

14



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ANALISIS Y CORRELACION DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL HACIA *H. Pylori* EN PACIENTES INFECTADOS CON DISTINTAS PATOLOGIAS PROVOCADAS POR ESTA BACTERIA

298903

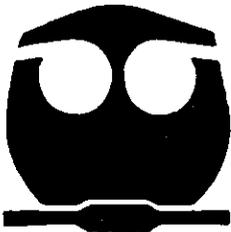
TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

ELENA MARIA BRITO QUIJANO



MEXICO, D. F.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

2001



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	PROFA. MARÍA DEL CARMEN CORTÉS DEQUIR
VOCAL	PROFA. ANA ESTHER AGUILAR CÁRDENAS
SECRETARIO	M. EN B. VERÓNICA LUQUEÑO MARTÍNEZ
1er SUPLENTE	PROFA. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO
2o SUPLENTE	PROF. ANTONIO CASTILLO DURÁN

Esta tesis se desarrolló en el Departamento de Infectología - Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

ASESORA

M. en B. Verónica Luqueño Martínez

SUSTENTANTE

Elena María Brito Quijano

Gracias,

A Dios, por haberme dado la fortaleza para superar obstáculos y adversidades y no permitir que me diera por vencida.

A mi papi y a mi mamá, Paco[†] y Lolita[†],
por haberme dado la vida y por ser
mis ángeles guardianes desde el lugar
privilegiado en el que ahora se encuentran.

A mi familia (mi tía Alicia y mis hermanas Rosalba,
Anabelle y Lucina) por su apoyo, por su cariño
y por los lazos tan especiales que nos unen a todas.

A mis padrinos, Luis y Delta,
Por su cariño y apoyo en todo momento.

Gracias también a:

Ethel,
Por su cariño, apoyo y consejos a lo largo de casi 10 años de amistad.

Normita,
Por su cariño, sus consejos, su buen humor y por haberme enseñado a ver la vida con mayor optimismo.

Diego,
Por escucharme siempre que lo he necesitado, por respetar mis decisiones sin juzgar, por enseñarme a ser más paciente y menos radical, y principalmente...por el cariño que nos une desde hace muchos años.

Alejandro Osornio y [Ricardo] Jasso,
Por su amistad a lo largo de la carrera, por su apoyo y por enseñarme a no tomar la vida con tanta seriedad.

Meli,
Por haberme brindado su amistad y por todo (opiniones, críticas, sugerencias) lo que como investigadora aportó a este trabajo.

Gelcaps (Diofanto, Rebeca, Ing. Gómez y Marco V.),
Por haberme motivado a titularme.

Ángeles,
Por sus valiosos comentarios y observaciones en la revisión de este trabajo.

A Vero,
Por TODO su apoyo para poder llevar a cabo
y terminar este trabajo,
por todos sus conocimientos y
experiencia como investigadora,
los cuales fueron fundamentales
para que esta revisión quedara concluida,
y principalmente por la amistad que ahora nos une.

Al Dr. Guillermo Ruíz-Palacios,
Por su consentimiento para la elaboración de este trabajo
en el Departamento de Infectología – Investigación del
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
Salvador Zubirán.

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	<i>i</i>
RESUMEN	<i>ii</i>
INTRODUCCIÓN	
Características microbiológicas de <i>H. pylori</i>	1
Transmisión.....	1
Epidemiología.....	2
Genoma de <i>H. pylori</i>	3
Patogénesis de la infección.....	3
Diagnóstico de la infección por <i>H. pylori</i>	8
Tratamiento.....	13
OBJETIVO Y ENFOQUE	15
GENERALIDADES	
Descripción de las proteínas de importancia en la infección por <i>H. pylori</i>	16
Respuesta inmunológica hacia <i>H. pylori</i> y su diagnóstico por medio de la técnica de Western Blot.....	34
Severidad de la infección por <i>H. pylori</i>	50
DISCUSIÓN	61
CONCLUSIONES	65
ANEXO I	67
BIBLIOGRAFÍA	70

1877
1878
1879
1880
1881
1882
1883
1884
1885
1886
1887
1888
1889
1890
1891
1892
1893
1894
1895
1896
1897
1898
1899
1900



IMPRESA
Mendez
PORTAL DE STD. DOMINGO
No. 10-E PLANTA BAJA
COL. CENTRO C.P. 66010, MEXICO, D.F.
TEL. 521-37-30

ABREVIATURAS

Término	Abreviatura
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>H. pylori</i>
Tejido linfoide asociado a mucosas (mucosa-associated lymphoid tissue)	MALT
Western blot	WB
Proteínas de choque térmico (heat shock proteins)	HSP
Interleucina	IL-
Factor activador de plaquetas (platelet-activating factor)	PAF
Radicales libres (reactive oxygen species)	ROS
Ácido desoxirribonucleico	AND
Ácido ribonucleico	ARN
Food and Drug Administration	FDA
Reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)	PCR
Hematoxilina y eosina	H&E
Antígeno del gen A asociado a la citotoxina (cytotoxin-associated gene A)	CagA
Factor de necrosis tumoral alfa (tumor necrosis factor alpha)	TNF- α
Proteínas de membrana externa (outer membrane proteins)	OMP
Glóbulos rojos (red blood cells)	RBCs
Lipopolisacárido	LPS
Proteína de <i>H. pylori</i> rica en cisteína (<i>H. pylori</i> cysteine-rich protein)	HcpA
Subunidad pequeña de la ureasa	UreA
Subunidad mayor de la ureasa	UreB
Células mononucleares (mononuclear cells)	MNC
Dodecil sulfato de sodio (sodium dodecyl sulfate)	SDS
Electroforesis en gel de poliacrilamida (polyacrylamide gel electrophoresis) con dodecil sulfato de sodio (sodium dodecyl sulfate)	SDS-PAGE
Leucocitos polimorfonucleares (polymorphonuclear leukocytes)	PMN
Factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (granulocyte macrophage colony-stimulating factor)	GM-CSF
Interferón gamma	IFN- γ
Especies reactivas del oxígeno y nitrógeno	NO
Adhesina que se une a grupo sanguíneo (blood group antigen-binding adhesin)	BabA
Proteínas de membrana externa represibles por hierro (iron- repressible outer membrane proteins)	IROMP
Isla de patogenicidad (pathogenicity island)	PAI
Citotoxina vacuolizante	VacA
Ensayo inmunoenzimático (Enzyme-linked Immunosorbent assay)	ELISA
Solución amortiguadora de fosfatos (phosphates buffer solution)	PBS
Succinato deshidrogenasa	SDH
Microorganismos parecidos a <i>Helicobacter</i> (<i>Helicobacter</i> -like organisms)	HLO
Proteínas de peso molecular alto (high molecular-mass proteins)	HMMP
Proteínas de peso molecular bajo (low molecular-mass proteins)	LMMP
Proteínas de peso molecular medio (medium molecular-mass proteins)	MMMP
Dispepsia no ulcerosa	DNU

RESUMEN

H. pylori es el agente etiológico de diversas patologías, tales como dispepsia y gastritis, úlceras gástrica y duodenal, cáncer gástrico y MALT. Existen métodos de diagnóstico de esta infección, tanto invasivos como no invasivos; entre los no invasivos, la técnica de WB ha demostrado tener una sensibilidad y una especificidad altas (97 al 100% y 85 al 100%, respectivamente). Con el propósito de validar esta técnica, es necesario aislar a la bacteria a partir de biopsias gástricas y, en caso de que esto no sea posible, llevar a cabo el análisis histológico de la biopsia con la observación de la bacteria y la prueba de ureasa positiva en biopsia.

En referencia al diagnóstico de la infección con *H. pylori* por medio de WB, debe haber reactividad ya sea hacia una HMMP o hacia dos LMMP, cuyos pesos moleculares se encuentran entre 87 y 128 kDa y 19.5 y 42 kDa, respectivamente. Este criterio elimina la reactividad cruzada que ocurre entre algunas MMMP de *H. pylori* y otras especies bacterianas como *Campylobacter spp.* Debido a la importancia que tienen ciertos grupos de proteínas (HMMP y LMMP) en el diagnóstico de la infección con *H. pylori* por WB, la preparación antigénica más adecuada es el antígeno de células completas, el cual permite obtener un mayor número de bandas protéicas.

Respecto a la correlación que existe entre la reactividad hacia ciertos antígenos y las diferentes patologías que ocasiona la bacteria, se ha encontrado que las cepas productoras de CagA y VacA ocasionan úlcera duodenal en pacientes occidentales, mientras que en pacientes orientales la reactividad hacia estas proteínas se presenta en pacientes infectados con úlcera duodenal o asintomáticos. Aún no se

ha definido si el antígeno de 35 kDa es un marcador en los pacientes con úlcera duodenal de ambas poblaciones. Por otro lado, en pacientes con MALT no se ha logrado establecer todavía una correlación entre la reactividad hacia CagA y dicha patología. Finalmente, la infección con cepas productoras de CagA y VacA está asociada con el desarrollo de cáncer gástrico, mientras que el papel de la proteína de 26 kDa y su correlación con esta patología debe ser estudiado en forma más extensa.

INTRODUCCIÓN

H. pylori es una bacteria que se encuentra en el estómago humano, es gram negativa, espiral y presenta extremos redondeados (1). Crece a 37 °C, en condiciones de microaerofilia y medios enriquecidos. Cuando se le cultiva en medio sólido las formas espirales son poco frecuentes y la bacteria adquiere una forma semejante a la de un bacilo (2). Después de un cultivo prolongado en medio sólido o líquido, predominan las formas cocoides (3, 4). Por microscopía electrónica, estas formas se observan como bacilos en forma de "U" con los extremos de ambos brazos unidos por una estructura membranosa. Además, estas formas son metabólicamente activas, aunque no es posible cultivarlas *in vitro* (3, 4).

En las biopsias gástricas, *H. pylori* mide de 2.5 a 5.0 μm de longitud y entre 0.5 y 1.0 μm de ancho; tiene de cuatro a seis flagelos unipolares con envoltura (1,2), los cuales son esenciales para la motilidad de la bacteria. Cada flagelo mide aproximadamente 30 μm de longitud y aproximadamente 2.5 nm de grosor (2,5). La superficie de la bacteria se encuentra unida a las microvellosidades del epitelio gástrico por medio de extensiones, semejantes a cordones, del glicocáliz (1).

Transmisión

Se han postulado diferentes formas de transmisión de *H. pylori*. Una de ellas es la iatrogénica. En ésta, los tubos, endoscopios, o especímenes en contacto con la mucosa gástrica de una persona infectada son introducidos en otra (6).

La segunda de las formas de transmisión de la infección es la fecal-oral. El aislamiento de la bacteria a partir de heces no es común; esto puede ser un indicativo de que ocurre un proceso de muda intermitentemente. El agua contaminada con materia fecal, así como los alimentos contaminados por esta vía,

también pueden ser una fuente de infección (7), pero aún no se ha aislado al microorganismo a partir de agua. Tampoco se ha comprobado la transmisión de la infección por medio de alimentos.

Por último, está la transmisión oral-oral, la cual mejor documentada en un estudio de mujeres africanas que premastican la comida que dan a sus hijos (8), por lo que la transmisión se da de madre a hijo. La transmisión por aspiración de *H. pylori* presente en vómito es otra posibilidad que aún no se ha documentado.

En conclusión, aunque *H. pylori* se encuentra presente en el estómago de aproximadamente un 50% de la población mundial, aún no se sabe claramente como se transmite.

Epidemiología

En los países en vías de desarrollo, entre el 70 y 90% de la población es portadora de *H. pylori* y casi la totalidad adquiere la infección antes de la edad de 10 años (9), mientras que en los países desarrollados, la prevalencia de la infección es menor, encontrándose entre un 25 y 50% en población adulta. Además, existe la evidencia de que la infección se adquiere durante la infancia y que la incidencia de la misma ha disminuido con los cambios inducidos por la industrialización (11,12,13). En los países desarrollados, el nivel socioeconómico es un factor importante para adquirir la infección, ya que personas de un nivel socioeconómico alto tienen niveles de infección inferiores que aquellas que pertenecen a niveles socioeconómicos más bajos. Por otro lado, en ciertas minorías étnicas la infección persiste independientemente del nivel socioeconómico (13,14).

Genoma de *H. pylori*

El tamaño del genoma de *H. pylori* varía en el rango de 1.6 a 1.73 Mb, con un promedio de 1.67 Mb. El porcentaje de G-C es de 35.2% mol en promedio, con un rango entre 34.1. y 37.5% (15). Aproximadamente el 40% de las cepas aisladas de *H. pylori* contienen plásmidos, pero en éstos no se han encontrado factores de virulencia conocidos (16,17). La localización variable de los múltiples genes en los mapas genómicos de *H. pylori* sugiere que ocurre un rearrreglo extensivo del genoma (18,19,20), además de que hay una diversidad significativa en la secuencia de varios genes, entre los que se encuentran los que codifican para la ureasa estructural (21) y accesoria (23), algunas proteínas como la flagelina (22), la citotoxina vacuolizante (VacA) (24) y la proteína CagA (25,26,27). A partir del análisis de la variación de los alelos en seis genes, se ha confirmado la diversidad genética de las cepas de *H. pylori* (28).

Patogénesis de la infección

H. pylori tiene especificidad por las células de la mucosa gástrica pero no con el epitelio intestinal, ya sea en el intestino delgado o en metaplasias intestinales ubicadas en el estómago. Esta bacteria se ha visto en el bulbo duodenal pero solamente asociado con metaplasia gástrica (29,30). Además, se ha comprobado que la bacteria se asocia con una patología específica gastroduodenal, como es el caso de las gastritis crónica superficial y atrófica tipo B. Por último, dado que la gastritis va acompañada de hipoclorhidria, se ha sugerido que ésta puede estar causada por la infección iatrogénica con *H. pylori* (31).

Existen suficientes evidencias que indican que la infección con *H. pylori* usualmente está asociada con la gastritis superficial crónica, la cual se caracteriza por la infiltración de MNC inflamatorias asociadas con la infiltración de neutrófilos del

epitelio. Sin embargo, este patrón no está asociado específicamente con el cambio metaplásico, la formación del granuloma y la atrofia de la glándula del fondo (32). El grado de inflamación del tejido gástrico varía, y el rango abarca desde la infiltración mínima de la lámina propia mientras que la arquitectura glandular se mantiene intacta, hasta la inflamación densa severa con formación de microabcesos y atipia epitelial reactiva (33). Al mismo tiempo ocurren cambios degenerativos en las células epiteliales de la superficie, mismos que incluyen el agotamiento de la mucina, la vacuolización citoplásmica y la desorganización de las glándulas de la mucosa. Después de la erradicación de la infección con agentes antimicrobianos, muchos de esos cambios desaparecen con rapidez (29), aunque las MNC pueden persistir durante varios meses.

Mecanismos de patogenicidad o virulencia

La bacteria tiene la capacidad de colonizar y persistir en un nicho biológico único en el lumen gástrico. Los determinantes de patogenicidad de *H. pylori* pueden clasificarse en dos grupos: factores de virulencia, que son los que contribuyen a los efectos patogénicos de la bacteria, y los factores de mantenimiento, que son los que permiten a la bacteria colonizar y permanecer en el huésped. Los factores de virulencia, por su lado, se clasifican de acuerdo a los efectos patogénicos de *H. pylori* en factores que inducen la inflamación gástrica, la destrucción de la barrera mucosa gástrica y la alteración de la fisiología gástrica. Al parecer, muchos de los factores de *H. pylori* tienen funciones tanto como de virulencia como de mantenimiento.

- Factores que inducen la inflamación gástrica

1. Colonización: Ésta se encuentra favorecida por la motilidad del microorganismo, enzimas producidas por él mismo (ureasa, catalasa y superóxido dismutasa), las proteínas de choque térmico, los sideróforos, así como adhesinas bacterianas y receptores celulares.

- a) Motilidad: La presencia de flagelos le permite a la bacteria desplazarse por medio de movimientos rápidos a través del moco gástrico.
- b) Enzimas: La ureasa permite a la bacteria crear un microambiente neutro óptimo en el lumen gástrico, esencial para su sobrevivencia. Además, es un estímulo potente para la actividad fagocítica de los mononucleares y la producción de citocinas inflamatorias. Por lo tanto, esta enzima es considerada un factor de virulencia. Por otro lado, la catalasa y la superóxido dismutasa le confieren al microorganismo cierta resistencia frente a la actividad de los leucocitos polimorfonucleares.
- c) Proteínas homólogas de las HSP: Una de estas moléculas es la HSPB, misma que al parecer funciona como chaperonina de la ureasa. La expresión de HSPA y la HSPB actúan juntas y potencian la actividad de la ureasa. Además, se ha descubierto que la HSPA tiene un sitio de unión para el níquel, por lo que posiblemente tenga un papel importante en la integración de este elemento en la molécula funcional de la ureasa (67).
- d) Sideróforos: El hierro es un elemento esencial para el crecimiento y el metabolismo de la bacteria. Se ha reportado que *H. pylori* no es capaz de producir sideróforos (proteínas que captan hierro) en condiciones limitadas de hierro. Sin embargo, se ha establecido que el microorganismo puede crecer en presencia de lactoferrina y se sugirió que la bacteria tiene receptores de

superficie para esta proteína capaces de unirse a hierro. Por lo tanto, aún no se ha definido la forma en la que la bacteria adquiere el hierro necesario para su crecimiento (35,36).

e) Adhesinas bacterianas y receptores celulares: El flagelo, aparte de conferirle movilidad a la bacteria, actúa como adhesina, ya que se une a las superficies del huésped y contribuye a la habilidad del organismo para colonizar el epitelio (37). Algunas de las moléculas receptoras que están involucradas en la adhesión de *H. pylori* a las células de la mucosa son los antígenos del grupo sanguíneo Le^b. Además, la disponibilidad de dichos receptores está reducida en individuos del grupo sanguíneo A y B, en comparación con el grupo O, lo cual ayuda a explicar por qué la población con dicho grupo sanguíneo tiene un riesgo mayor de padecer úlceras péptica con respecto a aquella cuyo fenotipo es A o B. Otros receptores potenciales para *H. pylori* incluyen los componentes de la matriz extracelular, los cuales pueden quedar expuestos después de la lesión del epitelio gástrico (67).

2. IL-8: La IL-8 es un péptido pequeño secretado por diferentes células (tales como las células del epitelio gástrico o los macrófagos), y sirve como un potente mediador de la inflamación y como activador de los neutrófilos. Diversos estudios han demostrado que las cepas de *H. pylori* son capaces de inducir la secreción de IL-8 a partir de células de carcinoma gástrico *in vitro* (38,39,40).

3. Adherencia de neutrófilos: Evans y colaboradores caracterizaron una proteína capaz de incrementar la expresión de las moléculas CD11b/CD18 en los neutrófilos, así como de incrementar la adherencia de los neutrófilos a las células endoteliales (41).

4. PAF: El PAF es un mediador de naturaleza fosfolipídica que se reconoce como un potente agente ulcerogénico. El Lyso-PAF es un mediador no ulcerogénico que las células de *H. pylori* pueden metabolizar a PAF, y este puede ejercer su acción estimuladora de la secreción gástrica a través de los receptores de las células parietales específicas (42). Por lo tanto, a través de la síntesis del PAF, *H. pylori* puede provocar lesiones en la mucosa gástrica tanto directamente o en forma indirecta al incrementarse la secreción de ácido.

5. LPS: El LPS es un constituyente de la membrana externa de las bacterias gram negativas, por lo tanto se encuentra en *H. pylori*. Esta estructura es capaz de alterar la mucosa gástrica al interferir en la interacción entre la mucina y su receptor en la mucosa (43), sin embargo su actividad proinflamatoria es pobre (44,45).

- Factores que alteran la barrera de la mucosa gástrica

1. Enzimas: Las fosfolipasas A₂ y C son capaces de alterar la capa rica en fosfolípidos que se encuentra en la membrana apical de las células de la mucosa. Por otro lado la mucinasa es capaz de alterar la barrera de la mucosa gástrica.

2. Citotoxina vacuolizante: *H. pylori* produce una citotoxina que induce la formación de vacuolas acídicas en el citoplasma de las células epiteliales gástricas.

3. ROS: *H. pylori* induce la síntesis de estas especies en la mucosa gástrica *in vivo*, los cuales favorecen la lesión gástrica. Además, existe una asociación positiva entre la cantidad de ROS presentes y la carga infectiva de *H. pylori* (46).

4. Apoptosis: Al parecer, *H. pylori* induce la apoptosis (muerte celular programada) de las células del epitelio gástrico (47,48) y estimula el daño oxidativo del ADN en la mucosa en pacientes infectados (49). Además, *H. pylori* inhibe la migración y la proliferación de las células epiteliales gástricas (50).

- Factores que alteran la homeostasis gástrica

1. Inducción de gastrina: La infección por *H. pylori* induce en forma reversible la expresión de la gastrina, la cual estimula la producción de ácido y suprime la expresión de la hormona somatostatina, misma que inhibe la producción de ácido (51). Aunque estos efectos no están provocados directamente por la bacteria, están relacionados con el grado de inflamación gástrica presente. Se ha observado que cuando la producción de ácido se suprime con omeprazol, la relativa susceptibilidad de *H. pylori* en el antro y el cuerpo difiere, dando la impresión de que la bacteria migra del antro al cuerpo (52).
2. ATPasa tipo P: Este tipo de enzimas son particularmente importantes en *H. pylori* ya que, al parecer, la ATPasa es uno de los blancos de la acción de los inhibidores de la bomba de protones, tales como el lansoprazol o el omeprazol (ambos fármacos antisecretores de ácido), en *H. pylori* (53).

Diagnóstico de la infección por *H. pylori*

Los métodos de diagnóstico de la infección por el microorganismo se dividen en invasivos y no invasivos. Los primeros consisten en la exploración endoscópica del daño en la mucosa gástrica y en tomar muestras de tejido a partir de las cuales se efectúa el diagnóstico por métodos como el cultivo, la histología, la prueba de la ureasa o la prueba PCR. Por otro lado, los métodos no invasivos se fundamentan en la detección indirecta de la presencia de la bacteria, ya sea a través de anticuerpos dirigidos hacia la misma o de alguno de sus metabolitos.

Métodos invasivos

1. Endoscopía: En endoscopías practicadas en pacientes con gastritis asociada a la infección con *H. pylori* generalmente se observa una mucosa con aspecto normal. Tomando en cuenta que la distribución de *H. pylori* y la inflamación

asociada a ésta se da normalmente en forma de "parches", el diagnóstico endoscópico puede originar errores que ocasionan falsos negativos tanto en biopsias como en cultivos y en la prueba de ureasa rápida. Por esta razón, es necesario tomar al menos dos biopsias en los 5 centímetros más cercanos al píloro, así como observar por medio de endoscopia, nodularidad antral y úlcera duodenal no complicada, mismas que generalmente están asociadas con la infección con *H. pylori* (54).

2. Diagnóstico histológico: En secciones teñidas con H&E pueden observarse la bacteria y el daño celular ocasionado por la misma. Las bacterias se localizan en la capa mucosa adherida a la superficie del epitelio y a menudo se encuentran en la parte profunda de las criptas. Hay otras técnicas como las tinciones de Warthin-Starry y la tinción modificada de Giemsa, las cuales magnifican el tamaño de la bacteria y facilitan su identificación (55,56). Otra técnica sensible que permite evaluar simultáneamente la histología gástrica e identificar a la bacteria, es la desarrollada por Genta y colaboradores (57), la cual emplea la tinción de H&E, la tinción de plata de Steiner e incorpora azul alsaciano.
3. Cultivo: El cultivo de *H. pylori* tiene dos grandes ventajas. En primera, es posible conocer la susceptibilidad de la cepa a determinados antimicrobianos; en segunda, el microorganismo aislado por medio de cultivo puede ser caracterizado con detalle. A pesar de que la sensibilidad del cultivo en laboratorios especializados es superior al 95%, existen otros métodos para el diagnóstico de la infección con *H. pylori* que presentan una menor variabilidad, son más simples y que consumen menos tiempo. El cultivo de la bacteria a partir de biopsias gástricas genera altos rendimientos, aunque también se ha logrado el aislamiento a partir de jugo gástrico y de heces (58,59). Para su crecimiento, *H. pylori*

requiere un ambiente microaerofílico, humedad elevada e incubación a 35-37 °C durante 4 a 7 días. Los cultivos positivos usualmente se detectan entre el día 3 y el 7. Esta bacteria se identifica en función de su morfología colonial (colonias translúcidas, con un tamaño que les permite ser apenas detectadas a simple vista a aquellas con un diámetro de 3 mm aproximadamente); las colonias consisten de bacilos curvos (generalmente no tienen forma helicoidal) que son ureasa, catalasa y oxidasa positivos.

4. Detección de la producción de ureasa en biopsia: Esta prueba permite identificar en forma indirecta al microorganismo mediante la detección de uno de sus metabolitos, la ureasa. Sin embargo, ésta prueba tiene una sensibilidad que depende de la carga bacteriana en el estómago.
5. PCR en biopsia: Esta técnica se considera altamente sensible y específica para la detección de *H. pylori* (60,61). Los factores que afectan la exactitud de la prueba incluyen la selección de primers y el ADN blanco, la preparación del espécimen, densidad bacteriana y aspectos técnicos relativos al ensayo de PCR. Una de las grandes ventajas de la técnica de PCR es que permite llevar a cabo un diagnóstico debido a que es capaz de detectar ADN de *H. pylori* en fluidos no gástricos como la saliva y heces (62). Por último, es importante mencionar que esta prueba puede dar lugar a falsos positivos, como en los casos en que se amplifica parte del genoma humano (63).

Métodos no invasivos

1. Prueba de aliento de la ureasa: En esta prueba, la urea se administra como sustrato y se emplean el isótopo [¹³C] o el [¹⁴C]. La ureasa producida por *H. pylori* hidroliza la urea ingerida a bicarbonato y amonio. El bicarbonato marcado es exhalado y colectado mediante un equipo especial. El isótopo de ¹³C se

detecta mediante espectrometría de masas y el isótopo de ^{14}C se detecta mediante un contador de centelleo (64,65). Por otro lado, es posible medir la concentración de bicarbonato sérico marcado después de haberse administrado urea marcada con ^{13}C , por lo que puede determinarse el estatus de infección por *H. pylori* en un paciente. De manera similar, la determinación de ^{14}C en orina es una forma exacta de diagnosticar la infección (66). En presencia de ureasa, se ingiere la urea marcada con ^{15}N y el metabolito de amoniaco marcado, se absorbe y excreta en la orina. Los niveles de amoniaco marcado con ^{15}N han permitido hacer una discriminación de pacientes infectados con respecto a los no infectados (67). Sin embargo, este último método no ha sido completamente estandarizado, por lo que no confiere ventajas significativas con respecto a los métodos de diagnóstico previamente descritos.

2. Detección de anticuerpos: La infección de la mucosa gástrica con *H. pylori* provoca tanto una respuesta inmune como sistémica, incluyendo la elevación de los niveles de IgG e IgA en suero, así como de los niveles de IgA e IgM en el estómago. Esto permite desarrollar técnicas de detección serológica de la bacteria (68,69), las cuales han demostrado ser no invasivas, relativamente rápidas, fáciles de llevar a cabo y mucho menos caras que las pruebas que requieren de endoscopia. La utilidad de cualquier método serológico en la detección de anticuerpos específicos contra *H. pylori* depende de la preparación antigénica empleada. En general, existen tres tipos de antígenos que se emplean para este tipo de ensayos: antígenos crudos, tales como células completas y el sonificado de células completas, fracciones celulares como el extracto de glicina y

los antígenos termoestables, y antígenos enriquecidos tales como la ureasa, la proteína CagA y su antígeno recombinante (68,70,71,72).

Cuando no se emplea un método terapéutico para combatir la infección, los niveles de anticuerpos permanecen elevados en algunas ocasiones de por vida, lo que refleja la duración de la infección. Después de la erradicación de la infección de *H. pylori*, los niveles de IgG e IgA específicas tienden a disminuir a aproximadamente la mitad del valor antes del tratamiento en un lapso de 6 meses (73,74,75). Niveles bajos de IgG específicas pueden persistir aún después de haber sido erradicada la infección de *H. pylori*; por lo tanto, el empleo de las pruebas serológicas en la valoración de la efectividad del tratamiento puede ser problemático a menos que se puedan comparar muestras de suero antes y después del tratamiento.

Una de las ventajas que presentan los métodos de diagnóstico serológico, es que permite reflejar la infección, independientemente que se encuentre en cualquier parte del estómago, a diferencia de pruebas como el aislamiento del microorganismo a partir de biopsias, en el que solo se aísla si se toma la muestra del lugar adecuado. Por lo tanto, puede decirse que las pruebas serológicas son útiles como una técnica de monitoreo. Una prueba negativa implica una baja probabilidad de infección en un paciente con pocas posibilidades de infección, por lo que en este caso es innecesaria una mayor evaluación para buscar al microorganismo. Sin embargo, si se considera un resultado positivo en el mismo paciente, es necesaria una mayor evaluación. Por el contrario, cuando se lleva a cabo una prueba serológica en un paciente con úlcera péptica y el resultado es positivo, ya no se requiere un estudio confirmativo; sin embargo, confiar en un resultado negativo (especialmente cuando el paciente presenta úlcera sangrante)

podría ser inapropiado, dado que el manejo del paciente depende de la identificación de la infección por *H. pylori*. Una de las desventajas de las técnicas serológicas es la detección de títulos altos de anticuerpos, los cuales disminuyen mucho tiempo después de haber sido erradicada la infección: esto da lugar a falsos positivos.

Tratamiento

El régimen aprobado por la FDA para pacientes con úlcera péptica consiste en una terapia triple que incluye subsalicilato de bismuto (dos tabletas: 262 mg), metronidazol (250 mg), y tetraciclina (500 mg). Todos se toman 4 veces al día durante 14 días. Este régimen puede variar cuando se administra amoxicilina en lugar de tetraciclina. Aunque el porcentaje de recuperación de pacientes es menor, este régimen es recomendable en población pediátrica, en la cual las tetraciclinas están contraindicadas. Fuera de los Estados Unidos es común la administración de subcitrato de bismuto en lugar del subsalicilato, por lo que el tiempo de tratamiento se reduce de 14 a 7 días. El porcentaje de curación para esta terapia triple es de aproximadamente el 85% (76).

El régimen descrito no incluye un agente antisecretor, lo cual es altamente recomendable en casos de úlcera activa (34). En general, se administra concomitantemente una terapia de antiácidos durante 2 semanas. Sin embargo, dependiendo del agente seleccionado y de la localización y tamaño de la úlcera, este tipo de terapia debe continuarse durante 4 a 6 semanas.

La terapia cuádruple, en la cual se usa la terapia triple combinada con un antiácido, ha demostrado ser aún más eficaz y presenta un menor porcentaje de efectos adversos que la terapia triple (73,69,34). Este régimen permite obtener porcentajes de recuperación de hasta un 90%.

OBJETIVO Y ENFOQUE

El presente trabajo monográfico de actualización tiene como objetivos principales:

- a) Definir cuáles son las proteínas de importancia en la infección por *H. pylori*.
- b) Definir la respuesta inmunológica frente a antígenos específicos y de reactividad cruzada por medio de WB.
- c) Correlacionar la respuesta inmunológica hacia ciertos antígenos con la severidad de la infección.
- d) Definir los patrones de reconocimiento de la respuesta inmunológica de *H. pylori* de acuerdo a su distribución geográfica.

En el presente trabajo se llevó a cabo la revisión de artículos publicados durante los últimos diez años en promedio. Se incluyeron tanto revisiones bibliográficas acerca de *H. pylori*, así como estudios clínicos y artículos referentes al análisis bioquímico de varias de las proteínas de *H. pylori*.

GENERALIDADES

DESCRIPCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE IMPORTANCIA EN LA INFECCIÓN POR

H. pylori

Las proteínas de *H. pylori* que están involucradas en el desarrollo de una respuesta inmune en individuos infectados con este microorganismo son proteínas producidas por la bacteria y liberadas al exterior (como la ureasa) y proteínas que forman parte de la estructura bacteriana (tales como las adhesinas y las proteínas de membrana externa). Hasta el momento, las proteínas de mayor importancia son la de 87 kDa (VacA), la de 120 kDa (CagA) y la ureasa (la cual está formada por dos subunidades de 62- y 30 kDa, respectivamente). A continuación se describirán primero estas tres proteínas y posteriormente las demás en orden creciente de peso molecular.

Proteína de 87 kDa, citotoxina vacuolizante

En varios estudios histológicos de individuos infectados con *H. pylori* se han identificado vacuolas en las células epiteliales gástricas. Además, se ha comprobado que en el suero de estos individuos existe una actividad inhibitoria de la vacuolización en cultivos celulares infectados con *H. pylori*. Adicionalmente, las cepas de *H. pylori* que provocan la vacuolización son productoras de una proteína que se encuentra frecuentemente en cepas de pacientes con úlcera duodenal y gastritis atrófica. Por lo tanto, tomando en consideración los criterios mencionados puede sugerirse que esta proteína vacuolizante (citotoxina) está implicada en la patogénesis de la infección de *H. pylori*.

Dada la importancia de esta citotoxina, se ha analizado esta proteína con el propósito de determinar varios de sus parámetros bioquímicos (76). En cuanto al peso molecular, éste varía de 87 a 90 kDa (76,78), aunque también se ha establecido que dicha proteína tiene un peso molecular de 600 kDa en condiciones no desnaturizantes y que está constituida por 6-7 monómeros de 95 kDa, los cuales a su vez constan de un fragmento de 37 kDa (subunidad N-terminal) y uno de 58 kDa (subunidad C-terminal) (76).

Recientemente, Cover y colaboradores (77) analizaron el patrón de ensamblaje de la citotoxina y cómo influyen las variaciones de pH en dicho patrón. Primero se llevó a cabo el aislamiento y la purificación de dicha proteína a partir de sobrenadantes de medio de cultivo donde había crecido la bacteria, considerando que VacA es secretada al medio exterior. La proteína ya purificada se adsorbió en láminas de mica y se analizó por medio de microscopía electrónica tipo deep-etch. VacA presentó una forma de flor, el centro es un anillo de aproximadamente 15 nm que está rodeado de seis pétalos globulares de aproximadamente 5-6 nm de diámetro, por lo que el diámetro de la estructura final es de cerca de 30 nm. Sin embargo, aproximadamente el 10% de las moléculas presentan una estructura plana que carece del anillo central. Es importante destacar que este comportamiento se presenta en proteína aislada a partir de cepas cuyo genotipo es s1a/m1. Por el contrario, si la proteína se obtiene de cepas cuyo genotipo es m2 no se observa la presencia de dichas formas planas.

Además del análisis microscópico de la proteína se observó un patrón de proteólisis de la misma cuando se almacena durante un tiempo prolongado. Siendo el peso molecular de VacA de aproximadamente 90 kDa, después de la proteólisis las fracciones que se obtuvieron fueron de aproximadamente 34- y 58 kDa.

Posteriormente se observó el efecto del pH en el patrón de ensamblaje de la proteína. Al disminuir el pH se formaron conglomerados de aproximadamente 12 pétalos. Otro cambio asociado a la influencia del pH fue el coeficiente de sedimentación de la proteína: a un pH de 7.5 este valor era de 22-S, y al disminuir el valor de pH a 3.0 el otro parámetro disminuyó a 5-S. Sin embargo, el peso molecular de la proteína se conservó en 90 kDa. Esto permitió concluir que al disminuir drásticamente el pH se pierde la forma oligomérica de la proteína. Como consecuencia, ciertos dominios hidrofóbicos de VacA quedan expuestos en la superficie, lo que facilitaría la unión y/o penetración de membranas. Esto se ha podido deducir a partir de la observación de otras toxinas protéicas, así como del TNF- α , los cuales sufren cambios conformacionales que permiten su inserción en membranas y la formación de canales iónicos. Por lo tanto, dado que *H. pylori* está expuesto a condiciones de acidez en el estómago, dichas condiciones provocan el desensamblaje de VacA. Ya desensamblada la proteína es capaz de hacer contacto con sus células blanco o entrar en ellas (77).

Proteína de 120 kDa (CagA)

La proteína VacA que se mencionó con anterioridad es considerada uno de los tres factores de patogenicidad de mayor relevancia en la infección por *H. pylori*, junto con la ureasa y la presencia de flagelos. Se ha detectado que en el sobrenadante de los cultivos de muchas cepas citotóxicas de *H. pylori* está presente, además de VacA, otra proteína cuyo peso molecular es de 120, 128 o 130 kDa, lo cual se sugiere que también interviene en la patogénesis del microorganismo. Debido a su alta inmunogenicidad en individuos infectados con *H. pylori*, así como la asociación con la citotoxina, se nombró a esta proteína CagA.

Se llevaron a cabo estudios que permitieron comprobar que la proteína de 128 kDa no tiene actividad citotóxica y que la citotoxicidad está asociada con fracciones que contienen una proteína de 87 kDa que no cruza antigénicamente con CagA. Estos resultados indican que la molécula de 128 kDa no es la citotoxina, pero está asociada con ésta. La asociación entre la presencia del gen *cagA* y la citotoxicidad sugiere que el producto de *cagA* es necesario para la transcripción, plegamiento, exportación o funcionamiento de la citotoxina. Inclusive, se han hecho analogías con sistemas similares que sugieren que una proteína que consta de varias unidades (como es el caso de la citotoxina de *H. pylori*) probablemente requiera proteínas accesorias para su plegamiento y exportación.

El antígeno CagA se caracteriza por su gran variabilidad en su peso molecular, así como a la presencia de secuencias de aminoácidos que se repiten. Esto último le permite al microorganismo, ya sea evadir la respuesta inmune al generar diversidad antigénica, o generar epítopes inmunodominantes no protectores que atraen la atención del sistema inmune con respecto a los epítopes protectores. En el caso de *H. pylori*, este sistema duplica secuencias ya presentes en el antígeno sin generar diversidad antigénica. Sin embargo, la duplicación genera dos regiones altamente hidrofílicas ricas en prolina, las cuales muy probablemente estén expuestas hacia la superficie y sean muy inmunogénicas. Lo que aún queda por saber es si dichas repeticiones le confieren ciertas ventajas a la bacteria con respecto al sistema inmune, dan origen a una proteína más funcional o simplemente son neutrales y se han propagado debido a que no le confieren desventaja alguna a la bacteria.

En un estudio que se llevó a cabo para determinar en qué parte de la bacteria se encuentra el antígeno CagA se creció a la bacteria en un medio con ciclodextrinas, en lugar de suero bovino. Se encontró que en este medio, el antígeno se encuentra

asociado a la superficie de la célula. Esto sugiere que la liberación del antígeno en el sobrenadante puede deberse a la acción de las proteasas presentes en el suero, las cuales probablemente degraden al antígeno mismo o a los complejos que sostienen a CagA unida a la superficie de la bacteria. Probablemente, este tipo de fenómenos también ocurre *in vivo* (92).

Ureasa (subunidades de 62- y 30 kDa)

Se ha atribuido a esta enzima un papel importante en el desarrollo de gastritis y úlcera péptica. La actividad de la ureasa es considerada un factor de colonización importante, ya que esta enzima genera amoníaco a partir de la urea en el microambiente inmediato a la bacteria y la protege contra los efectos nocivos de la acidez gástrica. Las concentraciones elevadas de amoníaco ejercen un efecto tóxico en las uniones intercelulares, provocando una alteración en la permeabilidad de la mucosa gástrica (79). Esta proteína tiene una estructura dimérica, subunidades UreA y UreB, y la estructura tridimensional tiene cationes divalentes que mantienen juntas a las subunidades de la enzima. Esta enzima se localiza en la superficie de la bacteria y tiene homología con otras ureasas producidas por diferentes especies de *Helicobacter*.

Dunn et al determinaron el peso molecular de las subunidades de la ureasa y asignaron valores de 62- y 30 kDa a UreB y UreA, respectivamente. Estos mismos autores determinaron que ambas subunidades se encuentran en proporción 1:1 en una estructura del tipo (UreB:UreA)_n, y también propusieron que tiene una estructura trilobular, la cual no siempre se observa ya que como la ureasa es un objeto no esférico cada molécula se visualiza de diferente manera. Inicialmente se planteó que la estructura de la ureasa podría corresponder a un pentámero (470 kDa) o un hexámero (564 kDa). Sin embargo, al encontrar que los pesos

moleculares de las ureasas nativas de las especies *H. pylori*, *H. mustelae*, *H. felis* y *H. nemestrinae* correspondían a 568, 564, 597 y 566 kDa, respectivamente, se concluyó que la estructura de dicha enzima es un hexámero (80).

Si bien se ha propuesto que las subunidades de la ureasa se mantienen unidas por medio de cationes divalentes, aún no se ha determinado con exactitud la naturaleza de dichos elementos: Dunn et al (79) sugirieron la presencia de los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} y Turbett et al (80) propusieron la presencia de 6 átomos de níquel por molécula de ureasa (1 átomo por cada dímero UreA-UreB).

En cuanto a la localización de la enzima, ésta se encuentra en la superficie de la bacteria y no forma parte integral de la membrana externa. Dunn (79) et al extrajeron la ureasa con agua y después cuantificaron las células viables: entre un 50 y un 80% de las células de *H. pylori* permanecieron viables. Esto indica que la ureasa se encuentra en la superficie de la bacteria y que no se obtuvo como un producto de la lisis bacteriana. Además, por medio de una técnica en la que se emplea un isótopo de yodo, se identificó la subunidad UreB en la superficie de la bacteria.

Por último, y en relación a la homología con otras ureasas, la secuencia de aminoácidos de la unidad UreB presenta entre un 95 y un 100% de homología con respecto a las secuencias de las ureasas de otras especies de *Helicobacter*, mientras que la homología de la secuencia de UreA va del 75 al 92% (80). Adicionalmente se encontró homología entre la ureasa de *H. pylori* y la ureasa tanto de una especie de frijol conocida como "jack bean", así como con la ureasa de *Proteus mirabilis* (65 y 60% de homología, respectivamente, con la subunidad UreA). Por lo tanto, la

ureasa de *H. pylori* tiene similitud con las ureasas presentes en plantas y otras especies bacterianas.

Proteína de 19 kDa, proteína de membrana externa especie-específica

A partir de experimentos realizados en suero hiper inmune de conejo, así como en suero humano de pacientes infectados con *H. pylori* se ha podido comprobar una respuesta consistente de anticuerpos frente a una proteína antigénica de membrana externa, cuyo peso molecular es de 19 kDa. Dicha proteína pertenece al grupo de las OMP de *H. pylori* y es además un antígeno especie-específico.

Drouet et al (81) llevaron a cabo una serie de experimentos que permitieron comprobar la existencia de esta OMP de 19 kDa que es especie-específica para *H. pylori*. La primera parte del estudio consistió en obtener estas proteínas de membrana externa a partir de 26 cepas de *H. pylori*. El patrón de bandas observado en el corrimiento electroforético de dichas proteínas fue de seis bandas principales de 61, 54, 46, 40, 30 y 19 kDa. Después se procedió a transferir las proteínas de corrimiento electroforético a papel de nitrocelulosa y las proteínas se enfrentaron tanto a suero hiper inmune de conejo, así como suero de pacientes infectados con *H. pylori* y que presentaban gastritis. Se observó que el suero de conejo presentaba reactividad frente a las bandas de 120, 88, 61, 54, 30, 25 y 19 kDa, y que el suero de los pacientes presentaba reactividad principalmente frente a las bandas de 61, 25 y 19 kDa. El siguiente paso fue producir anticuerpos monoclonales contra la proteína de 19 kDa y se comprobó que reaccionaban específicamente frente a *H. pylori* pero no frente a otras especies de *Helicobacter* o de *Campylobacter*. Posteriormente, se enfrentó el anticuerpo monoclonal dirigido hacia la proteína de 19 kDa con los componentes del LPS de la bacteria, pero no hubo reacción.

Por último, se realizó un ensayo de microscopía inmunoelectrónica en el cual el anticuerpo monoclonal unido a la bacteria se acopló a inmunoglobulinas anti-murinas marcadas con partículas de oro de 5 nm; este ensayo permitió demostrar que el epítipo se encuentra en la superficie de la bacteria (81).

Proteína de 19.6 kDa, adhesina

H. pylori ha demostrado tener propiedades de adhesividad *in vivo* e *in vitro*, aunque dicha capacidad parece ser relativamente compleja ya que la bacteria produce una gran variedad de adhesinas. Además de la capacidad de adherirse a las células de la mucosa gástrica *in vivo*, se adhiere a diferentes especies de RBCs. En un estudio que se llevó a cabo con dos distintas cepas de *H. pylori* éstas mostraron diferentes especificidades en sus patrones de hemaglutinación. Una de ellas produjo un patrón de aglutinación fuerte con glóbulos rojos humanos pero no con RBCs de conejo, mientras que la otra produjo un patrón de aglutinación fuerte con RBCs de conejo, pero pobre con glóbulos rojos humanos.

En la superficie de la bacteria se ha detectado la presencia de una adhesina, la cual posee una subunidad con un peso molecular aparente de 19.6 kDa, misma que es capaz de adherirse a eritrocitos humanos y de conejo, así como a células epiteliales bucales humanas y a laminina. Esta capacidad de unión a laminina le permite a la bacteria colonizar cualquier membrana basal por medio de la unión a sus componentes. Por lo tanto, es posible la iniciación y continuación de la colonización de cualquier lesión ulcerativa formada.

La adhesina de 19.6 kDa pertenece a un grupo de proteínas afimbriadas, diferente a los grupos de adhesinas descritas previamente. Esta proteína no reaccionó con el anticuerpo monoclonal ni con los anticuerpos policlonales capaces de reconocer el

dominio adhesivo de la exoenzima S de *Pseudomonas aeruginosa*, además de que no es inhibible por *N*-acetilneuraminilactosa.

Aunque la proteína de 19.6 kDa se encuentra en cantidades significativas en la superficie de la bacteria, mostró una baja inmunogenicidad en conejos. Esta propiedad es importante en la patogenicidad de la bacteria ya que esta proteína no es capaz de generar una respuesta inmune agresiva. También se pudo comprobar que esta proteína es especie-específica, dado que no se produce en otras especies de *Helicobacter* (82).

Proteína de 27.3 kDa (HcpA)

El peso molecular de esta proteína es de 27.3 kDa y contiene 250 aminoácidos, de los cuales 14 (5.6%) son cisteína. Esta proteína es específica del género *Helicobacter* (78).

Proteína de 29 kDa, tipo envoltura flagelar

Aparte de los factores de patogenicidad de *H. pylori* ya mencionados (ureasa altamente activa, hemaglutininas, citotoxinas vacuolizantes), hay otros parámetros que están implicados en ésta y ellos son la motilidad de la bacteria y la expresión de flagelos. En *H. pylori* estos flagelos están compuestos por proteínas de diversos pesos moleculares, entre las que se encuentra una de 29 kDa que es especie-específica y que se encuentra en la envoltura.

A la envoltura flagelar y/o la proteína constitutiva se le atribuye la función de adhesión a las superficies de las células epiteliales gástricas. Otra posible función de dicha envoltura es la de proteger el flagelo de la disociación de sus unidades por efecto del ácido del estómago, por ejemplo. Sin embargo, independientemente de la función de la proteína de la envoltura del flagelo, su importancia radica en su

especificidad para *H. pylori*, ya que no se encuentra presente en otras especies de *Helicobacter* ni en otras especies bacterianas gastro-intestinales.

Para identificar esta proteína se empleó un anticuerpo monoclonal y se encontró que ésta está presente en todas las cepas de *H. pylori*, por lo tanto es especie-específica. Cabe destacar que aunque esta proteína es similar en peso molecular a UreA, es más pequeña y menos abundante que UreA.

A la envoltura flagelar y/o la proteína constitutiva se le atribuye la función de adhesión a las superficies de las células epiteliales gástricas. Otra posible función de dicha envoltura es la de proteger el flagelo de la disociación de sus unidades por efecto del ácido del estómago, por ejemplo. Sin embargo, independientemente de la función de la proteína de la envoltura del flagelo, su importancia radica en su especificidad para *H. pylori*, ya que no se encuentra presente en otras especies de *Helicobacter* ni en otras especies bacterianas gastro-intestinales (37).

Antígeno de peso molecular entre 33 y 35 kDa

Recientemente se descubrió una proteína antigénica cuyo peso molecular fluctúa entre 33 y 35 kDa, la cual es capaz de provocar la elevación de los niveles de IL-8 en la mucosa gástrica de los pacientes infectados. Esto se demostró a partir de un estudio en población japonesa, la cual estaba subdividida en 2 grupos: pacientes infectados con *H. pylori* (patologías: úlcera gástrica, úlcera duodenal, cáncer gástrico y gastritis crónica simple) diagnosticados por histología y un grupo de voluntarios asintomáticos (cultivo, serología e histología negativos). En este estudio se evaluó la respuesta inmune humoral por medio de WB, se efectuó el análisis histológico de las biopsias por medio de microscopía y se cuantificó la IL-8 en las biopsias de los pacientes por medio de la técnica de ELISA.

Se encontró que los pacientes con anticuerpos contra los antígenos en el rango de 33-35 kDa presentaban niveles más elevados de IL-8 con respecto a los pacientes que no tenían anticuerpos hacia dichos antígenos. Sin embargo, no es posible concluir a partir de este estudio si el antígeno es una proteína o diferentes proteínas con pesos moleculares semejantes. Además, se pudo demostrar que un 97.5% de los pacientes con úlcera gástrica o duodenal presentaban respuesta hacia dicho antígeno, mientras que sólo el 70% de los pacientes con gastritis crónica presentaba el mismo tipo de respuesta inmune. Por otro lado, este antígeno puede presentar variación en su peso molecular (33-35 kDa) debido a su variabilidad genotípica. Anteriormente, la producción elevada de IL-8 en la mucosa gástrica se atribuía a la presencia de la PAI en algunas cepas; sin embargo, este estudio demostró que la presencia de los antígenos de 33-35 kDa provocan el mismo efecto. Pese a que no fue posible demostrarse una asociación entre dichos antígenos y el grado de infiltración aguda o crónica ni con el grado de atrofia, sí se pudo observar que la infiltración de MNC fue significativamente alta tanto en el antro como en el cuerpo en los casos que presentaban anticuerpos contra el antígeno de 30 kDa (HB 2.0).

Por último, la expresión la proteína de 35 kDa no depende de la expresión de CagA, ya que se encontró que en 9 pacientes que presentaban reactividad hacia CagA no había anticuerpos hacia la proteína de 35 kDa (83).

Porinas

Las porinas de *H. pylori* son proteínas cuyo peso molecular fluctúa entre 25-50 kDa y tienen como función facilitar la difusión de moléculas hidrosolubles pequeñas a través de la barrera externa de la bacteria. Estas proteínas se clasifican en porinas no específicas con canales largos, las cuales miden de 0.6 a 2.3 nm de diámetro y

permiten la difusión no específica de sustratos, y en porinas específicas, que son aquéllas que tienen sitios de unión para sustratos. Las porinas están formadas principalmente por una estructura de hoja plegada β , la cual se mantiene compacta a través de la membrana, confiriéndole resistencia a la desnaturalización por SDS a bajas temperaturas. Además, no se encuentran asociadas al peptidoglicano y tienen secuencias aminoterminales y propiedades de solubilización que son semejantes entre sí (89).

Hasta la fecha se han identificado cinco porinas: HopA, HopB, HopC, HopD (89) y HopE (90). Los pesos moleculares de las primeras cuatro son 37, 38, 39 y 55 kDa (en condiciones normales) y 48, 49, 50 y 67 kDa (previa desnaturalización térmica), respectivamente. La última porina, HopE, tiene un peso molecular de 31 kDa y forma canales largos a través de la membrana, lo cuales también permiten la difusión de sustancias hidrosolubles (90). A diferencia de las otras tres porinas, HopA tiene dominios diferentes expuestos hacia la superficie (89).

Las porinas de *H. pylori* modulan las principales funciones de los granulocitos y podrían promover el reclutamiento de estas células inflamatorias *in vivo* desde la circulación y su acumulación en tejidos. Además, se ha demostrado que estas moléculas interfieren en la actividad fagocítica de los PMN, lo cual favorece la invasividad de *H. pylori*. También, estas proteínas inducen la liberación de mediadores del proceso inflamatorio, como TNF- α , IL-6, IL-8 y GM-CSF, los cuales favorecen la acumulación de PMN y granulocitos. La producción de GM-CSF aumenta el proceso inflamatorio y la infiltración de granulocitos, cuyo metabolismo se ve reducido, favoreciendo la invasividad de *H. pylori*. La IL-6 aumenta la inflamación y la liberación de IL-3 estimula la liberación de histamina, la cual a su

vez aumenta la secreción de HCl en las células parietales de la mucosa gástrica. Por último, la IL-4, así como el IFN- γ , otro mediador inflamatorio, modulan la selección de isotipos de inmunoglobulinas y la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, induciéndose con ello una respuesta inmune específica. Además, IFN- γ activa la producción de las NO en fagocitos, las cuales son extremadamente tóxicas para los tejidos (91).

Proteína de tipo HSP

La ureasa es una proteína que copurifica con una HSP de 60 kDa, aunque otros autores le han asignado un peso molecular de 56 kDa (78) y por lo tanto, miembro de una familia de chaperoninas (84).

Estas proteínas (HSPs) son altamente conservadas en todas las células procarióticas y eucarióticas y actúan junto con otras HSP (como la HSP10 o la proteína homóloga a la GroES) en el plegamiento y ensamblaje de cadenas polipeptídicas, sin pasar a formar parte de la estructura final. La síntesis de las HSPs se favorece cuando las células se exponen a factores de estrés ambiental tales como cambios rápidos de temperatura y la inflamación de los tejidos. Sin embargo, la mayoría de las HSPs son constitutivas y se expresan abundantemente aun en ausencia de estrés. Estas proteínas son esenciales para la viabilidad de las células en condiciones normales de crecimiento.

Debido a que esta proteína también se encuentra en células epiteliales, esto le permite a proteína de *H. pylori* evadir la respuesta inmune mediante un mecanismo conocido como mímica molecular.

Además, se han caracterizado hasta la fecha otras proteínas de este tipo y estas incluyen una homóloga de la familia de las HSP60 de *H. pylori* que tiene un peso

molecular 54 kDa, así como una HSP de 66 kDa que se induce en *H. pylori* mediante un choque térmico a 42 °C. De esta última proteína determinó su secuencia amino terminal y se comprobó que es idéntica a la de las HSP de 54- y 62 kDa reportadas previamente por Dunn et al (86) y por Evans et al, respectivamente (85).

Proteína de 75 kDa (BabA)

La adherencia de *H. pylori* al epitelio gástrico humano está mediada por el grupo fucosilado Lewis b (Le^b) presente en algunos tejidos y en eritrocitos. El fenotipo del factor de unión a Le^b está asociado al fenotipo *cagA* en *H. pylori*. La bacteria coloniza la mucosa humana gástrica por medio de la adhesión a las células epiteliales de la mucosa, así como a la capa de la mucosa que recubre el epitelio gástrico. Estas propiedades de adherencia protegen a la bacteria de la acidez extrema que presenta el lumen gástrico, así como del desplazamiento del estómago por fuerzas como las generadas por peristaltismo y vaciado gástrico. Los antígenos de los grupos sanguíneos fucosilados Le^b y H-1 se encargan de mediar la adherencia de *H. pylori* a las células gástricas epiteliales humanas in situ.

Se ha logrado caracterizar bioquímicamente e identificar a la adhesina de *H. pylori* capaz de unirse a los antígenos de grupo sanguíneo. En primera se determinó (por medio de marcaje radioactivo de grupos sanguíneos fucosilados con ¹²⁵I) que la adhesina en *H. pylori* tiene afinidad por los antígenos de los grupos sanguíneos Le^b y H-1. Además, se demostró que existe una alta prevalencia de actividad de unión a grupo sanguíneo en cepas aisladas de pacientes.

Además, se determinó por medio de microscopía electrónica, en la cual la cepa de *H. pylori* CCUG 17875 se expuso a los glicoconjugados Le^b marcados con biotina y después se reveló con anticuerpos anti-biotina marcados con partículas de oro de 10 nm, que BabA se encuentra en la pared celular externa de la bacteria pero no en

la envoltura flagelar (este dato es importante ya que implica que la composición protéica de las membranas de la superficie celular difiere de la envoltura flagelar).

También se determinó el peso molecular de BabA y éste es de 75 kDa. Otro análisis relacionado con la proteína fue la determinación de la secuencias de aminoácidos y nucleotídicas de dicha proteína (87).

Proteína de 77 kDa, tipo IROMP

Las bacterias requieren de hierro como un factor de crecimiento importante. Sin embargo, el cuerpo humano ha desarrollado un sistema de protección del hierro en el cual las glicoproteínas transferrina y lactoferrina captan dicho elemento y evitan que los invasores microbianos tengan acceso a éste. La carencia de hierro induce la síntesis de una variedad de proteínas bacterianas de membrana externa que están involucradas en la adquisición de dicho elemento. Estas proteínas, conocidas como IROMPs, se han encontrado en muchos patógenos, tanto *in vivo* como *in vitro*, y se asume que son factores de virulencia importantes. Algunas de esas proteínas son capaces de adquirir el hierro unido a compuestos como la hemina. Se considera también que la virulencia de la bacteria se debe, entre otros factores, a la habilidad de *H. pylori* para tomar hierro de un ambiente limitado como la mucosa del estómago.

En un estudio que se realizó con una cepa crecida en condiciones restrictivas y no restrictivas de hierro, las proteínas de *H. pylori* se enfrentaron a sueros de pacientes infectados (dolor abdominal recurrente, cultivo e histología positivos). Dichos sueros presentaron una reacción inmunogénica hacia una proteína de 77 kDa de tipo IROMP capaz de unirse al grupo hemo. La reactividad hacia la proteína de 77 kDa se presenta en el 100% de los casos estudiados (20/20), el 65% de los

sueros analizados presentaron una reactividad hacia una proteína de 37 kDa (también del grupo de las IROMPs).

Dicha proteína contiene al menos un epítoto inmunodominante, lo que sugiere que la proteína contiene un dominio no variable expuesto en la superficie, mismo que se podría requerir para la interacción con el componente del huésped (ya sea el grupo hemo o la hemoglobina).

Dado que la proteína de 77 kDa sólo se expresa *in vivo* y no en condiciones normales de crecimiento *in vitro*, ello implica un papel esencial en la patogénesis de *H. pylori*.

A diferencia de los marcadores de virulencia ya establecidos (como son la ureasa y CagA), la IROMP de 77 kDa es reconocida por el suero de todos los pacientes infectados por *H. pylori*. Por lo tanto, esta proteína puede ser de valor diagnóstico en la detección serológica de la infección con *H. pylori* (88).

En la Tabla 1 aparece un resumen de las proteínas mencionadas anteriormente.

TABLA 1. PROTEÍNAS DE IMPORTANCIA EN LA INFECCIÓN POR *H. pylori*

Peso molecular	Nombre	Función	Localización	Características
19 kDa	OMP	Multifuncional (adherencia, protección y estabilidad bacteriana)	Membrana externa	Antígeno especie-específico (81)
19.6 kDa	Adhesina afimbrial	Adhesión a células de la mucosa gástrica in vivo	Se encuentra en cantidades significativas en la superficie de la bacteria	Antígeno especie-específico Forma filamentosa Se adhiere a eritrocitos de conejo y humanos Baja inmunogenicidad (82)
25-50 kDa (89)	Porinas (89)	Facilitar la difusión de moléculas hidrosolubles pequeñas a través de la barrera externa de la bacteria (89)	Membrana externa (89, 90)	No se encuentran asociadas al peptidoglicano Tienen propiedades de solubilidad y secuencias aminoterminales semejantes entre sí (89) Modulan las funciones de los granulocitos, interfieren en la actividad fagocítica de los polimorfonucleares e inducen la liberación de mediadores del proceso inflamatorio (91)
27.3 kDa	HcpA	Desconocida		Proteína inmunogénica específica del género <i>Helicobacter</i> Proteína rica en cisteína (5.6% de los aminoácidos) (78)
29 kDa	Proteína flagelar	Adhesión del flagelo a la superficie de las células epiteliales gástricas Protección de la disociación de las unidades del flagelo por efecto de la acidez gástrica	Envoltura flagelar	Proteína especie-específica (37)

Peso molecular	Nombre	Función	Localización	Características
30 (79)-30.4 kDa (80), 62 (79)-64.3 kDa (80)	UreA y UreB	Es una enzima que genera amoníaco a partir de la urea en el microambiente inmediato a la bacteria, protegiéndola contra los efectos nocivos de la acidez gástrica. Sin embargo, a concentraciones elevadas el amoníaco ejerce un efecto tóxico en las uniones intercelulares, provocando una alteración en la permeabilidad de la mucosa gástrica (79)	Superficie de la bacteria (79)	Son subunidades de la ureasa que forman un dímero, el cual está unido mediante cationes divalentes (79, 80) Existe entre un 95-100% y un 75-92% de homología con UreA y UreB, respectivamente, con otras especies de <i>Helicobacter</i> (80) Se encuentran proporción 1:1 (79) La proteína nativa es un hexámero con un peso aproximado de 564 kDa (80)
33-35 kDa	No determinado	Provoca una elevación de los niveles de IL-8 y un aumento en la infiltración de PMNs en el cuerpo y el antro del estómago	No determinada	El gen que codifica para esta proteína no se encuentra en la isla de patogenicidad cag (83)
56 (78)-60 (84, 85) kDa	HSP	Participa en el plegamiento y ensamblaje de cadenas polipeptídicas, sin pasar a formar parte de la estructura final	Superficie celular	Su síntesis se favorece cuando las células se exponen a condiciones de estrés ambiental (cambios de temperatura e inflamación de tejidos) (84)
75 kDa	BabA	Adhesina que permite la unión a células epiteliales gástricas humanas in situ	Pared celular externa de la bacteria pero no en envoltura flagelar	Proteína que tiene afinidad por los antígenos Le ^b y H-1 de grupo sanguíneo en mucosa gástrica (87)

Peso molecular	Nombre	Función	Localización	Características
77 kDa (88)	IROMP	Adquisición de hierro, cuando hay carencia de éste, a partir de moléculas del huésped tales como el grupo hemo	Membrana externa	Su síntesis se induce cuando hay carencia del mineral (Fe) La proteína tiene un dominio no variable expuesto a la superficie, el cual es necesario para la interacción con la molécula del huésped que contiene al hierro (88)
87(76, 78) - 90 (77) kDa	VacA	Vacuolización de células epiteliales (76)	Superficie de la bacteria (la proteína se sintetiza y se secreta) (77)	La subunidad de 90 kDa está formada por un fragmento de 37- y otro de 58 kDa Al disminuir el pH se pierde la estructura oligomérica de la proteína, lo que facilita la unión y/o penetración de membranas (77)
120 kDa	CagA	Proteína necesaria para la transcripción, plegamiento, exportación o funcionamiento de la citotoxina (VacA)	Superficie de la bacteria	Gran variabilidad en su peso molecular Presencia de secuencias de aminoácidos que se repiten Alta inmunogenicidad (92)

RESPUESTA INMUNOLÓGICA HACIA *H. pylori* Y SU DIAGNÓSTICO POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE WB

Respuesta inmune celular hacia *H. pylori*

Las patologías más comunes asociadas a la infección con *H. pylori* son la gastritis crónica activa y la úlcera péptica. Sin embargo, la infección crónica a largo plazo es un factor de riesgo para el adenocarcinoma y el linfoma gástrico. Esta infección se caracteriza por la infiltración masiva de células inflamatorias de la lamina propia y la erosión del epitelio gástrico. Experimentos realizados en ratones han postulado que la severidad de la infección está relacionada con un subgrupo de cepas de la bacteria, conocidas como de tipo I. Estas cepas contienen un fragmento de ADN de 40 kbp (pares de kilobases), conocido como PAI, el cual codifica para un antígeno de superficie inmunodominante de aproximadamente 120 kDa (CagA). Adicionalmente, estas cepas producen la citotoxina vacuolizante A (VacA), la cual se cree es responsable de la erosión del tejido, además de otros factores que aun no se han identificado pero que se sabe inducen la producción de IL-8, citocina que puede ser responsable de la inflamación observada ya que actúa como un factor quimiotáctico y activante para los neutrófilos. Por otro lado, las cepas de tipo II carecen de dicha secuencia y por lo tanto no producen VacA ni CagA y sólo provocan gastritis moderada. La seropositividad para el antígeno CagA en el hombre está asociada con patologías como úlcera péptica y cáncer gástrico, que a su vez son las formas de enfermedad mas severas inducidas por *H. pylori*.

También existe la posibilidad de que el factor inductor de IL-8 provoque la expresión de otras citocinas, o por el contrario, que las funciones secretoras del PAI puedan regular la liberación de otros factores de virulencia involucrados en el

mantenimiento de la inflamación (como es el caso de IL-6 e IL-1 β ; así como la expresión del receptor para IL-2 en individuos infectados con la bacteria).

Proliferación de células Th1 durante la infección por *H. pylori*

Se ha comprobado que los antígenos liberados por *H. pylori* durante la infección inducen la síntesis de ciertas citocinas pro-inflamatorias en macrófagos. Dichas citocinas pueden ser las responsables del reclutamiento *in vivo* de células inflamatorias en la lamina propia.

Un grupo de células que se ha identificado en el sitio de la infección son los linfocitos Th1. Se ha evidenciado la presencia de dichas células a partir de la producción constitutiva de IFN- γ , el cual, junto con el TNF- α , podría contribuir a la inflamación inducida en la infección por *H. pylori*. Un estudio llevado a cabo a partir de biopsias gástricas de pacientes infectados con *H. pylori* y que presentaban úlcera péptica, permitió comprobar que el 80% de las células Th pertenecían al fenotipo Th1. Las clonas remanentes pertenecían al fenotipo Th0 y producían tanto citocinas de tipo Th1 como Th2 (IFN- γ , IL-4, IL-5 y TNF- α). Todas las clonas producían niveles elevados de la citocina inflamatoria TNF- α . Este estudio no sólo permitió comprobar que el fenotipo predominante de las células Th presentes en la infección por *H. pylori* es Th1, sino también que el 50% de las clonas Th1 eran específicas para el antígeno CagA. Esto último permite corroborar que CagA no sólo es un antígeno sistémico inmunodominante, sino también que es capaz de dirigir una respuesta inmune local de linfocitos de tipo Th1 en el sitio de la infección (Fig. No. 1) (93).

Fig. 1 Respuesta inmune celular hacia *H. pylori*

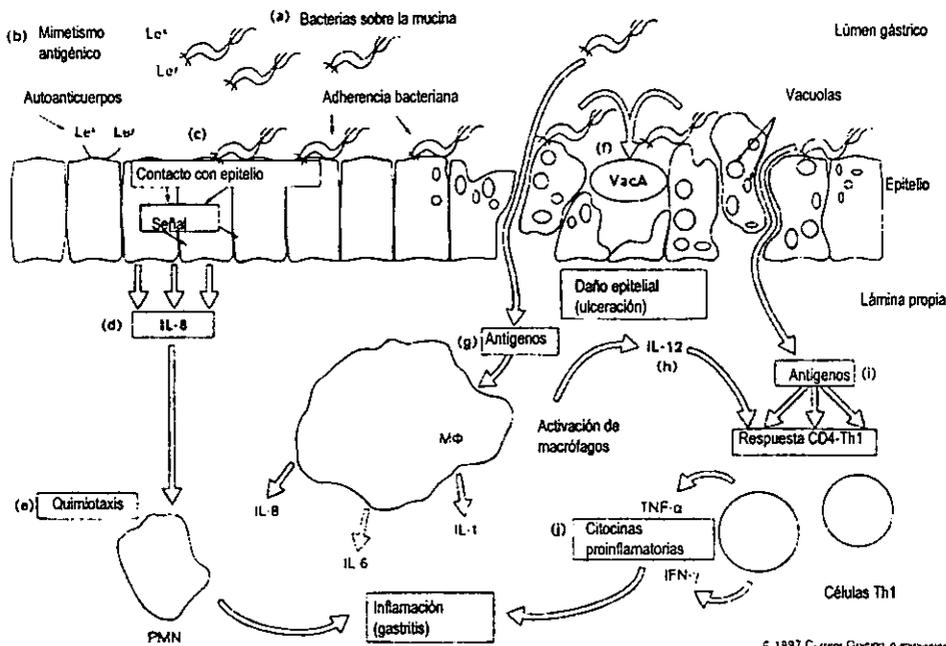


Fig. 1 *H. pylori* induce daño gástrico e inflamación. a) Infección por *H. pylori* lleva a la presencia de la bacteria en la mucina del lumen gástrico. Los lipopolisacáridos de *H. pylori* contienen los antígenos de grupo sanguíneo Le^a y Le^b. b) Así, *H. pylori* tiene la capacidad para inducir mimetismo antigénico de esas estructuras del hospedero que pueden llevar a la producción de autoanticuerpos contra Le^a y Le^b en el epitelio gástrico. Este proceso puede, en algunas circunstancias, ser importante para la inducción de enfermedad. c) Contacto con el epitelio, la bacteria que contiene la isla de patogenicidad tipo I induce, a través de señales, a las células epiteliales a d) síntesis y liberación de interleucina 8 (IL-8) quien (e) es fuertemente quimioatrayente de leucocitos polimorfonucleares (PMN). El contacto con el epitelio también conduce (f) a la liberación de factores de virulencia de *H. pylori* que juegan un papel importante en la enfermedad. La toxina VacA es el principal factor de virulencia que es considerada importante por la capacidad que le da a *H. pylori* para inducir daño epitelial gástrico (vacuolas), que finalmente conducen a úlcera péptica. Una actividad biológica de la toxina VacA es expresada sólo por bacterias tipo I. (g) Los antígenos de *H. pylori* que cruzan la bacteria epitelial son capaces de activar macrófagos (MΦ) para liberar algunas citocinas proinflamatorias, tales como IL-8, IL-6 y posiblemente IL-12. Así, la presencia de IL-12 es importante para polarizar la respuesta de CD4 dentro de un prominente fenotipo Th1. (h) Los antígenos de *H. pylori* pueden llevar también una respuesta de Th1 a un antígeno específico en el sitio de la infección y así la mayoría de las clones Th1 aisladas de pacientes con úlcera péptica tienen especificidad antigénica para la proteína CagA, que es expresada sólo por las bacterias tipo I. (i) Las células Th1 liberan citocinas proinflamatorias tales como TNF-α y IFN-γ, quienes contribuyen a mantener la gastritis. Estos efectos explican por qué las cepas de tipo I son las más patogénicas (93).

Respuesta inmune humoral hacia *H. pylori*

Además de la respuesta inmune celular que se presenta en la infección con *H. pylori*, el paciente también presenta una respuesta inmune humoral constituida por anticuerpos séricos (IgG) y en fluido gingival (respuesta inmune sistémica), así como en anticuerpos en jugo gástrico (IgA). Este tipo de respuesta inmune no tiene un papel significativo en la erradicación de la infección por *H. pylori*, pero sí tiene relevancia clínica ya que permite diagnosticar en forma indirecta la infección, como técnica de monitoreo y para dar seguimiento a la efectividad de tratamientos de erradicación de la infección (94).

Detección de la respuesta inmune humoral por medio de ELISA y WB

La detección de la respuesta inmune humoral por IgG ha demostrado ser la más útil desde el punto de vista clínico en el diagnóstico de la infección por *H. pylori*. Hasta la fecha, los ensayos que se utilizaban para detectar dicha respuesta eran los inmunoenzimáticos, como es el caso de la ELISA, aunque algunas desventajas relacionadas con éste incluyen la determinación del punto de corte para considerar una prueba positiva, el antígeno empleado y la reactividad cruzada principalmente contra algunas especies de *Campylobacter*. Por otro lado, debido a que esta técnica requiere mucho tiempo para llevarse a cabo se optó por otros ensayos más rápidos como el de la aglutinación en látex (95).

En la actualidad se utiliza la técnica de ELISA para la detección de IgA e IgG, así como para factores de virulencia, WB y pruebas inmunológicas para la detección de anticuerpos en saliva, entre otras.

Debido a que WB determina la respuesta serológica hacia una gran variedad de antígenos, proporciona más información que una ELISA. En un estudio en el cual se compararon las técnicas de WB y la de ELISA empleando un antígeno de extracción

compararon las técnicas de WB y la de ELISA empleando un antígeno de extracción ácida, se encontró que el WB tiene una correlación del 97.5% en pacientes con cultivo positivo; por el contrario, la correlación del ELISA varía entre un 87.5 - 92.5% (96). En la Tabla 2 aparecen los porcentajes en los que se diagnostica *H. pylori* por WB empleando diferentes kits (94).

Tabla 2. Kits comerciales de diagnóstico de la infección por *H. pylori* por medio de WB

Tipo de diagnóstico	Helico- blot 2.0	RIDA Blot Helicobacter	RIBA HP SIA
Diagnóstico de colonización (+)	97%	94%	98%
Diagnóstico de no colonización (-)	90%	92%	85%
Infección por cepa productora de CagA (+)	96%	94%	95%
Infección por cepa no productora de CagA (-)	55%	100%	55%
Infección por cepa productora de VacA (+)	100%	78%	95%
Infección por cepa no productora de VacA (-)	46%	100%	76%

Técnica de WB

La técnica que se describe a continuación es la descrita por Aucher (97). Se emplea un aparato Maxi-Gel y se efectúa una electroforesis (ver Anexo I) de los extractos bacterianos en un gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio. Se emplea un gel concentrador al 4% y uno separador con un gradiente del 8 al 16% de poliacrilamida. Antes de la electroforesis los extractos bacterianos (antígeno) se calientan a 100 °C durante 5 minutos en un buffer de Tris-HCl (pH 6.8) que contiene 1% de dodecil sulfato de sodio y 10% de β -mercaptoetanol. A cada uno de los pozos se agrega una cantidad de antígeno equivalente a 1 mg de proteína y una muestra con marcadores de peso molecular. El corrimiento electroforético se lleva a cabo a 150 V hasta que el colorante de azul de bromofenol haya salido del gel. Las proteínas se transfieren durante 1 h a membranas de

nitrocelulosa, empleando una celda de transferencia electroforética y bajo una corriente constante de 100 V. Después de la transferencia a las membranas de nitrocelulosa, éstas se cortan en tiras. La tira correspondiente a los marcadores de peso molecular de tiñe con rojo de Ponceau y se guarda para fines de calibración. Las otras tiras se incuban durante 1 h con una dilución del suero de los pacientes. Las tiras se lavan tres veces con buffer salino de Tris para WB (pH 8) y se incuban durante 1 h con anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa. Posteriormente, las tiras se lavan y se les adiciona α -naftol como sustrato para la reacción enzimática. La reacción se detiene a los 15 minutos mediante el lavado de las tiras con agua destilada.

Preparaciones antigénicas

Aunque todavía no se ha definido cuál es la preparación antigénica más adecuada para el diagnóstico serológico de la infección por *H. pylori*, se sabe que es más conveniente emplear una mezcla antigénica en lugar de antígenos purificados (como es el caso de las proteínas recombinantes), ya que ello aumenta la sensibilidad del método (97). A continuación se describirán los antígenos que se han empleado con mayor frecuencia en la técnica de WB, así como las técnicas de extracción de los mismos.

Lisado bacteriano: Esta técnica consiste en lisar el paquete bacteriano obtenido de medio sólido por medio de centrifugación. La cepa de *H. pylori* que se emplea expresa antígenos de importancia como VacA, CagA y el antígeno UreA de la ureasa. El paquete bacteriano se lava con PBS (la cual contiene NaCl 150 mM, fosfato de sodio 20 mM y pH 7.2) y se resuspende en una solución que contenga volúmenes iguales de PBS y Tris 120 mM pH 6.8 con SDS al 4%, glicerol

al 20%, mercaptoetanol al 10% y azul de bromofenol al 0.002%. Después el antígeno se somete a ebullición durante 5 minutos, se cuantifican las proteínas y se emplea en el ensayo de WB (98).

Antígeno de extracción ácida con glicina: Este método consiste en cultivar a la bacteria a partir de medio sólido, tomar 5 mg de células y resuspenderlas en 10 ml de buffer de glicina pH 2.2. Esta suspensión se centrifuga durante 30 minutos y después se ajusta el pH a 7.0 con hidróxido de sodio 1 M. Nuevamente, se centrifuga a 12,000-14,000 rpm durante 20 minutos y se separa el sobrenadante, el cual se dializa con agua. El dializado se concentra por ultrafiltración (Amycon) con un punto de exclusión de 10 kDa. Por último, se efectúa la cuantificación de proteínas en el concentrado y el antígeno se emplea en la técnica de WB.

Antígeno hidrosoluble: Este método consiste en cultivar a la bacteria a partir de placas de agar chocolate que se incuban durante 48 h, a 37 °C en condiciones de microaerofilia. El paquete obtenido de medio sólido se resuspende en 2 ml de solución de cloruro de sodio 0.15 M a 4 °C. La suspensión se mezcla con ayuda de un vórtex durante 60 s y posteriormente se centrifuga (10,000 x g durante 20 min a 4 °C). El sobrenadante se dializa durante una noche a 4 °C contra una solución de cloruro de sodio 0.15 M. Se determina la concentración de proteína del extracto salino resultante y se emplea en el ensayo de WB (97).

Sonicado de células bacterianas: Las células se obtienen de medio sólido y se suspenden en 2 ml de solución estéril de cloruro de sodio al 0.15 M a 4 °C. Posteriormente, las células se rompen por medio de ultrasonificación y se centrifugan a 15,000 x g durante 15 min. El sobrenadante se dializa contra una solución de

cloruro de sodio 0.15 M durante 48 h, se cuantifica la concentración de proteínas y se emplea en el ensayo de WB (97).

Proteínas de membrana externa: Existen dos métodos para la preparación de las proteínas de membrana externa de *H. pylori*. a) Preparación de membranas externas con sarcosina. El paquete celular se resuspende en Tris 20 mM pH 7.5. Las células se colectan por centrifugación (12 000 x g, 20 min, 4 °C), y se lavan tres veces con Tris 20 mM pH 7.5. Las células se resuspenden en Tris 20 mM pH 7.5 y se lisan por medio de una prensa francesa para células, prensando a 15 000lb/in² tres veces. Se agrega ADNasa (0.1 mg) y ARNasa (0.5 mg) y la mezcla se incuba a temperatura ambiente durante 30 min. Las células que no se lisan se remueven por centrifugación, conservándose el sobrenadante. Éste se centrifuga (40 000 x g, 30 min, 4 °C) para obtener las membranas totales. Las membranas se resuspenden en Tris 20 mM pH 7.5 que contiene sarcosina lauril sódico al 2.0% (p/v) y se incuban a temperatura ambiente durante 30 min. Las membranas externas se colectan por medio de centrifugación (40 000 x g, 30 min, 4 °C) y se lavan tres veces con agua desionizada. El botón se resuspende en agua desionizada, se determina la concentración de proteínas y se emplea en el ensayo de WB. b) Preparación de membranas externas con tritón. El tratamiento es similar al descrito, la única diferencia es que se emplea Tris 10 mM pH 7.5. Las membranas totales se colectan por centrifugación (40 000 x g, 30 min, 4 °C) y se resuspenden en Tris 10 mM pH 7.5 y sacarosa al 20%. Esta suspensión se ultracentrifuga en un gradiente de sacarosa de 52-58-64-70% (p/v) a 150 000 x g durante 18 h. Las bandas obtenidas a estos gradientes se lavan con Tris 10 mM pH 7.5 tres veces y se determina el contenido de proteínas, la actividad de SDH y el

contenido de LPS. La fracción que contiene la menor actividad de SDH y la más alta proporción de LPS es la preparación cruda de envolturas. La mayor parte de la envoltura interna remanente se remueve por medio de extracción con un 2% (v/v) de tritón X-100 o tritón X-114 en Tris 20 mM pH 7.5 (0.4 mg de proteína por mL (99).

Las técnicas anteriormente mencionadas se enfocan al aislamiento de un conjunto de proteínas de *H. pylori* y las que se mencionan a continuación tienen como objetivo el aislar una proteína en particular.

Antígeno recombinante: Un fragmento de ADN que contiene los nucleótidos 2776-3465 del gen *cagA*, derivado de la clona recombinante *gt11*, se digiere con *EcoRI* y se subclona el vector de expresión *pEX34b*. Las proteínas de fusión generadas del vector tienen la porción N-terminal de la MS2 polimerasa (aproximadamente 12 kDa) y la porción C-terminal codificada por el fragmento de ADN clonado. En este caso, las cepas de *E.coli* que contienen el plásmido producen altos rendimientos de una proteína de 37.5 kDa, derivada de la fusión de la MS2 polimerasa (12 kDa aminoterminal) y 239 aminoácidos de la proteína *CagA* (25.5 kDa carboxilo terminal). La manipulación del ADN se lleva a cabo por medio de procesos estándares. La proteína recombinante se purifica por el método de anticuerpos de inclusión. Después, se cuantifican las proteínas, se alicuotan y se almacenan a -20 ° hasta su uso (100).

Toxina vacuolizante: Esta técnica consiste en cultivar a la bacteria durante 72 h a 37 °C en caldo *Brucella* que contiene un 5% de suero fetal bovino. Se emplean condiciones de microaerofilia y se mantiene en agitación durante el período de incubación. El medio de cultivo se centrifuga a 12 000 x g durante 60 minutos y las

proteínas del sobrenadante libre de células se precipitan con un 50% de sulfato de amonio saturado a 4 °C. Después de un período de centrifugación a 12 000 x g durante 60 minutos a 4 °C, el botón se resuspende en PBS y posteriormente se dializa dos veces contra PBS. Por último, se determina la concentración de proteínas y se emplea en el ensayo de WB. (76).

Detección de la respuesta inmune humoral hacia *H. pylori* por medio de WB

En primera, es importante mencionar que este tipo de diagnóstico depende del antígeno utilizado. Es decir, entre menos específico sea el método de extracción u obtención del antígeno, se identificará un mayor número de proteínas. En la Tabla 3 se hace la comparación de la reactividad hacia diferentes bandas proteicas al utilizar distintos antígenos.

Tabla 3. Diferencias en la reactividad inmunogénica hacia *H. pylori* por medio de WB empleando tres antígenos diferentes.

Antígeno de extracción ácida (96)	Antígeno de células completas (70)	Proteínas de membrana externa (81)
110/120	150	120
87	120	88
66	75	61
64	60	54
60	56	30
57	50	25
52	47	19
47	36	
43	30	
31/33	27	
26/29	25	
	19	
	15	

Ya se describió en qué consiste la técnica de WB, así como las ventajas y las desventajas de los diferentes preparados antigénicos que se emplean en ésta. A continuación se presentará la Tabla 4, en la cual aparecen los porcentajes de

reactividad de sueros de pacientes infectados y no infectados hacia las distintas proteínas de la bacteria por medio de la técnica de WB.

Tabla 4. Relación de la reactividad de sueros de pacientes infectados y no infectados con *H. pylori* hacia las diferentes bandas proteicas en el ensayo de WB.

Peso molecular de la proteína (en kDa)	% de reactividad en pacientes infectados	% de reactividad en pacientes no infectados
14	97.1% (101), 36.6% (97)	49% (101), 12.3% (97)
16	48.8% (97)	1.8% (97)
19	59.4% (101)	0% (101)
25	53.6% (101)	0% (101)
29.5 - 30	91.3% (101), 63.4% (97), 93% (96)	0% (101), 29.8% (97)
35	63.4% (97)	10.5% (97)
42	58.5% (97)	7.0% (97)
46	53.7% (97)	14.0% (97)
48	34.1% (97)	7.0% (97)
51 (54, 56)	78.3% (101), 82.9% (97)	13.7% (101), 17.5% (97)
66	94.2% (101), 46.3% (97)	15.7% (101), 15.8% (97)
67 (66)	89.8% (101)	0% (101)
74 - 75	75.4% (101), 34.1% (97)	0% (101), 10.5% (97)
87 - 90	71% (101), 60.9% (97)	0% (101), 19.3% (97)
120- 125	85.5% (101), 70.7% (97), 90.7% (124)	0% (101), 19.3% (97)
180	68.1% (101)	0% (101)

Criterios de diagnóstico de la infección por *H. pylori* por medio de WB

Los criterios que se han empleado, principalmente, para efectuar el diagnóstico serológico de la infección por *H. pylori* por medio de WB se basan en el número de bandas inmunorreactivas y en la combinación de estas bandas.

En la Fig. 2 aparecen las principales bandas antigénicas de *H. pylori*.

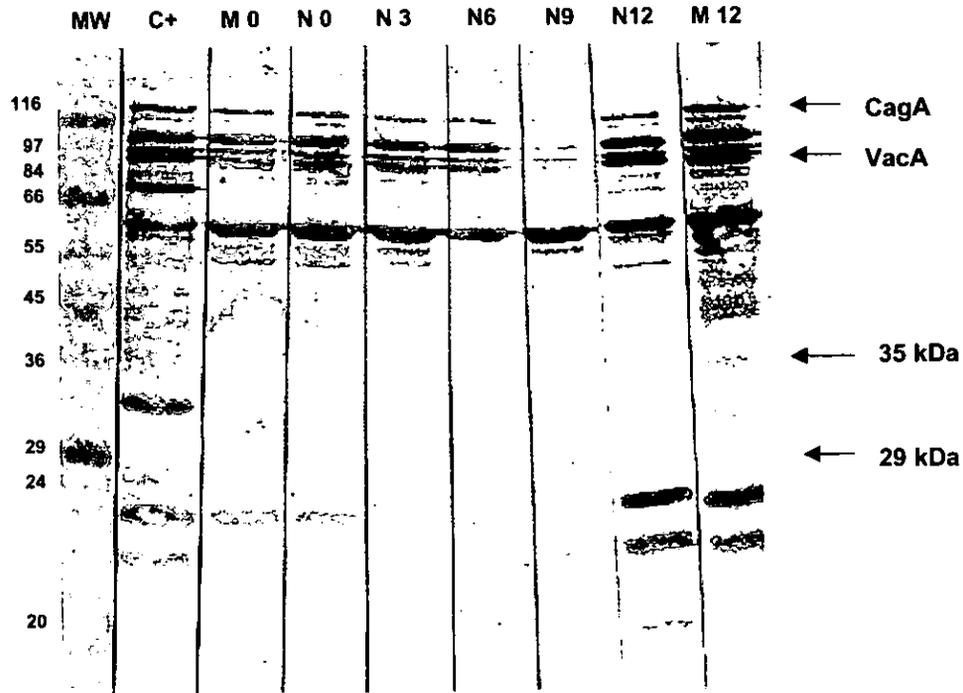


Fig. 2 Principales bandas antigénicas de *H. pylori*.

PM: marcadores de peso molecular; C+: Control positivo; M0: mamá al momento del nacimiento del niño; N0: niño recién nacido; N3, N6, N9 y N12: niño a los 3, 6, 9 y 12 meses, respectivamente; M12: mamá doce meses después del nacimiento del niño (123).

En la tabla que aparece a continuación (Tabla 5) se muestran los criterios que se tomaron en cuenta para considerar colonizado a un paciente con *H. pylori*.

Tabla 5. Criterios de colonización con *H. pylori*

Autor	Criterio de colonización con <i>H. pylori</i>
Aucher et al (97)	Cultivo (+) o la presencia de bacterias espirilares en biopsia y ureasa (+)
Faulde et al (101)	Ureasa (+) y observación directa de bacterias espirilares en biopsia (+)
Bazillou et al (102)	Diagnóstico de infección por medio de ELISA
Karvar et al (98)	Presencia de bacterias espirilares en biopsia y ureasa (+)
Nilsson et al (96)	Cultivo (+) y síntomas de úlcera duodenal, así como dolor abdominal no definido
Mitchell et al (125)	Cultivo (+)
Johansen (104)	Cultivo (+) u observación de HLO en biopsia (+)

a) Número de bandas inmunorreactivas

Bazillou et al y Aucher et al establecieron que un promedio de 7.7 y 8.1 (entre 1 y 15) bandas inmunorreactivas, respectivamente, es indicativo de infección por *H. pylori* en pacientes seropositivos por ELISA. Por el contrario, un promedio entre 2.4 y 1.4 (entre 0 y 5) bandas inmunorreactivas, respectivamente, es indicativo de diagnóstico negativo de infección (97,102).

b) Combinación de bandas inmunorreactivas

Se ha establecido otro criterio de diagnóstico en función de la combinación de ciertas bandas inmunorreactivas.

- Faulde et al determinaron que cualquier combinación de las bandas de 120, 90, 75, 67, 29.5 y 19 kDa sería indicativo de infección con *H. pylori* (101).
- Por otro lado, Aucher et al definieron otro criterio de diagnóstico de la infección por el cual la presencia de al menos una de las bandas de 54, 42 o 35 kDa es capaz de predecir la infección con una sensibilidad y una especificidad del 95% y del 82%, respectivamente (97).

- Karvar et al estableció otro criterio mediante el cual considera infectado a un paciente cuyo suero reacciona con al menos una HMMP (87-120 kDa) o al menos dos LMMPs (22-33 kDa) (98).
- Nilsson et al plantearon un criterio de diagnóstico que considera a un paciente positivo si hay reactividad hacia una de las bandas de 87, 94 o 110/120 kDa o hacia dos de cualquiera de las cinco bandas siguientes: 26, 29, 30, 31 y 33 kDa (96).
- Mitchell et al propusieron otro criterio, en el cual se considera positiva la infección con *H. pylori* si se presenta reactividad hacia al menos dos de las bandas siguientes: 19, 26, 29, 45, 60, 76 a 77, 120 y 128 kDa (125).
- Bazillou et al consideran que los antígenos reconocidos en el rango de 15 a 40 kDa (LMMPs) así como aquéllos con un peso molecular superior a 66 kDa (HMMPs) son específicos en la infección con *H. pylori* (102).
- Por último, Mitchell et al establecieron otro criterio que se basa en considerar positivo un suero que reaccione hacia al menos una banda de 116 kDa, de 89 kDa o de 35 kDa, o al menos dos de las bandas de 30 kDa, 26.5 kDa y 19.5 kDa (103).

c) Reactividad cruzada

Así como hay bandas específicas, también hay bandas de reactividad cruzada, las cuales se presentan entre algunas proteínas de *H. pylori* y proteínas de otras especies bacterianas. Esta reactividad ocurre debido a la semejanza en el peso molecular, en epítopes o en la estructura conformacional de la proteína. Este fenómeno ocasiona que el suero de un paciente infectado por una especie bacteriana que tenga proteínas que crucen antigénicamente con *H. pylori* reaccione

también con las proteínas producidas por éste último, dando lugar a un falso positivo. Algunos de los estudios en los que se ha evaluado la reactividad cruzada con *H. pylori* se mencionan a continuación:

- Faulde et al consideran que las proteínas de reactividad cruzada son las de flagelo (51, 52, 56 y 66 kDa) así como la de 14 kDa (101).
- Nilsson et al establecieron que las proteínas de 43 a 66 kDa, así como las Hsp, son las responsables de la reactividad cruzada con *T. pallidum*, *B. burgdorferi* y *Pseudomonas aeruginosa* (96).
- Doig et al demostraron también que existe reactividad cruzada de *Campylobacter coli* con respecto a las proteínas de membrana de *H. pylori* de 50- y 54 kDa (99).
- Karvar et al consideran que los anticuerpos dirigidos hacia MMMPs (43-66 kDa) tienen reacción cruzada con antígenos de otras especies bacterianas (98).
- Por último, Johansen et al comprobaron que existe reactividad cruzada con los antígenos de *H. pylori* en el suero de pacientes infectados con *Pseudomonas aeruginosa* o *Haemophilus influenzae*, así como en el suero de pacientes en recuperación por la infección aguda con *Campylobacter jejuni*. Se observó en este mismo estudio que existe reactividad cruzada fuerte con el antígeno de 14 kDa, así como con las proteínas de 27, 30 y 60 kDa (la HSP GroEL es equivalente al antígeno común de *Pseudomonas aeruginosa*). En estas tres últimas proteínas la reacción antigénica fue más débil (104).

En la Figura No. 3 se muestran las principales bandas de reactividad cruzada de *H. pylori* con otras especies bacterianas.

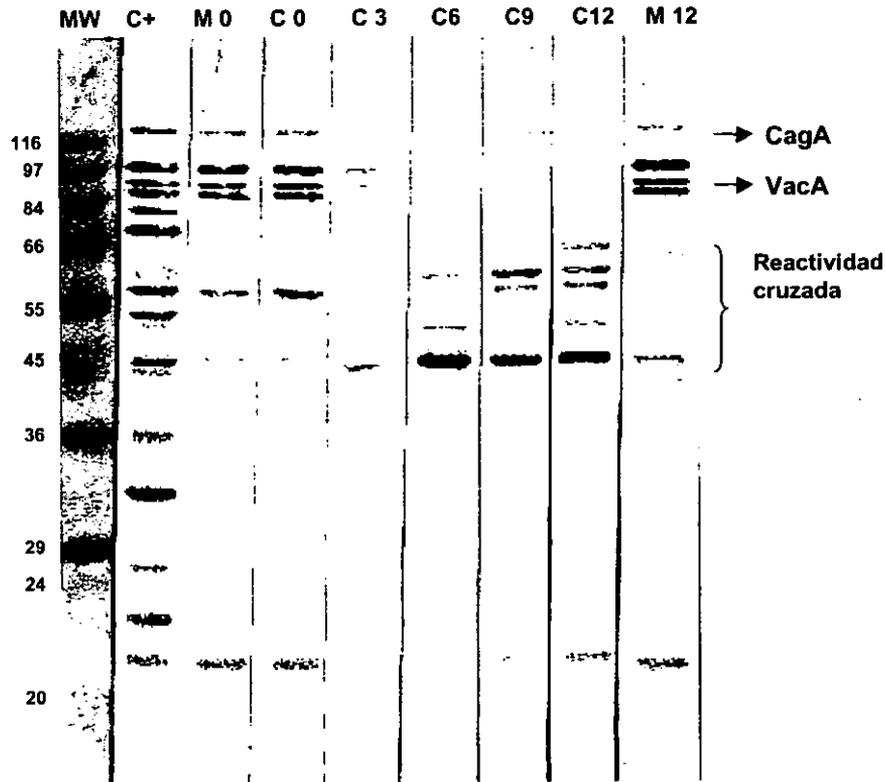


Fig. 3 Bandas de reactividad cruzada de *H. pylori* con otras especies bacterianas.

PM: marcadores de peso molecular; C+: Control positivo; M0: mamá al momento del nacimiento del niño; N0: niño recién nacido; N3, N6, N9 y N12: niño a los 3, 6, 9 y 12 meses, respectivamente; M12: mamá doce meses después del nacimiento del niño (123).

SEVERIDAD DE LA INFECCIÓN POR *H. pylori*

La severidad de la infección por *H. pylori* puede provocar úlcera duodenal, MALT y cáncer gástrico. Estas tres patologías se han asociado con la respuesta inmune del paciente dirigida hacia ciertas proteínas antigénicas de la bacteria que pudieran funcionar como marcadores de patogenicidad.

A continuación se describe el desarrollo de éstas patologías y la respuesta inmune humoral del huésped.

Úlcera duodenal

El riesgo de úlcera duodenal está potenciado por la infección por *H. pylori* (especialmente las cepas con la PAI *cag* intacta), el cual actúa como iniciador del proceso inflamatorio (121). La infección del antro provoca una hipersecreción de ácido gástrico, lo que origina el desarrollo de una metaplasia gástrica en el bulbo duodenal. Ésta es un prerrequisito para la colonización del bulbo por la bacteria (122). El daño progresivo del duodeno promueve el desarrollo de la metaplasia gástrica, por lo que se generan más sitios para la colonización de la bacteria y aumenta la inflamación. Este ciclo provoca que el bulbo duodenal sea incapaz de neutralizar el ácido proveniente del estómago hasta que los cambios en la estructura y la función del bulbo son suficientes para el desarrollo de una úlcera (121).

Estudios recientes han permitido comprobar que existe una asociación entre la presencia de anticuerpos dirigidos contra los antígenos CagA y VacA y la presencia de úlcera duodenal, en el caso de la población occidental. Por el contrario, la población oriental se caracteriza por presentar anticuerpos dirigidos hacia dichos

antígenos independientemente de la patología, por lo que no pueden considerarse a CagA ni a VacA como marcadores de patogenicidad en esta población.

Población oriental:

En el caso de la población oriental, diversos estudios han permitido comprobar que el suero de los pacientes infectados por la bacteria presenta anticuerpos que reconocen a CagA, independientemente de la patología que el microorganismo ocasione. Por ejemplo, Kumar et al evaluaron a un grupo de hindúes y comprobaron que no había diferencia en los títulos de anticuerpos contra CagA en pacientes con úlcera duodenal y en pacientes con dispepsia no ulcerosa (111).

Asimismo, se observó el mismo tipo de respuesta en una población africana integrada por pacientes sanos y por otros que presentaban diversas patologías. El cuadro que aparece a continuación presenta los porcentajes de reactividad hacia CagA en dicho grupo:

Grupo en estudio	Porcentaje de pacientes con anticuerpos anti-CagA
Pacientes con úlcera duodenal	100%
Pacientes con duodenitis	89%
Pacientes con gastritis macroscópica	78.9%
Voluntarios sanos (endoscopia normal)	87.7%

Debido a que los porcentajes de reconocimiento de CagA fueron elevados tanto en el grupo de pacientes como en el de voluntarios sanos, se sugiere que otros factores distintos a CagA intervienen en la patogénesis de la úlcera en esta población (112).

En otro estudio que se efectuó en un grupo de japoneses, se determinó la presencia de anticuerpos anti-CagA por medio de WB. Del grupo de pacientes infectados con

H. pylori y que presentaban úlcera gástrica, úlcera duodenal, gastritis crónica, cáncer gástrico y mucosa normal, la reactividad hacia la proteína CagA fue 89%, 87%, 90%, 94% y 93%, respectivamente. Esto permite concluir que la mayoría de las cepas de *H. pylori* que infectan a los japoneses son productoras de CagA (113).

Shyu et al efectuaron un estudio en Taiwan, el cual tuvo por objeto determinar la prevalencia de la infección por *H. pylori*. Se observó que el 98.7% de los sueros positivos para *H. pylori* presentaban anticuerpos hacia CagA. Por lo tanto, los pacientes infectados con *H. pylori* en la población taiwanesa tienen reactividad contra la proteína CagA y no se considera ésto como un factor de predisposición para el desarrollo de cuadros más severos como úlceras o cáncer gástrico (114).

Por otro lado, Cover et al evaluaron a un grupo formado por 47 pacientes belgas (Occidente), 16 marroquíes (Medio Oriente) y un subgrupo formado por 3 africanos no marroquíes, 7 italianos, 5 turcos, 4 españoles, 2 griegos y 2 europeos orientales. De los marroquíes, el 18.8% presentó úlcera duodenal, el 16.0% úlcera gástrica y el 15.4% dispepsia no ulcerosa. El 31.3% de las cepas aisladas de este grupo de pacientes eran *cagA*⁺. Este porcentaje era significativamente menor que el 73.7 y 82.6%, correspondientes al grupo de pacientes belgas y al de pacientes no marroquíes, respectivamente. Además, tres de los cuatro pacientes con úlcera duodenal que no mostraron evidencia bacteriológica o serológica de infección con una cepa *cagA*⁺ pertenecían al grupo de pacientes marroquíes. Por lo tanto, se ha planteado que la asociación entre cepas de *H. pylori cagA*⁺ y el desarrollo de úlcera duodenal es más evidente entre algunos grupos raciales o étnicos que en otros o que hay factores adicionales que aún no se han identificado que contribuyen a la ulceración duodenal en pacientes marroquíes (115).

Con respecto a la importancia de la proteína VacA en la severidad de la infección, Ogura et al estudiaron a un grupo de pacientes japoneses infectados por *H. pylori*. Se encontró que el 89.4% de los pacientes estaban infectados y de éstos el 92% presentaba anticuerpos hacia VacA. Los porcentajes de reactividad frente a VacA fueron 85%, 95%, 95% y 100%, para úlcera gástrica, úlcera duodenal, gastritis crónica y mucosa normal por endoscopia, respectivamente. No hubo una diferencia significativa en la seropositividad entre los grupos. Por lo tanto, la mayoría de las cepas de *H. pylori* en Japón producen la citotoxina vacuolizante *in vivo* independientemente del tipo de patología gastroduodenal (116).

Población occidental:

La respuesta inmunológica humoral hacia CagA y VacA en este grupo, es significativamente más alta en pacientes con úlcera duodenal que en pacientes con otras patologías como gastritis crónica y dispepsia no ulcerosa.

Un estudio que Holtmann et al llevaron a cabo en Alemania permitió determinar que la infección con *H. pylori* es significativamente más alta en pacientes con úlcera duodenal (100%) que en pacientes con dispepsia funcional (60%). Sin embargo, sólo la respuesta hacia el antígeno de 91 kDa (VacA) fue significativamente más alta en pacientes con úlcera con respecto al grupo control (individuos sanos) (117).

Además, Mitchell et al demostraron, a partir de un estudio llevado a cabo en pacientes con úlcera duodenal y con DNU, que la presencia de anticuerpos anti-CagA en el suero del primer grupo fue significativamente mayor que en el segundo grupo (89.6% contra 66.7%) (103).

También, a partir de diversos estudios que se han efectuado en Estados Unidos, Gran Bretaña e Italia, en los cuales se ha investigado la respuesta de anticuerpos

hacia CagA en suero y en mucosa, se ha demostrado que existe una fuerte correlación entre la presencia de éstos y la presencia de úlceras (115).

Por último, un estudio que se efectuó en Francia permitió determinar que la presencia de anticuerpos contra las proteínas CagA, VacA y la proteína de 35 kDa se expresan frecuentemente en pacientes con úlceras. El anticuerpo anti-VacA, sin embargo, es un marcador de úlceras más poderoso que el dirigido hacia CagA. Se asume que esto se debe a que la citotoxina vacuolizante está involucrada en el mecanismo de la lesión ulcerativa de la mucosa. El anticuerpo dirigido contra la proteína de 35 kDa parece ser el mejor marcador de úlceras, y la presencia simultánea de éste y del anti-VacA predice con buena sensibilidad (83%, ensayo de WB) la predisposición al desarrollo de úlceras; por el contrario, la especificidad (69%) es baja y puede atribuirse al hecho de que las úlceras pépticas están presentes en forma intermitente y ciertos pacientes pueden no presentar ulceración en el momento de la endoscopia, aunque más tarde evolucionen a un estado ulceroso (97).

Estos resultados coinciden con estudios que se han llevado a cabo con anterioridad en países desarrollados, en los cuales la respuesta inmunológica frente a ambos antígenos (CagA y VacA) se encuentra aumentada en los pacientes con úlcera duodenal. Esto sugiere que ambos antígenos pueden ser marcadores de cepas más virulentas de *H. pylori* (117).

MALT

Se ha podido comprobar que el MALT en el estómago es una de las consecuencias de la infección por *H. pylori* y si bien otros agentes diferentes de esta bacteria provocan el desarrollo de este tipo de tejido, se cree que en más del 90% de los

casos la infección por *H. pylori* es la responsable de la inducción de tejido linfoide en el estómago. Este tipo de patología está caracterizado tanto por la presencia de cierto tipo de células como por una histología particulares. Además, estudios recientes han demostrado que existe una alta prevalencia de anticuerpos dirigidos contra la proteína CagA de *H. pylori* en pacientes con este tipo de linfoma, por lo que se intuye que esta proteína está involucrada en el desarrollo de esta patología.

El MALT es un sistema de defensa inmune para controlar en forma local la infección causada por *H. pylori*. Está compuesto por células T reactivas frente a *H. pylori*, células plasmáticas y otras células de tipo B y semeja a los folículos linfoides característicos en los tejidos linfoides típicos. La localización del MALT gástrico concide con el sitio de infección por *H. pylori*, el antro. Además, el número de folículos linfoides en el estómago se correlaciona con el grado de inflamación inducida por *H. pylori*.

El MALT se destaca por ser diferentes de otros tipos de linfoma. Emerge de la zona marginal del folículo linfoide y consta de células tipo centrocitos, así como de lesiones de tipo epitelial, mismas que deben presentarse para establecer un diagnóstico de MALT gástrico. Aparte de los criterios histológicos ya mencionados se ha establecido un sistema de graduación que facilita la determinación de la variación interindividual. Adicionalmente, se ha detectado una elevada expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en las células del linfoma. Además, este tipo de patología presenta una baja proporción de células en proceso de apoptosis. Por último, se ha planteado que la interacción de un ligando para CD40 (presente en las células T) con el CD40 (expresado en las células B) puede tener un papel causal en el desarrollo de esta patología (118).

A partir de un estudio que se llevó a cabo en pacientes con MALT, pudo comprobarse que existe una asociación entre dicha patología y la presencia de anticuerpos dirigidos contra *H. pylori* así como contra CagA. Se comprobó que el 98.5% de los pacientes con MALT fueron seropositivos para CagA. Un total del 95.4% de los pacientes con linfoma de bajo grado, así como el 100% de los pacientes con linfoma secundario de alto grado y el 100% de los pacientes con linfoma de alto grado presentaban anticuerpos contra la bacteria. Además, se demostró que un 95.5% de los sueros de los pacientes presentaron reactividad frente a una proteína CagA recombinante. El 95.2% de los pacientes con linfoma de bajo grado, el 90% de los pacientes con linfoma secundario de alto y grado y el 97.2% de los pacientes con linfoma de alto grado mostraron reactividad frente a dicha proteína. Por el contrario, al comparar dicha respuesta con la presentada por una población de pacientes con gastritis crónica e infectados con la bacteria, ésta última mostró sólo un 67% de reactividad frente a la proteína. Por lo tanto, sí fue posible establecer que el porcentaje de pacientes con MALT (95.5%) que presentaron reactividad frente a la proteína CagA es significativamente más alto con respecto al porcentaje de reactividad frente a la misma proteína en los pacientes con gastritis crónica (119).

Por otro lado, un estudio llevado a cabo en pacientes con MALT reveló que no existe una asociación entre la presencia de cepas productoras de CagA y el desarrollo de esta patología. Dicho estudio consistió en aislar al microorganismo a partir de biopsias y determinar la presencia de la secuencia de cagA por medio de PCR. En dicho estudio participaron 30 pacientes de los cuales 12 eran positivos para *H. pylori* por PCR y de dicho subgrupo 7 de los 12 pacientes (58%) eran

positivos para *cagA* por la misma metodología. El grupo control constaba de 77 pacientes infectados con *H. pylori*, de los cuales 38 presentaban úlcera péptica y los otros 39 padecían de DNU. Se encontró que la prevalencia de cepas productoras de citotoxina no fue significativamente más alta en pacientes con MALT (58%) con respecto a los pacientes con dispepsia funcional (65%) (120%).

Como puede observarse, no hay concordancia en los resultados obtenidos a partir de ambos estudios y esto puede atribuirse a los controles seleccionados, ya que en el primer caso eran pacientes con gastritis crónica y en el segundo pacientes con dispepsia. Además, debe considerarse que no se efectuó el mismo tipo de ensayo en ambos casos. A diferencia de los ensayos moleculares, la serología permite detectar la respuesta de anticuerpos a todas las cepas independientemente de sus concentraciones relativas en el estómago y no están influenciadas por las mutaciones que pueda sufrir el genoma de *H. pylori*, por ejemplo la pérdida de la secuencia *cagA*. Por lo tanto, la serología es un indicador más sensible de la infección con cepas *CagA*⁺ (119).

Cáncer gástrico

Aunque hasta la fecha no se conoce totalmente de qué manera la presencia de *H. pylori* está asociada con el desarrollo de cáncer gástrico, se postula que tanto la inflamación gástrica como la alteración de los mecanismos de defensa del huésped son factores que favorecen el desarrollo de dicha enfermedad. Aparentemente, la colonización de la mucosa gástrica por el microorganismo ocasiona infiltración de células inflamatorias, provocando un proceso de inflamación crónica que permite que la colonización por *H. pylori* continúe. Sin embargo, hay diferencias notables en la severidad de la inflamación de la mucosa gástrica debido a diferencias en la

cepa de la bacteria así como en la respuesta inmune del huésped. Aunque existen diferentes grados de atrofia de la mucosa, probablemente ésta ocurre a lo largo del tiempo debido a la influencia de una inflamación prolongada. También se ha comprobado que hay una asociación entre el título de anticuerpos y el desarrollo de cáncer gástrico, lo que sugiere que niveles elevados de inflamación preceden a la mutagénesis y al cáncer gástrico. Posiblemente la inflamación interactúa con otros factores (ambientales o hereditarios) relacionados con la carcinogénesis y el resultado es el cáncer de tipo intestinal o el cáncer gástrico temprano (105).

A partir de diversos estudios que se han llevado a cabo hasta la fecha, ha sido posible comprobar que las proteínas VacA y CagA de *H. pylori* están asociadas con el desarrollo de cáncer gástrico en pacientes infectados con la bacteria. En estos pacientes se han encontrado anticuerpos contra las proteínas VacA y CagA y se ha comprobado que el riesgo de tener cáncer cuando se encuentran anticuerpos contra estas proteínas es de 1.7 y 1.6 veces, respectivamente.

Rudi et al evaluaron a una población de pacientes con cáncer gástrico y encontró que un 97.4% de los pacientes con un diagnóstico positivo para *H. pylori* por WB presentaron anticuerpos contra VacA o CagA, mientras que los anticuerpos dirigidos contra tales proteínas eran menos frecuentes en el grupo control con diagnóstico positivo para *H. pylori* (106).

En una población de pacientes con cáncer e infectados con *H. pylori*, Parsonnet et al encontraron que las cepas productoras de CagA tienen tres veces más probabilidades de provocar cáncer con respecto a las cepas que no producen dicha proteína (107).

Por último, Crabtree et al evaluaron a un grupo de pacientes con cáncer gástrico y a un grupo control constituido por pacientes con DNU. Encontró que el 91% los pacientes con cáncer gástrico reconocían, en su mayoría, una proteína de 120 kDa (CagA), comparado con los pacientes con DNU, los cuales presentaron un reconocimiento de la proteína de 120 kDa de apenas el 72% (108).

En un estudio llevado a cabo por Wang et al se identificó otra proteína antigénica de 26 kDa que funciona como marcador de infección por *H. pylori* en pacientes con cáncer gástrico. Al analizar una mezcla de sueros de pacientes con dicha patología y una mezcla de sueros de pacientes sin cáncer, se encontró que había reconocimiento de esta proteína únicamente en el primer pool de sueros. Asimismo, al obtener la proteína recombinante y realizar un WB con los sueros individuales de ambos grupos de pacientes, se obtuvo como resultado que un 25% de los sueros de los pacientes con cáncer gástrico reaccionaron con la proteína recombinante, mientras que ninguno de los sueros del grupo control reaccionó contra dicha proteína (109).

Respecto a la relación entre la edad del paciente y su riesgo de progresar a cáncer gástrico, en el caso de que se encuentre infectado con *H. pylori*, se encontró que los pacientes infectados menores de 50 y 65 años tenían un riesgo de 8.00 y 2.33, respectivamente, de progresar a cáncer con respecto a los pacientes infectados mayores de 65 años. Además, se encontró que los pacientes menores de 65 años y que presenten anticuerpos dirigidos contra VacA tienen un riesgo del 2.33 de progresar a cáncer gástrico con respecto a los pacientes mayores de dicha edad. Por el contrario, los pacientes con cáncer y mayores de 65 años no presentaron diferencias significativas en la presencia de anticuerpos contra *H. pylori*, CagA o

VacA con respecto al grupo control. Por lo tanto, la elevada seroprevalencia de anticuerpos anti VacA en el grupo de pacientes más jóvenes con cáncer gástrico comparado con el grupo control, sugiere que la infección con cepas de *H. pylori* productoras de VacA constituye un factor de riesgo en el cáncer gástrico (106).

Finalmente, la presencia de anticuerpos dirigidos contra las proteínas de 120 y 87 kDa (CagA y VacA, respectivamente) se ha asociado como un factor de riesgo de cáncer gástrico en pacientes infectados con *H. pylori*, mismo que se ve incrementado en forma notoria en grupos de pacientes menores de 50 años.

DISCUSIÓN

La técnica de WB es una prueba no invasiva que permite efectuar un diagnóstico de la infección por *H. pylori* con una sensibilidad del 97% (98) al 100% (101) y una especificidad del 85% (98) al 100% (101). Sin embargo, es conveniente llevar a cabo esta prueba en forma simultánea con otra prueba diagnóstica debido a que los títulos de anticuerpos se mantienen durante 3-6 meses después de haber sido erradicada la infección, lo que da lugar a falsos positivos. Como alternativa, si sólo se cuenta con ésta prueba diagnóstica positiva y el paciente presenta síntomas de patologías ocasionadas por *H. pylori*, el paciente puede considerarse infectado con esta bacteria. Para validar la técnica de WB, los diferentes autores que se consultaron a lo largo de esta revisión, definieron colonizados a los pacientes que presentaban más de una prueba diagnóstica positiva. La prueba que se considera estándar de oro y que sola puede definir colonización es el aislamiento de *H. pylori* de biopsias gástricas. Sin embargo, tomando en cuenta que no siempre se aísla la bacteria, se emplean el análisis histológico de la biopsia con la observación de la bacteria y la prueba de ureasa positiva en biopsia. Es importante señalar que los investigadores que han validado la técnica de WB no emplearon como prueba diagnóstica la técnica de PCR.

El diagnóstico de la infección de *H. pylori* mediante la técnica de WB puede efectuarse ya sea considerando el número de bandas inmunorreactivas (97, 102) o la combinación de las mismas (96, 87, 98, 101, 102, 103, 125). En el primer caso, un promedio de 7.7 y 8.1 bandas es indicativo de infección, mientras que un promedio de 2.4 y 1.4 bandas sugiere que el paciente no se encuentra infectado con la bacteria (97, 102). La desventaja que presente este criterio es que no

considera la existencia de proteínas producidas por otras especies bacterianas, las cuales cruzan antigénicamente con algunas proteínas de *H. pylori*. Tal es el caso de las bandas de 43-66 kDa, las cuales tienen reactividad cruzada con algunas proteínas presentes en *T. pallidum*, *B. burgdorferi*, *Pseudomona aeruginosa*, *Campylobacter coli*, *Haemophilus influenzae* y *Campylobacter jejuni* (96, 98). Esto puede ocasionar el diagnóstico de falsos positivos.

El segundo criterio de diagnóstico se fundamenta en considerar positivo el diagnóstico siempre y cuando haya reactividad hacia una HMMP o hacia dos LMMP. Se consideran HMMP a las siguientes: 110/120 (96), 116 (103), 99 (96), 89 (103) y 87 (96). Por otro lado, las LMMP son las que se mencionan a continuación: 19.5 (103), 26 (96), 26.5 (103), 29 (96), 30 (96,103), 31 y 33 (96). Karvar et al (98) no asignan pesos moleculares a las HMMP ni a las LMMP, sino que establecen intervalos para éstas, los cuales abarcan de 87 a 120 kDa para las HMMP y de 22 a 33 kDa para las LMMP. Tomando como base estos criterios, se sugiere uno nuevo que considere positiva una prueba en la que haya reactividad hacia una HMMP o hacia dos LMMP, siendo los rangos para éstas de 87 a 128 kDa y 19.5 a 42 kDa, respectivamente. Al ampliar el rango de las LMMP hasta 42 kDa, y no hasta 33 kDa como lo proponen en Karvar et al (98), permite incluir a la proteína de 35 kDa, la cual es considerada por Mitchell et al (103) tan importante como las proteínas de 116 y 89 kDa (CagA y VacA, respectivamente) desde el punto de vista diagnóstico. Adicionalmente, la relevancia de este criterio se fundamenta en que descarta la reactividad cruzada con las MMMP.

Por otro lado, puesto que las proteínas son de importancia diagnóstica en la técnica de WB, es necesario llevar a cabo una selección adecuada de la preparación

antigénica. En la Tabla 3 se compararon los patrones de bandas obtenidos con el antígeno de extracción ácida con glicina, el antígeno de células completas y las proteínas de membrana externa. Aquél que genera un número mayor de bandas es el antígeno de células completas.

En cuanto a la relación de la severidad de la infección por *H. pylori* con distintas patologías provocadas por el microorganismo, se han encontrado dos tendencias distintas en el caso de los pacientes con úlcera duodenal. La primera abarca a los pacientes orientales (por ejemplo, japoneses y africanos, entre otros), los cuales presentan anticuerpos contra VacA (116) y contra CagA (111-114), independientemente de que presenten un cuadro de úlcera duodenal o uno más severo como cáncer gástrico. Por el contrario, los pacientes occidentales presentan cuadros de úlcera cuando la infección está ocasionada por cepas productoras de CagA (97,103,115) y VacA (97,117). Se considera que la respuesta inmune hacia esta última proteína (VacA) es de mayor relevancia a nivel diagnóstico puesto que la citotoxina vacuolizante está involucrada en el mecanismo de lesión ulcerativa. También, se ha considerado al antígeno de 35 kDa como un buen marcador en el diagnóstico de úlceras (97).

Respecto al MALT, hay estudios que sí establecen una correlación entre la respuesta inmunológica hacia CagA y el desarrollo de esta patología (119), mientras que otros afirman que esto no es cierto (120).

Por último, el desarrollo de cáncer gástrico está relacionado con la presencia de anticuerpos hacia las proteínas CagA (106,107,108), VacA (106) y hacia una proteína de 26 kDa. Además, el riesgo de progresar a cáncer gástrico en pacientes infectados por *H. pylori* se ve aumentado en pacientes jóvenes (menores de 65

CONCLUSIONES

1. La técnica de WB permite diagnosticar la infección con *H. pylori* con una sensibilidad del 97% (98) al 100% (101) y una especificidad del 85% (98) al 100% (101). Para validar esta técnica se considera como estándar de oro el aislamiento de la bacteria a partir de biopsias gástricas o en su defecto el análisis histológico de la biopsia con la observación de la bacteria y la prueba de ureasa positiva en biopsia.
2. Para considerar positivo el diagnóstico de la infección con *H. pylori* mediante WB es necesario que se presente reactividad hacia una HMMP o hacia dos LMMP, las cuales se encuentran en los rangos de 87 a 128 kDa y 19.5 a 42 kDa, respectivamente.
3. La preparación antigénica más adecuada es el antígeno de células completas, el cual permite obtener un mayor número de bandas protéicas.
4. Tomando en consideración los puntos 2 y 3, podría producirse un kit comercial de diagnóstico de la infección con *H. pylori*.
5. En pacientes occidentales con úlcera duodenal hay una incidencia mayor de infección con cepas productoras de VacA y CagA. La reactividad hacia la proteína de 35 kDa como marcador en esta patología debe ser estudiada con mayor profundidad en población oriental.
6. En los pacientes con MALT y que se encuentran infectados con la bacteria, aún no se ha podido establecer una correlación entre la patología y la expresión de CagA, puesto que no se cuenta con estudios suficientes que demuestren si la presencia de esta proteína es o no un factor determinante para el desarrollo de esta patología.

7. Existe una correlación entre la presencia de cepas productoras de VacA, CagA y una proteína de 26 kDa y la evolución a cáncer gástrico. Sin embargo, se sugiere efectuar un estudio más vasto acerca de la proteína de 26 kDa.

ANEXO I.

ELECTROFORESIS

La SDS-PAGE es el método más utilizado para el análisis cualitativo de mezclas de proteínas. Es particularmente útil para el seguimiento de la purificación de proteínas y porque, debido a que éste se basa en la separación de proteínas en función de su tamaño, también se puede utilizar para determinar el peso molecular relativo de las proteínas. El SDS ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{10}\text{-CH}_2\text{SO}_3^-\text{Na}^+$) es un detergente aniónico. Las muestras que se someten a este procedimiento generalmente se tratan durante 5 minutos en una solución amortiguadora que contiene β -mercaptoetanol y SDS, a temperatura de ebullición. El β -mercaptoetanol reduce los puentes disulfuro que están presentes y que contribuyen a estabilizar la estructura terciaria de la proteína, y el SDS se une a la proteína y la desnaturaliza. Por lo tanto, cada proteína presente en la mezcla es totalmente desnaturalizada mediante este tratamiento y se abre dando lugar a una estructura de forma alargada que está cargada negativamente debido a la presencia de las moléculas de SDS que están unidas a lo largo de la cadena polipeptídica. En promedio, una molécula de SDS se une a dos residuos de aminoácidos. La solución amortiguadora de muestra también contiene un colorante ionizable, usualmente azul de bromofenol, el cual permite que la corrida en el gel pueda visualizarse, así como sacarosa o glicerol, los cuales proporcionan a la solución de muestra una densidad adecuada que permite una correcta interacción con la solución amortiguadora de electroforesis una vez que la muestra ha sido depositada en la parte superior del gel. Una vez que ya las muestras se han depositado en el gel, se pasa una corriente a través de éste. De hecho, dichas muestras no se depositan directamente en el gel separador: cuando

éste (normalmente de 10 cm de longitud) se ha preparado en medio de las placas de vidrio y se ha dejado polimerizar, se prepara un gel concentrador más corto (aproximadamente 1 cm) sobre el gel separador, y es éste el que contiene las cavidades en las que se depositan las muestras de proteínas. La función de este gel es la de concentrar la muestra en una banda angosta antes de que pase a través del gel separador. Esto se consigue utilizando diferencias en la fuerza iónica y el pH entre la solución amortiguadora de electroforesis y el gel concentrador, e involucra un fenómeno conocido como isotacoforesis. El gel concentrador tiene un tamaño de poro grande (4% de acrilamida), lo que permite que las proteínas tengan un movimiento libre y se concentren bajo el efecto del campo eléctrico. Debido a que todas las proteínas tienen la misma carga por unidad de longitud, la separación de éstas obedece a sus pesos moleculares por las propiedades de tamiz que tiene el gel. Brevemente, la proteína más pequeña pasa con mayor facilidad a través de los poros del gel, mientras que las proteínas más grandes sufren un retardo en su paso debido a la resistencia en la fricción que ocurre por efecto de tamiz del gel. Debido al tamaño pequeño del azul de bromofenol, éste no sufre retardo e indica el frente de la electroforesis. Cuando el colorante llega a la parte inferior del gel, la corriente se apaga y el gel se retira de entre las placas de vidrio y se sumerge en una solución de tinte adecuada (por ejemplo, azul de Coomassie) en agitación durante algunas horas. Posteriormente, el gel se lava en una solución de destinte la cual elimina la solución de tinte que no se unió a las proteínas y éstas se observarán en forma de bandas en el gel. En caso de que se vaya a llevar a cabo la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa para efectuar el ensayo de WB, se omite el proceso de tinte.

Generalmente, el gel de separación contiene un 15% de poliacrilamida, lo que le confiere al gel un tamaño de poro en el que proteínas de un peso molecular de alrededor de 10 000 Da se muevan a través del gel con facilidad, mientras que proteínas de alrededor de 100 000 Da apenas puedan pasar a través de los poros del gel. Por lo tanto, una proteína de 150 000 Da no podría pasar a través de este gel. En este caso, un gel al 10 o 7.5% se podría utilizar, de tal manera que la proteína podría entrar a través del gel y ser teñida e identificada. Adicionalmente, puede haber geles de gradiente con respecto a la concentración de poliacrilamida. En conclusión, la selección del gel depende del tamaño de la proteína en estudio.

El peso molecular de la proteína puede determinarse mediante la comparación de su movilidad con respecto a proteínas de peso molecular conocidas que también son separadas en el mismo gel. Mediante la construcción de una gráfica de distancia recorrida en función del logaritmo del peso molecular, se puede obtener una curva de calibración. La distancia recorrida de una proteína de peso molecular desconocido se interpola en dicha gráfica y por lo tanto se determina el valor del logaritmo del peso molecular y en forma consiguiente el valor del peso molecular.

Una proteína pura debe dar lugar sólo a una banda a partir de una SDS-PAGE, a menos que la molécula contenga dos subunidades distintas. En este caso, se obtendrían dos bandas que corresponderían a cada una de las subunidades (126).

BIBLIOGRAFÍA

1. Goodwin, C.S. et al. Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. *J. Med. Microbiol.* 1987; 19:257-267.
2. Goodwin, C.S. y J. A. Armstrong. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori*. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 1990; 9:1-13.
3. Bode, G. et al. The coccoid forms of *Helicobacter pylori*. Criteria for their viability. *Epidemiol. Infect.* 1993;111:483-490.
4. Nilius, M. et al. Coccoid like forms (clf) of *Helicobacter pylori*. Enzyme activity and antigenicity. *Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.* 1993;280:259-272.
5. Gets, Z. et al. Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* 1993;38:371-377.
6. Akamatsu, T. et al. Transmission of *Helicobacter pylori* infection via flexible fiberoptic endoscopy. *Am. J. Infect. Control* 1996;24:396-401.
7. Klein, P.D. et al. Water source as a risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. *Lancet* 1991;337:1503-1506.
8. Megraud, F. Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1995; 9(Suppl. 2):85-91.
9. Taylor, D.N. y J. Parsonnet. Epidemiology and natural history of *H. pylori* infections. En M. J. Blaser et al (ed). *Infections of the gastrointestinal tract.* Raven Press, New York, N.Y.
10. Banatvala, N.K. et al. The cohort effect and *Helicobacter pylori*. *J. Infect. Dis.* 1993;168:219-221.

11. Parsonnet, J. The incidence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1995;9(Suppl. 2):45-51.
12. Parsonnet, J. et al. Symptoms and risk factors of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of epidemiologists. *Gastroenterology* 1992;102:41-46.
13. Graham, D.Y. et al. Epidemiology of *Helicobacter pylori* in an asymptomatic population in the United States. *Gastroenterology* 1991;100:1495-1501.
14. Mendall, M.A. et al. Childhood living conditions and *Helicobacter pylori* seropositivity in adult life. *Lancet* 1992;339:896-897
15. Beji, A. et al. GC content of DNA of *Campylobacter pylori* and other species belonging or related to the genus *Campylobacter pylori*. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol* 1988;139:527-534.
16. Kleanthous, H. et al. Characterization of a plasmid from *Helicobacter pylori* encoding a replication protein common to plasmids in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 1991;5:2377-2389.
17. Minnis, J.A. et al. Characterization of a 3.5-kbb plasmid from *Helicobacter pylori*. *Plasmid* 1995;34:22-36.
18. Bukanov, N.O. et al. Ordered cosmid library and high-resolution physical genetic map of *Helicobacter pylori* strain NCTC11638. *Mol. Microbiol.* 1994;11:509-523.
19. Jiang, Q. et al. Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Mol. Microbiol.* 1996;20:833-842.
20. Taylor, D.E. et al. Construction of a *Helicobacter pylori* genome map and demonstration of diversity at the genome level. *J. Bacteriol.* 1992;174:6800-6806.

21. Foxall, P.A. et al. Use of polymerase chain reaction-amplified *Helicobacter pylori* urease structural genes for differentiation of isolates. J. Clin. Microbiol. 1992;30:739-741.
22. Forbes, K.J. et al. Allelic variation in the *Helicobacter pylori* flagellin genes *flaA* and *flaB*: its consequences for strain typing schemes and population structure. Epidemiol. Infect. 1995;114:257-266.
23. Desai, M. et al. Molecular typing of *Helicobacter pylori* isolates from asymptomatic, ulcer and gastritis patients by urease gene polymorphism. Epidemiol. Infect. 1994;112:151-160.
24. Cover, T.L. et al. Divergences of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. J. Biol. Chem. 1994;269:10566-10573.
25. Garner, J.A. et al. Analysis of genetic diversity in cytotoxin-producing and non-cytotoxin-producing *Helicobacter pylori* strains. J. Infect. Dis. 1995;172:290-293.
26. Kato, S. et al. Genetic polymorphisms of the cancer related gene and *Helicobacter pylori* infection in Japanese gastric cancer patients. An age and gender matched case-control study. Cancer 1996;77:165-71.
27. Miehle, S. et al. Allelic variation in the *cagA* gene of *Helicobacter pylori* obtained from Korea compared to the United States. Am. J. Gastroenterol. 1996;91:1322-1325.
28. Go, M.F. et al. Population genetic analysis of *Helicobacter pylori* by multilocus enzyme electrophoresis: extensive allelic diversity and recombinational population structure. J. Bacteriol. 1996;178:3934-3938.

29. de Boer, W.A. et al. 4-day lansoprazole quadruple therapy: a highly effective cure for *Helicobacter pylori* infection. *Am. J. Gastroenterol.* 1996;91:1778-1782.
30. Morris, A. et al. *Campylobacter pylori* infection in Meckel's diverticula containing gastric mucosa. *Gut* 1989;30:1233-1235.
31. Peterson, W.L. *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. *N. Engl. J. Med.* 1991;324:1043-1048.
32. Dixon, M.F. Histological responses to *Helicobacter pylori* infection: gastritis, atrophy and preneoplasia. *Baillieres Clin. Gastroenterol.* 1995;9:467-486.
33. Genta, R.M. y D.Y. Graham. *Helicobacter pylori*: the new bug on the paraffin block. *Virchows Arch.* 1994;425:339-347.
34. Sung, J.J., et al. Antibacterial treatment of gastric ulcers associated with *Helicobacter pylori*. *N. Engl. J. Med.* 1995;332:139-142.
35. Husson, M.O. et al. Iron acquisition by *Helicobacter pylori*: importance of human lactoferrin. *Infect. Immun.* 1993; 61:2694-2697.
36. Illingworth, D.S. et al. Siderophore production and iron-regulated envelope proteins of *Helicobacter pylori*. *Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.* 1993;280:113-119.
37. Luke, Catherine J. y Charles W. Penn. Identification of a 29 kDa flagellar sheath protein in *Helicobacter pylori* using a murine monoclonal antibody. *Microbiology* 1995; 141:597-604.
38. Crabtree, J.E. et al. *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 expression in gastric epithelial cells is associated with cagA positive phenotype. *J. Clin. Pathol.* 1995;48:41-45.

- 39.Huang, J. et al. Stimulation of interleukin-8 production in epithelial cells lines by *Helicobacter pylori*. Infect. Immun. 1995;63:1732-1738.
- 40.Sharma, S.A. et al. Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation *in vitro*. Infect. Immun. 1995;63:1681-1687.
- 41.Evans, D.J. et al. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. Infect. Immun. 1995;63:2213-2220.
- 42.Sobbani, I. et al. *Helicobacter pylori* stimulates gastric acid secretion via platelet activating factor. J. Physiol. Pharmacol. 1996;47:177-185.
- 43.Piotrowski, J. et al. Inhibition of *Helicobacter pylori* urease activity by ebrotidine. Biochem. Mol. Biol. Int. 1995;37:247-253.
- 44.Moran, A.P. The role of lipopolysaccharide in *Helicobacter pylori* pathogenesis. Aliment. Pharmacol. Ther. 1996;10(Suppl.1):39-50.
- 45.Muotiala, A. et al. Low biological activity of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide. Infect. Immun. 1992;60:1714-1716.
- 46.Davies, G.R. et al. Relationship between infective load of *Helicobacter pylori* and reactive oxygen metabolite production in antral mucosa. Scand. J. Gastroenterol. 1994;29:419-424.
- 47.Mannick, E.E. et al. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants. Cancer Res. 1996;56:3238:3243.
- 48.Moss, S.F. et al. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. Gut 1996;38:498-501.
- 49.Baik, S.C. et al. Increased oxidative DNA damage in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. Cancer Res. 1996;56:1279-1282.

50. Ricci, V. et al. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cell migration and proliferation *in vitro*: role of vacA and cagA. *Infect. Immun.* 1996;64:2829-2833.
51. Calam, J. *Helicobacter pylori*, acid and gastrin. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 1995;7:310-317.
52. Logan, R.P. et al. Changes in the gastric distribution of *Helicobacter pylori* during treatment with omeprazole. *Gut* 1995;36:12-16.
53. Nagata, K. et al. Potent inhibitory action of the gastric proton pump inhibitor lansoprazole against urease activity of *Helicobacter pylori*: a unique action selective for *H. pylori* cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993;37:769-774.
54. Laine, L. et al. Interobserver agreement and predictive value of endoscopic findings for *H. pylori* and gastritis in normal volunteers. *Gastrointest. Endosc.* 1995;42:420-423.
55. el-Zimaity, H.M. et al. Interobserver variation in the histopathological assesment of *Helicobacter pylori* gastritis. *Hum. Pathol.* 1996;27:35-41.
56. Genta, R.M. et al. Comparison of biopsy sites for the histopathologic diagnosis of *Helicobacter pylori*: a topographic study of *H. pylori* density an distribution. *Gastrointest. Endosc.* 1994;40:342-345.
57. Genta, R.M. et al. Simultaneous visualization of *Helicobacter pylori* and gastric morphology: a new stain. *Hum. Pathol.* 1994;25:221-226.
58. Kelly, S.M. et al. Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. *Gastroenterology* 1994;107:1671-1674.
59. Thomas, J.E. et al. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet* 1992;340:1194-1195.

60. Ashton-Key, M. et al. Detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy and resection specimens. *J. Clin. Pathol.* 1996;49:107-111.
61. el-Zaatari, F. et al. Determination of *Helicobacter pylori* status by reverse transcription-polymerase chain reaction. Comparison with urea breath test. *Dig. Dis. Sci.* 1995;40:109-113.
62. Li, C.F. et al. A newly developed PCR assay of *H. pylori* in gastric biopsy, saliva and feces - evidence of high prevalence of *H. pylori* in saliva supports oral transmission. *Dig. Dis. Sci.* 1996;41:2142-2149.
63. Chong, S.K.F. et al. Evaluation of 16S rRNA gene PCR with primers Hp1 and Hp2 for detection of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 1996;34:2728-2730.
64. Koletzko, S. et al. Isotype-selective non-dispersive infrared spectrometry for detection of *Helicobacter pylori* infection with 13C-urea breath test. *Lancet* 1995;345:961-962.
65. Schuman, R. et al. Diagnosis of *Helicobacter pylori* by the Lara system - towards a simplified breath test. *Gastroenterology* 1995;108:A215.
66. Patbak, C.M. et al. Evaluation of 14C-urinary excretion and its comparison with 14CO₂ in breath after 14C-urea administration in *Helicobacter pylori* infection. *Am. J. Gastroenterol.* 1994;89:734-738.
67. Dunn, Bruce E. et al. *Helicobacter pylori*. *Clinical Microbiology Reviews* 1997;10(4):720-741.
68. Perez-Perez, G. et al. *Campylobacter pylori* antibodies in humans. *Ann. Intern. Med.* 1988;109:11-17.
69. de Boer, W.A. et al. Only four days of quadruple therapy can effectively cure *Helicobacter pylori* infection. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1995;9:633-638.

70. Andersen, L.P. y F. Espersen. Immunoglobulin G antibodies to *Helicobacter pylori* in patients with dyspeptic symptoms investigated by the Western immunoblot technique. *J. Clin. Microbiol.* 1992;30:1743-1751.
71. Dunn, B.E. et al. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 1990;265:9464-9469.
72. Evans, D.J. et al. A sensitive and specific serologic test for detection of *Campylobacter pylori* infection. *Gastroenterology* 1989;96:1004-1008.
73. de Boer, W. et al. Effect of acid suppression on efficacy of treatment for *Helicobacter pylori* infection. *Lancet* 1995;345:817-820.
74. Hirschl, A.M. y M.L. Rotter. Serological tests for monitoring *Helicobacter pylori* eradication treatment. *J. Gastroenterol.* 1996;31:33-36.
75. Kosunen, T.U. et al. Diagnostic value of decreasing IgG and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 1992;339:893-895.
76. Hirai, Masamichi et al. High prevalence of neutralizing activity to *Helicobacter pylori* cytotoxin in serum of gastric-carcinoma patients. *Int. J. Cancer* 1994; 56:56-60.
77. Cover, Timothy L. et al. Acid-induced dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, reveals its pattern of assembly. *The Journal of Cell Biology* 1997; 138(4): 759-769.
78. Cao, Ping et al. Extracellular release of antigenic proteins by *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity* 1998; 66(6): 2984-2986.
79. Dunn, Bruce E. et al. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *The Journal of Biological Chemistry* 1990; 265(16):9464-69.

80. Turbett, Gavin R. et al. Purification and characterization of the urease enzymes of *Helicobacter* species from humans and animals. *Infection and Immunity* 1992; 60(12):5259-5266.
81. Drouet, Emmanuel B. et al. Characterization of an immunoreactive species-specific 19-kilodalton outer membrane protein from *Helicobacter pylori* by using a monoclonal antibody. *Journal of Clinical Microbiology* 1991; 29(8):1620-1624.
82. Doig, Peter et al. Production of a conserved adhesin by the human gastroduodenal pathogen *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology* 1992; 174(8): 2539-2547.
83. Yamaoka, Yoshio et al. Search for putative virulence factors of *Helicobacter pylori*. The low-molecular weight (33-35 K) antigen. *Digestive Diseases and Sciences* 1998; 43(7):1482-1487.
84. Amini, Hamid-Reza et al. Immunochemical properties of a 60 kDa cell surface-associated heat shock-protein (Hsp60) from *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1996; 16:163-172.
85. Yamaguchi, Hiroyuki et al. Induction and epitope analysis of *Helicobacter pylori* heat shock protein. *J Gastroenterol* 1996; 31[Suppl IX]: 12-15.
86. Dunn BE et al. Localization of *Helicobacter pylori* urease and heat shock protein in human gastric biopsies. *Infection and Immunity* 1997; 65(4): 1181-1188.
87. Ilver, Dag et al. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 1998; 279(5349):373-377.
88. Worst, Dennis J. et al. Human antibody response against iron-repressible outer membrane proteins of *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiology Letters* 1996; 144:29-32.

- 89.Exner, Maurice M. et al. Isolation and characterization of a family of porin proteins from *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity* 1995; 63(4):1567-72.
- 90.Doig, Peter et al. Isolation and characterization of a conserved porin protein from *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology* 1995; 177(19):5447-52.
- 91.Tufano, Maria Antonietta et al. Immunobiological activities of *Helicobacter pylori* porins. *Infection and Immunity* 1994; 62(4):1392-99.
- 92.Covacci, Antonello et al. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993;90:5791-5795.
- 93.Telford, John L et al. Immunobiology of *Helicobacter pylori* infection. *Current Opinion in Immunology* 1997; 9:498-503.
- 94.Vaira, D et al. New immunological assays for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1999;45(Suppl 1):I23-I27.
- 95.de Boer, W.A. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 1997;32S Suppl 223.35-42.
- 96.Nilsson, I. et al. Immunoblot assay for serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infections. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35(2):427-432.
- 97.Aucher et al. Use of Immunoblot assay to define serum antibody patterns associated with *Helicobacter pylori* infection and with *H. pylori*-related ulcers. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36(4):931-936.
- 98.Karvar, S. et al. Use of serum-specific immunoglobulins A and G for detection of *Helicobacter pylori* infection in patients with chronic gastritis by Immunoblot analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35(12):3058-3061.

- 99.Doig, Peter y Trevor J. Trust. Identification of surface-exposed membrane antigens of *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity* 1994; 62(10):4526-4533.
- 100.Xiang, Z. et al. Detection in an enzyme immunoassay of an immune response to a recombinant fragment of the 128 kDa protein (CagA) of *Helicobacter pylori*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1993; 12(10):739-745.
- 101.Faulde, M. et al. Humoral immune response against *Helicobacter pylori* as determined by Immunoblot. *Electrophoresis* 1993; 14:945-951.
- 102.Bazillou M et al. Serum antibody response to the superficial and released components of *Helicobacter pylori*. *Clin Diagn Lab Immunol* 1994; 1(3):310-317.
- 103.Mitchell, Hazel M. et al. Serological response to specific *Helicobacter pylori* antigens: antibody against CagA is not predictive of gastric cancer in a developing country. *The American Journal of Gastroenterology* 1996; 91(9):1785-1788.
- 104.Johansen, H.K. et al. Cross-reactive antigens shared by *Pseudomona aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, and *Haemophilus influenzae* may cause false-positive titers of antibody to *H. pylori*. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2(2):149-155.
- 105.Asaka, M. et al. What role does *Helicobacter pylori* play in gastric cancer? *Gastroenterology* 1997; 113:S56-S60.
- 106.Rudi, J. et al. Serum antibodies against *Helicobacter pylori* proteins VacA and CagA are associated with increased risk for gastric adenocarcinoma. *Digestive Diseases and Sciences* 1997; 42(8): 1652-1659.

107. Parsonnet, J. et al. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1997; 40: 297-301.
108. Crabtree, J.E. et al. Systemic and mucosal humoral responses to *Helicobacter pylori* in gastric cancer. *Gut* 1993; 34: 1339-1343.
109. Wang, J.T. et al. Antibody to a *Helicobacter pylori* species specific antigen in patients with adenocarcinoma of the stomach. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 244(2):360-363.
110. Klaamas, K. et al. IgG immune response to *Helicobacter pylori* antigens in patients with gastric cancer as defined by ELISA and Immunoblotting. *Int. J. Cancer* 1996; 67: 1-5.
111. Kumar, S. et al. Antibodies to CagA protein are not predictive of serious gastroduodenal disease in Indian patients. *Indian J Gastroenterol* 1998 Oct-Dec;17(4):126-8.
112. El-Mahdi et al. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998 Apr;10(4):313-6.
113. Shin, M. et al. High seropositivity of anti-CagA antibody in *Helicobacter pylori*-infected patients irrelevant to peptic ulcers and normal mucosa in Japan. *Digestive Diseases and Sciences* 1997;42(9):1841-1847.
114. Shyu, R.Y. et al. High frequency of cytotoxin-associated gene A in *Helicobacter pylori* isolated from asymptomatic subjects and peptic ulcer patients in Taiwan. *J Clin Gastroenterol* 1998 Jul;27(1):54-9.
115. Cover, T. et al. Serologic detection of infection with cagA+ *Helicobacter pylori* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 1995;33(6):1496-1500.

- 116.Ogura, K. et al. High prevalence of cytotoxin positive *Helicobacter pylori* in patients unrelated to the presence of peptic ulcers in Japan. *Gut* 1997;41:463-468.
- 117.Holtmann, G. et al. Antibody response to specific *H. pylori* antigens in functional dyspepsia, duodenal ulcer disease and health. *The American Journal of Gastroenterology* 1998;93(8):1222-1227.
- 118.Tiede, C. et al. What role does *Helicobacter pylori* eradication play in gastric MALT and gastric MALT lymphoma?. *Gastroenterology* 1997; 113:S61-S64.
- 119.Eck, M. et al. MALT-type lymphoma of the stomach is associated with *Helicobacter pylori* strains expressing the CagA protein. *Gastroenterology* 1997; 112:1482-1486.
- 120.De Jong, D. et al. Gastric non-Hodgkin lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue are not associated with more aggressive *Helicobacter pylori* strains as identified by CagA. *Am J Clin Pathol* 1996; 106:670-675.
- 121.Dore MP y DY Graham. Pathogenesis of duodenal ulcer disease: the rest of the story. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000 Feb; 14(1):97-107.
- 122.Olbe, L et al. Conceivable mechanisms by which *Helicobacter pylori* provokes duodenal ulcer disease. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2000 Feb; 14(1):1-12.
- 123.Solano, A et al. Serologic response by Western blot to *Helicobacter pylori* (Hp) in a cohort of Mexican children during the first year of life. 10th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and related organisms. Instituto Nacional de la Nutrición, México 1999. p. 169.

124. Park, SM et al. Antigenic diversity and serotypes of *Helicobacter pylori* associated with peptic ulcer diseases. *Korean J Intern Med* 1998 Jul; 13(2):104-9.
125. Mitchell, Hazell M. et al. Antigen recognition during progression from acute to chronic infection with cagA-positive strain of *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity* 1996; 64(4):1166-1172.
126. Wilson K. and Walter M. Principles and techniques of practical biochemistry. 4a ed., Cambridge University, Great Britain 1994.