylon Hybond-N⁺ (Amersham, Pharmacia Biotech) con 20 ng de ADN genómico por pozo. Se realizó un paso de prehibridación (6x SDS, 5x Reactivo de Denhardt's, 0.5% SDS, 100 μ g/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y 50% de Formamida) durante 1 hr a 65°C y posteriormente se realizó la hibridación (6x SSC, 0.5% SDS, 100 μ g/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y 50% de Formamida) con las sondas marcadas radioactivamente durante 24 hrs a 65°C. Se realizaron 3 lavados (Lavado 1: 2x SSC y 0.5% SDS; Lavado 2: 2x SSC y 0.1% SDS; Lavado 3: 0.1x SSC y 0.5% SDS), los dos primeros a temperatura ambiente durante 15 min y el último a 37°C durante 30 min. Las membranas se procesaron para autoradiografía con películas KODAK en un cassette de exposición y se revelaron mediante rayos X.

V-6 Amplificación de la región 3' variable del gen *cagA*

A las 250 colonias que fueron positivas para la presencia de *cagA*, se les realizó PCR con los oligonucleótidos cag2 y cag4 (Tabla 1) para amplificar la región 3' variable del gen *cagA*. La mezcla de PCR se preparó en un volumen final de 25 μ l con 1 μ l (100 ng/ μ l) de ADN cromosomal; 1 x de buffer de PCR; 1.5 mM de MgCl₂; 0.2 mM de cada deoxinucleótido (Boehringer Mannheim, Germany); 25 pmol de cada oligonucleótido y 1.25 unidades de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, Life Technologies, Brasil).

La reacción de PCR se realizó bajo condiciones específicas (Tabla 2), en un termociclador GeneAmp PCR system 9700 (PE de Applied Biosystems). Se incluyeron controles positivos (26695, 84-183) y negativos (Tx30a, H₂O).

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio y visualizados en el procesador de imágenes GeneSnap.

V-7 Amplificación al Azar del ADN genómico (RAPD-PCR)

Las mezclas de PCR se prepararon en un volumen final de 25 µl, con 1 µl (40 ng/µl) de ADN genómico; 2.5 µl de Buffer de PCR 10X; 3.5 mM de MgCl₂; 20 pmol de oligonucleótido 1254 ó 1281 (Tabla 1); 0.25 mM de cada deoxinucleótido (Boehringer Mannheim, Germany) y 1.2 unidades de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, Life Technologies, Brazil). Los productos se amplificaron en un termociclador GeneAmp PCR system 9700 (PE de Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: Una etapa de inicio a 94°C por 5 min, a 36°C por 5 min y a 72°C por 5 min durante 4 ciclos; una segunda etapa a 94°C por 1 min, a 36°C por 1 min y 72°C por 2 min durante 30 ciclos y una extensión final a 72°C por 10 min.

Los patrones RAPD-PCR se analizaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2%, 80 volts con 20 µl de producto, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en el procesador de imágenes GeneSnap.

Tabla 1.- Secuencias de oligonucleotidos utilizados en este trabajo.

Gen	Nombre	Secuencias de nucleótidos (5' → 3')	Producto (pb)	Referencia
<i>cagA</i>	F1 B1	GAT AAC AGG CAA GCT TTT TGA GG CTG CAA AAG ATT GTT TGG CAG	349	146
	<i>cag2</i> <i>cag4</i>	GGA ACC CTA GTC GGT AAT G ATC TTT GAG CTT GTC TAT CG	450 - 850	118
<i>cagE</i>	picB 101 picB 102	TTG AAA ACT TCA AGG ATA GGA TAG AGC GCC TAG CGT AAT ATC ACC ATT ACC C	510	147
	PBRT-F PBRT-R	AAG GGT AAA GAA ATG GGA CTG GGA AGC GTG ATA AAA GAG CAA TGT	1,800	159
<i>cagT</i>	<i>cagT</i> -F <i>cagT</i> -R	ATG AAA GTG AGA GCA AGT GT TCA CTT ACC ACT GAG CAA AC	823	85
	CAG13 CAG14	TCT AAA AAG ATT ACG CTC ATA GGC G CTT TGG CTT GCA TGT TCA AGT TGC C	489	74
<i>cag10</i>	<i>cag10</i> -F <i>cag10</i> -R	ATG GAA GAC TTT TTG TAT AA TCA CAG TTC GCT TGA ACC CA	2208	85
	Empty site-2 Empty site-25	ACA TTT TGG CTA AAT AAA CGC TG TCA TGC GAG CGG CGA TGT G	360	2
	1254 1281	CCG CAG CCA A AAC GCG CAA C		1

Tabla 2.- Condiciones de amplificación de los productos de PCR.

<i>cagA</i>		<i>cagE</i>		<i>cagT</i>		<i>cag10</i>	Empty site
F1 – B1	<i>cag2</i> – <i>cag4</i>	101 – 102	PBRT F – R	<i>cagT</i> F – R	CAG 13 – 14	<i>cag10</i> F – R	2 – 25
94°C 1 min	95°C 1 min	94°C 1 min	95°C 1 min	94°C 30 seg	94°C 1 min	94°C 30 seg	94°C 1 min
55°C 1 min	50°C 3 min	52°C 1 min	56°C 2 min	50°C 30 seg	53°C 2 min	57°C 30 seg	57°C 1 min
72°C 1 min	72°C 1:30 min	72°C 1 min	72°C 4 min	72°C 2 min	72°C 2 min	72°C 2 min	72°C 1 min
35 ciclos	35 ciclos	35 ciclos	35 ciclos	30 ciclos	35 ciclos	30 ciclos	35 ciclos
72°C 6 min	72°C 10 min		72°C 2 min		72°C 10 min		

V-8 Actividad biológica en colonias de *Helicobacter pylori*

Para determinar la actividad biológica de diversas colonias de *H. pylori*, se seleccionaron 75 colonias de acuerdo a los resultados de genotipificación de *cagPAI* para realizar experimentos de infección *in vitro* utilizando células epiteliales de cáncer gástrico humano AGS (ATCC CRL-1739) y cultivos bacterianos jóvenes (24 hrs de crecimiento).

Las actividades biológicas que se evaluaron fueron:

- Fenotipo de elongación celular hummingbird
- Inducción en la secreción de IL-8
- Translocación y fosforilación de CagA
- Adherencia y viabilidad de la bacteria durante el período de infección.

V-8.1 Fenotipo de elongación celular hummingbird

Crecimiento las células AGS y colonias de *H. pylori*: Las células AGS se crecieron en botellas de 75 cm² bajo condiciones microaerofílicas a 37°C, 5% de CO₂, durante 48 hrs, para alcanzar una confluencia del 90% en medio de cultivo celular F-12-HAM con L-Glutamina (GIBCO, Invitrogen Corporation, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) descomplementado a 56°C durante 30 min. Las células se cosecharon y se sembraron en placas de 6 pozos, a una densidad de 2x10⁵ células/2 ml/pozo, con medio F12–10% SFB a 37°C, 5% de CO₂ durante 48 hrs.

Al mismo tiempo se crecieron las cepas de *H. pylori* de las colonias seleccionadas en placas de agar sangre a 37°C, 9% de CO₂ por 24 hrs.

Infección de células AGS: El crecimiento de 24 hrs de *H. pylori* se cosechó en medio F-12 sin SFB (F-12 s/SFB). La densidad bacteriana se midió por espectrofotometría a 550 nm y se preparó un inóculo bacteriano a una densidad óptica de 0.1 a 550 nm para infectar las células AGS a una proporción de 100 bacterias x célula (MOI 100:1) con medio F-12 s/SFB a 37°C, 5% de CO₂ durante 48 hrs.

El fenotipo de elongación celular “Hummingbird” se evaluó por microscopia de luz blanca en por lo menos 3 campos seleccionados al azar, a un aumento de 20x y los resultados se reportaron como porcentaje de células que mostraron el fenotipo hummingbird. Las cepas de referencia de *H. pylori* 26695 y 60190 (ATCC 49503) se utilizaron como controles positivos y Tx30a como control negativo, además de las células AGS sin infectar como blanco.

Cada una de las muestras se evaluó por lo menos 2 veces en experimentos por separado.

V-8.2 Inducción de interleucina 8 (IL-8) *in vitro*

El crecimiento de células AGS y *H. pylori* así como la infección se realizaron de la misma manera que se describe para el experimento de elongación celular hummingbird excepto que las células AGS se prepararon en botellas de 25 cm² y se infectaron con 5 ml de suspensión bacteriana durante 6 hrs.

Después de la incubación de 6 hrs se colectó 1 ml de sobrenadante y se congeló a –70°C hasta la determinación de los niveles de IL-8. La cantidad de IL-8 secretada después de la infección con *H. pylori* se evaluó por la prueba de ELISA, con 100 µl de sobrenadante, usando el kit comercial OptEIA human IL-8 kit (BD Biosciences, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Los niveles de IL-8 se expresaron en pg/ml. En todos los experimentos se incluyeron controles positivos (26695, 60190, J99), negativos (Tx30a) y blanco (AGS sin infectar). Todas las muestras se corrieron por duplicado en cada experimento.

V-8.3 Translocación y Fosforilación de la proteína CagA

Después de haber tomado 1 ml de sobrenadante para IL-8, se eliminó por completo el sobrenadante que quedó y las células se lavaron 2x con PBS estéril. Se adicionaron 5 ml de PBS-Vanadato Sodio 1 mM para cosechar las células con un gendarme desechable estéril y se colectó la pastilla de los extractos celulares del co-cultivo (AGS – *H. pylori*),

por centrifugación a 2,500 rpm, a 4°C por 10min. La pastilla se resuspendió con 100 µl de PBS-Vanadato de Sodio 1 mM y las muestras se hirvieron 5 min con 50 µl de buffer de muestra 4x (Tris-HCl 0.2M pH 6.8; Ditiotritol 0.4M; SDS 8%; Glicerol 40%; Azul de bromofenol 0.4%) y se almacenaron a -70°C hasta la realización del Western-blot.

En total se prepararon 10 ml de suspensión bacteriana ($DO_{550nm} = 0.1$) y sólo se utilizaron 5 ml para la infección de células AGS. Los 5 ml restantes se incubaron bajo las mismas condiciones de infección para obtener los extractos celulares de las bacterias por centrifugación a 4,000 rpm, a 4°C, 10 min. La pastilla se resuspendió con 100 µl de PBS-Vanadato Sodio 1 mM, se hirvieron por 5 min con 50 µl de buffer de muestra 4x y se almacenaron a -70°C hasta la realización del Western-blot.

Las muestras se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), a una concentración del 9% para el gel separador y 4% para el gel concentrador. Se corrieron 2 geles con 12 µl de muestra/pozo; el gel concentrador a 10 mAmp/gel y el separador a 20 mAmp/gel. Un gel se utilizó para determinar la presencia de CagA por tinción con azul de Coomassie y el otro se utilizó para realizar la transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa bajo las condiciones estándar [121].

En todos los geles se incluyó un marcador de masa para las proteínas (Precision Plus Protein™ Standard, BIO-RAD Laboratorios).

La transferencia de proteínas se realizó a 4°C, 75 volts durante 2:30 hrs. Las membranas se bloquearon con albúmina al 2.5% preparada con PBS-Tween20 0.1% a 4°C durante toda la noche. Se incubaron con los anticuerpos primarios: α -CagA policlonal (bN20, Santa Cruz Biotechnology) dil 1:1,100 y α -Tirosina fosforilada monoclonal (PY99, Santa Cruz Biotechnology) dil 1:3000 a temperatura ambiente y agitación por 3 hrs, posteriormente las membranas se lavaron por 4 min 7x con PBS-Tween20 0.1%, se adicionaron los anticuerpos secundarios de conejo α -cabra y de cabra α -ratón acoplados a Peroxidasa para CagA y Tirosina fosforilada respectivamente (Zymed Laboratories, California) dil 1:20,000, se incubaron a temperatura ambiente y agitación por 1 hr. Finalmente las membranas se lavaron por 4 min, 7x con PBS-Tween20 0.1% y revelaron por quimioluminiscencia con el kit comercial “ECL Western Blotting detection reagents” (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) y rayos X.

En algunos casos la proteína CagA translocada se detectó usando sueros (dil 1:50) de pacientes infectados con *H. pylori* y altos títulos de anticuerpos contra CagA. Las membranas se incubaron con los sueros durante 3 hrs a temperatura ambiente y agitación, los lavados se realizaron de la manera antes descrita; se adicionó el anticuerpo secundario de cabra α -IgG humana acoplado a Peroxidasa dil 1:1000 (Zymed Laboratories, California), se volvió a lavar y se reveló con el kit comercial “ECL Western Blotting detection reagents” (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) y rayos X.

Cada una de las muestras se evaluó por lo menos 2 veces en experimentos por separado.

V-9 Secuenciación de la región 3' variable del gen *cagA*

Se amplificó por PCR con los oligos *cag2* y *cag4* la región 3' variable del gen *cagA* en 30 colonias (18 de niños y 12 de adultos) de *H. pylori* seleccionadas de acuerdo a los resultados de actividad biológica (inducción de IL-8, fenotipo de elongación celular hummingbird y translocación y fosforilación de CagA).

Los fragmentos amplificados se purificaron con el kit Rapid Gel Extraction Systems (Marligen Bioscience, U.S.A) de acuerdo al protocolo, la pureza y la concentración de los productos purificados se determinó por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio y con la ayuda de un marcador de masa λ -HindIII (ADN del plásmido λ digerido con HindIII). Los productos purificados se utilizaron como templado para la reacción de secuenciación de la cadena positiva y negativa usando el método de secuenciación automática en gel con el kit de BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) en un secuenciador automatizado ABI PRISM 377 (Applied Biosystems) [13].

La reacción de secuenciación se prepararon en un volumen final de 20 μ l con 5 a 10 μ l de templado (\approx 50 a 100 ng), 3.2 pmol de oligonucleótido; 3 μ l de BigDye y cuanto baste para 20 μ l de agua destilada estéril; en un termociclador GeneAmp PCR system 9700 (PE de Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: 96°C por 10 seg; 50°C por 5 seg y 60°C por 4 min durante 25 ciclos.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas se analizaron y alinearon con los programas Chromas (version 1.62 Technelysium) y DNAMAN (version 3.0 Lynnon BioSoft), de igual que las secuencias de aminoácidos obtenidas para el resultado final.

V-9.1 Números de acceso en el GenBank

Algunas de las secuencias de nucleótidos obtenidas en este estudio se depositaron en el GenBank bajo los números de acceso del EF552407 a EF552424 (Tabla 3) [116].

Tabla 3.- Números de acceso de las secuencias de nucleótidos registradas en el GenBank

Fuente	Colonia	Números de Acceso
Niño	646a5	EF552407
Adulto	259c2	EF552408
Adulto	259c4	EF552409
Niño	236c6	EF552410
Niño	291a7	EF552411
Niño	525c1	EF552412
Niño	555a1	EF552413
Niño	648c6	EF552414
Adulto	248c7	EF552415
Adulto	259a6	EF552416
Adulto	261a1	EF552417
Niño	307a1	EF552418
Niño	475a3	EF552419
Niño	555a9	EF552420
Adulto	249c5	EF552421
Adulto	261c1	EF552422
Adulto	256a5	EF552423
Niño	646c10	EF552424

V-10 Adherencia y viabilidad de *Helicobacter pylori* durante la infección de las células AGS

Para evaluar la adherencia y la viabilidad de *H. pylori* durante la infección de células AGS se utilizaron dos cepas *cagPAI*⁺: Una induce la secreción de IL-8, elongación celular y translocación y fosforilación de CagA (291-a7). La otra es negativa para la inducción de IL-8, pero positiva para el resto de las actividades biológicas (646-c10).

La preparación de las células y las bacterias se realizó igual que para el fenotipo hummingbird. La adherencia se evaluó por microscopia de luz, a un aumento de 40x, durante diferentes periodos de tiempo (5, 10, 15, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 min; 24 y 48 hrs), en los cuales se tomaron fotos para documentar el fenómeno de adherencia.

Para el experimento de viabilidad se tomaron alícuotas de 110 µl del sobrenadante de los co-cultivo a diferentes tiempos (1, 24 y 48 hrs). En placas de agar sangre se sembraron 100 µl de manera directa y 100 µl de una dilución 1:10 (10 µl suspensión bacteriana + 90 µl de F-12 s/SFB) para crecer la bacteria a 37°C, 9% de CO₂ durante 48 hrs. Como control se tomó una alícuota de 110 µl de la suspensión bacteriana antes de la infección y se creció la bacteria bajo las mismas condiciones.

Los resultados se reportaron como positivo o negativo al cultivo.

V-11 Análisis estadístico

Para el análisis de la posible asociación entre la heterogeneidad en la isla de patogenicidad *cag* (*cagPAI*) y la inducción de IL-8, elongación celular y translocación y fosforilación de CagA en células AGS, además de la asociación del polimorfismo en *cagA* con las actividades biológicas, se utilizó la prueba *t* de Student's. Los resultados con un valor de *p* menor a 0.05 ($p = < 0.05$) fueron considerados estadísticamente significativos.

VI. RESULTADOS

VI-1 Presencia de los genes *cagA*, *cagE*, *cagT* y *cagI0* de *cagPAI*

La presencia de los 4 genes de *cagPAI* se determinó por PCR y se confirmó por hibridación tipo slot blot. Los resultados indican algunos falsos negativos por PCR que se confirmaron como positivos por spot blot; la correlación de resultados positivos por ambos métodos fue del 90, 95, 83 y 78% para *cagA*, *cagE*, *cagT* y *cagI0* respectivamente.

De las 318 colonias de *H. pylori* estudiadas: 250 (78.6%) poseían los 4 genes de *cagPAI* y a este grupo de colonias se les denominó “*cagPAI*⁺” ya que se consideró que la isla se encontraba íntegra (Tabla 4). En 48 colonias (15.1%), se confirmó la ausencia de los genes *cagA*, *cagE*, *cagT* y *cagI0* y de la isla de patogenicidad *cag* por el PCR de “Empty-Site”, por lo que a este grupo se le llamo “*cagPAI*⁻”; estas colonias se aislaron de 4 pacientes adultos (251, 252, 254 y 259). Se encontró que el paciente 259 está colonizado con colonias *cagPAI*⁺ y *cagPAI*⁻ y ambos tipos de colonias tuvieron diferentes patrones RAPD por lo que se determinó “**infección mixta**” (Tabla 4; Fig. 9). En las 20 colonias restantes (6.3%) se confirmó la presencia de *cagE*, *cagT* y *cagI0* pero no la de *cagA*, por lo que a este grupo de le denominó “*cagPAI* **parcial**” (Tabla 4), todas estas colonias se aislaron del mismo paciente (365). En los pacientes con *cagPAI*⁻ no se observó relación entre el estatus de la isla y el diagnóstico clínico.

VI-2 Diversidad en la región 3' variable del gen *cagA*

La región 3' variable del gen *cagA* se amplificó en todas las colonias *cagPAI*⁺ por PCR. Los resultados muestran gran diversidad en el tamaño de los productos amplificados, que van de 500 a 850 pb (Tabla 4; Fig. 10).

Generalmente todas las colonias que se aislaron del mismo paciente tuvieron fragmentos de *cagA* 3' de igual tamaño, sin embargo, en algunos casos (pacientes 555, 259 y 261) hubo colonias que tuvieron diferentes tamaños en *cagA* 3' (Tabla 4; Fig. 10).

De las 20 colonias analizadas del paciente 555, 19 tuvieron un fragmento de *cagA* 3' de 550 pb (ejem. a1) y solo una colonia (a9) tuvo un fragmento de 650 pb. Los patrones RAPD para a1 y a9 fueron diferentes (Fig. 9) lo que sugiere que este paciente está colonizado con más de una cepa de *H. pylori cagPAI*⁺.

En el paciente 261 sucedió algo similar: Una colonia (c1) de las 14 tuvo un tamaño de *cagA* 3' de 800 pb y el resto de ellas tuvo un tamaño de 550 pb (ejem. a1). Los patrones RAPD fueron diferentes entre a1 y c1, sugiriendo infección mixta con cepas *cagPAI*⁺ (Tabla 4; Fig. 9 y 10).

El paciente con mayor diversidad fue el 259 ya que además de estar colonizado con cepas *cagPAI*⁺ y *cagPAI*⁻; tuvo dos colonias (c2 y c4) *cagPAI*⁺ con diferente tamaño de *cagA* 3' (500 pb), comparado con el resto de las colonias que tuvieron un tamaño de 550 pb. Sin embargo, en este caso no se encontraron diferencias en los patrones RAPD entre colonias con 500 y 550 pb, lo que sugiere que se trata de la misma cepa *cagPAI*⁺ (Tabla 4, Fig. 9 y 10).

Tabla 4.- Características de las colonias de *H. pylori* estudiadas para *cagPAI*, región 3' de *cagA* y actividad biológica en células AGS.

	Paciente	Diagnostico ^a	No. de colonias	<i>cagPAI</i> ^b	<i>cagA</i> 3' (tamaño, pb)	No. de colonias probadas en AGS / No. de colonias secuenciadas	Patrones EPIYA ^c
Niños	365	DAC	20	Parcial	-	4 / 0	-
	646	DAC	20	+	500	6 / 2	ACC
	525	DAC	20	+	550	3 / 2	ABC
	648	DAC	20	+	550	5 / 2	AB ^{&} C
	236	DAC	20	+	570	4 / 2	ABC
	291	DAC	20	+	570	5 / 1	ABC
	482	UD	20	+	570	3 / 2	ABC
	475	DAC	20	+	650	9 / 2	ABCC
	307	DAC	20	+	650	4 / 2	AB ^{&} CC
	555	DAC	19	+	550	3 / 2	ABC
		1	+	650	1 / 1	ABCC	
Adultos	251	UD	14	-	-	3 / 0	-
	252	UG	14	-	-	2 / 0	-
	254	DNU	17	-	-	2 / 0	-
	248	UG	15	+	550	4 / 2	AB [*] C
	249	UD	15	+	800	2 / 2	ABCCC
	256	UD	16	+	850	4 / 2	ABABC
	259	UD	8	+	550	5 / 2	ABC
			2	+	500	2 / 2	ABC
			3	-	-	2 / 0	-
	261	UG	13	+	550	1 / 1	AB ^{&} C
1			+	800	1 / 1	AB ^{&} AB ^{&} C	
Total			318			75 / 30	

^a DAC = Dolor Abdominal Crónico; UD = Úlcera duodenal; UG = úlcera gástrica; DNU = Dispepsia no ulcerosa.

^b + = Presente; - = Ausente.

^c B^{*}=EPTYAQVAKKV; B[&]=EPIYTQVAKKV

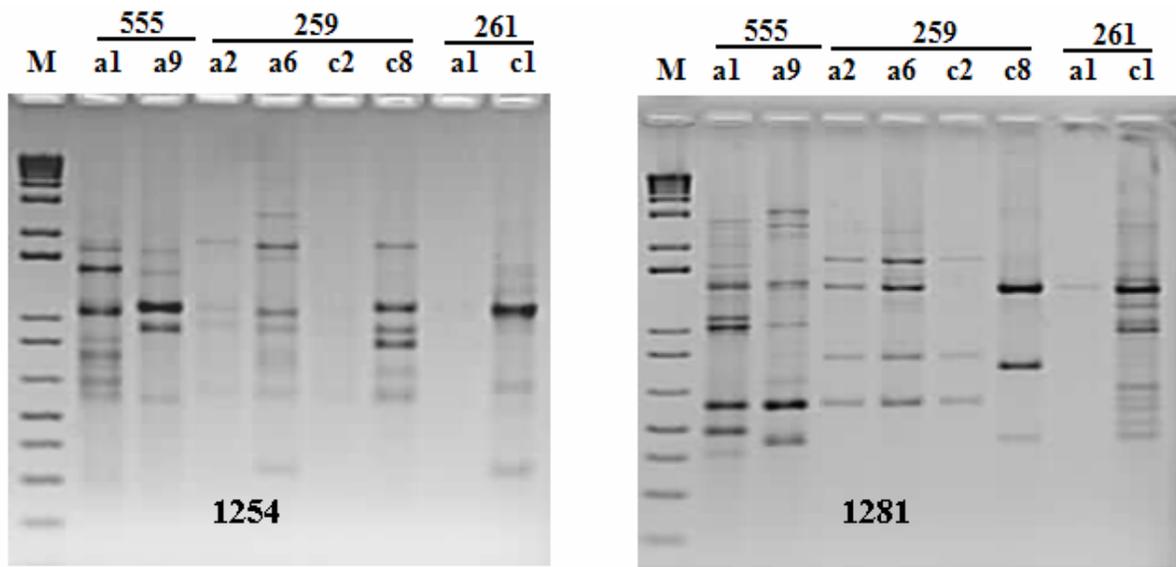


Figura 9.- Patrones RAPD-PCR. Diferentes patrones de RAPD-PCR obtenidos con los oligonucleótidos 1254 y 1281 de algunas colonias de *H. pylori* aisladas de 3 pacientes (555, 259 y 261) que tienen diversidad en los tamaños de la región 3' variable de *cagA* y diversidad fenotípica en células AGS. Se corrieron 20 μ l de producto en un gel de agarosa al 2% a 80 volts teñido con bromuro de etidio. M es el marcador de peso molecular de 1 Kb. El experimento se realizó por duplicado y los resultados fueron los mismos.

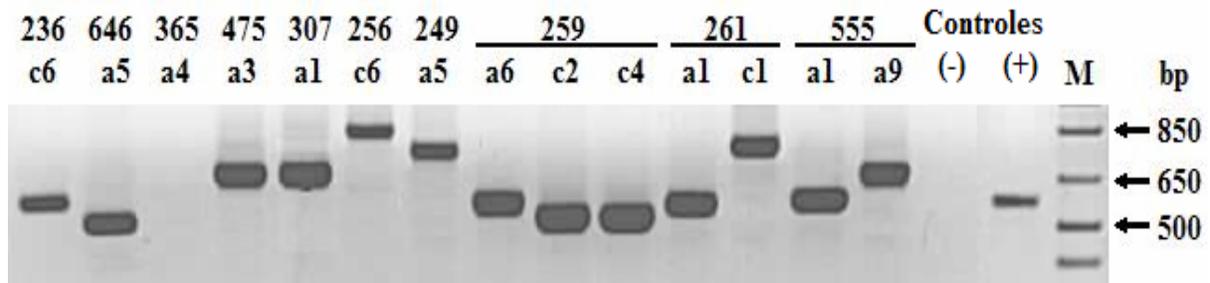


Figura 10.- Diversidad en la región 3' de *cagA*. Diversidad en el tamaño de los fragmentos de *cagA* 3' en colonias de *H. pylori* aisladas de diferentes pacientes y del mismo paciente (259, 261, 555). M, marcador de peso molecular.

VI-3 Diversidad en la secreción de IL-8 en células AGS

Para evaluar la actividad biológica en células AGS se seleccionaron 75 colonias de *H. pylori*: 62 *cagPAI*⁺, 9 *cagPAI*⁻ y 4 *cagPAI* parcial.

Entre las colonias *cagPAI*⁺ se encontró una amplia diversidad en la capacidad de inducir la secreción de IL-8 ya que los niveles de producción oscilan entre 50 y 1,500 pg/ml (Fig. 11A). Las colonias *cagPAI*⁻ y *cagPAI* parcial tuvieron niveles de inducción de IL-8 significativamente menores a los niveles de las colonias *cagPAI*⁺ ($p = 0.0002$; $p = 0.0273$).

No fue sorprendente encontrar niveles de inducción de IL-8 diferentes entre pacientes, lo interesante fue observar que entre colonias aisladas del mismo paciente había diversidad en la inducción de la IL-8 (Fig. 12).

Para determinar el valor de corte en la inducción de IL-8 en células AGS infectadas con *H. pylori*, se calculó el promedio de los niveles de IL-8 inducidos por las colonias *cagPAI*⁻ y la cepa de referencia Tx30a, más 3 desviaciones estándar. El valor de corte para la inducción de IL-8 fue de 200 pg/ml, por lo que valores menores a este se consideraron como negativos o “**No inductores**” de IL-8 en células AGS (Fig. 11A y 12).

Dieciséis colonias *cagPAI*⁺ (25.8%) se consideraron negativas o No inductoras (Fig. 11A) para IL-8; 5 de ellas se aislaron del paciente 646, 3 del paciente 248, 2 del paciente 555, 2 del paciente 648 y el resto de los pacientes 259, 256, 249 y 261 (Fig. 12).

VI-4 Diversidad en el fenotipo de elongación celular hummingbird

Se probaron las mismas 75 colonias de *H. pylori* del experimento anterior y se observó gran diversidad en la capacidad de las colonias *cagPAI*⁺ para inducir el fenotipo de elongación celular hummingbird en células AGS; los porcentajes de inducción de hummingbird fueron muy variables ya que oscilan entre el 10 y 70%.

Entre pacientes, se observó gran diversidad en la inducción de elongación celular; por ejemplo: 475-a3 que induce el mayor porcentaje de células con hummingbird entre colonias *cagPAI*⁺. También se observaron diferencias entre las colonias aisladas del mismo paciente (Fig. 13). Muchas de las colonias que tuvieron altos niveles de inducción de IL-8, también tuvieron altos porcentajes de elongación celular aunque hubo algunas excepciones como en los pacientes 307, 475, 249 y 261 (Fig. 11) que tienen mayor producción de IL-8 y menor porcentaje de células con elongación o viceversa.

Se calculó un valor de corte para la inducción de hummingbird del 20%, utilizando el valor promedio de los niveles de inducción de hummingbird de las colonias *cagPAI*⁻ y la cepa Tx30a, más 3 desviaciones estándar. Las cepas *cagPAI*⁻ y *cagPAI* parcial tuvieron menos del 20% de elongación celular (Fig. 11B) lo que fue significativamente menor al porcentaje inducido por las colonias *cagPAI*⁺ ($p < 0.0001$; $p = 0.0027$). Todos aquellos valores menores a este se consideraron como negativos o “**No inductores**” para este fenotipo. Dentro de este grupo encontramos 11 colonias (17.7 %) *cagPAI*⁺, 4 del paciente 248, 3 del paciente 648, 3 del paciente 646 y una del paciente 555 (Fig. 12).

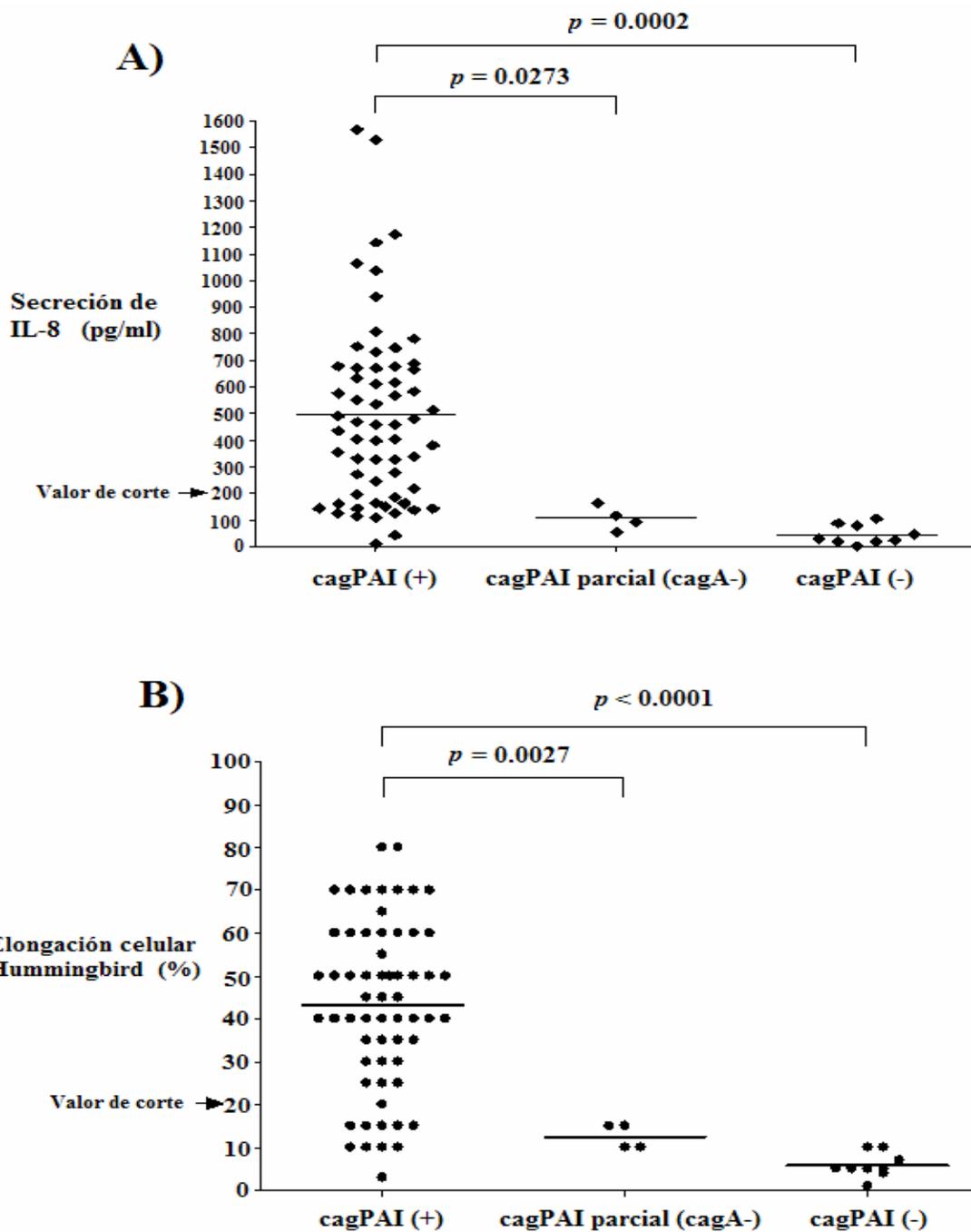


Figura 11.- Diversidad en la actividad biológica de colonias de *H. pylori* en células AGS. Existen diferencias significativas en la actividad biológica inducida por colonias *cagPAI*⁺, *cagPAI* parcial y *cagPAI*⁻ en células AGS. **A)** Inducción de IL-8. **B)** Inducción del fenotipo de elongación celular hummingbird. Se muestran los valores de corte en el eje "X" y el valor promedio en las líneas horizontales.

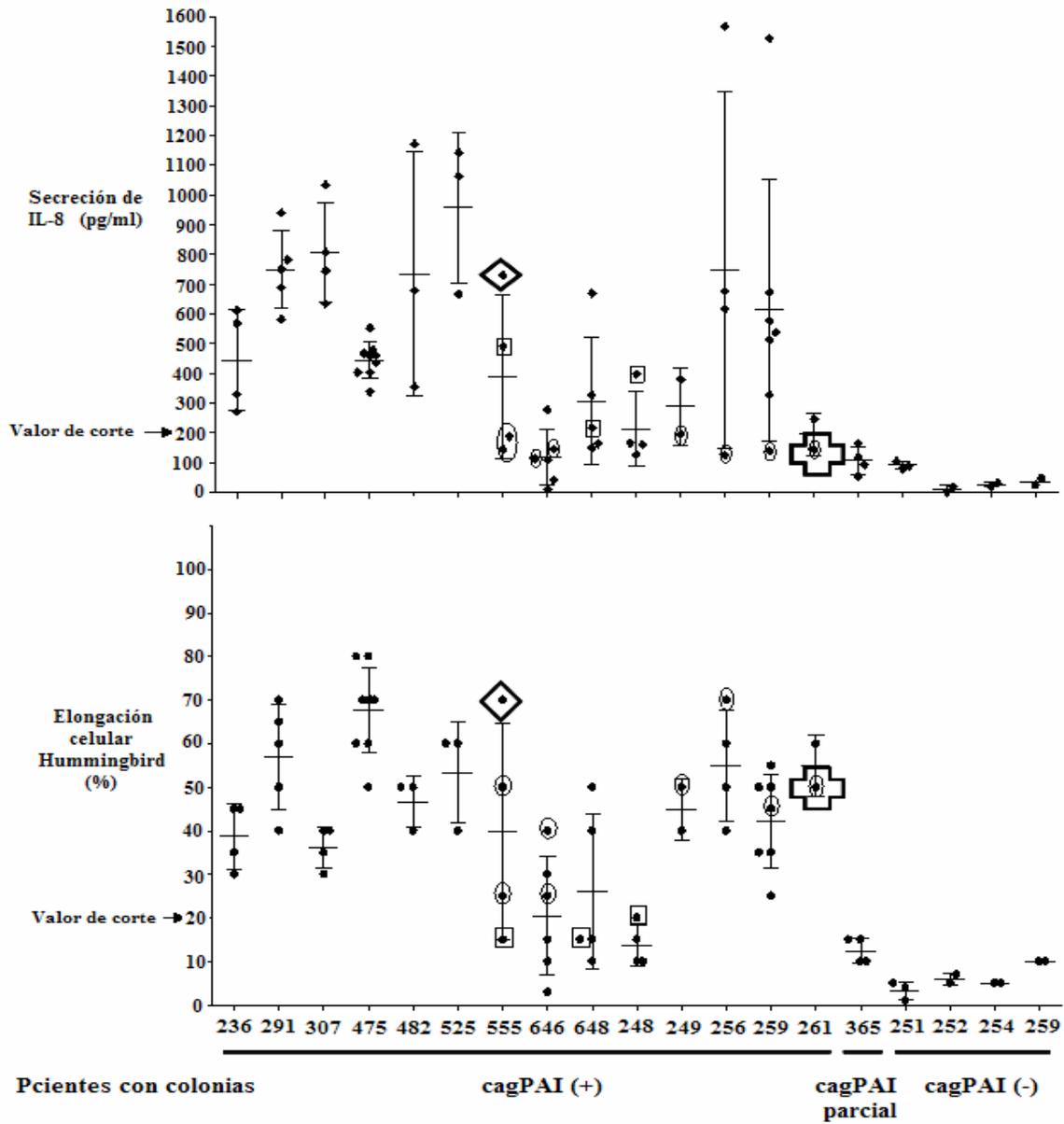


Figura 12.- Diversidad fenotípica entre colonias de *H. pylori* aisladas del mismo paciente. Se observó diversidad fenotípica entre pacientes y dentro del mismo paciente. Cada punto representa una colonia, las líneas horizontales el valor promedio y las barras la desviación estándar. Los resultados representan el promedio de 3 experimentos independientes.

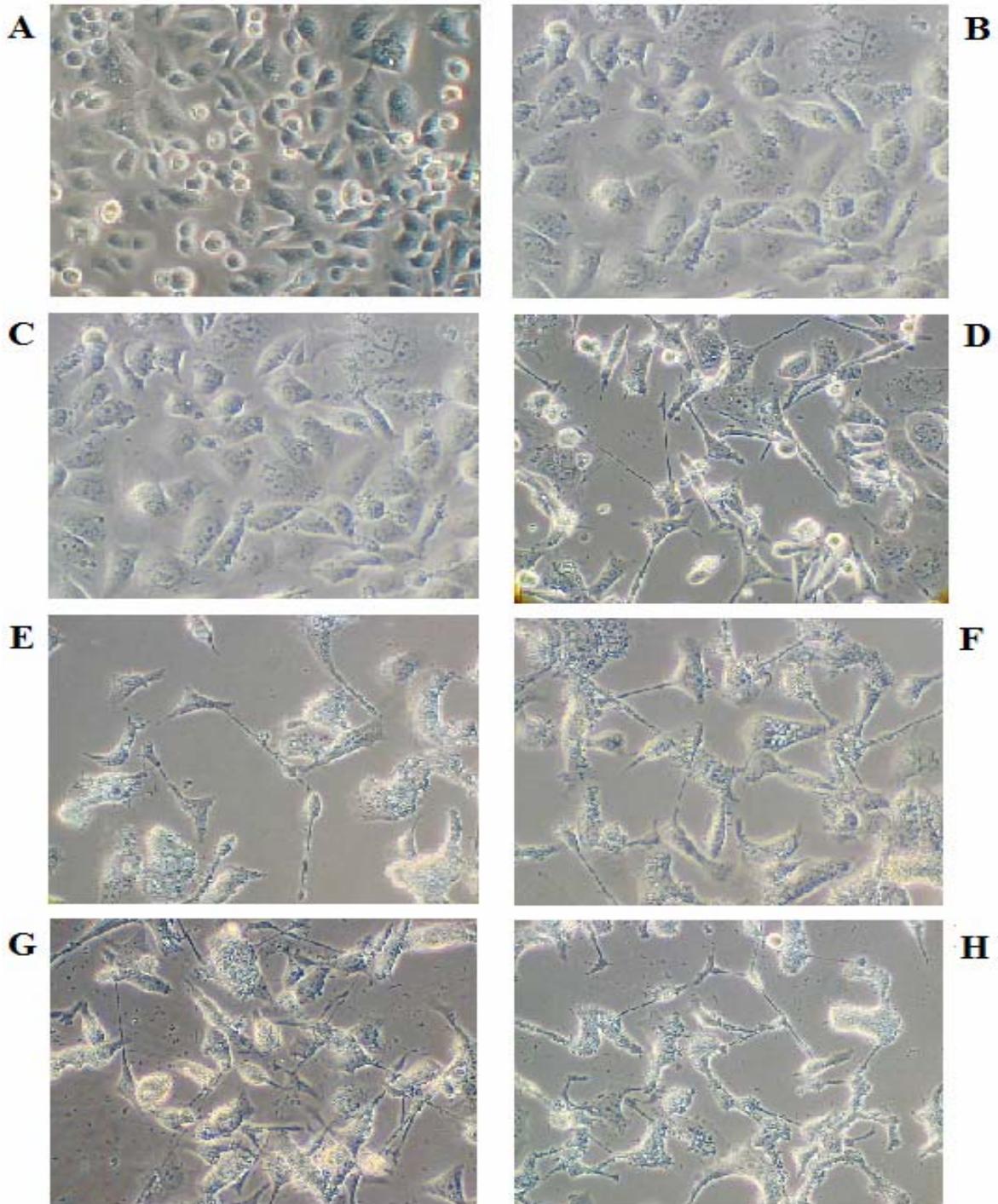


Figura 13.- Fenotipo de elongación celular hummingbird en células AGS. Se muestran imágenes de hummingbird de diferentes colonias de *H. pylori* a un aumento de 20x: **A)** AGS; **B)** Colonia *cagPAI*⁻; **C)** 365a3; **D)** 475a3; **E)** 259a6; **F)** 259c2; **G)** 261a1 y **H)** 261c1. Hay diferencias en la inducción de hummingbird entre colonias de diferentes pacientes (**D, F, H**) y del mismo paciente (**E y F; G y H**). Las colonias con *cagPAI*⁻ (**B**) y *cagPAI* parcial (**C**) fueron incapaces de inducir elongación celular en células AGS.

VI-5 Translocación y fosforilación de CagA en células AGS

Con los resultados anteriores se documentó la diversidad fenotípica de las colonias *cagPAI*⁺ de *H. pylori* en células AGS. Para tratar de explicar esta diversidad, se analizó la translocación y fosforilación de CagA en células AGS usando las mismas 75 colonias.

Se observaron diferentes tamaños de la proteína CagA que coinciden con los tamaños del producto de PCR para *cagA* 3' (Fig. 14). De las 62 colonias *cagPAI*⁺ 58 fueron positivas para la translocación y fosforilación de CagA y 4 que se aislaron del mismo paciente (236), no fueron reconocidas por el anticuerpo comercial policlonal α -CagA (bN-20) (Fig. 14). Aunque, en todas las colonias la proteína CagA fosforilada fue identificada con el anticuerpo comercial PY99. De manera interesante, CagA del paciente 236, si fue reconocida cuando se utilizaron sueros de pacientes infectados con *H. pylori* y con altos títulos de anticuerpos α -CagA (Fig. 15).

Las colonias con *cagPAI*⁻ o parcial no expresaron CagA, por lo tanto, no hubo translocación y fosforilación. Es interesante mencionar que las colonias *cagPAI*⁺ que fueron No inductoras para IL-8 y elongación celular fueron capaces de translocar y fosforilar CagA; por lo que no se encontraron diferencias significativas con aquellas colonias que fueron Inductoras para ambas actividades biológicas, aunque en algunos casos como en la colonia 648a9 (No inductora) la señal de fosforilación fue más débil (Fig. 14).

En todos los casos se documentó la producción de CagA en cultivos de *H. pylori*, con geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie, excepto para el paciente 365 que no tiene el gen *cagA* (Fig.14 Panel inferior). Sin embargo, no se logró identificar la proteína en colonias aisladas del paciente 236 (236-c6) utilizando el anticuerpo comercial bN-20 (Fig.14 Panel inferior), tal y como sucedió con la proteína translocada.

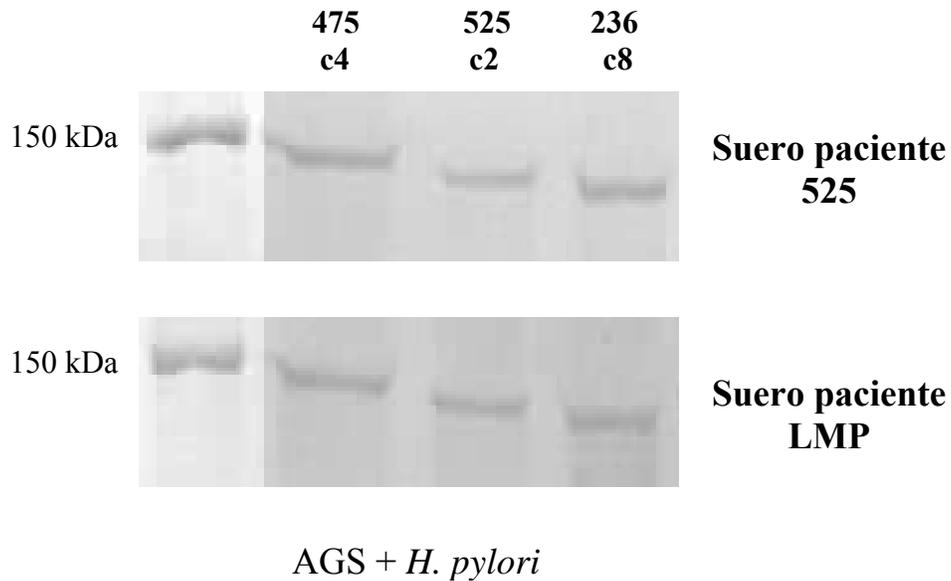


Figura 15.- Reconocimiento de CagA translocada con sueros de pacientes. Para el Western blot se utilizaron co-cultivos de 3 cepas y 2 sueros (niño y adulto) de pacientes infectados con *H. pylori* y altos títulos de anticuerpos contra CagA. Dos de las 3 muestras (475c4 y 525c2) si fueron reconocidas con el anticuerpo comercial α -CagA (bN20). Con los sueros de los pacientes la proteína CagA si fue reconocida en todos los casos, incluso en la muestra 236c8 que no había sido reconocida por el anticuerpo comercial bN20.

VI-6 Diversidad fenotípica entre colonias aisladas del mismo paciente

Aunque la mayoría de las colonias de *H. pylori* aisladas del mismo paciente mostraron niveles de actividad biológica similares, hubo algunos casos en los que se observaron diferencias fenotípicas importantes.

Se lograron identificar colonias con altos porcentajes de elongación celular pero fueron No inductoras para IL-8 (pacientes 555, 646, 249, 256, 259 y 261) o viceversa (pacientes 555, 648 y 248) (Fig. 12).

Los resultados anteriores son muy interesantes, además de que llaman mucho la atención, ya que se esperaban resultados de inducción de ambas actividades biológicas muy similares.

VI-7 Secuenciación del extremo 3' de *cagA*.

De las 62 colonias *cagPAI*⁺ que se probaron para la inducción de IL-8, la translocación y fosforilación de CagA y la inducción del fenotipo de elongación celular hummingbird, se eligieron 30 de acuerdo a los resultados obtenidos para secuenciar la región 3' variable del gen *cagA* (Tabla 4).

En todas las colonias secuenciadas se encontró la huella occidental (WSS) definida por la secuencia QAASGLGGVGQAGFPLKRHDKVDDLSKV (Fig. 16) [148]. Se encontró diferencias en el número y el tipo de motivos EPIYA presentes en nuestra población: 20 colonias (66.6 %) tuvieron 3 motivos EPIYA; cinco (16.7 %) tuvieron 4 motivos y cinco más (16.7 %) tuvieron 5 motivos.

Todas las colonias con 3 motivos EPIYA tuvieron un tamaño de *cagA* 3' \leq 570 bp y la mayoría de ellas tuvieron un patrón EPIYA-ABC; aunque se encontraron dos colonias aisladas del paciente 646 con un patrón ACC (Fig 16). Las colonias con cuatro motivos EPIYA tuvieron un tamaño de *cagA* 3' de 650 bp y un patrón EPIYA-ABCC (pacientes 307, 475 y 555). Entre las colonias con cinco motivos EPIYA, dos tuvieron un patrón

ABCCC (paciente 249) y dos un patrón ABABC (paciente 256) y estas colonias tuvieron el tamaño más grande de *cagA* 3' (850 pb) (Tabla 4; Fig 16).

En las colonias c2 y c4 del paciente 259 que tuvieron una tamaño de *cagA* 3' de 500 pb, se encontró una delección de 24 y 15 a.a. respectivamente, después del motivo EPIYA-C (Fig. 16). El resto de las colonias de este paciente tuvieron un tamaño de 550 pb.

VI-8 Asociación del polimorfismo en la región 3' variable de *cagA* con la actividad en células AGS

Con los resultados de secuenciación de la región 3' variable de *cagA* se realizó un análisis para tratar de encontrar una posible asociación entre el polimorfismo observado en esta región y la capacidad de las cepas de *H. pylori* para inducir secreción de IL-8, la translocación y la fosforilación de CagA y la elongación celular hummingbird en células AGS, especialmente en las colonias *cagPAI*⁺ con baja o nula actividad.

De acuerdo al análisis no hay una clara asociación entre el número y tipo de los motivos EPIYA presentes en la región 3' de *cagA* y la capacidad de las cepas para inducir las actividades biológicas antes mencionadas (Fig. 17). Sin embargo, se encontraron otros resultados interesantes durante el análisis de las secuencias: Las colonias del paciente 646 que tienen un patrón EPIYA-ACC (Fig.16) tienen poca o nula actividad biológica lo que sugiere que el motivo EPIYA-B podría ser importante para el desarrollo de actividad en células. Las colonias del paciente 248 tienen una modificación en el motivo EPIYA-B ($B^* = EPIYA$) y 3 de las 4 colonias estudiadas fueron No inductoras de IL-8 y todas fueron negativas para la inducción de Hummingbird (Fig. 17). Algo similar se observó en las colonias del paciente 307 en donde el EPIYA-B ($B^{\&} = EPIYT$) que fue diferente a la del paciente 248. Estas colonias a pesar de tener un patrón EPIYA-ABCC fueron poco inductoras de elongación celular y de la secreción de IL-8. En contraste, las colonias del paciente 475 que también tienen un patrón EPIYA ABCC, pero el motivo B normal (EPIYA), fueron más inductoras de ambas actividades (Fig. 17). También fue interés fue la identificación de una secuencia corta de inserción de 5 aminoácidos (DKGPE) antes del EPIYA-A (Fig. 16), en las colonias del paciente 236 que fueron *cagA*⁺ (Fig. 10) pero que la proteína CagA no fue reconocida por el anticuerpo policlonal comercial α -CagA utilizado en este trabajo, aunque la proteína si se translocó y se fosforiló, de hecho, las colonias inducen niveles moderados de IL-8 y elongación celular (Fig. 14).

Deleciones después del EPIYA-C también podrían estar asociadas con la pérdida de actividad biológica ya que una de las colonias del paciente 259 con una deleción de aproximadamente 24 aminoácidos (c2) fue negativa para la inducción de IL-8 mientras que las colonias del mismo paciente a1 y a6 que no tienen deleción y c4 que tiene una deleción más pequeña fueron positivas para la inducción de IL-8 y elongación celular en células AGS.

Se observó una asociación entre los patrones EPIYA-ABCC y una mayor actividad biológica (pacientes 555 y 475) aunque no en todos los casos (paciente 307) quizás debido a las modificaciones encontradas en el motivo EPIYA-B (Fig. 17).

VI-9 Viabilidad y Adherencia de *H. pylori* durante la infección de células AGS

Dos colonias *cagPAI*⁺ de *H. pylori* una Inductora (291-a7) y otra No inductora (646-c10) de ambas actividades biológicas fueron monitoreadas para la adherencia y la viabilidad de la bacteria durante la infección de células AGS. En ambos casos no se observaron diferencias importantes en la adherencia y la viabilidad entre colonias Inductoras y No inductoras de secreción de IL-8 y de elongación celular (Fig. 18). La viabilidad y la sobrevivencia de la bacteria para los dos aislados fue evidente ya que se pudo recuperar la bacteria ($> 10^{10}$ CFU/ml) en placas de agar sangre bajo condiciones microaerófilas después de 48 de cultivo del sobrenadante de la co- infección con las células AGS.

Tenemos evidencias de que *H. pylori* no sólo sobrevive durante el período de infección de células AGS, también es capaz de crecer bajo las condiciones de co-cultivo formando colonias sobre la superficie de las células AGS.

La formación de colonias de *H. pylori* sobre las células AGS se incrementa conforme pasa el tiempo de co-infección (Fig. 18). No existen diferencias significativas en la adherencia, la movilidad y la viabilidad de la bacteria entre cepas Inductoras (291a7) y No inductoras (646c10), por lo que se sugiere que estos no son factores que puedan influenciar y determinar el resultado de la inducción de actividad biológica por *H. pylori* en células AGS en experimento *in vitro*, por lo tanto, consideramos que la adherencia o la viabilidad de la bacteria en este caso en particular no son los responsables de la diversidad fenotípica encontrada en nuestras cepas.

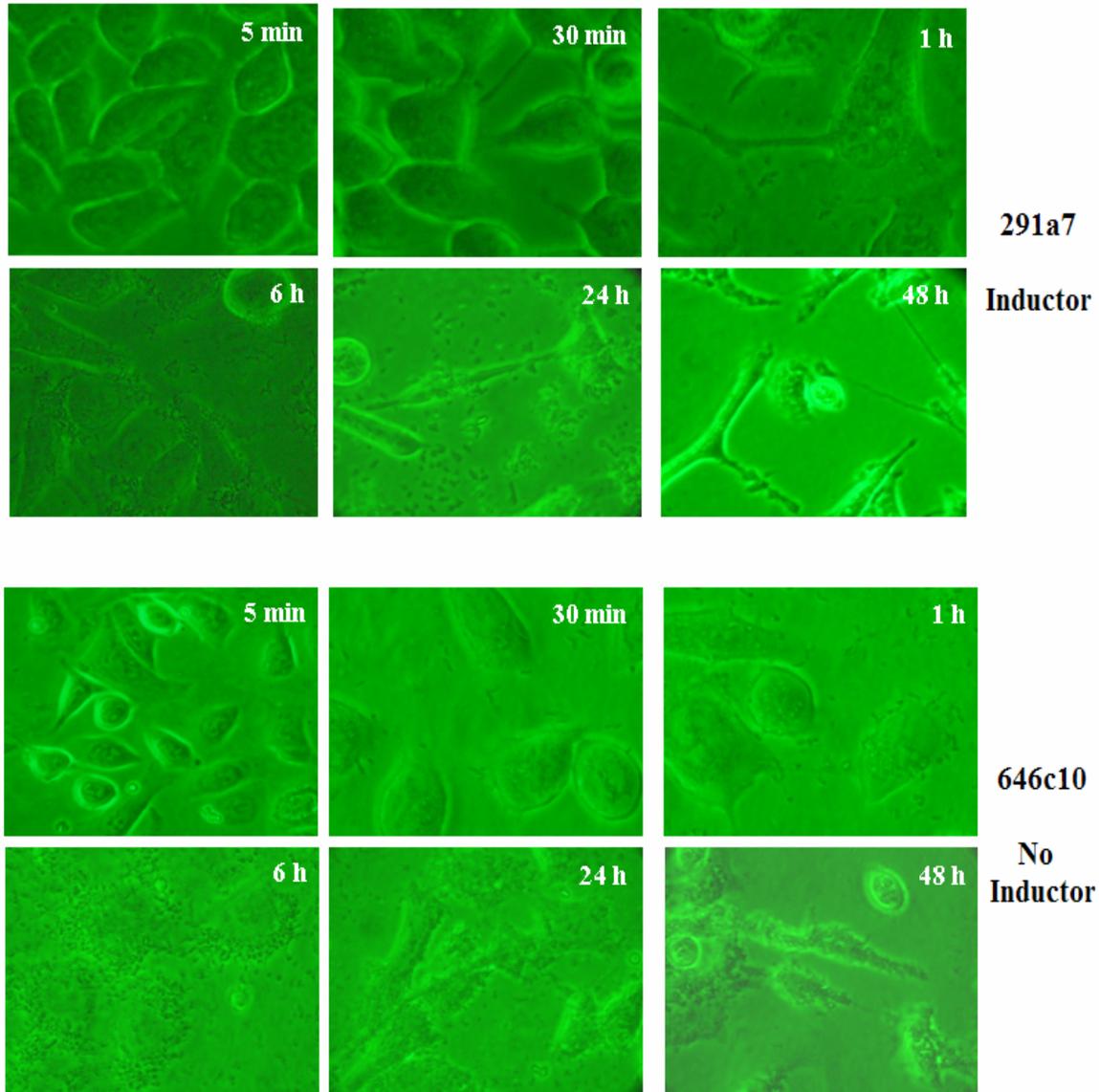


Figura 18.- Viabilidad y adherencia de *H. pylori* durante la infección de células AGS. Dos colonias de *H. pylori* con diferentes fenotipos (Inductora y No Inductora) se utilizaron para evaluar la adherencia y viabilidad de la bacteria durante la infección de células AGS. A los 30 min ya se observan bacterias adheridas a las células; a 1 hr la cepa Inductora empieza a mostrar elongación celular; a las 6 hrs ya hay varias bacterias adheridas a la célula y se empiezan a formar micro-colonias. A las 24 y 48 hrs es evidente el fenotipo hummingbird. La única diferencia observada entre las colonias Inductora (291a7) y No inductora (646c10) fue el porcentaje de células con elongación celular a las 48 hrs de infección.

VII. DISCUSIÓN

Los métodos (PCR y Slot-blot) que utilizamos para la genotipificación de *cagPAI* son específicos y sensibles. Sin embargo, existe la posibilidad de obtener resultados falsos positivos debido a las contaminaciones en la muestra o en los reactivos, al igual que falsos negativos que en el PCR se deben principalmente a la presencia de inhibidores. Cabe mencionar que en algunos resultados negativos por PCR se puede deber a variaciones en la secuencia del gen lo que impide que los oligonucleótidos reconozcan su sitio blanco y se unan para iniciar la reacción de amplificación. En nuestro caso, obtuvimos algunos resultados falsos negativos por PCR para determinar la presencia de los genes *cagA*, *cagE*, *cagT*, y *cagI0* de *cagPAI* los cuales posteriormente se confirmaron como positivos por Dot-blot utilizando como sondas los productos de PCR de cada gen a partir de la cepa de referencias 84-123 de *H. pylori*. Para los genes *cagI0* y *cagT* la discrepancia entre PCR y Dot-blot fue del 22 y 17%, respectivamente. Es importante mencionar que en ambos casos se trató de amplificar el gen completo, lo que significa que los oligonucleótidos (Forward y Reverse) iniciaban en la primera y última base, consideramos que esta podría ser la causa por la cual obtuvimos un porcentaje alto de falsos negativos por PCR.

El gen *cagA* es altamente polimórfico con gran diversidad en la región 3' que es la más importante para su actividad biológica en células epiteliales gástricas. En esta región se encuentran el sitio de fosforilación de la proteína (EPIYA) y el sitio de unión a la fosfatasa SHP-2 (EPIYATIDFD / EPIYATIDDL) [132]. La interacción de CagA con estas proteínas activa una serie de vías de señalización que causa un incremento en la proliferación anormal de células y en la movilidad de las mismas [144, 145]. Lo anterior resulta muy importante para continuar estudiando el polimorfismo en la región 3' del gen *cagA* en poblaciones y tratar de correlacionar esta diversidad con la actividad biológica de las diferentes cepas de *H. pylori* en células AGS.

El objetivo principal de este estudio fue analizar la heterogeneidad en *cagPAI*, el polimorfismo en el gen *cagA* y la diversidad en las actividades biológicas en células epiteliales gástricas de colonias de *H. pylori* aisladas de pacientes mexicanos.

Se estudiaron muchas colonias de *H. pylori* aisladas de dos sitios diferentes del estómago de pacientes infectados. Todos los aislados de antro y de cuerpo de 13 de los 18 pacientes estudiados tuvieron un contenido de genes en *cagPAI* homogéneo (*cagPAI*⁺); algunas tuvieron un contenido parcial por la ausencia de *cagA* (paciente 365) y sólo un paciente tuvo infección mixta con cepas *cagPAI*⁺ y *cagPAI*⁻ (paciente 259). En este caso en particular, se ha confirmado que ambos tipos de cepas se agrupan en cladas distintas de acuerdo a un análisis de microarreglos [120]. Sin embargo, aun cuando la isla está completa, existe diversidad en la secuencia de la región 3' de *cagA* en aislados de 3 pacientes. En uno de los 3 casos se demuestra que la cepa que está colonizando al paciente es la misma (paciente 259) y en los otros dos casos las cepas que están colonizando no son las mismas de acuerdo al análisis de RAPD (pacientes 555 y 261). Estos últimos casos, los hemos documentado como infección mixta, además del polimorfismo en la región 3'.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, podemos documentar la nula actividad biológica de las cepas *cagPAI*⁻ y *cagPAI* parciales (*cagA*⁻) en células epiteliales gástricas ya que inducen niveles muy bajos de elongación celular (<20%) e IL-8 (<200 pg/ml), tal y como se esperaba. Por otro lado, entre las colonias positivas para los cuatro genes de la isla, un número variable de ellas, fueron incapaces de inducir la secreción de IL-8 o inducir elongación celular, lo cual sugiere que la presencia de la isla de patogenicidad no es suficiente para inducir ambas actividades. En algunos casos, los bajos niveles de fosforilación de CagA puede explicar la baja actividad celular, pero en otros, aún cuando la actividad es baja o nula se observó la translocación y la fosforilación de la proteína CagA. En todos los casos en donde se consideró una isla de patogenicidad completa (250 colonias *cagPAI*⁺) por la presencia de los genes *cagA*, *cagE*, *cagT* y *cagI0* la integridad de la isla se confirmó ya que todas estas colonias fueron capaces de translocar y de fosforilar CagA, lo que confirma la formación de un Sistema de Secreción tipo IV funcional. El polimorfismo en la región 3' del gen explica muchos de los casos e ilustra la importancia de los motivos EPIYA-B, ya que las cepas a las cuales les falta este motivo (paciente 646, patrón ACC) fueron incapaces de inducir la secreción de IL-8 y el fenotipo de elongación celular y las cepas con un motivo EPIYA-B modificado (EPTIYA) también muestran débil actividad. Estos resultados son una parte muy importante de este trabajo ya que es el primer reporte

acerca de la posible participación del motivo EPIYA-B en la inducción de ambas actividades biológicas.

Deleciones después del motivo EPIYA-C se asociaron también con baja o nula actividad biológica. Estos resultados muestran que cepas *cagPAI*⁺ pueden no inducir o inducir poca actividad en células AGS, lo cual se puede deber a ciertas modificaciones específicas en la secuencia de aminoácidos de la región carboxilo de CagA. De acuerdo con estos resultados, recientemente Brandt y colaboradores han reportado que entre las cepas *cagPAI*⁺ existen altos y bajos inductores de IL-8 y esta variabilidad fue asociada con el número de motivos EPIYA y la secuencia de aminoácidos alrededor de estos motivos; lo que de alguna manera contribuye para que CagA colabore en la inducción para la secreción de IL-8 en células epiteliales [27]. La diversidad en la actividad de diferentes cepas de *H. pylori cagPAI*⁺ en células AGS no parece estar influenciada por el grado de adherencia de la bacteria a las células o a su capacidad de crecer durante el periodo de infección de las células, ya que no se encontraron diferencias en cuanto a la adherencia y crecimiento de la bacteria en células AGS por las diferentes colonias estudiadas (altos y bajos inductores de actividad en células).

Entre los aislados de *H. pylori cagPAI*⁺ el rango de producción de IL-8 varía como 30 veces (de 50 a 1,500 pg/ml) y el porcentaje de elongación celular vara aproximadamente 15 veces (de 5 a 80%) por lo que se observa una amplia diversidad en colonias que tiene la isla completa y funcional, lo cual no ha sido documentada previamente. El polimorfismo en *cagA* explica parcialmente esta diversidad; Higashi y colaboradores han descrito que la variación en la actividad biológica es causada por la diversidad en el número de sitios de fosforilación presentes en CagA [67]. Sin embargo, esta correlación no se observó en nuestra población; ya que los niveles de secreción de IL-8 y de elongación celular de las colonias con un patrón EPIYA-ABC varían mucho, de valores negativos hasta valores de altos productores. La cantidad de CagA translocada y fosforilada tiene una correlación con baja actividad en varias colonias pero no en otras, en este estudio lo que se observó es que el nivel de actividad biológica tiende a incrementar en la siguiente dirección **ACC**→**ABC**→**ABC**→**ABCC**→**ABABC**, lo cual coincide parcialmente con estudios previos [8, 95], sin embargo, esta correlación no se observó para la inducción de en IL-8, lo

cual también coincide con reportes previos [7, 8, 105] y confirma que aunque el papel de CagA para ambas actividades es controversial, el mecanismo de acción es diferente para cada una de ellas [128]. Esto es además apoyado por el hecho de que las colonias aisladas de 6 pacientes muestran de moderada a alta actividad de elongación celular pero negativa inducción de IL-8. Varios autores han documentado la importancia de *cagE* para la inducción de IL-8 y lo han considerado fundamental para esta respuesta [52, 105, 147], sin embargo, nuestros resultados no coinciden con esta postura, ya que todas las colonias con bajos o nulos niveles de inducción para IL-8 fueron *cagE*⁺ y aún así fueron incapaces de producir IL-8 como en el caso particular del paciente 365 (*cagPAI* parcial por la ausencia de *cagA*). Aunque no podemos descartar la posibilidad de que exista polimorfismo en la secuencia del gen *cagE* lo que pudiera ser la causa de la diversidad en la inducción de IL-8. Por otro lado, algunos autores han reportado que *H. pylori* puede inducir la activación de NF-kB para la producción de IL-8 a través de la vía Nod1 que responde al peptidoglican liberado en el citoplasma de las células por el SST-IV [151].

La diversidad fenotípica en algunos casos puede ser explicada por el polimorfismo en *cagA*, lo que nos lleva a sugerir que puede haber polimorfismo en algunos otros genes dentro de la isla o fuera de ella que regulan de alguna manera la inducción de estas actividades. Es importante mencionar que aún cuando se determina la presencia de una sola cepa que coloniza el huésped por métodos como RAPD y/o AFLP puede haber variaciones en el contenido de genes ya que del 3 al 5% de los genes son específicos de cada cepa [20, 73] y estas variaciones pueden causar diversidad fenotípica, por lo que el mecanismo responsable de la diversidad en estos pacientes requiere de futuras investigaciones.

Un caso interesante fue el del paciente 236, en donde CagA no fue reconocida con el anticuerpo comercial utilizado en este estudio; aunque si pudo ser reconocida por sueros de pacientes infectados con *H. pylori*. Los resultados de secuenciación muestran una inserción de 5 aminoácidos antes del motivo EPIYA-A, lo que posiblemente podría causar cambios en la estructura de la proteína suficientes para evitar el reconocimiento de la proteína por estos anticuerpos en particular.

VIII. CONCLUSIONES

- El 6.3% de nuestra población tiene heterogeneidad en el contenido de *cagPAI*.
- *cagA SI* participa en la inducción de IL-8 en células epiteliales gástricas después de la infección con *H. pylori* (paciente 365).
- La presencia de *cagPAI* completa no es un factor determinante para la inducción de actividad biológica en células AGS.
- Existe gran diversidad fenotípica entre pacientes y dentro del mismo paciente, la cuál se puede explicar parcialmente con el polimorfismo en *cagA*.
- Hay una tendencia entre el patrón EPIYA-ABCC y mayor actividad biológica en células AGS, pero no hay una asociación directa entre el número de motivos EPIYA-C presentes en CagA y mayor actividad.
- La ausencia ó modificación del motivo EPIYA-B esta relacionado a baja o nula actividad biológica en células AGS.
- El tamaños de la región 3' de *cagA* no esta asociado a la presencia de repetidos en los motivos EPIYA-C en todos los casos (paciente 256 EPIYA-ABABC).

IX. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Akopyanz, N., N. O. Bukanov, T. U. Westblom, S. Kresovich, and D. E. Berg. 1992. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **20**: 5137 – 5142.
- 2.- Akopyants Natalia S., Sandra W. Clifton, Dangeruta Kersulyte, Jean E. Crabtree, Bryan E. Youree, C. Adonis Reece, Nick O. Bukanov, E. Susan Drazek, Bruce A. Roe, Douglas E. Berg. 1998. Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Molecular Microbiology.* **28**: 37 – 53.
- 3.- Alm Richard A., Lo-See L. Ling, Donald T. Moir, Benajmin L. King, Eric D. Brown, Peter C. Doig, Douglas R. Smith, Brian Noonan, Braydon C. Guild, Boudewijn L. deJonge, et. al. 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* **397**: 176 – 180.
- 4.- Amedei Amedeo, Andrea Cappon, Gaia Codolo, Anna Cabrelle, Alessandra Polenghi, Marisa Benagiano, Elisabetta Tasca, Annalisa Azurri, Mario Milco D’Elios, Gianfranco Del Petre, Marina de Bernard. 2006. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. *The Journal of Clinical Investigation.* **116**: 1092 – 1101.
- 5.- Amieva Manuel R., Roger Vogelman, Antonello Covacci, Lucy S. Tompkins, W. James Nelson, Stanley Falkow. 2003. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science.* **300**: 1430 – 1434.
- 6.- Ando T., R. M. Peek, D. Pride, S. M. Levine, T. Takata, Y. C. Lee, K. Kusugami, A. van der Ende, E. J. Kuipers, J. G. Kusters, M. J. Blaser. 2002. Polymorphisms of *Helicobacter pylori* HP0638 reflect geographic origin and correlate with *cagA* status. *Journal of Clinical Microbiology.* **40**: 239 – 246.
- 7.- Aras, R. A., Y. Lee, S. K. Kim, D. Israel, R. M. Peek, Jr., and M. J. Blaser. 2003. Natural variation in populations of persistently colonizing bacteria affect human host cell phenotype. *Journal and Infection Diseases.* **188**: 486 – 496.
- 8.- Argent Richard H., Mark Kidd, Robert J. Owen, Rachael J. Thomas, Marie C. Limb, John C. Atherton. 2004. Determinants and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **127**: 514 – 523.

- 9.- **Asish K. Mukhopadhyay, Dangeruta kersulyte, Jin Yong Jeong, Simanti Datta, Yoshiyuki Ito, Abhijit Chowdhury, Sujit Chowdhury, Amal Santra, Sujit K. Bhattacharya, Takeshi Azuma, G. Balakrish Fair, Douglas E. Berg.** 2000. Distinctiveness of genotypes of *Helicobacter pylori* in Calcutta, India. *Journal of Bacteriology*. **182**: 3219 – 3227.
- 10.- **Atherton John C., Ping Cao, Richard M. Peek, Murali K. R. Tummuru, Martin J. Blaser, Timothy L. Cover.** 1995. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. *The Journal of Biological Chemistry*. **270**: 17771 – 17777.
- 11.- **Atherton John C., Richard M. Peek, Kyi T. Tham, Timothy L. Cover, Martin J. Blaser,** 1997. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. **112**: 92 – 99.
- 12.- **Audibert, C., C. Burucoa, B. Janvier, and J. L. Fauchère.** 2001. Implication of the 2 structure of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island in induction of interleukin-8 secretion. *Infection and Immunity*. **69**: 1625 – 1629.
- 13.- **Azuma Takeshi, Akiyo Yamakawa, Shiho Yamazaki, Kanako Fukuta, Masahiro Ohtani, Yoshiyuki Ito, Manabu Dojo, Yukinao Yamazaki, Masaru Kuriyama.** 2002. Correlation between variation of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* and disease outcome in Japan. *The Journal Infectious Diseases*. **186**: 1621 – 1630.
- 14.- **Azuma Takeshi, Shiho Yamazaki, Akiyo Yamakawa, Masahiro Ohtani, Atsushi Muramatsu, Hiroyuki Suto, Yoshiyuki Ito, Manabu Dojo, Yukinao Yamazaki, Masura Kuriyama, Yoshihide Keida, Hideaki Higashi, Masaroni Hatakeyama.** 2004. Association between diversity in the Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase binding site of *Helicobacter pylori* CagA protein and gastric atrophy and cancer. *The Journal Infectious Diseases*. **189**: 820 – 827.
- 15.- **Backert Steffen, Elke Ziska, Volker Brinkmann, Ursula Zymny-Arndt, Alan Fauconnier, Peter R. Jungblut, Michael Naumann, Thomas F. Meyer.** 2000. Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cellular Microbiology*. **2**: 155 – 164.
- 16.- **Backert Steffen, Stefan Moese, Matthias Selbach, Volker Brinkmann, Thomas F. Meyer.** 2001. Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Molecular Microbiology*. **42**: 631 – 644.
- 17.- **Backert Steffen, Tobias Schwarz, Stephan Miehke, Christian Kirsch, Christian Sommer, Terry Kwok, Markus Gerhard, Ulf B. Goebel, Norbert Lehn, Wolfgang Koenig, Thomas F. Meyer.** 2004.

Functional analysis of the *cag* pathogenicity island in *Helicobacter pylori* isolates from patients with gastritis, peptic ulcer and gastric cancer” *Infection and Immunity*. **72**: 1043 – 1056.

18.- Bäckhed Fredrik, Bachra Rokbi, Elisabeth Torstensson, Ying Zhao, Christina Nilsson, Delphine Seguin, Staffan Normark, Alison M. J. Buchan, Agneta Richter-Dahifors. 2003. Gastric mucosal recognition of *Helicobacter pylori* is independent of Toll-like receptor 4. *The Journal Infectious Diseases*. **187**: 829 - 836.

19.- Björkholm Britta M., A. Lundin, A. Sillén, K. Guillemin, N. Salama, C. Rubio, J. I. Gordon, P. Falk, and L. Engstrand. 2001. Comparison of genetic divergence and fitness between two subclones of *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*. **69**: 7832 – 7838.

20.- Björkholm Britta M., Jung D. Oh, Per G. Falk, Lars G. Engstrand, Jeffrey I. Gordon. 2001. Genomics and proteomics converge on *Helicobacter pylori*. *Current Opinion in Microbiology*. **4**: 237 – 245.

21.- Blaser Martin J. 1988. Bacteriology characteristics of *Campylobacter pylori*. Proceeding of the first Tokyo International Symposium on *Campylobacter pylori*. Tokyo, Japón.

22.- Blaser, M. J., G. I. Perez-Perez, H. Kleanthous, T. L. Cover, M. Peek, P. Chyou, G. N. Stemmermann, A. Nomura. 1995. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Research*. **55**: 2111 – 2115.

23.- Blaser Martin J. 1996. The bacteria behind ulcers. *Scientific American*. **274**: 2

24.- Blaser Martin J., John C. Atherton. 2004. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *The Journal of Clinical Investigation*. **113**: 321 – 333.

25.- Blecker U. Lanciers S. Vandenplas Y. 1994. The role of *Helicobacter pylori* in children with recurrent abdominal pain: The Brusses experience. *Int. Pediatr*. **9**: 276 – 279.

26.- Boren T., P. Falk, K. A. Roth, G. Larson, S. Normark. 1993. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*. **262**: 1892 – 1895.

27.- Brandt, S., T. Kwok, R. Harting, W. König, and S. Backert. 2005. NF- κ B activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **102**: 9300 – 9305.

- 28.- Censini Stefano, Christina Lange, Zhaoying Xiang, Jean E. Crabtree, Paolo Ghiara, Mark Borodovsky, Rino Rappuoli, Antonello Covacci.** 1996. *cag* a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. Proceedings of the National Academy of Sciences. **93**: 14648 – 14653.
- 29.- Censini Stefano, Markus Stein, Antonello Covacci.** 2001. Cellular responses induced after contact with *Helicobacter pylori*. Current Opinion in Microbiology. **4**: 41 – 46.
- 30.- Chen A., C. N. Li, P. I. Hsu, K. H. Lai, H. H. Tseng, P. N. Hsu, G. H. Lo, C. C. Lo, C. K. Lin, I. R. Hwang, Y. Yamaoka, H. C. Chen.** 2004. Risks of interleukin-1 genetic polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection in the development of gastric cancer. Aliment. Pharmacol. Ther. **20**: 203 – 211.
- 31.- Churin Yuri, Laila Al-Ghoul, Oliver Kepp, Thomas F. Meyer, Walter Birchmeier, Michael Naumann.** 2003. *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response. The Journal of Cell Biology. **161**: 249 – 255.
- 32.- Conçalves Adriana Oliveira, Adriana Santos, Juliana Becattini Guerra, Gifone Aguiar Rocha, Andreia Maria Camargos Rocha, Celso Affonso Oliveira, Mônica Maria Demas Álvares Cabral, Ana Margarida Miguel Ferreira Nogueira, Dulciene Maria Magalhaes Queiroz.** 2003. *babA2* and *cagA* positive *Helicobacter pylori* strains are associated with duodenal ulcer and gastric carcinoma in Brazil. Journal of Clinical Microbiology. **41**: 3964 – 3966.
- 33.- Covacci Antonello, Stefano Censini, Máximo Bugnoli, Roberto Petracca, Daniela Burroni, Giovanni Macchia Analiza Massone, Emanuelle Papini, Zhaoying Xiang, Natale Figura, Rino Rappuoli.** 1993. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. Proceedings of the National Academy of Sciences. **90**: 5791 – 5795.
- 34.- Covacci A.** 1998. *Helicobacter pylori* molecular evolution. Current Opinion Microbiology. **1**: 96 – 102.
- 35.- Covacci Antonello, John L. Telford; Giuseppe Del Giudice; Julie Parsonnet; Rino Rappuoli.** 1999. *Helicobacter pylori* Virulence and Genetic Geography. Science. **284**: 1328 – 1333.
- 36.- Cover Timothy L. and Martin J. Blaser.** 1992. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. The Journal of Biological Chemistry. **267**: 10570 – 10575.

- 37.- Cover Timothy L., Murali K. R. Tummuru, Ping Cao, Stuart A. Thompson, Martin J. Blaser.** 1994. Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. The Journal of Biological Chemistry. **269**: 10566 – 10573.
- 38.- Cover Timothy L., Uma S. Krishna, Dawn A. Israel, Richard M. Peek.** 2003. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. Cancer Research. **63**: 951 – 957.
- 39.- Crabtree J. E.** 1996. Immune and inflammatory responses to *Helicobacter pylori* infection. Scand Journal Gastroenterology. **31**: 3 – 10.
- 40.- Daiva Janulaityte-Gunther, Ruta Kucinskiene, Limas Kupcinskas, Alvydas Pavilonis, Liutauras Labanauskas, Arvydas Cizauskas, Uwe Schmidt, Torkel Wadström, Leif Percival Andersen.** 2005. The humoral immunoresponse to *Helicobacter pylori* infection in children with gastrointestinal symptoms. FEMS Immunology and Medical Microbiology. **44**: 205 – 211.
- 41.- Dangeruta Kersulyte, Henrikas Chalkauskas, Douglas E. Berg.** 1999. Emergence of recombinant strains of *Helicobacter pylori* during human infection. Molecular Microbiology. **31**: 31 – 43.
- 42.- Dixon M. F.** 2001. Prospects for intervention in gastric carcinogenesis: reversibility of gastric atrophy and intestinal metaplasma. Gut. **49**: 2 – 4.
- 43.- Drumm B., Sherman P., Cutz E., Karmali M.** 1987. Association of *Campylobacter pylori* on the gastric mucosa with antral gastritis in children. N. Engl. J. Med. **316**: 1557 – 1561.
- 44.- Dunn E. Bruce, Hartley Cohen and Martin J. Blaser.** 1997. *Helicobacter pylori* Clinical Microbiology Reviews. **10**: 720 – 741.
- 45.- El-Omar E. M., Penman I. D., Ardill J. E., Chittajallu R. S., Howie S., McColl K. E.** 1995. *Helicobacter pylori* infection and abnormalities of acid secretion in patients with duodenal ulcer disease. Gastroenterology **109**: 681 – 691.
- 46.- El-Omar E. M., Oien K., El-Nujumi A., Gillen D., Wirz A., Dahill S., Williams C., Ardill J. E., McColl K. E.** 1997. *Helicobacter pylori* infection and chronic gastric acid hyposecretion. Gastroenterology. **113**: 15 – 24.
- 47.- El-Omar E. M., Mary Carrington, Wong-Ho Chow, Kenneth E. L. McColl, Jay H. Bream, Howard A. Young, Jesus Herrera, Jolanta Lissowska, Chiu-Chin Yuan, Nathaniel Rothman, George Lanyon,**

Maureen Martin, Joseph F. Fraumeni, Charles S. Rabkin. 2000. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature*. **404**: 398 – 402.

48.- El-Omar Emad M., Charles S. Rabkin, Marilie D. Gammon, Thomas L. Vaughan, Harvey A. Risch, Janet B. Schoenberg, Janet L. Stanford, Susan T. Mayne, James Goedert, William J. Blot, Joseph F. Fraumeni, Wong-Ho Chow. 2003. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology*. **124**: 1193 – 1201.

49.- Ernst P. B., Gold B. D. 2000. The disease spectrum of *Helicobacter pylori* the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol*. **54**: 615 – 640.

50.- Evans Doyle J., Dolores G. Evans, Toshiaki Takemura, Hironobu Nakano, Heather C. Lampert, David Y. Graham, D. Neil Granger, Peter R. Kviety. 1995. Characterization of a *Helicobacter pylori* Neutrophil-Activating protein. *Infection and Immunity*. **63**: 2213 – 2220.

51.- Ewa E. Henning, Ray Mernaugh, Jennifer Edl, Ping Cao, Timothy L. Cover. 2004. Heterogeneity among *Helicobacter pylori* strains in expression of the outer membrane protein BabA. *Infection and Immunity*. **72**: 3429 – 3435.

52.- Fischer Wolfgang, Jürgen Püls, Renate Buhrdorf, Bettina Gebert, Stefan Odenbreit, Rainer Haas. 2001. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Molecular Microbiology*. **42**: 1337 – 1348.

53.- Fraser A. G., Scragg R., Metcall P., McCullough S., Yeates N. J. 1996. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different ethnic groups in New Zealand children and adults. *Aust NZ Journal Medical*. **26**: 636 – 651.

54.- Galgani Mario, Immacolata Busiello, Stefano Censini, Serafino Zappacosta, Luigi Racioppi, Raffaele Zarrilli. 2004. *Helicobacter pylori* induces apoptosis of human monocytes but not monocyte-derived dendritic cells: Role of the *cag* pathogenicity island. *Infection and Immunity*. **72**: 4480 – 4485.

55.- Genisset Christophe, Cesira L. Galeotti, Pietro Lupetti, David Mercati, David A. G. Skibinski, Silvia Barone, Roberto Battistutta, Marina de Bernard, John L. Telford. 2006. A *Helicobacter pylori* vacuolating toxin mutant that fails to oligomerize has a dominant negative phenotype. *Infection and immunity*. **74**: 1786 – 1794.

56.- Gerhard Markus, Norbert Lehn, Nina Neumayer, Thomas Borén, Roland Rad, Wolfgang Schepp, Stephan Miehke, Meinhard Classen, Christian Prinz. 1999. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori*

gene for blood-group antigen-binding adhesion. Proceedings of the National Academy of Sciences. **96**: 12778 – 12783.

57.- Gillen D., El-Omar E. M., Wirz A. A., Ardill J. E. S., McColl K. E. L. 1998. The acid response to gastrin distinguishes duodenal ulcer patients from *Helicobacter pylori*-infected healthy subjects. Gastroenterology. **114**: 50 – 57.

58.- Glassman M. S., Schwarz S. M., Medow M. S. 1989. *Campylobacter pylori*-related gastrointestinal disease in children incidence and clinical findings. Digestive Disease Science. **34**: 1501 – 1504.

59.- Glocker Erik, Christina Lange, Antonello Covacci, Stefan Bereswill, Manfred Kist, Heike L. Pahl. 1998. Proteins encoded by the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* are required for NF- κ B activation. Infection and Immunity. **66**: 2346 – 2348.

60.- Gobert A. P. 2001. *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. Proceedings of the National Academy of Sciences. **98**: 13844 – 13849.

61.- González Valencia G., J. C. Atherton, O. Muñoz, M. Dehesa. A. Marazo-de la Garza, J. Torres. 2000. *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes in Mexican adults and children. The Journal of Infectious Diseases. **182**: 1450 – 1454.

62.- Goodman K. J., Correa P. 1995. The transmission of *Helicobacter pylori*. A critical review of the evidence. Internal Journal of Epidemiology. **24**: 875.

63.- Harris P. R., Mobley H. L., Perez-Perez G. I., Blaser M. J., Smith P. D. 1996. *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. Gastroenterology. **111**: 419 – 425.

64.- Hassall E. Dimmick J. E. 1991. Unique features of *Helicobacter pylori* disease in children. Digestive Disease Science. **36**: 417 – 423.

65.- Hatakeyama Masanori, Hideaki Higashi. 2005. *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. Cancer Science. **96**: 835 – 843.

66.- Higashi Hideaki, Ryouhei Tsutsumi, Syuichi Muto, Toshiro Sugiyama, Takeshi Azuma, Masahiro Asaka, Masaroni Hatakeyama. 2002. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. Science. **295**: 683 – 686.

- 67.- Higashi Hideaki, Ryouhei Tsutsumi, Akiko Fujita, Shiho Yamazaki, Masahiro Asaka, Takeshi Azuma, Masaroni Hatakeyama.** 2002. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. Proceedings of the National Academy of Sciences. **99**: 14428 – 14433.
- 68.- Higashi Hideaki, Kazuyuki Yokoyama, Yumiko Fujii, Shumei Ren, Hitomi Yuasa, Iraj Saadat, Naoko Murata-Kamiya, Takeshi Azuma, Masaroni Hatakeyama.** 2005. EPIYA motifs is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells. The Journal of Biological Chemistry. **280**: 23130 – 23137.
- 69.- Hofreuter Dirk, Stefan Odenbreit, Jürgen Püls, Dorothee Schwan, Rainer Haas.** 2000. Genetic competence in *Helicobacter pylori*: mechanisms and biological implications. Res. Microbiology. **151**: 487 – 491
- 70.- Hwang I. R., Kodama T., Kikuchi S., Salai K., Peterson L. E., Graham D. Y., Yamaoka Y.** 2002. Effect of interleukin 1 polymorphisms on gastric mucosal interleukin 1 beta production in *Helicobacter pylori* infection. Gastroenterology. **123**: 1793 – 1803.
- 71.- Ikenoue Tsuneo, Shin Maeda, Keiji Ogura, Masao Akanuma, Yuzo Mitsuno, Yasuo Imai, Haruhiko Yoshida, Yasushi Shiratori, Masao Omata.** 2001. Determination of *Helicobacter pylori* virulence by simple gene analysis of the *cag* pathogenicity island. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. **8**: 181 – 186.
- 72.- Israel D. A., Lou A. S., Blaser M. J.** 2000. Characteristics of *Helicobacter pylori* natural transformation. FEMS Microbiology Letter. **186**: 275 – 280.
- 73.- Israel Dawn A., Nina Salama, Uma, Krishna, Ulrich M. Rieger, John C. Atherton, Stanley Falkow, Richard M. Peek.** 2001. *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. Proceedings of the National Academy of Sciences. **98**: 14625 – 14630.
- 74.- Jenks P. J., F. Mégraud, A. Labigne.** 1998. Clinical outcome after infection with *Helicobacter pylori* does not appear to be reliably predicted by the presence of any of the genes of the *cag* pathogenicity island. Gut. **43**: 752 – 758.
- 75.- Jung D. Oh., Helene Kling-Bäckhed, Marios Giannakis, Jian Xu, Robert S. Fulton, Lucinda A. Fulton, Holland S. Cordum, Chunyan Wang, Glendoria Elliott, Jennifer Edwards, Elaine R. Mardis, Lars G. Engstrand, Jeffrey I. Gordon.** 2006. The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis

Helicobacter pylori strain: Evolution during disease progression. Proceedings of the National Academy of Sciences. 103: 9999 – 10004.

76.- Kauser Farhana, Aleem A. Khan, M. Abid Hussain, Ian M. Carroll, Naheed Ahmad, Santosh Tiwari, Yogesh Shouche, Bimal Das, Mahfooz Alam, S. Mahaboob Ali, C. M. Habibullah, Rafaela Sierra, Francis Megraud, Leonardo A. Sechi, Niyaz Ahmed. 2004. The *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* is disrupted in the majority of patient isolates from different human populations. Journal of Clinical Microbiology. **42**: 5302 – 5308.

77.- Kawamura Osamu, Masami Murakami, Osamu Araki, Takuro Yamada, Sayaka Tomizawa, Yasuyuki Shimoyama, Keiko Minashi, Masaki Maeda, Motoyasu Kusano, Masatomo Mori. 2003. Relationship between gastric disease and deletion of *cag* pathogenicity island genes of *Helicobacter pylori* in gastric juice. Digestive Diseases and Sciences. **48**: 47 – 53.

78.- Khulusi S., Badve S., Patel P., Lloyd R., Marrero J. M. 1996. Pathogenesis of gastric metaplasma of the human duodenum: role of *Helicobacter pylori*, gastric acid, and ulceration. Gastroenterology. **110**: 452 – 458.

79.- Kidd M., A. J. Lastovica, J. C. Atherton, J. A. Louw. 2001. Conservation of the *cag* pathogenicity island is associated with *vacA* alleles and gastroduodenal disease in South African *Helicobacter pylori* isolates. Gut. **49**: 11 – 17.

80.- Kim Sanguk, Aaron K. Chamberlain, James U. Bowie. 2004. Membrane channel structure of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin: Role of multiple GXXXG motifs in cylindrical channels. Proceedings of the National Academy of Sciences. **101**: 5988 – 5991.

81.- Kiupers Ernst J., Dawn A. Israel, Johannes G. Kusters, Monique M. Gerrits, Jan Weel, Arie van der Ende, René W. M. van der Hulst, Hans P. Wirth, Johanna Höök-Nikanne, Stuart A. Thompson, Martin J. Blaser. 2000. Quasispecies development of *Helicobacter pylori* observed in paired isolates obtained years apart from the same host. The Journal of Infectious Diseases. **181**: 273 – 282.

82.- Lahner E., Bordi C., Cattaruzza M. S., Iannoni C., Milione M., Delle Fave G., Annibale B. 2005. Long-term follow-up in atrophic body gastritis patients: atrophy and intestinal metaplasia are persistent lesions irrespective of *Helicobacter pylori* infection. Aliment Pharmacol. Ther. **22**: 471 – 481.

83.- Li Shude D., Dangeruta Kersulyte, Ivan J. D. Lindley, Beena Neelam, Douglas E. Berg, Jean E. Crabtree. 1999. Multiple genes in the left half of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* are required for tyrosine kinase-dependent transcription of interleukin-8 in gastric epithelial cells. Infection and Immunity. **67**: 3893 – 3899.

- 84.- Maeda Shin, Fumihiko Kanai, Keiji Ogura, Haruhiko Yoshida, Tsuneo Ikenoue, Morio Takahashi, Takao Kawabe, Yasushi Shiratori, Masao Omata.** 1997. High seropositivity of anti-CagA antibody in *Helicobacter pylori*-infected patients irrelevant to peptic ulcers and normal mucosa in Japan. *Digestive Diseases and Sciences*. **42**: 1841 – 1847.
- 85.- Maeda S., H. Yoshida, T. Ikenoue, K. Ogura, F. Kanai, N. Kato, Y. Shiratori, M. Omata.** 1999. Structure of *cag* pathogenicity island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates. *Gut*. **42**: 336 – 342.
- 86.- Mahdavi J., B. Sonden, M. Hurting, F. O. Olfat, L. Forsberg, N. Roche, J. Angstrom, T. Larsson, S. Teneberg, K. A. Karlsson, S. Altraja.** 2002. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science*. **297**: 573 – 578.
- 87.- Marshall, B. J., Warren, J.R.** 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *The Lancet* **1**: 1311 – 1315.
- 88.- Miehke Stephan, Kirsten Kibler, Jong G. Kim, N. Figura, Susan M. Samll, David Y. Graham, Mae f. Go.** 1996. Allelic variation in the *cagA* gene of *Helicobacter pylori* obtained from Korea compared to the United States. *The American Journal of Gastroenterology*. **91**: 1322 – 1325.
- 89.- Mimuro Hitomi, Toshihiko Sukuki, Jiro Tanaka, Momoyo Asahi, Rainer Haas, Chihiro Sasakawa.** 2002. Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. *Molecular Cell*. **10**: 745 – 755.
- 90.- Mobley Harry L. T., George L. Mendz, Stuart L. Hazell.** 2001. *Helicobacter pylori* physiology and genetics. ASM Press. USA.
- 91.- Moese Stefan, Matthias Selbach, Volker Brinkmann, Alexander Karlas, Beatrice Haimovich, Steffen Backert, Thomas F. Meyer.** 2007. The *Helicobacter pylori* CagA protein disrupts matrix adhesion of gastric epithelial cells by dephosphorylation of vinculin. *Cellular Microbiology*. **9**: 1148 – 1161.
- 92.- Mohammadi M., Nedrud J., Redline R., Lycke N., Czinn S. J.** 1997. Murine CD4 T-cell response to *Helicobacter pylori* infection: TH1 cells enhance gastritis and TH2 cells reduce bacterial load. *Gastroenterology*. **113**: 1848 – 1857.
- 93.- Momynaliev K. T., O. V. Smirnova, L. V. Kudryavtseva, V. M. Govorun.** 2003. Comparative genome analysis of *Helicobacter pylori* strains. *Molecular Biology*. **37**: 529 – 536.

- 94.- Montecucco Cesare and Rino Rappuoli.** 2001. Living dangerously: How *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Molecular Cell Biology*. **2**: 457 – 466.
- 95.- Naito, M., T. Yamazaki, R. Tsutsumi, H. Higashi, K. Onoe, S. Yamazaki, T. Azuma, and M. Hatakeyama.** 2006. Influence of EPIYA-Repeat polymorphism on the phosphorylation dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology*. **130**: 1181– 1190.
- 96.- Narikawa Shinichi, Shinichi Kawai, Hideyuki Aoshima, Osamu Kawamata, Ryuji Kawaguchi, Kazumasa Hikiji, Miyako Kato, Shiro Iino, Yutaka Mizushima.** 1997. Comparison of the nucleic acids of helical and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. **4**: 285 – 290.
- 97.- Neale K. R., Logan R. P. H.** 1995. The epidemiology and transmission of *Helicobacter pylori* infection in children. *Aliment Pharmacology. Ther.* **9**: 77 – 84.
- 98.- Nilsson Christina, Anna Sillén, Lena Eriksson, Mona-Lisa Strand, Helena Enroth, Staffan Normark, Per Falk, Lars Engstrand.** 2003. Correlation between *cag* pathogenicity island composition and *Helicobacter pylori*-associated gastroduodenal disease. *Infection and Immunity*. **71**: 6573 – 6581.
- 99.- Nozawa Yoshihisa, Katsushi Nishihara, Richard M. Peek, Motoko Nakano, Tatsuya Uji, Hirofusa Ajioka, Naosuke Matsuura, Hidekazu Miyake.** 2002. Identification of a signaling cascade for interleukin-8 production by *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells. *Biochemical Pharmacology*. **64**: 21 – 30.
- 100.- Occhialini Alessandra, Armelle Marais, Maria Urdaci, Rafaela Sierra, Nubia Muñoz, Antonello Covacci, Francis Mégraud.** 2001. Composition and gene expression of the *cag* pathogenicity island in *Helicobacter pylori* strains isolated from gastric carcinoma and gastritis patients in Costa Rica. *Infection and Immunity*. **69**: 1902 – 1908.
- 101.- Odenbreit Stefan, Markus Till, Dirk Hofreuter, Gerhard Faller, Rainer Haas.** 1999. Genetic and functional characterization of the *alpAB* gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Molecular Microbiology*. **31**: 1537 – 1548.
- 102.- Odenbreit Stefan, Jürgen Püls, Bettina Sedlmaier, Elke Gerland, Wolfgang Fischer, Rainer Haas.** 2000. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science*. **287**: 1497 – 1500.
- 103.- Ohata H., Kitauchi s., Yoshinura N., Mugitani K., Iwane M., Nakamura H., Yoshikawa A., Yanaoka K., Arii K., Tamai H.** 2004. Progression of chronic atrophic gastritis associated with *Helicobacter pylori* infection increases risk of gastric cancer. *Int J. Cancer* **109**: 138 – 143.

- 104.- Oliveira Maria J., Ana C. Costa, Angela M. Costa, Lara Henriques, Gianpaolo Suriano, John C. Atherton, Jose C. Machado, Fatima Carneiro, Raquel Seruca, Marc Mareel, Ancy Leroy, Ceu Figueiredo.** 2006. *Helicobacter pylori* induces gastric epithelial cell invasion in a c-Met and type IV secretion system-dependent manner. The Journal of Biological Chemistry. **281**: 34888 – 34896.
- 105.- Owen, R. J., S. I. Sharp, A. J. Lawson, Z. Durrani, S. Rijpkema, and M. Kidd.** 2003. Investigation of the biological relevance of *Helicobacter pylori* *cagE* locus diversity, presence of CagA tyrosine phosphorylation motifs and vacuolating cytotoxin genotype on IL-8 induction in gastric epithelial cells. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **36**: 135 – 140.
- 106.- Pai Rama, Timothy L. Cover, Andrzej S. Tarnawski.** 1999. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) disorganizes the cytoskeletal architecture of gastric epithelial cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. **262**: 245 – 250.
- 107.- Pai Rama, Eiji Sasaki, Andrzej S. Tarnawski.** 2000. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) alters cytoskeleton-associated proteins and interferes with re-epithelialization of wounded gastric epithelial monolayers. Cell Biology International. **24**: 291 – 301.
- 108.- Parsonnet J.** 1995. The incidence of *Helicobacter pylori* infection. Aliment Pharmacol. Ther. **9**: 45 – 51.
- 109.- Peck Birgit, Martina Ortkamp, Klaus D. Diehl, Erika Hundt, Bernhard Knapp.** 1999. Conservation, localization and expression of HopZ a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. Nucleic Acids Research. **27**: 3325 – 33333.
- 110.- Perez-Perez G. I., Sheperd V. L., Morrow J. D. Blaser M. J.** 1995. Activation of human THP-1 cells and rat bone marrow-derived macrophages by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. Infection and Immunity. **63**: 1183 – 1187.
- 111.- Prinz Christian, Nadia Hafsi, Petra Volland.** 2003. *Helicobacter pylori* virulence factors and the host immune response: implications for therapeutic vaccination. Trends in Microbiology. **11**: 134 – 138.
- 112.- Püls Jürgen, Wolfgang Fischer, Rainer Haas.** 2002. Activation of *Helicobacter pylori* CagA by tyrosine phosphorylation is essential for dephosphorylation of host cell proteins in gastric epithelial cells. Molecular Microbiology. **43**: 961 – 969.

- 113.- Queiroz Dulciene M. M., Gifone A. Rocha, Edilberto N. Mendes.** 1995. *Helicobacter pylori*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología. **15**: 424 – 429.
- 114.- Rad Roland, Christian Prinz, Bruno Neu, Mathilde Neuhofer, Marco Zeitner, Petra Voland, Ingrid Becker, Wolfgang Schepp, Markus Gerhard.** 2003. Synergistic effect of *Helicobacter pylori* virulence factors and interleukin-1 polymorphisms for the development of severe histological changes in the gastric mucosa. The Journal of Infectious Diseases. **188**: 272 – 281.
- 115.- Rad R., A. Dossumbekova, B. Neu, R. Lang, S. Bauer, D. Saur, M. Gerhard, C. Prinz.** 2004. Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonization during *Helicobacter pylori* infection. Gut. **53**: 1082 – 1089.
- 116.- Reyes-Leon Adriana, John C. Atherton, Richard H. Argent, J. L. Puente and J. Torres.** 2007. Heterogeneity in the activity of Mexican *Helicobacter pylori* strains in gastric epithelial cells and its association with diversity in the *cagA* gene. Infection and Immunity. **75**: 3445 – 3454.
- 117.- Rieder G., R. A. Hatz, A. P. Moran, A. Walz, M. Stolte, G. Enders.** 1997. Role of adherence in interleukin-8 induction in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. Infection and Immunity. **65**: 3622 – 3630.
- 118.- Rudi Jochen, Christof Kolb, Matthias Maiwald, Dirk Kuck, Andreas Sieg, Peter R. Galle, Wolfgang Stremmel.** 1998. Diversity of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genes and relationship to VacA and CagA protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. Journal of Clinical Microbiology. **36**: 944 – 948.
- 119.- Salama Nina, Karen Guillemin, Timothy K. McDaniel, Gavin Sherlock, Lucy Tompkins, Stanley Falkow.** 2000. A whole-genome microarray reveals genetic diversity among *Helicobacter pylori* strains. Proceedings of the National Academy of Sciences. **97**: 14668 – 14673.
- 120.- Salama Nina R., Gerardo Gonzalez Valencia, Brooke Deatherage, Francisco Aviles-Jimenez, John C. Atherton, David Y. Graham, Javier Torres.** 2007. Genetic analysis of *Helicobacter pylori* strain populations colonizing the stomach at different times postinfection. Journal of Bacteriology. **189**: 3834 - 3845.
- 121.- Sambrook J. E. F. Fritsch, T. Maniatis.** 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2ª Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- 122.- Sang Hui Chu, Hyeyoung Kim, Jeong Yeon Seo, Joo Weon Lim, Naofumi Mukaida, Kyung Hwan Kim.** 2003. Role of NF- κ B and AP-1 on *Helicobacter pylori*-induced IL-8 expression in AGS cells. Digestive Diseases and Sciences. **48**: 257 – 265.
- 123.- Satin By Barbara, Giuseppe Del Giudice, Vittorina Della Bianca, Stefano Dusi, Carlo Laudanna, Fiorella Tonello, Dermot Kelleher, Rino Rappuoli, Cesare Montecucco, Filippo Rossi.** 2000. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. Journal Experimental Medical. **191**: 1467 – 1476.
- 124.- Segal Ellyn D., C. Lange, A. Covacci, L. S. Tompkins, S. Falkow.** 1997. Induction of host signal transduction pathways by *Helicobacter pylori*. Proceedings of the National Academy of Sciences. **94**: 7595 – 7599.
- 125.- Segal Ellyn. D., J. Cha, J. Lo, S. Falkow, and L. S. Tompkins.** 1999. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. Proceedings of the National Academy of Sciences. **96**: 14559 – 14564.
- 126.- Selbach Matthias, Stefan Moese, Christof R. Hauck, Thomas F. Meyer, Steffen Backert.** 2002. Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein *in vitro* and *in vivo*. The Journal Biological Chemistry. **277**: 6775 – 6778.
- 127.- Selbach Matthias, Stefan Moese, Robert Hurwitz, Christof R. Hauck, Thomas F. Meyer, Steffen Backert.** 2002. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. The European Molecular Biology Organization Journal. **22**: 515 – 528.
- 128.- Selbach, M., S. Moese, T. F. Meyer, and S. Backert.** 2002. Functional analysis of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island reveals both VirD4-CagA-dependent and VirD4-CagA-independent mechanisms. Infection and Immunity. **70**: 665 – 671.
- 129.- Sharma Smita A., Murali K. R. Tummuru, Geraldine G. Miller, Martin J. Blaser.** 1995. Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation *in vitro*. Infection and Immunity. **63**: 1681 – 1687.
- 130.- Sharma Smita A., Murali K. R. Tummuru, Martin J. Blaser, Lawrence D. Kerr.** 1998. Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor- κ B in gastric epithelial cells. The Journal of Immunology. **160**: 2401 – 2407.

- 131.- Smith Michael F., Anastasia Mitchell, Guolian Li, Song Ding, Ann Marie Fitzmaurice, Kieran Ryan, Sheila Crowe, Joanna B. Goldberg.** 2003. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF-kappa B activation and chemokine expression by epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry.* **278**: 32552 – 32560.
- 132.- Stein Markus, Fabio Bagnoli, Robert Halenbeck, Rio Rappuoli, Wendy J. Fantl, Antonello Covacci.** 2002. c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Molecular Microbiology.* **43**: 971 – 980.
- 133.- Stoicov Calin, Reza Safari, Xun Cai, Chhaya Hasyagar, JeanMarie Houghton.** 2004. Molecular biology of gastric cancer: *Helicobacter* infection and gastric adenocarcinoma: bacterial and host factors responsible for altered growth signaling. *Gene.* **341**: 1 – 17.
- 134.- Suerbaum Sebastian, John Maynard Smith, Khairun Bapumia, Giovanna Morelli, Noel H. Smith, Erdmute Kunstmann, Isabelle Dyrek, Mark Achtman.** 1998. Free recombination within *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **95**: 12619 – 12624.
- 135.- Suerbaum Sebastian, Christine Josenhans.** 2007. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host. *Nature Reviews Microbiology.* **5**: 441 – 452.
- 136.- Sundrud Mark S., Victor J. Torres, Derya Unutmaz, Timothy I. Cover.** 2004. Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* **101**: 7727 – 7732.
- 137.- Taylor Diane E., Michelle Eaton, Nicholas Chang, Sameeh M. Salama.** 1992. Construction of a *Helicobacter pylori* genome map and demonstration of diversity at the genome level. *Journal of Bacteriology.* **174**: 6800 – 6806.
- 138.- Teneberg Susann, Halina Miller-Podraza, Heather C. Lampert, Doyle J. Evans, Dolores G. Evans, Dan Danielsson, Karl-Anders Karlsson.** 1997. Carbohydrate binding specificity of the neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori*. *The Journal of Biological Chemistry.* **272**: 19067 – 19071.
- 139.- Tomb Jean F., Owen White, Anthony R. Kerlavage, Rebecca A. Clayton, Granger G. Sutton, Robert D. Flesischmann, Karen a. Ketchum, HansPeter Klenk, Steven Gill, Brian A. Dougherty, et. al.** 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* **388**: 539 – 547.
- 140.- Torok Anastasia M., Amy H. Bouton, Joanna B. Goldber.** 2005. *Helicobacter pylori* induces Interleukin-8 secretion by Toll-like receptor 2 and Toll like receptor 5 dependent and independent pathways. *Infection and Immunity.* **73**: 1523 – 1531.

- 141.- Torres Javier, Yelda Leal-Herrera, Guillermo Perez-Perez, Alejandro Gomez, Margarita Camorlinga-Ponce, Roberto Cedillo-Rivera, Roberto Tapia-Conyer, Onofre Muñoz.** 1998. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. *The Journal of Infectious Diseases*. **178**: 1089 – 1094.
- 142.- Torres Javier, Guillermo Pérez-Pérez, Karen J. Goodman, John C. Atherton, Benjamin D. Gold, Paul R. Harris, Armando Madrazo de la Garza, Jeannette Guarner, Onofre Muñoz.** 2000. A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. *Archives of Medical Research*. **31**: 431 – 469.
- 143.- Tsuda M., M. Karita, M. G. Morshed, K. Okita, and T. Nakazawa.** 1994. A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infect. Immun.* **62**:3586 – 3589.
- 144.- Tsutsumi R., H. Higashi, M. Higuchi, M. Okada, and M. Hatakeyama.** 2003. Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA-SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. *J. Biol. Chem.* **278**: 3664 – 3670.
- 145.- Tsutsumi R., A. Takahashi, T. Azuma, H. Higashi, and M. Hatakeyama.** 2006. Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with *Helicobacter pylori* CagA. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 261 – 276.
- 146.- Tummuru Murali K. R., Timothy L. Cover, Martin J. Blaser.** 1993. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infection and Immunity*. **61**: 1799 – 1809.
- 147.- Tummuru Murali K. R., Smita A. Sharma, Martin J. Blaser.** 1995. *Helicobacter pylori* *picB*, a homologue of the *Bordetella pertussis* toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. *Molecular Microbiology*. **18**: 867 – 876.
- 148.- Unemo Magnus, Marina Aspholm-Hurtig, Dag Ilver, Jörgen Bergström, Thomas Borén, Dan Danielsson, Susann Teneberg.** 2005. The sialic acid binding SabA adhesion of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*. **280**: 15390 – 15397.

- 149.- Van der Ende Arie, Zhi-Jun Pan, Aldert Bart, René W. M. van der Hulst, Monique Feller, Shu-Dong Xiao, Guido N. J. Tytgat, Jacob Dankert.** 1998. *cagA*-positive *Helicobacter pylori* populations in China and the Netherlands are distinct. *Infection and Immunity*. **66**: 1822 – 1826.
- 150.- Van Doorn Leen-Jan, Céu Figueiredo, Francis Mégraud, Salvador Pena, Peter Midolo, Dulciene Maria de Magalhães Queiroz, Fátima Carneiro, Bart Vanderborght.** 1999. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. **116**: 823 – 830.
- 151.- Viala Jérôme, Catherine Chaput, Ivo G. Boneca, Ana Cardona, Stephen E. Girardin, Anthony P. Moran, Rafika Athman, Sylvie Mémet, Michel R. Huerre, Anthony J. Coyle, Meter S. DiStefano, Philippe J. Sansonetti, Agnés Labigne, John Bertin, Dana J. Philpott, Richard L. Ferrero.** 2004. Nod1 responds to peptidoglycan by the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island. *Nature Immunology*. **5**: 1166 – 1174.
- 152.- Wang Ge, M. Zafri Humayun, Diane E. Taylor.** 1999. Mutation as an origin of genetic variability in *Helicobacter pylori*. *Trends in Microbiology*. **7**: 488 – 493.
- 153.- Yamaoka Yoshio, Tadashi Kodama, Kei Kashima, David Y. Graham, Antonia R. Sepúlveda.** 1998. Variants of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H. pylori*-associated diseases. *Journal of Clinical Microbiology*. **36**: 2258 – 2263.
- 154.- Yamaoka Yoshio, Dong H. Kwon, David Y. Graham.** 2000. A M_r 34,000 proinflammatory outer membrane protein (*oipA*) of *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **97**: 7533 – 7538.
- 155.- Yamaoka Yoshio, Shogo Kikuchi, Hala M. T. El-Zimaity, Oscar Gutierrez, Michael S. Osato, David Y. Graham.** 2002. Importance of *Helicobacter pylori oipA* in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin-8 production. *Gastroenterology*. **123**: 414 – 424.
- 156.- Yamazaki Shiho, Akiyo Yamakawa, Yoshiyuki Ito, Masahiro Ohtani, Hideaki Higashi, Masanori Hatakeyama, Takeshi Azuma.** 2003. The CagA protein of *Helicobacter pylori* is translocated into epithelial cells and binds to SHP-2 in human gastric mucosa. *The Journal of Infectious Diseases*. **187**: 334 – 337.
- 157.- Yu J., W. K. Leung, M. Y. Y. Go, M. C. W. Chan, K. F. To, E. K. W. Ng, F. K. L. Chan, T. K. W. Ling, S. C. S. Chung, J. J. Y. Sung.** 2002. Relationship between *Helicobacter pylori babA2* status with gastric epithelial cell turnover and premalignant gastric lesions. *Gut*. **51**: 480 – 484.

158.- Zambon C. F., F. Navaglia, D. Basso, M. Rugge, M. Plebani. 2003. *Helicobacter pylori* babA2, cagA and s1 vacA genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. *Journal Clinical Pathology*. **56**: 287 – 291.

159.- Zhang Youli, Richard H. Argent, Daren P. Letley, Rachael J. Thomas, John C. Atherton. 2005. Tyrosine phosphorylation of CagA from Chinese *Helicobacter pylori* isolates in AGS gastric epithelial cells. *Journal of Clinical Microbiology*. **43**: 786 – 79

X. PUBLICACIÓN

Adriana Reyes-Leon, John C. Atherton, Richard H. Argent, J. L. Puente and J. Torres. 2007. Heterogeneity in the activity of Mexican *Helicobacter pylori* strains in gastric epithelial cells and its association with diversity in the *cagA* gene. *Infection and Immunity*. **75**: 3445-3454.