

302827



UNIVERSIDAD MOTOLINIA, A. C.

7
Lej

ESCUELA DE QUIMICA
con estudios incorporados a la U.N.A.M.

ADHERENCIA DE Helicobacter pylori
A LA LINEA CELULAR HEP-2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S
Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a

OLGA ALICIA MONTES DE OCA ZAMUDIO

México, D. F.

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

Esta investigación fue realizada en el departamento de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán bajo la dirección de la Dra. Yolanda López Vidal, a quién agradezco su asesoría, sus consejos, y la oportunidad que me brindó para realizar el presente trabajo.

INDICE

Página

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 Planteamiento del problema	1
1.2 Objetivos	2
1.3 Hipótesis	2

CAPITULO II.

ANTECEDENTES

2.1 Historia y antecedentes	3
2.2 Taxonomía	4
2.3 Importancia clínica	5
2.4 Características generales de <i>Helicobacter pylori</i>	9
2.4.1 Características morfológicas	9
2.4.2 Aislamiento y cultivo	10
2.4.3 Identificación	11
2.5 Mecanismos de patogenicidad	12
2.5.1 Características estructurales	12
2.5.2 Actividad enzimática	13
2.5.3 Citotoxina	14
2.5.4 Adherencia	14

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Diagrama experimental	19
3.2 Material, reactivos y equipo	20
3.2.1 Material biológico	20
3.2.2 Material de laboratorio	20
3.2.3 Reactivos y soluciones	21
3.2.4 Medios de cultivo	22
3.2.5 Equipo	22
3.3 Preparación de soluciones	22
3.4 Metodología	26
3.4.1 Crecimiento de la bacteria	26
3.4.2 Investigación de los factores que afectan la adherencia de <i>H.pylori</i>	26
3.4.3 Metodología utilizada para el estudio de la adherencia de <i>H.pylori</i> a células Hep-2	27
3.4.4 Metodología para la tinción de Warthin-Starry	28
3.4.5 Metodología para la tinción con naranja de acridina	28

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1 Resultados	29
4.2 Discusión	42

CAPITULO V

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

46

47

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 Planteamiento del problema.

Desde que en 1983, se logró el aislamiento de *Helicobacter pylori* de la mucosa gástrica de pacientes con gastritis crónica, este microorganismo se ha convertido en el centro de atención de muchos investigadores.

En la actualidad, existen abundantes evidencias que señalan a esta bacteria como el principal agente causal de las gastritis agudas y crónicas; por otra parte, *H.pylori*, ha sido implicado como un factor importante en la patogenia de la úlcera péptica, e incluso en el síndrome de dispepsia no ulcerosa; Sin embargo, están aún por esclarecerse los mecanismos a través de los cuales interviene este microorganismo en el desarrollo de estas enfermedades^(19,24,50).

Helicobacter pylori posee varios mecanismos que le permiten colonizar la mucosa gástrica, entre ellos se encuentran algunas características morfológicas y bioquímicas, y su capacidad de adherirse a las células epiteliales.⁽¹⁵⁾

Se ha observado que cuando *H.pylori* se adhiere a las células del epitelio gástrico, causa alteraciones estructurales y bioquímicas, originándose una respuesta inmunológica.⁽⁵²⁾

Hasta el momento, *H.pylori* ha sido encontrado en las uniones intercelulares, y en la superficie de las células antrales in vivo, pero no se ha observado dentro de ellas, por lo que se piensa que son sus propiedades de adherencia las que pueden generar las lesiones histopatológicas observadas.^(34,45)

Dado que la adherencia es el primer evento que sucede, para que se establezca la relación huésped-parásito, es importante establecer un modelo in vitro que permita el estudio de las propiedades de adherencia de esta bacteria; Para el estudio in vitro de la adherencia,

se han utilizado diversas líneas celulares que permiten extrapolar los eventos observados, a modelos in vivo.

Debido a la importancia médica que tiene *H.pylori*, y tomando en cuenta que en México no existen aún estudios reportados sobre las propiedades de adherencia de esta bacteria, se consideró necesario estandarizar un modelo in vitro que permita llevar a cabo investigaciones sobre este punto.

1.2 Objetivos.

- 1) Establecer la utilidad de la línea celular HEP-2 para evaluar la capacidad de adherencia de *H.pylori*
- 2) Estandarizar un método para evaluar la capacidad de adherencia de la cepa control CCUG 15818 de *H.pylori* a células HEP-2.
- 3) Determinar el índice de adherencia de *H.pylori* a la línea celular HEP-2.

1.3 Hipótesis.

Si la adherencia es un factor importante en la patogénesis de las enfermedades gastrointestinales, entonces *Helicobacter pylori*, tiene la capacidad de adherirse a las células epiteliales.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1 Historia y antecedentes.

Helicobacter pylori, es una bacteria gramnegativa, de estructura curva o espirilar, que fue aislada por primera vez en 1983 por Warren y Marshall; sin embargo, anteriormente ya se había reportado la existencia de microorganismos curvos, presentes en la mucosa gástrica de algunos mamíferos (41).

En 1893, Bizzozero y Salomón, reportaron la existencia de bacterias curvas, presentes en el estómago de perros y gatos (41).

En 1938, Doenges profundizó en estos estudios, y encuentra bacterias espirilares similares, en el estómago de cadáveres humanos; dos años más tarde, Freedberg y Barron observan la presencia de estas bacterias en secciones de tejido gástrico de pacientes con úlcera péptica (41).

En 1950, Palmer realiza otra investigación, y niega la existencia de estos microorganismos espirales, por lo que el estudio de éstos queda olvidado por espacio de casi veinte años (41).

En 1975, Colin y Jones, encontraron bacterias asociadas a la presencia de gastritis difusa y úlcera gástrica, sin embargo, la importancia de este hallazgo disminuyó, cuando el microorganismo fue erróneamente identificado como *Pseudomona spp* (41).

Fue hasta 1979, que Robin Warren, observa nuevamente la presencia de estas bacterias en un espécimen de biopsia gástrica; es entonces, cuando en combinación con Barry Marshall, emprende un estudio con cien pacientes que presentaban sintomatología de enfermedad ácido-péptica (úlceras duodenales y/o gastritis) a los que se les realizó una endoscopia, con el objeto de encontrar el origen de la bacteria, identificarla, y asociarla a algún síndrome (44).

Después de varios intentos, Marshall y cols, lograron aislar bacterias curvas de mucosa gástrica, y posteriormente determinaron el grado de asociación de este microorganismo con enfermedad ácido-péptica, encontrándose un cultivo positivo en el 87% de los casos de úlcera-duodenal, y en el 55% de los casos de gastritis; mientras que sólo se aisló en un 5% de los pacientes con mucosa gástrica histológicamente normal (44).

En estudios realizados con diferentes modelos animales (cerdos, primates, y hurones), se encontraron bacterias similares a las del género *Campylobacter*, a las que se les denominó como GCLO (Gastric Organisms Like *Campylobacter*) pero, posteriormente se demostró que sólo los organismos aislados de primates y de cerdos pertenecen al mismo género y a la misma especie que aquellos que son aislados de humanos, mientras que los organismos aislados de hurones, presentan características diferentes, por lo que se les clasificó como *Helicobacter mustelae*.(45)

2.2 Taxonomía.

La bacteria aislada por Marshall y cols, fue inicialmente clasificada como *Campylobacter pyloridis*, ya que presentaba algunas características afines al género *Campylobacter*; más tarde, se decidió que este nombre era gramaticalmente incorrecto, y se cambió por el de *Campylobacter pylori* (42,43).

En 1985, Goodwin y cols, demostraron que el contenido de ácidos grasos celulares, y algunas características ultraestructurales de *C.pylori*, eran muy diferentes de las que presentaban *Campylobacter jejuni* y otros integrantes del género; por lo que se sugirió que la bacteria debía clasificarse en otro género (22).

Posteriormente, Thompson y cols, propusieron que se le integrara dentro del género *Wolinella*, y Paster postuló casi al mismo tiempo que se le incluyera dentro del género

Flexispira (22)

Diversos tipos de estudios se realizaron para tratar de clasificar a la bacteria en alguno de estos géneros; sin embargo, las diferencias morfológicas, bioquímicas, y de cultivo, que se encontraron entre *C.pylori* y los integrantes de los géneros *Campylobacter*, *Wolinella*, y *Flexispira* (Tablas 1 y 2), dieron lugar a la creación de un nuevo género al que se le llamó *Helicobacter* (Del griego *helix*=hélice), nombre que se refiere a la morfología del microorganismo, que presenta una estructura espiral in vivo, pero se encuentra frecuentemente como un bastón curvo in vitro (22,46).

Por lo tanto, en 1989, el Comité de Reconciliación y Aprobación para la Clasificación Bacteriana, aprobó que *C.pylori* fuera transferido al género *Helicobacter*, y la bacteria quedara clasificada como *Helicobacter pylori* (22).

2.3 Importancia clínica.

Desde que Marshall y Warren reportaron en 1983, la asociación existente entre *H.pylori* y la presencia de gastritis, numerosos estudios se han enfocado a la investigación del papel de esta bacteria en la enfermedad ácido-péptica; como consecuencia de esto, diversos reportes se han publicado, postulando que *H.pylori* no sólo se encuentra asociado a gastritis tipo B, sino también a otros padecimientos gástricos.

La gastritis tipo B, o gastritis antral, es un padecimiento muy común, en el cuál las células epiteliales secretoras de moco son dañadas, y por lo tanto se produce una inflamación en el antro gástrico; se diferencia de la gastritis tipo A, en que en ésta, las células secretoras de moco no sufren cambios, y el daño se produce básicamente por la producción de anticuerpos contra las células parietales, que son destruidas gradualmente, este tipo de gastritis se ha clasificado como un padecimiento autoinmune, y generalmente es asintomática (35,40).

TABLA 1

CARACTERISTICAS ULTRAESTRUCTURALES DE *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, y *Wolinella succinogenes*

CEPA	PARED CELULAR	FLAGELOS	VAINA FLAGELAR	BULBO FLAGELAR	GLICOCALIX
<i>C.jejuni</i>	Rugosa	Unico, bipolar	Ausente	Ausente	Escaso
<i>H.pylori</i>	lisa	Múltiple, unipolar	Presente	Presente	Presente
<i>H.mustelae</i>	lisa	Múltiple, bipolar,	Presente	Presente	Presente
<i>W.succinogenes</i>	Variable	Unico, bipolar	Ausente	Ausente	Escaso

TABLA 2

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS Y DE CULTIVO DE *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Helicobacter mustelae*, *Wolinella succinogenes* Y *Flexispira rappini*.

CARACTERISTICA	<i>C.jejuni</i>	<i>H.pylori</i>	<i>H.mustelae</i>	<i>W.succinogenes</i>	<i>F.rappini</i>
Oxidasa	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	-	+
Ureasa	-	+	+	-	+
Hidrólisis del hipurato	+	-	-	-	-
Reducción de Nitratos	+	-	+	+	-
Gamma glutamil-transpeptidasa	-	+	+	-	+
Fosfatasa alcalina	ND	+	+	-	-
Hidrólisis del indoxil-acetato	+	-	+	+	ND
Motilidad	+	+	+	+	+
Temperatura óptima de crecimiento *	42°C	37°C	42°C	37°C	30°C
Susceptibilidad a ácido nalidíxico	S	R	S	R	R
Suscep.a cefalotina	R	S	R	R	R
Suscep. a metronidazol	R	S	S	S	R

↳ (+) = Positivo (-) = negativo S= Sensible R= Resistente ND= No determinado * Ambiente microaerofílico

La relación que existe entre *H.pylori* y la existencia de gastritis tipo B, ha sido plenamente confirmada por los resultados obtenidos en numerosas investigaciones (2,9,11,24,53)

Uno de los estudios más relevantes, fue el que Goodwin y cols. realizaron en 1987 con 107 pacientes con diagnóstico histológico de gastritis, encontrándose que el 100% de los pacientes presentaba un cultivo positivo de *H.pylori*. Además, en un estudio realizado por Sjösted, se encontró que *H.pylori* ocupa el segundo lugar entre los microorganismos que se encuentran presentes en la mucosa gástrica de pacientes con síntomas de enfermedad ácido-péptica (24,53).

Helicobacter pylori, también ha sido asociado a la presencia de úlcera duodenal por numerosos autores, y dicha asociación se encuentra en más del 70% de los casos (2,10,50); sin embargo, el papel que desempeña esta bacteria en la patogénesis de la enfermedad ulcerosa es aún controversial, ya que la existencia de úlcera duodenal se encuentra muy relacionada con la presencia de gastritis, y también con metaplasia gástrica, y dado que se ha demostrado que *H.pylori* es un agente etiológico de la gastritis antral, y que se encuentra presente en un 90% de los casos de metaplasia gástrica, algunos autores han sugerido que estos dos factores pueden relacionar en alguna manera a *H.pylori* con la presencia de úlcera duodenal (6,54).

Por otro lado, se ha demostrado que la presencia de *H.pylori* es un factor muy significativo en las recaídas a la enfermedad ulcerosa, ya que se ha observado, que la erradicación de esta bacteria reduce la frecuencia de recaídas en los pacientes con úlcera duodenal (50).

Aunque no existen muchos estudios al respecto, *H.pylori*, también ha sido relacionada con dispepsia no ulcerosa (NUD), que es un padecimiento en el cuál existe dolor abdominal o retroesternal, y esta sintomatología tiene una duración mayor de cuatro semanas. La patogenicidad de la NUD es probablemente heterogénea, y se creó que puede ser causada por anomalías en la secreción de ácido gástrico o en la motilidad gástrica, y por factores

sicológicos (19).

En un estudio realizado por Lambert y Dunn, se demostró que la mayoría de los pacientes que padecían NUD, presentaban una mejoría cuando se les administraba antibiótico, y el microorganismo era erradicado, así que se creó que *H.pylori* puede ser un agente importante en el desarrollo de esta enfermedad (32,19,25).

2.4 Características generales de *Helicobacter pylori*.

2.4.1 Características morfológicas.

Helicobacter pylori, es un bacilo gramnegativo, de forma curva o espiral; mide aproximadamente 0.5 μm de ancho y de 2-3 μm de largo (15).

El análisis ultraestructural, muestra que *H.pylori* posee pared celular lisa, glicocálix, y de 4-6 flagelos unipolares (lofótricos) que presentan vaina flagelar y bulbo, miden de 30-35 nm de diámetro y no se ha demostrado todavía que tengan una función específica (21,22).

Una característica importante, es que *H.pylori* se encuentra en dos formas morfológicamente distintas; generalmente se encuentra in vivo como una bacteria curva de estructura similar a la de *Vibrio cholerae*, pero también puede encontrarse en forma cocoide, tanto in vivo, como in vitro. Frecuentemente, *H.pylori* se encuentra en forma cocoide en cultivos viejos, pero también se ha demostrado que la forma curva (vegetativa) de *H.pylori* puede transformarse a la forma cocoide, agregando concentraciones subinhibitorias de antibióticos, y que ésta puede regresar a la forma vegetativa, incrementando la concentración de sustratos en un medio líquido o semilíquido y manteniéndola por un período de 4-6 semanas (37). Se ha llegado a proponer, que *H.pylori* se mantiene en forma cocoide bajo condiciones ambientales desfavorables por largos periodos de tiempo, y que después de ser

ingerido, se transforma a la forma vegetativa en la mucosa gástrica (13,57).

2.4.2 Aislamiento y cultivo.

Helicobacter pylori, se ha logrado aislar únicamente de biopsias de mucosa gástrica, y en muy baja proporción de jugo gástrico. Hasta el momento no se ha podido aislar de heces humanas (9).

Se han utilizado diversos medios de cultivo para el primo aislamiento como son: el agar chocolate, el agar BHI, y el agar de Skirrow, todos estos medios son suplementados con los requerimientos nutricionales necesarios para el crecimiento de la bacteria, y con antibióticos que inhiben el crecimiento de otros microorganismos (15).

También se han utilizado diversos medios para el cultivo de *H.pylori*, y la mayoría de los autores han observado que la bacteria crece bien en casi todos los medios suplementados con sangre o suero de caballo o carnero, por lo que se ha confirmado que la hemina es un requerimiento nutricional indispensable para el crecimiento de *H.pylori* (15).

Otros investigadores, han demostrado que el suero, el carbón, y el almidón, también aumentan el crecimiento de *H.pylori*, cuando son agregados a los medios de cultivo (5).

Algunos de los medios que han sido más utilizados para el cultivo de *H.pylori*, son el agar chocolate, el agar Brucella, el agar Mueller-Hinton, y el medio bifásico. Los resultados obtenidos en cada uno de los medios varían de uno a otro autor; sin embargo, en un estudio realizado en el Instituto Nacional de la Nutrición, se demostró que el medio de Infusión cerebro-corazón (BHI) suplementado con sangre entera de caballo, permite un mayor crecimiento en menor tiempo (13,46,47).

Los medios inoculados con *H.pylori* deben ser incubados en condiciones

microaerófilicas (10% de CO₂, 5% de O₂, y 85% de N₂); los cultivos líquidos deben además mantenerse en agitación continua, y la temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, algunas cepas pueden crecer a 42°C, pero no crece a temperatura ambiente (15).

2.4.3 Identificación.

Básicamente, *H. pylori* se identifica por su morfología colonial, observación al microscopio y por pruebas bioquímicas.

Helicobacter pylori, forma colonias pequeñas, de 0.5-1 mm de diámetro, translúcidas y de bordes continuos (44).

Para la observación al microscopio, se han utilizado una gran variedad de tinciones. La más utilizada ha sido la tinción de plata de Warthin-Starry, pero tiene la desventaja de ser una tinción complicada que lleva mucho tiempo, y además es costosa; algunos autores han mencionado que la tinción de Giemsa proporciona mejores resultados que la de Warthin-Starry, ya que ofrece la ventaja de que preserva la morfología del microorganismo, mientras que la tinción de W.S. le confiere a la bacteria un aspecto granuloso, por lo que muchas veces puede confundirse con un precipitado de plata (15,37,58).

Otros autores han reportado que la tinción de naranja de acridina, es la que permite una mejor visualización de la bacteria, además de que es un procedimiento fácil y rápido de realizar. También se han utilizado la tinción de Gram, la tinción de violeta de cresilo, y la de hematoxilina y eosina, pero presentan menor sensibilidad que las anteriores. Debe mencionarse, que aunque todas estas tinciones permiten la visualización de la bacteria, ninguna es específica (13,15,33,56).

Así mismo, *Helicobacter pylori* puede identificarse por sus características bioquímicas (Tabla 2) (22)

2.5 Mecanismos de patogenicidad.

Observaciones histológicas muestran que *H.pylori* se encuentra en tres áreas cuando invade la mucosa gástrica; la primera de ellas es la capa de moco que recubre a las células del epitelio, la segunda es en las uniones intercelulares, y también se ha observado unido o parcialmente fusionado a la membrana de las células (8).

Estudios in vivo han demostrado que *H.pylori* causa anomalías en las células del epitelio, como son: la degradación de los gránulos intracelulares de mucina, la pérdida de las microvellosidades celulares, y la presencia de adhesiones intermembranas entre la pared celular bacteriana y la superficie de las células epiteliales (10).

Aunque no se conoce mucho sobre la patogenicidad de esta bacteria, *H.pylori* posee varios mecanismos que le permiten colonizar la mucosa gástrica, entre ellos se encuentran los siguientes:

2.5.1 Características estructurales.

a) Forma y movimiento: Una de las características que le confieren a *H.pylori* la capacidad de colonizar la mucosa gástrica, es su forma, similar a la de un sacacorchos; además es una bacteria muy flexible, y esto le permite moverse rápidamente en medios viscosos, por lo cual penetra fácilmente la capa de moco que recubre al epitelio gástrico (3,28).

b) Presencia de glicocálix: *H.pylori* posee una capa proteica que recubre a la bacteria, y se disocia de la superficie bacteriana en condiciones ácidas, facilitando la penetración del microorganismo en el moco, además de que promueve la adherencia (23).

2.5.2 Actividad Enzimática.

a) Ureasa: *Helicobacter pylori*, produce una ureasa, que es una proteína de peso molecular elevado (aproximadamente 510 KDA), cuyo sustrato es la urea, y al hidrolizarla produce amoníaco y CO₂. Se han observado dos efectos, por medio de los cuáles la ureasa puede estar involucrada en la patogénesis de *H.pylori*: Se postula que la liberación de amoníaco forma una capa, que cubre a la bacteria y la protege del efecto bactericida del ácido gástrico; además la acumulación de amoníaco causa vacuolización en las células gástricas epiteliales (14,26)

En cultivos in vitro, se ha demostrado que la ureasa es directamente citotóxica, y produce vacuolización en las células (14,17,30).

b) Mucinasas: *H.pylori*, produce una proteasa extracelular, cuya acción es degradar los polímeros presentes en el moco, por lo que la mucina pierde su estructura, adquiere una consistencia líquida, y permite la penetración del microorganismo. La actividad óptima de la enzima se obtiene a un pH de 7.0, y a una temperatura de 37°C (15,38)

c) Superóxido dismutasa: Esta enzima, confiere a la bacteria, resistencia contra los mecanismos de muerte oxidativa, que llevan a cabo macrófagos y neutrófilos (55).

d) Catalasa: La catalasa es una enzima que se encuentra presente en microorganismos aerobios y en algunos anaerobios aerotolerantes. *H.pylori* produce una catalasa de 180 KDA de peso; la capacidad de esta enzima para desdoblar el peróxido de hidrógeno, puede ser una ventaja para *H.pylori* cuando coloniza la mucosa gástrica, ya que durante la colonización primaria, *H.pylori* induce una infiltración de leucocitos polimorfonucleares, y estas células liberan peróxido de hidrógeno que es un producto tóxico para las bacterias como parte de su respuesta antibacteriana, el hecho de que *H.pylori* posea una catalasa muy activa le confiere la capacidad de destruir rápidamente este producto, y es uno de los mecanismos por los cuales

puede sobrevivir en el medio gástrico (27,39).

e) Hemolisina: Wetheral y Johnson, describieron la existencia de una hemolisina presente en algunas cepas de *H.pylori*. Se ha demostrado que puede lisar eritrocitos de humano, caballo, conejo, y carnero; y no se ha asociado con actividad ureolítica (15).

f) Hemaglutininas: Algunas cepas de *H.pylori*, comúnmente expresan dos o más hemaglutininas, que le confieren la capacidad de aglutinar eritrocitos de diferentes especies. Se ha demostrado que algunos sialoglicoconjugados, son inhibidores de la actividad de esta enzima (7).

2.5.3 Citotoxina.

Leunk y cols, han descrito una citotoxina, presente en los sobrenadantes de cultivos en caldo, que es capaz de producir vacuolización de las células in vitro (14).

Esta citotoxina, es una proteína lábil al calor, con un peso molecular de 10^5 KDA, y su actividad puede ser neutralizada con antisueros específicos.

El papel de esta citotoxina, no se encuentra aún bien esclarecido, ya que algunos autores han atribuido el efecto vacuolizante que se observa en los cultivos in vitro de *H.pylori* a la ureasa, más que a la citotoxina (14).

2.5.4 Adherencia.

La adherencia del microorganismo a las células del hospedero, es el primer evento que inicia la relación huésped-parásito, por lo que se le ha llegado a considerar un factor de suma importancia en la patogénesis de muchas enfermedades. La adherencia a las superficies

mucosas, se lleva a cabo por medio de una interacción entre las estructuras adhesivas de la superficie del microorganismo (Adhesinas) y los sitios adhesivos de la superficie de las células (Receptores) (1).

En general, los componentes bacterianos que se encuentran involucrados en la adherencia, son los flagelos, pili, fimbrias, y cápsulas; mientras que los receptores en la célula hospedera, generalmente, son porciones de carbohidratos (1).

Se ha demostrado que *H. pylori*, se adhiere a la superficie de las células secretoras de moco in vivo, y diversos autores han utilizado diferentes líneas celulares para el estudio de la adherencia in vitro.

Evans y cols, demostraron que *H. pylori* se adhiere a la línea celular Y-1, que es una línea aislada de células adrenales de ratón, obtuvieron un índice de adherencia del 47%, y encontraron que la adherencia era inhibida por la fetuína, como se verá más adelante (20).

Neman y Megraud, trabajaron con diversas líneas celulares, y encontraron que en las líneas celulares HEP-2 (aislada de carcinoma de laringe) e INT-407 (Aislada de intestino de feto humano), el grado de adherencia fue del 68% y del 46%, respectivamente, mientras que que en otras líneas como la HGT1 y la AG2791 (Aisladas de células endoteliales y de carcinoma fúndico respectivamente), obtuvieron un índice de adherencia menor al 10% (45).

Leunk y Rosenau, estudiaron la adherencia de *H. pylori* a células HeLa (Aislada de carcinoma de cérvix), encontrando que también se adhiere en un gran porcentaje, mientras que Dunn y cols, utilizaron la línea celular KATO-III (Aislada de carcinoma gástrico), obteniendo también buenos resultados (18,34,49).

Resumiendo todos estos estudios, se ha encontrado que *H. pylori* se adhiere in vitro, a líneas celulares gástricas, no gástricas, humanas, y no humanas, con excepción de las MDCK y la línea celular CHO (Aisladas de riñón de canino, y de ovario de hamster chino,

respectivamente) (34, 40, 57).

La observación en microscopio electrónico muestra, que cuando *H. pylori* se encuentra asociado a las células epiteliales, provoca pérdida de las microvellosidades celulares, y aplanamiento de la membrana plasmática, lo que le confiere una apariencia deforme a la célula. También existe degradación de los gránulos de mucina, y pérdida del citoplasma; las células adquieren un aspecto cuboide, y muestran un incremento en el radio del núcleo citoplasmático. Cuando los organismos se encuentran entre las células, se observa edema intracelular, vacuolización y acumulación de lisosomas (29).

En base a las apariencias morfológicas, se han definido tres categorías de sitios de adhesión para *H. pylori* :

a) La adhesión "pedestal", dónde las células epiteliales forman una especie de meseta, donde el microorganismo se encuentra unido, y de la que existen evidencias in vitro.

b) La adhesión en sitios de depresión, dónde el microorganismo se encuentra inmerso en la superficie epitelial.

c) La adhesión ligada, dónde existe pérdida de las microvellosidades, y el contorno de la célula epitelial se encuentra deformado, en el punto de contacto con el organismo.

El 67% de las cepas de *H. pylori*, forman adherencia ligada, las depresiones y los pedestales son menos frecuentes (17 y 16%, respectivamente) (29).

Se conoce muy poco acerca de cuáles son los mecanismos por medio de los cuáles *H. pylori* se adhiere a las células, pero se han postulado algunas posibles adhesinas y receptores que median la adherencia de este microorganismo a las células epiteliales.

Evans y cols, reportaron que *H. pylori* expresa una hemaglutinina fibrilar que media su adherencia a los eritrocitos, esta hemaglutinina tiene afinidad por residuos de carbohidratos específicos, que se expresan en la superficie de los eritrocitos. También encontraron que la fetuína, que es una sialoglico-proteína, rica en N-acetilneuraminil-lactosa, bloquea la

adherencia de *H.pylori* a las células epiteliales, por lo que se cree, que ésta es un posible receptor para *H.pylori* (20).

Doig y cols, identificaron un pili presente en la superficie de diez cepas de *H.pylori*, y encontraron que éste se encuentra fuertemente asociado con la superficie de las células. Por microscopia electrónica, se ha demostrado que este pili tiende a formar bloques o agregaciones, y es más flexible que la mayoría de los pilis; su naturaleza es proteica, y reacciona con anticuerpos elaborados a partir de pilis purificados, también reacciona con proteínas de *H.pylori*, pero no con proteínas de *H.mustelae*, o de *C.jejuni*.

Evidencias preliminares indican que este pili es codificado cromosomalmente, y que se adhiere a eritrocitos humanos, y a células epiteliales bucales humanas, por lo que se cree que puede representar un candidato para elaborar una vacuna capaz de prevenir la colonización del huésped por *H.pylori* (16).

Lingwood y cols, demostraron que *H.pylori* se une específicamente a un glicerolípido, que es un receptor presente en el estómago humano, y fue identificado como una forma de fosfolípid-etanolamina (PE), la asociación de *H.pylori* a este receptor está fuertemente influenciada por la presencia de cationes divalentes (8).

También se ha demostrado que la adherencia a las superficies mucosas, puede ser mediada por mecanismos no específicos, como son la carga y la hidrofobicidad; al respecto, aún no se encuentra bien determinado si *H.pylori* es una bacteria hidrofílica o hidrofóbica, y se cree que tiene una carga aniónica (51).

Debido a que la adherencia a las superficies mucosas es el primer paso en la patogénesis de muchas enfermedades, se han propuesto diversos métodos para bloquear la adhesión de los microorganismos a la célula huésped, como una medida para la prevención de la enfermedad. Entre los métodos que se han postulado para inhibir la adherencia, se encuentran:

a) La aplicación de receptores análogos, como inhibidores competitivos de la adherencia bacteriana.

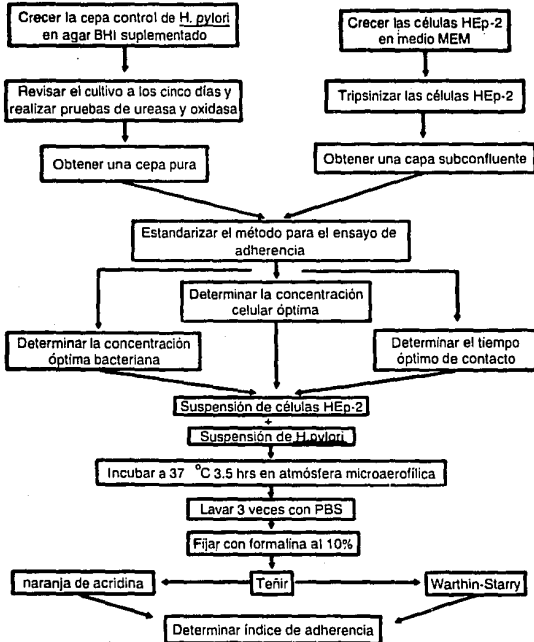
b) La administración de ciertas drogas que supriman la formación o la expresión de las adhesinas bacterianas, por ejemplo, la administración de dosis subletales de antibióticos.

c) La aplicación de vacunas elaboradas a partir de adhesinas bacterianas purificadas, que induzcan la formación de anticuerpos contra el microorganismo, y prevengan la adhesión de éste (1).

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 DIAGRAMA EXPERIMENTAL



3.2 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

3.2.1 Material biológico.

- Cepa CCUG15818 de *Helicobacter pylori*, obtenida de biopsia de mucosa gástrica
- Células HEp-2

3.2.2 Material de laboratorio.

- Botellas para cultivo de tejidos
- Cajas de Petri de 15 X 100 mm
- Cámara de Neubauer
- Filtros Millipore de 0.22µm de poro
- Jarra para atmósfera microaerofílica
- Jeringa hipodérmica de 50 ml
- Jeringas de insulina
- Jeringas de 10 y 20 ml; agujas calibre 18 y 21
- Matraz aforado de 2 lt
- Microcámaras para cultivo de tejidos
- Pipetas Pasteur
- Pipetas serológicas de 1, 5, y 10 ml
- Portaobjetos
- Probetas de 100 ml
- Tanque con mezcla de gases
- Termómetro
- Tubos de 13 x 100 mm, y de 10x 150 mm
- Vasos de precipitado de 100, 250, y 500 ml
- Viales de 2 ml

3.2.3 Reactivos y Soluciones.

<u>Reactivo</u>	<u>Grado Reactivo</u>	<u>Marca</u>
- Acetato de Sodio.	(ACS)	(Baker analyzed reactivo)
- Acido cítrico.	(ACS)	(Baker analyzed reactivo)
- Acido clorhídrico.	(Ultrex)	(Baker analyzed reactivo)
- Acido Etilendiaminetetracético	(R.A)	(Sigma)
- Acido Sulfúrico.	(ACS)	(Baker analyzed reactivo)
- Anfotericina B (Anfostat).		(Laboratorios Squibb)
- Azul de tripano.		(Sigma)
- Bicarbonato de Sodio.	(ACS)	(Baker analyzed reactivo)
- Cloruro de Sodio.	(QP)	(Baker analyzed reactivo)
- Cloruro de bario.	(ACS)	(Baker analyzed reactivo)
- Etanol.	(QP)	(Baker analyzed reactivo)
- Formaldehido.	(QP)	(Baker analyzed reactivo)
- Fosfato dibásico de potasio.	(ACS)	(Baker analyzed reactivo)
- Fosfato dibásico de sodio anhidro.	(ACS)	(Baker analyzed reactivo)
- Fosfato monobásico de potasio .	(ACS)	(Baker analyzed reactivo)
- Fosfato monobásico de sodio.	(ACS)	(Baker analyzed reactivo)
- Gelatina bacteriológica.	(RA)	(Bio-Rad)
- Naranja de acridina.	(RA)	(Kodak)
- Nitrato de Plata.	(RA)	(Kodak)
- Polienriquecimiento.		(Bioxon)
- Solución balanceada de Hanks (10X).		(Microlab)
- Suero de ternera		
- Tripsina.	(RA)	(Difco)
- Urea.		(Diagnóstica Merck)
- Vancomicina (Vancocin cp).		(Laboratorios Eli-Lily)
- Xileno.	(ACS)	(Baker analyzed reactivo)

• **Grados de calidad de los reactivos utilizados.**

- 1) Grado ultrex: reactivo ultrapuro
- 2) R.A: Reactivo analítico
- 3) Q.P: Reactivo químicamente puro
- 4) ACS: Productos que cumplen con las especificaciones que vienen en el "Reagents chemicals" de la sociedad de Química americana.

3.2.4 Medios de cultivo

- Agar-Agar (Bioxon).
- Agar BHI (Bioxon).
- Caldo Rojo de fenol y dextrosa (Bioxon).
- Medio MEM (Basal Medium Eagle) (Sigma).

3.2.5 Equipo

- Campana de flujo laminar (Veco S.A).
- Campana de seguridad biológica (Veco S.A).
- Espectrofotómetro (Gilford Instruments 250).
- Incubadora a 37°C (Precision gravity).
- Lámpara de fluorescencia (Zeiss).
- Microscopio de luz (Zeiss Axioskop).
- Microscopio invertido (Swift Instruments International).

3.3 Preparación de Soluciones

- 1) Preparación del Nefelómetro de Mac.Farland

Los tubos del Nefelómetro se preparan con soluciones de cloruro de bario y ácido sulfúrico

al 1 %, en las siguientes cantidades:

Tubo	BaCl ₂ al 1%	H ₂ SO ₄ al 1 %	Número aprox.de bacterias/ml
1	0.1	9.9	3x10 ⁸
2	0.2	9.8	6x10 ⁸
3	0.3	9.7	9x10 ⁸
4	0.4	9.6	1.2x10 ⁹
5	0.5	9.5	1.5x10 ⁹
6	0.6	9.4	1.8x10 ⁹
7	0.7	9.3	2.1x10 ¹⁰
8	0.8	9.2	2.4x10 ¹⁰
9	0.9	9.1	2.7x10 ¹⁰
10	1.0	9.0	3.0x10 ¹⁰

2) Medio BHI. para el cultivo de *H.pylori*.

Infusión BHI 11.1 g

Agar-agar 3.6 g

Sangre de caballo 21 ml

Anfotericina B 8 mg

Vancomicina 0.0018 g

Polienukeamiento 3 ml

a) Disolver la infusión BHI y el agar-agar en 300 ml de agua destilada, hervir y esterilizar en

autoclave

- b) Agregar la anfotericina, la vancomicina y el polienriquecimiento, por último agregar la sangre rápidamente, y agitar para evitar que se formen coágulos.
- c) Vaciar en cajas de Petri

3) Medio MEM.

- a) Disolver un frasco de medio MEM de Sigma en un litro de agua desionizada
- b) Ajustar a pH de 7.0 con bicarbonato de sodio al 7.5 %
- c) Filtrar con filtro millipore de 0.22 μm de poro
- d) Agregar 100 μl de gentamicina por cada 100 ml de medio

4) Buffer de Fosfatos salinos (PBS).

Solución para cultivo celular.

Cloruro de sodio 8.5 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.3799 g

Na_2HPO_4 1.4196 g

- a) Disolver en un litro de agua desionizada
- b) Ajustar a un pH de 7.2 con NaOH 3 M
- c) Esterilizar en autoclave.

5) Solución de tripsina al 1% en PBS

- a) Filtrar con filtro millipore

6) Solución de EDTA al 0.03 % en PBS

- a) Esterilizar en autoclave

7) Solución de tripsina/ EDTA

- a) A 100 ml de EDTA al 0.03% agregar 2.7 ml de tripsina al 1 %

8) Solución de bicarbonato de sodio.

a) Preparar al 7.5 % en agua bidestilada

b) Esterilizar en autoclave

9) Urea de Christensen

Caldo rojo de fenol 1.5 g

Urea 2.0 g

Glucosa 0.19 g

Agua 100 ml

Disolver en 100 ml de agua desionizada y ajustar a un pH de 6.8 a 7.2 con NaOH 3M.

10) Solución balanceada de Hanks

Disolver 10 ml de solución balanceada de Hanks de Microlab en 90 ml de PBS estéril para preparar 100 ml.

11) Reactivos para la tinción de Warthin-Starry.

a) Agua acidulada: acidular un litro de agua desionizada con una solución débil de ácido cítrico, para obtener una solución con un pH de 3.8 a 4.4.

b) Solución de Nitrato de plata al 1% para impregnación: disolver 1 gramo de nitrato de plata en 100 ml de agua acidulada.

c) Solución de nitrato de plata al 2%: disolver 2 gramos de nitrato de plata en 100 ml de agua acidulada.

d) Solución de gelatina al 5% : disolver 10 gramos de gelatina en 200 ml de agua acidulada.

e) Solución de hidroquinona al 0.15% : disolver 0.15 g de hidroquinona en 100 ml de agua acidulada.

• Las soluciones (c), (d), y (e), se utilizan como revelador, deben prepararse en el momento en que van a ser utilizadas, y se mezclan con agitación.

12) Reactivos para la tinción con naranja de acridina.

a) Buffer de acetatos: agregar 100 ml de acetato de sodio 1M a 160 ml de HCl 1M. Ajustar a un pH de 3.0 con HCl concentrado. A esta solución, agregar 20 mg de polvo de naranja de

acridina, para preparar el reactivo de tinción.

13) Solución de formalina al 10%.

Disolver 10 ml de formaldehído en 90 ml de PBS.

14) Azul de tripano.

Preparar al 0.05% en PBS.

3.4 METODOLOGIA.

3.4.1 Crecimiento de la bacteria.

a) Descongelar la cepa mantenida en polietilenglicol, y sembrarla en medio BHI suplementado.

b) Incubar a 37°C en ambiente microaerofílico, durante 3-7 días.

c) Realizar pruebas de ureasa y oxidasa, y tinción de Gram, para observar la morfología típica de la bacteria.

3.4.2 Investigación de los factores que afectan la adherencia de *H. pylori*.

1) Investigación de la concentración óptima de células HEP-2.

a) Crecer las células en botellas para cultivo de tejidos de 75 cm², conteniendo 20 ml de medio mínimo esencial (MEM), suplementado con 10% de suero de ternera, 0.2% de bicarbonato de sodio y 1 µg de gentamicina.

b) Incubar a 37°C, en atmósfera con 10% de CO₂, hasta obtener una monocapa confluyente.

c) Tripsinizar una botella con crecimiento celular confluyente, con una solución de

tripsina 1:40 en EDTA, incubar a 37°C por 1 minuto para desprender las células.

d) Resuspender las células desprendidas en 1 ml de medio de crecimiento.

e) Ajustar a concentraciones de 5×10^4 a 2×10^5 cels viables/ml/pozo, por el método de exclusión con azul de tripano, en cámara de Neubauer, contando los cuadrantes externos, y aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Células/ml} = \frac{\text{Promedio de células x dilución empleada x factor de la cámara contadas} \quad (10) \quad (10000)}{\text{Número de células decaídas}}$$

2) Investigación de la concentración bacteriana óptima.

Realizar suspensiones de la bacteria en medio MEM sin antibiótico, ajustar concentraciones desde 3×10^7 hasta 1.2×10^9 UFC/ml, por medio del nefelómetro de Mac Farland.

3) Investigación del tiempo óptimo de contacto.

Mantener en contacto a la bacteria con las células HEp-2, a diferentes tiempos, de 2, 3.5, y 5 hrs, para determinar cuál es el óptimo.

3.4.3 Metodología utilizada para el estudio de la adherencia de *H. pylori* a células HEp-2.

- Colocar en microplacas de 400µl de capacidad, una suspensión celular ajustada a una concentración óptima, incubar a 37°C, en atmósfera de CO₂ por 24 hrs
- Lavar las células 3 veces con solución balanceada de Hanks.

- c) Adicionar 100 μ l de una suspensión de *H.pylori* ajustada a una concentración óptima, incubar a diferentes tiempos a 37°C en atmósfera microaerofílica.
- d) Lavar 3 veces con PBS.
- e) Fijar con formalina al 10% de 1-10 hrs.
- f) Teñir con tinción de Warthin-Starry y de Naranja de acridina.
- g) Retirar los soportes de cultivo celular, para la búsqueda de adherencia bacteriana. Observar al microscopio con el objetivo de inmersión.
- h) La lectura se realiza contando el número de bacterias adheridas en 100 células elegidas al azar.

3.4.4 Metodología para la tinción de Warthin-Starry.

- a) Pasar el portaobjetos a través de xileno, alcohol, y agua (2 veces).
 - b) Colocar en la solución de nitrato de plata al 1% a 43°C por 30 min. en baño María
 - c) Cubrir con el revelador, y dejar hasta observar una coloración café o amarilla.
 - d) Enjuagar rápida y totalmente con agua tibia.
 - e) Pasar por agua, alcohol, y xileno.
- * Las bacterias se observan negras en un fondo amarillo.

3.4.5 Metodología para la tinción con naranja de acridina.

- a) Pasar el frotis por agua.
 - b) Teñir con el reactivo por 5 minutos.
 - c) Enjuagar con agua.
 - d) Secar al aire.
 - e) Pasar por xileno, y observar.
- * La bacterias se observan con fluorescencia naranja, las células se observan de color verde.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1 Resultados.

Para la estandarización de la metodología, cada ensayo fue realizado tres veces, valorándose cada uno de ellos con las tinciones de naranja de acridina y de Warthin-Starry. Los resultados que se presentan a continuación, son el promedio de los valores obtenidos en tres ensayos, y se detallan en las siguientes tablas y figuras:

El primer parámetro que se determinó fue la concentración óptima de células HEp-2 para llevar a cabo el ensayo de adherencia; esta determinación se basó en la búsqueda de una capa celular subconfluyente, ya que una capa subconfluyente presenta la ventaja de que existen espacios entre las células, y esto permite realizar un conteo adecuado de las bacterias adheridas, cosa que sería imposible en una capa confluyente, ya que en ésta no existe un espacio delimitado entre célula y célula. La tabla I, muestra que con una concentración de 2.0×10^5 células viables/ml en cada pozo de 400 μ l de capacidad, se obtiene una capa con un 85% de subconfluencia a las 18 hrs de incubación; también se puede observar que a concentraciones celulares menores, el porcentaje de subconfluencia es menor, por lo que no se consideraron apropiadas para realizar el ensayo de adherencia.

El segundo paso que se determinó, fue la concentración óptima de bacterias para realizar el ensayo; se probaron concentraciones desde 3×10^7 UFC/ml hasta 1.2×10^9 UFC/ml. En la tabla II se puede observar que a una concentración de 9×10^8 UFC/ml, se obtiene un 84% de células con más de veinte bacterias adheridas (Valorado por la tinción de Warthin-Starry); mientras que en la tabla III se puede observar, que cuando el ensayo fue valorado con la tinción de naranja de acridina, a la misma concentración bacteriana (9×10^8 UFC/ml) se obtuvo un 69% de células con más de veinte bacterias adheridas. Las gráficas 1 y 2, muestran el efecto de la concentración bacteriana en el índice de adherencia, y se puede observar que conforme se aumenta la concentración de bacterias aumenta el índice de adherencia; sin embargo, cuando la concentración bacteriana se aumentó hasta 1.2×10^9 UFC/ml, se observó

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

destrucción celular y fue imposible evaluar adherencia.

El tercer parámetro que se determinó, fue el tiempo óptimo de contacto entre la bacteria y las células, para esto, se probaron tiempos de 2, 3.5, y 5 hrs de incubación. En la tabla IV se puede apreciar que a un tiempo de 3.5 hrs, se obtuvo un 75% de células con más de veinte bacterias adheridas al valorar el ensayo con la tinción de Warthin-Starry; mientras que en la tabla V, se muestra, que al valorar el ensayo con la tinción de naranja de acridina, al mismo tiempo (3.5 hrs), se obtiene un porcentaje del 68% de células con más de veinte bacterias adheridas. En las gráficas 3 y 4, se muestra el efecto del tiempo de contacto en el índice de adherencia, y se puede observar que a las 3.5 hrs de contacto se obtiene el mayor número de bacterias adheridas, ya que a un tiempo de 2 hrs el número de bacterias adheridas es menor, y a las 5 hrs el porcentaje de células con más de veinte bacterias adheridas decrece.

Una vez estandarizado el ensayo, se procedió a determinar el índice de adherencia de la cepa CCUG 15818 de *H. pylori* a la línea celular HEP-2, bajo condiciones óptimas; como se puede observar en la tabla VI, cuando el ensayo fue valorado por la tinción de Warthin-Starry, se obtuvo un índice de adherencia del 80% de células con más de veinte bacterias adheridas, mientras que cuando se valoró con naranja de acridina, se obtuvo un índice del 69% de células con más de veinte bacterias adheridas. En la gráfica 5 se muestran las diferencias en el índice de adherencia al valorar el ensayo con ambas tinciones.

En la observación al microscopio, se pudo constatar que las células presentaban modificaciones en su estructura, tales como vacuolización, y pérdida del citoplasma, lo que le confiere a la célula una apariencia redondeada, estas modificaciones pudieron apreciarse mejor con la tinción de naranja de acridina, que con la tinción de Warthin-Starry.

Otra observación importante fue que las bacterias siempre se encontraron en un patrón de adherencia difuso, es decir adheridas alrededor de toda la superficie celular, y esto pudo visualizarse con ambas tinciones.

Al valorar el ensayo con las dos diferentes tinciones, se pudo observar, que aunque con la tinción de Warthin-Starry se cuantifica un mayor número de bacterias, la tinción de naranja de acridina ofrece una mejor visualización de la adherencia, ya que permite un mayor contraste entre las estructuras celulares y la bacteria.

TABLA I

**INVESTIGACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE CELULAS HEP-2
PARA OBTENER UNA CAPA SUBCONFLUENTE**

CELULAS VIABLES/ml	5×10^4	1.0×10^5	1.5×10^5	2.0×10^5
PORCENTAJE DE SUBCONFLUENCIA*	20%	35%	50%	85%

(*) = Observación a las 18 hrs de incubación.

TABLA II

EFFECTO DE LA CONCENTRACION BACTERIANA EN EL ENSAYO DE ADHERENCIA DE LA CEPA CCUG 15818 DE *H.pylori* A LA LINEA CELULAR HEP-2. VALORADO POR LA TINCION DE WARTHIN-STARRY

CONCENTRACION BACTERIANA UFC/ml*	PORCENTAJE DE CELULAS HEP-2 CON BACTERIAS ADHERIDAS Y NUMERO DE BACTERIAS POR CELULA			
	0	1-10	11-20	> 20
3×10^7	63	28	9	0
3×10^8	30	20	24	26
6×10^8	10	13	15	72
9×10^8	0	8	8	84
1.2×10^9	DC	DC	DC	DC

DC = Destrucción celular.

* UFC/ml = Unidades formadoras de colonia por mililitro.

Los valores presentados son el promedio de los resultados obtenidos en tres ensayos.

GRAFICA 1. EFECTO DE LA CONCENTRACION BACTERIANA EN EL ENSAYO DE ADHERENCIA DE *H.pylori* A LA LINEA CELULAR HEP-2

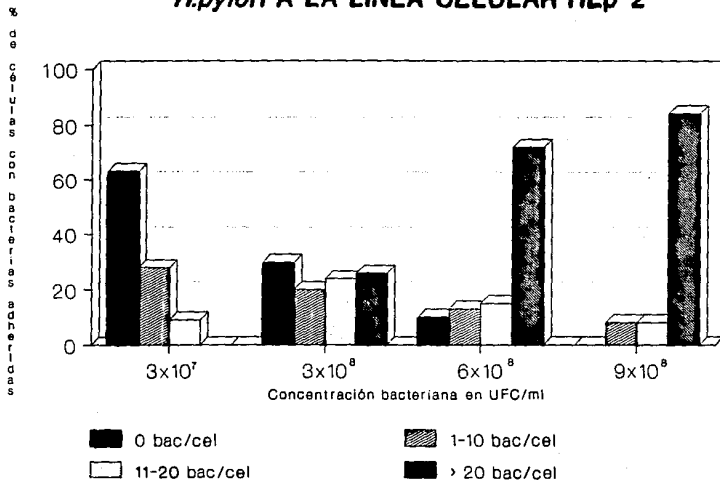


TABLA III

EFFECTO DE LA CONCENTRACION BACTERIANA EN EL ENSAYO DE ADHERENCIA DE LA CEPA CCUG 15818 DE *H.pylori* A LA LINEA CELULAR HEP-2. VALORADO POR LA TINCION DE NARANJA DE ACRIDINA

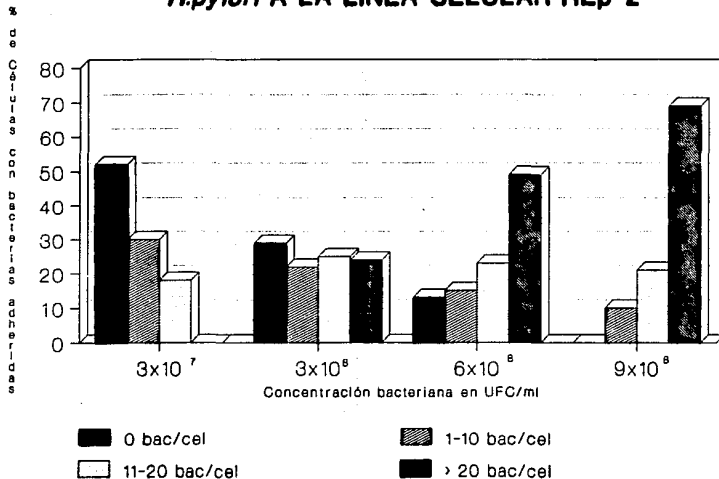
CONCENTRACION BACTERIANA UFC/ml*	PORCENTAJE DE CELULAS HEP-2 CON BACTERIAS ADHERIDAS Y NUMERO DE BACTERIAS POR CELULA			
	0	1-10	11-20	> 20
3×10^7	52	30	18	0
3×10^8	29	22	25	24
6×10^8	13	15	23	49
9×10^8	0	10	21	69
1.2×10^9	DC	DC	DC	DC

DC = Destrucción celular.

* UFC/ml = Unidades formadoras de colonia por mililitro.

Los valores presentados son el promedio los resultados obtenidos en tres ensayos.

GRAFICA 2. EFECTO DE LA CONCENTRACION BACTERIANA EN EL ENSAYO DE ADHERENCIA DE *H.pylori* A LA LINEA CELULAR HEP-2



TINGION CON NARANJA DE ACRIDINA

TABLA IV

**EFEECTO DEL TIEMPO DE CONTACTO EN EL ENSAYO DE ADHERENCIA DE
LA CEPA CCUG 15818 DE *H.pylori* A LA LINEA CELULAR HEp-2.
VALORADO POR LA TINCION DE WARTHIN-STARRY**

TIEMPO DE CONTACTO ENTRE LA CEPA Y LAS CELULAS	PORCENTAJE DE CELULAS HEp-2 CON BACTERIAS ADHERIDAS Y NUMERO DE BACTERIAS POR CELULA			
	0	1-10	11-20	> 20
2 Hrs	22	18	12	48
3.5 Hrs	5	5	10	75
5 Hrs	3	24	10	63

Los valores presentados son el promedio de los resultados obtenidos en tres ensayos.

**GRAFICA 3. EFECTO DEL TIEMPO DE CONTACTO
EN EL ENSAYO DE ADHERENCIA DE *H.pylori*
A LA LINEA CELULAR HEP-2**

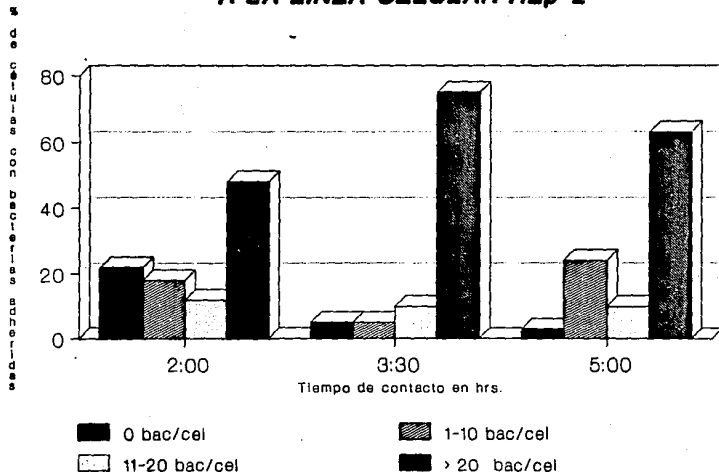


TABLA V

EFEECTO DEL TIEMPO DE CONTACTO EN EL ENSAYO DE ADHERENCIA DE *H. pylori* A LA LINEA CELULAR HEp-2. VALORADO POR LA TINCION DE NARANJA DE ACRIDINA.

TIEMPO DE CONTACTO ENTRE LA CEPA Y LAS CELULAS	PORCENTAJE DE CELULAS HEp-2 CON BACTERIAS ADHERIDAS Y NUMERO DE BACTERIAS POR CELULA			
	0	1-10	11-20	> 20
2 Hrs	28	22	15	35
3.5 Hrs	10	11	11	68
5 Hrs	2	30	14	54

Los valores presentados son el promedio de los resultados obtenidos en tres ensayos.

**GRAFICA 4.EFECTO DEL TIEMPO DE CONTACTO
EN EL ENSAYO DE ADHERENCIA DE *H.pylori*
A LA LINEA CELULAR HEP-2**

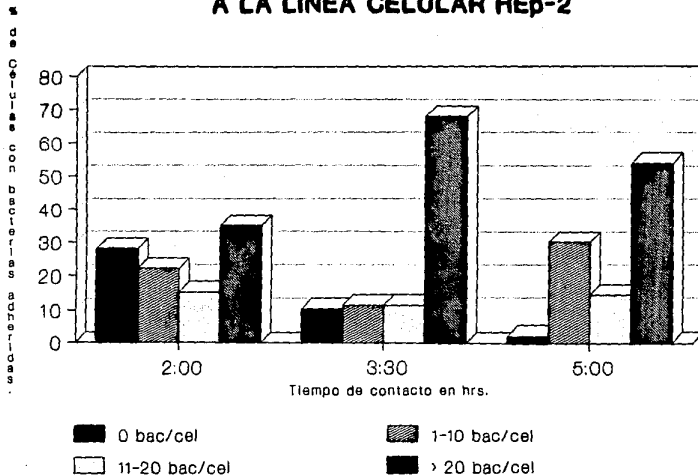


TABLA VI**INDICE DE ADHERENCIA DE LA CEPA CCUG 15818 de *Helicobacter pylori* A LA LINEA CELULAR HEP-2.**

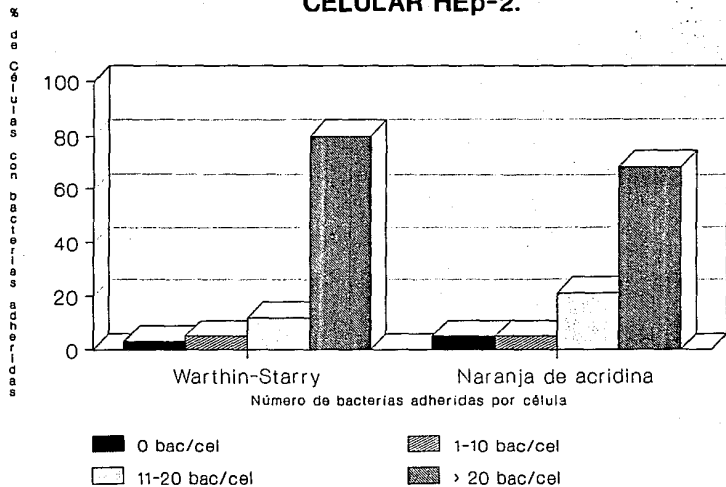
NUMERO DE BACTERIAS POR CELULA	PORCENTAJE DE CELULAS HEP-2 CON BACTERIAS ADHERIDAS	
	Estimación por tinción de Warthin-Starry	Estimación por tinción con naranja de acridina
0	3	5
1-10	5	5
11-20	12	21
> 20	80	69

Concentración celular de 2×10^5 cels.viables/ml.

Concentración bacteriana de 9×10^8 UFC/ml.

Tiempo de contacto de 3.5 hrs.

**GRAFICA 5. INDICE DE ADHERENCIA DE LA
CEPA CCUG 15818 DE *H.pylori* A LA LINEA
CELULAR HEP-2.**



4.2 Discusión

En la actualidad aún se desconoce mucho sobre los mecanismos de patogenicidad de *H.pylori*; sin embargo, se ha observado que esta bacteria se adhiere en gran cantidad a las células del epitelio gástrico, y que causa lesiones histopatológicas en las mismas; por lo que se ha propuesto que esta capacidad de adherencia está involucrada en la patogenicidad de *H.pylori* (3,8).

En el extranjero, ya existen reportes de algunos autores que han manejado diversas líneas celulares (HEp-2, HeLa, KATO III) para establecer modelos in vitro, que permitan reproducir de alguna manera las situaciones observadas in vivo; y se ha demostrado que *H.pylori* se adhiere a líneas celulares gástricas, no gástricas, humanas y no humanas, lo que probablemente se deba a que en estas líneas existe un receptor común para *H.pylori* (20,43).

En México no existen aún datos reportados sobre la capacidad de adherencia in vitro de esta bacteria, por lo que uno de los principales objetivos fue la estandarización de un modelo in vitro que permitiera estudiar dicha propiedad.

En el presente estudio, la línea celular HEp-2 fue seleccionada para la estandarización del modelo in vitro; esta selección se basó en criterios de disponibilidad, facilidad y experiencia en el manejo de la línea celular, además que resiste aproximadamente 350 pases, cambios nutricionales, ambientales, y de temperatura sin perder su viabilidad y características; incluso ya se ha reportado que esta línea celular constituye uno de los mejores modelos para el estudio de la adherencia in vitro de *H.pylori* (45,59).

Como ya se había mencionado anteriormente, toda la estandarización del método fue valorada con dos tipos de tinciones: la tinción de plata modificación de Warthin-Starry, que había sido considerada como la tinción más apropiada para *H.pylori*, y la tinción con naranja de acridina, que implica el uso de fluorescencia.

Esto se llevó a cabo, porque al realizar el conteo de bacterias adheridas por medio de la tinción de Warthin-Starry, surgieron algunos problemas que impedían una correcta cuantificación de las bacterias; es por eso, que se decidió probar otra tinción que no presentara este inconveniente, que ofreciera un mayor contraste entre célula y bacteria, y facilitara la cuantificación de las mismas.

En la práctica se pudo observar, que con la tinción de Warthin-Starry se tiene la ventaja de que la bacteria se aprecia con un tamaño mayor al que tiene en realidad, lo que facilita la cuantificación de las mismas, pero se presentaron varias desventajas, como la formación de precipitaciones del colorante que se confundían con acúmulos de bacterias e impedían muchas veces una correcta cuantificación bacteriana, además de que es una tinción costosa y que involucra mucho tiempo. La tinción con naranja de acridina permite una mejor cuantificación de las bacterias adheridas, y una mejor visualización de la adherencia, ya que ofrece un mayor contraste entre célula y bacteria; presenta las ventajas de ser una tinción de costo accesible, y fácil de realizar en poco tiempo, pero presenta la desventaja de que es una tinción que sólo puede aplicarse cuando se tiene un microscopio con fuente de luz ultravioleta. Debe mencionarse que ninguna de las dos tinciones es específica para *H. pylori*, ya que ambas tiñen otros microorganismos.

En las tablas de resultados se puede observar, que con la tinción de Warthin-Starry se observa mayor número de bacterias adheridas que con la tinción de naranja de acridina, sin embargo, debido a la razón mencionada anteriormente, pudieron haberse contado falsas positivas, es decir, precipitados del colorante que fueron tomados como acúmulos de bacterias; mientras que con la tinción de naranja de acridina se cuantificó un menor número de bacterias, pero que bajo un punto de vista personal, es una tinción más adecuada para observar adherencia.

En cuanto a resultados se refiere, se probaron diferentes concentraciones celulares y bacterianas, así como diferentes tiempos de contacto, para estandarizar la metodología.

En los resultados se observa, que una concentración celular de 2×10^5 células viables/ml es la óptima para obtener una capa subconfluente a las 18 hrs de incubación, ya que a concentraciones menores el porcentaje de subconfluencia fue menor.

La concentración bacteriana óptima fue de 9×10^8 UFC/ml, ya que a concentraciones menores, se observó un índice de adherencia relativamente bajo, y a concentraciones mayores se observó destrucción celular, además de que los acúmulos formados por un gran número de bacterias, impedían una observación apropiada de la adherencia.

El tiempo de contacto óptimo, fue de 3.5 hrs, ya que a las 2 hrs el índice de adherencia fue menor, y a las 5 hrs se observó un decremento en el mismo, y destrucción celular, esto probablemente se debe a que el fenómeno de adherencia es el evento inicial que sucede en la colonización de las células, y posteriormente comienzan a actuar otros mecanismos de patogenicidad propios de la bacteria (como la producción de ureasa y citotoxina) que destruyen a las células; es probable, que después del tiempo óptimo de contacto, el índice de bacterias adheridas disminuya, porque algunas de las bacterias han logrado penetrar en las células, aunque todavía no existen evidencias contundentes acerca de esto.

En promedio se obtuvo, un índice de adherencia del 80% de células con más de veinte bacterias adheridas (Valorado por la tinción de Warthin-Starry), y del 69% de células con más de veinte bacterias adheridas, cuando el ensayo fue valorado con la tinción de naranja de acridina.

Los resultados obtenidos, se acercan mucho a los reportados por Neman y cols. en 1988 que demostraron que una concentración de 3×10^8 UFC/ml y un tiempo de contacto de 3 hrs eran los parámetros óptimos para realizar el ensayo, valorando con la tinción de bisbenzimidazol, y reportaron un índice de adherencia del 68.8% de células con más de veinte bacterias adheridas; este resultado correlaciona con el índice de adherencia obtenido en nuestro estudio al valorarlo con la tinción de naranja de acridina (45).

Se han encontrado diferencias con los resultados obtenidos por otros autores, y esto probablemente se debe a que trabajaron con otras líneas celulares; Evans y cols, utilizaron células Y-1 y encontraron un índice de adherencia del 49%; Dunn y cols, realizaron el ensayo utilizando células Kato III, obteniendo un índice de adherencia del 28%. Neman, también trabajó con células INT-407, encontrando un índice de adherencia del 41%. Otras líneas celulares han sido trabajadas, pero los índices de adherencia reportados son aún menores. (18,20,45,47).

En la observación al microscopio, se pudo apreciar que las bacterias adheridas se encontraron en un patrón de adherencia difuso, es decir, adheridas alrededor de toda la superficie celular, y que las células que presentaban mayor número de bacterias adheridas mostraban anomalías en su estructura, como vacuolización y pérdida del citoplasma, lo que le confiere a la célula una apariencia redondeada.

Basándose en la observación de estos cambios morfológicos en las células, se puede decir que la adherencia a las células epiteliales es un factor importante en la patogénesis de *H.pylori*, y de acuerdo con los resultados obtenidos y comparándolos con los resultados reportados por autores que han trabajado otras líneas celulares, se puede concluir que la línea celular Hep-2 es un modelo adecuado para evaluar la capacidad de adherencia de *H.pylori*.

CAPITULO V

CONCLUSIONES.

- 1) La Línea celular HEP-2 es un modelo adecuado para evaluar la capacidad de adherencia de *H.pylori*, ya que los porcentajes de adherencia que se observan, son mayores que los reportados por autores que han trabajado otras líneas celulares.
- 2) La técnica estandarizada es accesible y de fácil manejo.
- 3) El porcentaje de células con más de 20 bacterias adheridas, fue superior al 50%, lo que indica que el microorganismo tiene una gran capacidad de adherirse a las células epiteliales.
- 4) La tinción con naranja de acridina ofrece ventajas sobre la tinción de Warthin-Starry, como la facilidad de manejo, menor costo, y permite una mejor apreciación de la adherencia.
- 5) Dado el alto porcentaje de adherencia de *H.pylori* a la línea celular, y que estas células presentan modificaciones morfológicas, se puede decir que la adherencia a las células epiteliales es un factor importante en la patogénesis de *H.pylori*.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Beachey Edwin H. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. The Journal of Infectious Diseases. 143; 3:325-345. 1981.
- (2) Blaser J. Martin. Gastric *Campylobacter like organisms*, gastritis, and peptic-ulcer disease. Gastroenterology. 93: 371-383. 1987.
- (3) Bode G; P.Malpertheiner; D.Chunnett. Pathogenetic implications of ultrastructural findings in *Campylobacter pylori* related gastroduodenal disease. Scand.J.Gastroenterology. 23 (Suppl 142) 25-39. 1988.
- (4) Bruce D; Hokey J.N; Waitkings A.S. Numerical classification and identification of *Campylobacter pylori* by DNA restriction endonuclease analysis. Abstracts of the IV international workshop on Campylobacter infections. Abst 208. 1987.
- (5) Buck G.E; Smith J.S. Medium supplementation for growth of *Campylobacter pyloridis*. J.Clin.Microbiol. 25: 597-599. 1989.
- (6) Burette A; C.de Prez; G.Glucpzynsky. Prevalence of gastric metaplasia and *C.pylori* infection in the duodenum and its relationship to infection. Gastroduodenal pathology and C.pylori. 1a. edición. Elsevier Science Publishers. Biomedical division. 1989.
- (7) Carlsson Asa; Levente Emody; Ljungh Asa. Carbohydrate receptor sepecificity of haemagglutinins of *C.pylori*. Gastroduodenal pathology and C.pylori. 1a. edición. Elsevier Science Publishers. Biomedical division. 1989.

- (8) Casselli Michel; Natale Figura. Patterns of physical modes of contact between *Campylobacter pylori* and gastric epithelium: Implications about the bacterial pathogenicity. The American Journal of Gastroenterology. 84; 5: 511-513. 1989.
- (9) Centeno Torres M. *Helicobacter pylori* prevalence in adults with gastritis. Abstracts of the VIth international workshop on Campylobacter, Helicobacter, and related organisms. Abst.S-114. Oct.1991.
- (10) Chen Xiao; Pelayo Correa; Johan Offerhauns. Ultrastructure of the gastric mucosa harboring *Campylobacter like organisms*. Am.J.Clin.Pathol. 86: 575-582. 1986.
- (11) Cheng Edward; Paul Remansky; Mark Silvers; Paul Valenstein; Hidenari Kawanishi. Prevalence of *C.pylori* in esophagitis, gastritis, and duodenal disease. Arch.Inter.Med. 149: 1373-1375. 1989.
- (12) Cohen H; Grambu M; Fitzgibons P; Appleman M; Skoglund M; Valenzuela M. *Campylobacter pylori*: association with antral and fundic mucosal histology and diagnosis by serology in patients with upper gastrointestinal symptoms. Am.J.Gastroenterol. 84: 367. 1989.
- (13) Coudron Phillippe; D.Kirby. Comparison of rapid urease tests, staining techniques, and growth on different solid media for detection of *Campylobacter pylori*. J.Clin.Microbiol. 27: 1527-1530. 1989.
- (14) Cover Timothy; Wonder puryear; Guillermo Pérez Pérez; Blaser Martin. Effect of urease on HeLa cell vacuolation induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin. Infection and Immunity. 59; 4: 1264-1270. 1991.
- (15) Dick James D. *Helicobacter (Campylobacter) pylori*: A new twists to an old disease. Annu.Rev.Microbiol. 44: 249-269. 1990.

(16) Doig Peter; John W.Austin; Trevor J.Trust. Identification and characterization of a conserved *H.pylori* pilus. The Vth International workshop on Campylobacter infections. Abst H3-4. Pag S-123. 1991.

(17) Duane T. Smoot; Harry L.T. Gwyn R; *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. Infection and Immunity. 58; 6: 1992-1994. 1990.

(18) Dunn Bruce; Magda Altmann; G.Campbell. Adherence of *Campylobacter pylori* to epithelial cells. Gastroduodenal pathology and C.pylori. 1a. edición. Elsevier Science Publishers. Biomedical division. pag 361-364. 1989.

(19) Ella Grace H; *Helicobacter pylori* in patients with nonulcer dyspepsia. Rev of Infectious Diseases. 13 (Suppl 8): S-696-699. 1991.

(20) Evans Dolores G; Doyle J.Evans; David Graham. Receptor mediated adherence of *Campylobacter pylori* to mouse γ -I adrenal cell monolayers. Infection and Immunity. 57; 8: 2272-2278. 1989.

(21) Geis G.Leying; H. Sverbaum; U.Offerhuck. Ultrastructure and chemical analysis of *Campylobacter pylori* flagella . J.Clin.Microbiol. 27; 3:436-441. 1989.

(22) Goodwin S; J.Amstrong; T.Chilvers; M.Peters; M.David Collins; Lindsay Sly; William Harper. Transfer of *C.pylori* and *C.mustelae* to *Helicobacter* gen.nov. as *Helicobacter pylori* comb.nov.and *Helicobacter mustelae* comb.nov. respectively. Int.J.Bacteriol 39: 4:397-405. 1989.

(23) Goodwin C.S; J.A. Armstrong; W.S. Harper. *C.pylori* has a glycocalyx which promotes adhesion and may be the site of action of bismuth. Vth International workshop of Campylobacter infections. pag 363. 1989.

- (24) Goodwin Stewart; Elizabeth Blincow; Graeme Peterson. Enzyme linked immunoabsorbent assay for *C.pyloridis* in the gastric mucosa. Journal of Infectious Diseases. 155; 3: 488-494. 1987.
- (25) Graham David J. *Campylobacter pyloridis* gastritis : the past, the present, and speculation about the future. The American Journal of Gastroenterology. 82: 4: 283-286. 1987.
- (26) Hawtin A; R Stacey; and D.G. Newell. Investigation of the structure and localization of the urease of *H.pylori* using monoclonal antibodies. Journal of General Microbiology. 136; 1995-2000. 1990.
- (27) Hazell S; D.J. Evans; Evans D.G; Graham D. *C.pylori* catalase: a putative virulence factor. Abstract of the Vth International workshop on Campylobacter infections. pag 367. 1989.
- (28) Hazell Stuart; Adrian Lee; Lynnette Brady; William Hennessy. *Campylobacter pyloridis* and gastritis. Association with intercellular spaces and adaptation to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium. Journal of Infectious Diseases. 153; 4: 658-663. 1986.
- (29) Hessey S.J; J. Spencer; J.E. Wyatt; G.Sobala; B.J. Rathbone; A.T Axon; M.Dixon. Bacterial adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. Gut. 31: 134-138. 1990.
- (30) Jia-Ke-Xu; Stewart Goodwin; M. Cooper; J.Robbinson. Intracellular vacuolization caused by the urease of *H.pylori*. Journal of Infectious Diseases. 161: 1302-1309. 1990.
- (31) Kronvall Goran; Erling M. Differential staining of bacteria in clinical specimens using acridine orange buffered at low pH. Acta Pathol.Microbiol.Scand. Sect B. 85: 249-254. 1987.

- (32) Lambert J.R; K.Dunn; M.Borromeo; J.Hansky. *Campylobacter pylori*, a role in non-ulcer dyspepsia?. Scand.J.Gastroenterol. 24(Suppl 160) 7-13. 1989.
- (33) Langdalebrown B; M. Baoani. Acridine orange fluorescence, *Campylobacter pylori* and chronic gastritis . Scand.J.Gastroenterol. 25: 127-133. 1990.
- (34) Leunk R.D; M.A. Ferguson; D.R. Morgan. *In vitro* adherence and hemagglutination by *C.pylori*. The Vth International workshop on Campylobacter infections. pag 359-360. 1989.
- (35) Leunk R.D; P.T.Johnson; B.C. David; W.G. Kraft; D.R. Morgan. Cytotoxic activity in broth culture filtrates of *C.pylori*. J. Med.Microbiol. 26:93-99. 1988.
- (36) Lingwood C.A; D.E Woods; H.C. Krivan. *Helicobacter pylori*: its lipids receptors and adhesin. The VIth International workshop on Campylobacter infections. Abst. H3-4. pag S-123. 1991.
- (37) Madan Elio; M.D. Judith Kemp; U.L.F. Westblom; M.D.Marc Subik; M.D. Sandra Sexton.M.L.T. Evaluation of Staining methods for identifying *Campylobacter pylori*. Am.J.Clin.Pathol. 90:450-453. 1988.
- (38) Maddocks A.C. *Helicobacter pylori* (Formerly *Campylobacter pylori*) 1986-1989: A review. J.Clin.Pathol. 43: 353-356. 1990.
- (39) McNulty Cam; Dent J.C. Rapid identification of *C.pylori* by performed enzymes. J.Clin.Microbiol. 25: 1683-1686. 1989.
- (40) Marshall Barry J. *Campylobacter pyloridis* and gastritis. The Journal of Infectious Diseases. 153; 4: 650-657. 1986.

- (41) Marshall B.J. The *Campylobacter pylori* story. Scand.J.Gastroenterol. 23(Suppl 146); 58-66. 1988.
- (42) Marshall B.J; G.S. Goodwin. Revised nomenclature of *C.pyloridis*. Int.J.Syst.Bacteriol. 37:68. 1987.
- (43) Marshall B.J; H.Royce; D.Annear. S.Goodwin; J.W. Pearman, J.R Warren; J.A. Armstrong. Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa. Microbios lett. 25: 83-88. 1984.
- (44) Marshall B.J; Robin Warren. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet. June 16: 1311-1314. 1984.
- (45) Neman-Simha Veronique; Megraud Francis. *In vitro* model for *Campylobacter pylori* adherence properties. Infection and Immunity. 56; 12: 3329-3333. 1988.
- (46) Popovic-Uroic Tatiana; Charlotte M.Patton; Mabel Nicholson; Julia Kiehlbauch. Evaluation of the indoxyl-acetate hydrolysis test for rapid differentiation of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* species. J.Clin.Microbiol. 28; 10: 2335-2339. 1990.
- (47) Rivera Martínez Eduardo. Elisa en suero para el diagnóstico de la infección por *H.pylori*. Su utilidad en la evaluación de la exposición al ganado porcino y sus productos, como un factor de riesgo para la infección en el humano. Tesis UNAM. División de estudios de Postgrado. INNSZ. México. 1990.
- (48) Rosenau A; E.N. Moyen; F.Bonneville; J.L. Fauchere. *In vitro* association of *C.pylori* to eucaryotic cells. The Vth international workshop on Campylobacter infections. pag 361. 1989.
- (49) Rosenau A; E.N. Moyen; F.Bonneville and J.L Fauchere. *In vitro* study of the association

of *Campylobacter* to epithelial cells. Gastroduodenal pathology and C.pylori. pag 371-374. Elsevier Science Publishers. Biomedical division. 1989.

(50) Smith A.C. Duodenal ulcer disease. What role does *C.pylori* play?. Scand.J.Gastroenterol. 24(Suppl 160), 14-18. 1989.

(51) Smith Jane; Brenda Drum; A. Nilhelm; Neumann Zdenka; Philip Sherman. *In vitro* surfaces properties of the newly recognized gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Infection and Immunity. 58; 9: 3056-3060. 1990.

(52) Smoot D.T; T.Gilliam; P.Phelps. Intimate attachment of *H.pylori* to cultured human gastric epithelial cells is associated with actin polymerization. Abst of the VIth international workshop of the Campylobacter infections. Abst S-126. 1991.

(53) Svante Sjosted; Lars Kager; Bela Vere; Carl Erik Nord. Gastroduodenal pathology and C.pylori. 1a.edición. Elsevier Science publishers. Biomedical division. 1989.

(54) Tobin A; E.Lien; D.Gilligan; C.O'Moran. Duodenal *C.pylori* and gastric metaplasia in duodenal ulceration. Gastroduodenal pathology and C.pylori. 1a.edición. Elsevier Science Publishers .Biomedical division. 1989.

(55) Tricottet U; Bruneau O. *Campylobacter like organisms* and surface epithelium anomalies in active, chronic gastritis in humans: an ultrastructural study. Ultrast.Pathol: 113-122. 1986.

(56) Tulliez M; S.Desligners; M.Gaudric;S.Chaussale. *C.pylori* and antral gastritis: advantages of cresyl violet staining as a routine method and the pathological interest of lymphoid follicle. Gastroduodenal pathology and C.pylori. 1a.edición. Elsevier Science Publishers. Biomedical division. 1989.

(57) Uwe Mai; Gabrielle Geis; hermann Lying. Dimorphism of *C.pylori*. Gastroduodenal pathology and C.pylori. 1a.edición. Elsevier Science publishers. Biomedical division. 1989.

(58) Yardley J.H; Paul G. *Campylobacter pylori*: a newly recognized infectious agent in the gastrointestinal tract. Am.J.Sur.Pathol. 12(Suppl 1): 89-99. 1988.

(59) Yvonne P. American type culture collection, catalogue of cell lines and hybridomas. Sixth edition. Editorial Staff. 1988.