



10524
30

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Determinación de la concentración
mínima inhibitoria de nuevos derivados
del ácido carbámico contra *Helicobacter pylori***

T E S I S
Que para obtener el Título de:
Química Farmacéutica Bióloga
P R E S E N T A :

Juana/Guerrero Olea

**Asesores: M. en C. Gloria Leticia Arellano Martínez.
Dr. Andrés Romero Rojas.
Dr. Enrique Angeles Anguiano.**

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Mex. 2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

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

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

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

Determinación de la concentración mínima inhibitoria de nuevos derivados del ácido carbámico contra Helicobacter pylori.

que presenta la pasante: Juana Guerrero Olea
con número de cuenta: 9361408-1 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

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

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 19 de abril de 2002

PRESIDENTE	<u>M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez</u>	
VOCAL	<u>Dr. José Luis Arias Téllez</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. Andrés Romero Rojas</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.B.P. Amparo Londoño Orozco</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M. en F.C. Beatriz de Jesús Maya Monroy</u>	

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

13

*La idea es nunca dejar de crecer.
El desafío de uno a uno mismo es darse
-entregar-se-
Nada nos asegura la vida,
por eso hay que saber disfrutarla
para que en el ocaso no veamos tiempo perdido
sino tiempo vivido.*

A Dios:

*Gracias Señor por estar siempre conmigo,
Por permitirme cumplir esta meta.*

A mis padres:

*Por que he llegado de su mano hasta aquí,
Por que con ustedes he sido hija, amiga, mujer
y ahora profesionalista,
Por que los tres somos uno.
Gracias.*

A la memoria de Paty:

*Por que eres el cero y el infinito,
por que eres el claro ejemplo de la amistad como el único fin importante.
Juntas llegamos, gracias por no faltar nunca.
Salud!!!, donde estás.*

A Omar:

*Por que además de mi hermano, eres mi amigo,
mi cómplice, mi crítico más severo.
y por que siempre has estado cerca.*

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

C

A mis asesores:

M en C. Gloria Leticia Arellano, Dr. Andrés Romero
Dr. Enrique Ángeles:

*Por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto y sobretodo
Mil gracias por su tiempo, sus conocimientos compartidos, sus enseñanzas,
su paciencia, su atención y su amistad.*

A la Dra Silvia Giono, a la M en C. Sarita Ochoa, a la Dra. Susana E. Mendoza
Por su gran ayuda y apoyo incondicional durante la realización del presente trabajo
Gracias

A la Dra. Anita Rios, del modulo de equinos de campo 4, por su apoyo y por
permitir usar a sus caballos el alucinante y tribilin, para la realización de este
trabajo

A todos mis compañeros del L-B de posgrado comandado por el Dr. Andes Romero
por su ayuda y amistad.

A mis hermanos, sobrinos, amigos y a todos aquellos que en algún momento
coincidieron en el mismo punto que yo, y han formado parte de mi vida.
Gracias.

A la UNAM:

*Por que además de darme una profesión, me has hecho crecer como persona y
como ser humano, me has dado amigos, me brindaste la oportunidad de llorar, de
reír, de pensar, de crear y criticar.*

Por todo ...

Goya Universidad!!!

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

	página
I. LISTA DE FIGURAS	3
II. LISTA DE CUADROS	4
III. LISTA DE ABREVIATURAS	5
1.0 RESUMEN	7
2.0 INTRODUCCION	8
3.0 GENERALIDADES	10
3.1 <i>Helicobacter pylori</i>	10
3.1.1 Características morfológicas	10
3.1.2 Características bioquímicas	11
3.1.3 Patogénia de la infección	12
3.1.3.1 Factores de virulencia	13
3.1.3.2 Efectos sobre el sistema inmune	14
3.1.4 Diagnóstico	16
3.1.5 Tratamiento	17
3.1.6 Epidemiología	19
3.2 Antimicrobianos.	22
3.2.1 Tipos de agentes antimicrobianos	23
3.2.2 Métodos para determinar la actividad antimicrobiana	26
3.2.2.1 Difusión en agar	26
3.2.2.2 Dilución en agar	27
3.2.2.3 Dilución en caldo	27
3.2.2.4 E-test	28
3.2.3. Resistencia bacteriana	30
3.2.3.1 Mecanismos genéticos de la resistencia bacteriana	31
3.2.3.2 Mecanismos bioquímicos de la resistencia bacteriana	33
3.3 Carbamatos	35

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.0 JUSTIFICACION	38
5.0 HIPOTESIS	38
6.0 OBJETIVOS	39
7.0 MATERIAL Y METODOS	40
7.1. Cepas	40
7.2. Compuestos derivados del ácido carbámico	40
7.2.1. Pruebas de solubilidad	40
7.3. Nefelómetro de Mc Farland	40
7.4. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	41
7.4.1 Método de Kirby-Bauer (difusión en disco)	41
7.4.1.1 Preparación de sensibilizados	41
7.4.1.2 Inoculación de <i>H. pylori</i>	42
7.4.1.3 Interpretación	43
7.4.2. Método de Dilución en agar	43
7.4.2.1 Preparación de placas de dilución	43
7.4.2.2 Inoculación de <i>H. pylori</i>	44
7.4.2.3 Interpretación	44
8.0 RESULTADOS	45
8.1 Pruebas de solubilidad	45
8.2 Identificación del microorganismo	46
8.3 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana	46
8.3.1 Método de Kirby-Bauer	46
8.3.2. Método de dilución en agar	48
9.0 DISCUSION	50
10.0 CONCLUSIONES	53
11.0 REFERENCIAS	54

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura. 1 Imagen de <i>Helicobacter pylori</i>	11
Figura. 2 <i>Helicobacter pylori</i> en la mucosa gástrica	13
Figura. 3 Interacción de <i>Helicobacter pylori</i> con las células epiteliales	15
Figura. 4 Sitios de acción de la mayoría de los agentes antimicrobianos	25
Figura. 5 Estructura química de carbamatos	35
Figura. 6 Estructura de telitromicina	36
Figura. 7 Estructura de cefalosponina 3'-quinolona-carbamato (Ro 24-4383). 37	

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

LISTA DE CUADROS

Página

Cuadro 1	Esquema de tratamiento de siete días contra la infección por <i>H. pylori</i>	18
Cuadro 2	Factores de riesgo para adquirir la infección por <i>H. pylori</i>	21
Cuadro 3	Clasificación y descripción de antimicrobianos	24
Cuadro 4	Factores que influyen en los antibiogramas y la respuesta clínica	29
Cuadro 5	Escala del nefelómetro de Mac Farland utilizada	41
Cuadro 6	Pruebas bioquímicas para identificar <i>H. pylori</i>	42
Cuadro 7	Solubilidad de los derivados del ácido carbámico	45
Cuadro 8	Disolvente ideal para los derivados del ácido carbámico	45
Cuadro 9	Inhibición de <i>H. pylori</i> por acción de los derivados del ácido carbámico. Por el método de Kirby-Bauer	47
Cuadro 10	Determinación de las CMI por el método de dilución en agar de los derivados del ácido carbámico contra <i>H. pylori</i>	48
Cuadro 11	Datos comparativos de las CMI y dilución (Log ₂) obtenidos en los métodos de Kirby-Bauer y dilución en agar	49

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	NOMBRE
° C	Centígrados
ACT	Acetona
ADN	Acido desoxirribonucleico
ATCC	American Type Culture Colection (Colección Americana de Cepas de Referencia)
CagA	Proteína asociada a citotoxicidad
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMB	Concentración mínima bactericida
CTM	Claritromicina
c.v.	Coefficiente de variación
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O.	Densidad óptica
d.s	Desviación estándar
FDA	Food and Drug Administration (Administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos de Norte América)
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Hrs.	Horas
ICAM-1	Moléculas de adhesión intercelulares tipo 1
IL	Interleucina
IARC	International Agency of Risk of the Cancer (Agencia internacional para la investigación del cáncer)
Log ₂	Logaritmo de dilución doble
LPS	Lipopolisacárido
ml	mililitros
mm	milímetros
m.o.	microorganismo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MTZ	Metronidazol
NCCLS	National Comité For Clinical Laboratory Standard (Comite Nacional para la estandarización de Laboratorios Clínicos)
nm	nanómetros
PAS	Ácido paraminosalisílico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	potencial de Hidrógeno
R	Resistente
RNAr	Acido ribonucleico ribosomal
S	Sensible
SSF	Solución Salina Fisiológica
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
Vac A	Toxina vacuolizante

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1.0 RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la actividad inhibitoria contra *Helicobacter pylori* de 11 derivados del ácido carbámico mediante los métodos Kirby-Bauer y dilución en agar.

Se utilizó una cepa de *Helicobacter pylori* ATCC 43504 la cual se hizo crecer en agar para *Campylobacter* suplementado con sangre de caballo al 5%, incubando bajo condiciones microaerofilicas durante 3 días

De acuerdo a los resultados por la técnica de Kirby-Bauer se observó una mayor inhibición del compuesto LQM996, y se presento el microorganismo inerte ante LQM903. Estos resultados se corroboraron con el método de dilución en agar el cual de acuerdo con la NCCLS es específico para las pruebas de susceptibilidad para *Helicobacter pylori*. Los datos obtenidos permitieron tener una referencia de la actividad de los compuestos en estudio contra el germen.

La mayor actividad antibacteriana contra *Helicobacter pylori* fue de los compuestos LQM996 y LQM904, por ambas técnicas; adicionalmente fueron determinados los valores de las CMI para los 11 derivados del ácido carbámico contra el microorganismo mencionado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.0 INTRODUCCION

La infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es extraordinariamente común, en particular infecta la mucosa gástrica humana provocando gastritis crónica, y se asocia con úlcera péptica la cual es una enfermedad frecuente que enfrenta importantes costos económicos y, antes de que la comunidad científica adoptara a esta bacteria, como el agente causal de la enfermedad, ya había constancia de la elevada tendencia recidivante que presentaba la úlcera gástrica, con cifras que se estimaban al año entre el 50 y 75%, y que además en estadios extremos desarrolla cáncer gástrico.^(1,5)

H. pylori fue inicialmente considerada como huésped de la mucosa gástrica, ya que se estima que la mitad de la población mundial está colonizada por esta bacteria, pero su capacidad de producir un sin número de sustancia que dañan la mucosa, además de desencadenar reacciones orgánicas por parte del huésped las cuales no logran erradicar la infección, también juegan un papel importante en el daño a la mucosa y su tendencia a causar enfermedad (10-15% de los colonizados), lo que determinan su significado e importancia en la salud pública. Se sabe que los factores de riesgo para contraer la infección incluyen un bajo nivel sociocultural, la pobreza, deficientes condiciones higiénico-sanitarias entre otras. Por lo cual es un problema de salud en nuestro país.^(4,5)

El tratamiento contra *H. pylori*, incluye el empleo de una terapia triple: un compuesto de Bismuto, un antibiótico (un derivado imidazólico) y un inhibidor de la bomba de protones, sin embargo se ha visto una creciente generación de resistencia del microorganismo (m.o.) a compuestos como el metronidazol (MTZ) y claritromicina (CTM) lo cual hace que el éxito de la terapia se vea disminuida, además de generarle al paciente diversos efectos colaterales como cefalea y náuseas.^(8,9)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por lo anterior se crea la necesidad de buscar alternativas de tratamiento antibiótico ya que en la mayoría de las infecciones, únicamente colocan su grano de arena para desbalancear las fuerzas a favor del hospedero y facilitar la eliminación del parásito. Sin embargo, lo que ocurre en el contexto de las gastropatías asociadas a *H. pylori*, es que la poderosa y continua respuesta inmunológica es evadida por el microorganismo o modificada de tal manera que la hace ver impotente o incluso en ocasiones beneficia al parásito. De esta manera, el diseño de una estrategia terapéutica debe ser capaz por sí misma de erradicar este microorganismo, recibiendo muy poca asistencia de los mecanismos inmunes del huésped.⁽¹¹⁾

Los carbamatos son sales de ácido carbámico, cristalinas y estables a la temperatura ambiente, en las cuales se les han dado diversas utilidades como plaguicidas e insecticidas, con cierta actividad inhibitoria de la acetilcolinesterasa, y algunas otras como anticancerígenos, así mismo se han sintetizado derivados cuya estructura les permite tener una actividad antiparasitaria y antimicrobiana importante. Estos últimos compuestos podrán representar una nueva posibilidad para el tratamiento antibiótico de las gastropatías asociadas a *H. pylori*.^(17,53)

La actividad antibacteriana de un agente se mide *in vitro* para determinar su potencia y la sensibilidad del microorganismo, en el caso específico de *H. pylori* considerado como un microorganismo de condiciones especiales de crecimiento la National Comité For Clinical Laboratory Standard (NCCLS) ha recomendado el método de dilución en agar.^(14,27)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.0 GENERALIDADES

3.1. *Helicobacter pylori*

Durante muchos años la úlcera gastroduodenal había sido vista fundamentalmente como una enfermedad psicósomática, involucrándose el ácido clorhídrico (HCl) como el principal factor responsable. En 1959 Fitzgerald relaciona la patología gástrica con una actividad ureásica debida a contaminación bacteriana, pero fue hasta 1983 que Marshall y Warren, describen a una bacteria Gram negativa como agente causal de los trastornos gástricos que hasta entonces había sido considerada como huésped del estómago, sin ninguna relación con la enfermedad ácido péptica. Fue aislada por primera vez de medio de cultivo agar chocolate bajo condiciones microaerofílicas. Inicialmente se le identificó como *Campylobacter pyloridis/pylori* y en 1989 Goodwin crea el género *Helicobacter* basándose en la secuencia de bases de la molécula 16S del ácido ribonucleico ribosomal (RNAr) y desde entonces se han aislado al menos otras 19 especies que infectan al hombre y animales^(1,2, 4).

En los últimos 13 años se han publicado más de 6000 trabajos sobre *H. pylori*, dato que expresa claramente el enorme interés que este microorganismo ha despertado en la comunidad científica mundial.

3.1.1. Características morfológicas

H. pylori es un bacilo Gram-negativo curvo (0.5-1 x 2.5-4 μ), en forma de espiral, posee de 1-8 (4-6) flagelos unipolares envainados con aspecto de coma o S, al ser observado en el microscopio óptico, con un ensanchamiento en el extremo distal lo que lo hace altamente móvil (fig.1), ocasionalmente adopta formas cocoides, las cuales pueden considerarse como formas de su estado latente que le permiten mantenerse viable en un medio muy adverso. Es un m.o. de crecimiento lento, toma de 3-7 días para poder apreciar las colonias en medios de

cultivo sólidos y su crecimiento en el laboratorio se requiere de condiciones de microaerofilia (10% de CO₂, 5% de Oxígeno y 85% de Nitrógeno) y medios artificiales ricos en nutrientes como: peptona, triptona, extracto de levadura, glucosa, y sales como cloruro de sodio, bisulfito de sodio, suplementados con sangre de caballo, polienriquecimiento, suero fetal bovino (SFB) o ambos. Morfológicamente se identifica en el agar como colonias pequeñas translúcidas y relucientes con una elevación convexa, un borde entero y una zona débil de hemólisis β □ (1,4,8)

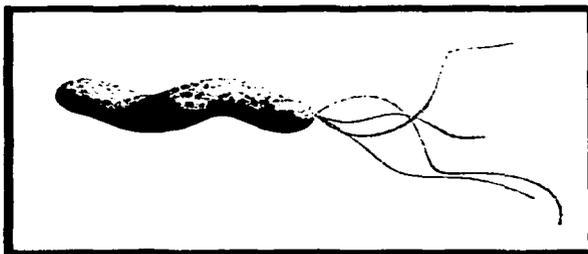


Fig1. Imagen de *H. pylori* ampliada por computadora 10,000x, que muestra la forma encorvada y flagelar de la bacteria que le permite impulsarse en la mucosa gástrica. (tomada de Research Laboratory website: www.hpylori.com.au)

3.1.2 Características bioquímicas

Su característica bioquímica más sobresaliente es la abundante producción de la enzima ureasa, que cataliza la hidrólisis de la urea en amonio y bióxido de carbono; la producción de amonio es un mecanismo importante para la sobrevivencia de la bacteria en un ambiente con pH tan ácido como el jugo gástrico. Además presenta actividad de Catalasa, Oxidasa, Fosfatasa alcalina, DNAsa, Leucina y Arginina arilamidasa, no reduce nitritos ni produce hidrólisis de Hipurato. (4,5,9)

3.1.3. Patogenia de la infección

La infección por *H. pylori* es silente en la mayor parte de los casos, por ser asintomática. A lo largo de su historia natural puede manifestarse como una úlcera péptica que la desarrolla uno de cada seis infectados aproximadamente. Otra patología importante asociada a *H. pylori* es el adenocarcinoma y linfoma de estómago el cual se ha confirmado es 6 veces más frecuente en la población infectada.⁽³⁶⁾

H. pylori no es un m.o. invasivo, habita en forma libre en el epitelio gástrico antral y en las criptas gástricas, en el moco, en la superficie de las células epiteliales o en el intersticio celular. También puede hacerlo en el epitelio gástrico ectópico encontrado en duodeno, esófago, etc. La bacteria posee la capacidad de modificar la estructura epitelial y alterar la difusión de iones de Hidrógeno, esto genera cambios en la capa mucosal y disminuye la capacidad de protección haciendo susceptible al epitelio a la agresión por el HCl, este es uno de los elementos secretados por el estómago capaces de producir daño a la propia mucosa. En condiciones normales las células parietales son las encargadas de producir HCl (basal o postestimulación), para lo que cuenta con receptores específicos en la superficie de la membrana. Los que activan su producción son: la histamina, acetilcolina y gastrina, en tanto que el principal inhibidor es la somatostatina. En presencia de *H. pylori* se producen anomalías importantes en la secreción de estas hormonas elevando la producción de gastrina en condiciones basales y postestimulación por alimentos, así mismo disminuye la concentración de somatostatina en el antro y la cantidad de células D.

Este m.o. presenta una superficie con elevada hidrofobicidad superior a la de otras bacterias que unida a la gran actividad de ureasa desprende una mayor producción local de amonio, éste por efecto tóxico directo o por cambios del pH pericelular desencadena daño epitelial (fig.2), ya que al alcalinizar el pH local lesiona a las células superficiales, lo que hace al ambiente menos hostil para

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

favorecer la proliferación de la bacteria. La presencia de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa le permiten tener una resistencia a la fagocitosis y le confieren una mayor afinidad por la mucosa gástrica facilitando su penetración.^(29,31,32)

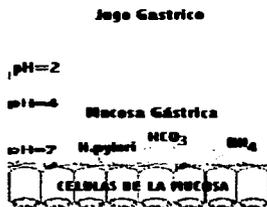


Fig2. Cambios del pH pericelular provocados por *H. pylori* en la mucosa gástrica. (Modificada de *Helicobacter Foundation* <http://www.helico.com>)

3.1.3.1 Factores de virulencia

En los últimos estudios publicados en relación a la fisiopatología de la infección se menciona que la virulencia del *H. pylori* está relacionada con la presencia de un gen denominado *Vac A*, codificador de una citotoxina vacuolizante que se encuentra en la mayoría de las cepas. Se le correlaciona con la capacidad toxígena de la bacteria, siendo el subtipo S1 el que está asociado con la úlcera péptica. Entre los factores de virulencia del *H. pylori* se encuentran las proteínas de membrana o superficiales, algunas de las cuales están implicadas en fenómenos de adhesión y en la alteración de la arquitectura del epitelio mucoso gastroduodenal, además de relacionarse con la actividad endotóxica del germen. Se ha sugerido que dicha toxicidad estaría ligada a un lipopolisacárido (LPS) de la superficie del m.o. ya que, a diferencia de otros Gram negativos, sus LPS son inmunogénicos con lo que logran evitar en gran medida los mecanismos de

defensa del hospedero y le permiten mantener la infección por décadas. En las lesiones digestivas mediadas por LPS bacterianos, han sido implicados fosfolípidos plaquetarios, cuya actividad se ha detectado en cultivos de *H. pylori* con las mismas propiedades biológicas y fisiológicas que el factor activador plaquetario (PAF) liberado por diversas células eucariotas.⁽³⁶⁾

Otro de los conceptos desarrollados es la relación entre los genes *Cag A*, *B* y *C* con la producción de proteínas que dañan la mucosa y que se encuentran en el 60% de las cepas detectadas en los países en desarrollo y se les asocia a úlcera, gastritis atrófica y cáncer, sobretodo a la presencia del gen *Cag A* en la cepa infectante.^(3,10)

3.1.3.2 Efectos sobre el sistema inmune

Un efecto característico de la infección por *H. pylori*, es la activación de neutrófilos polinucleares (PNN) que se traduce en un profuso infiltrado inflamatorio de las áreas superficiales de la mucosa (fig.3), lo cual, está mediado por la interleucina-8 (IL-8), así como por la proteína *Cag A* de la bacteria que posee potente capacidad quimiotáctica y la presencia de anticuerpos contra esta proteína se asocia con elevación de los niveles séricos de pepsinógeno, un marcador de inflamación de la mucosa gástrica.^(36,51)

La activación da lugar a la producción de citocinas, aumento de los fenómenos oxidativos locales y de la expresión de moléculas de adhesión intercelulares tipo I (ICAM-1). Las células de la mucosa gástrica también producen estas moléculas lo que junto a la producción de IL-8 puede contribuir al desarrollo de los procesos inflamatorios inducidos por la infección de *H. pylori*. Aproximadamente la tercera parte de las cepas inducen fuerte actividad oxidativa mediada por polimorfonucleares. Las cepas que tienen esta capacidad son significativamente más frecuentes en pacientes con enfermedad ulceropéptica, que en aquellos con gastritis crónica activa.³⁷

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se ha comprobado que asociado a la infección por *H. pylori*, se produce un incremento pronunciado de la población linfocitaria T, una importante fracción de las cuales expresan en su superficie receptores para IL-2 acompañado de un aumento de moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH).³⁷



Fig.3 La interacción de *H. pylori* con las células epiteliales, estimula la quimiotaxis de neutrófilos y macrófagos produciendo así inflamación crónica. tomada de ILADIBA (1996)⁵¹

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.1.4 Diagnóstico

Los métodos empleados para el diagnóstico de *H. pylori* involucran pruebas invasivas y no invasivas, cualquiera de estas pruebas son de alta especificidad y sensibilidad.

- a) Directas o invasivas : Incluyen la realización de una endoscopia al paciente en el cual las biopsias son tomadas de sitios múltiples en el esófago, estomago y duodeno. A estas se les realiza la prueba de ureasa en tejido, a demás histología para analizar a través del microscopio con ayuda de algunas tinciones (tinción de plata de Warthin-Starry, Hematoxilina-Eosina, Giemsa, Naranja de Acridina, bromuro de etidio y Gram) y cultivo bacteriológico de las muestras obtenidas.
- b) Indirectas o no invasivas: se dividen en dos grupos, los serológicos que determinan la presencia de anticuerpos anti-Hp IgG en el suero. Se realiza por el método de ELISA o mediante inmunoblot que detecta respuesta serológica frente a diferentes anticuerpos. La prueba con saliva para *H. pylori* no es tan sensible ni tan específica como las basadas en suero y la prueba con jugo gástrico está en espera de validación. Los test del aliento utilizan urea marcada con C-13 o C-14 y se basan en la capacidad que tiene *H. pylori* en hidrolizar urea mediante su ureasa. Después de ingerir urea marcada se puede medir la cantidad de CO₂ marcado liberado, que se producirá si el paciente está infectado con *H. pylori*.

Recientemente se han propuesto y puesto en práctica otros métodos de diagnóstico como:

- a) Determinación de antígeno en heces: Es un método en investigación que parece presentar una buena sensibilidad y especificidad. Se utilizan anticuerpos policlonales de ratón (Premier Platinum HpSA) o anticuerpos

monoclonales de clase plural (FemtoLab, Connex GMBH). Los cuales reconocen antígenos de *H. pylori* en muestras de heces mediante una ELISA.

- b) Prueba del hilo: Destacando la posibilidad de realizar un cultivo del microorganismo sin necesidad de realizar una endoscopia digestiva, sin embargo, la muestra se manipula mucho y puede en consecuencia estar muy contaminada y resulta desagradable para el paciente.

- c) PCR: Las técnicas de PCR han demostrado claramente algunas ventajas como la posibilidad de utilizar diferentes tipos de muestras (saliva, heces, muestras de agua, jugo gástrico, etc) o aún muestras mal conservadas. Sin embargo, es importante aplicarlas con precaución debido a la posibilidad de contaminaciones cruzadas. Estas técnicas tienen un valor en métodos especiales como detección de resistencia a macrólidos, detección de factores de virulencia o bien con fines epidemiológicos. ^(5,12,13,22,50)

3.1.5. Tratamiento

La necesidad de erradicación de estos microorganismos está aceptada hoy día en determinadas situaciones clínicas, y el uso de antibióticos está claramente indicado en los enfermos con úlcera péptica infectados por *H. pylori*.⁽³⁹⁾

En los últimos años el tratamiento de elección para los pacientes con úlcera péptica infectados por *H. pylori*, tanto en la etapa inicial como para la recurrencia de la enfermedad incluye antimicrobianos junto con los fármacos antisecretoras de HCl. Los fármacos que han sido utilizadas en diversas composiciones son amoxicilina, metronidazol, tetraciclinas, eritromicina, claritromicina, así como sales de bismuto (peptobismol) y antagonistas de los receptores de H₂ o los inhibidores de la bomba de protones de las células parietales gástricas como el

omeprazol o lansoprazol, (cuadro 1). Estos compuestos se sabe que actúan sinérgicamente con los antimicrobianos, aunque no se conoce las razones de ello. (10,11,14)

Algunos conceptos de los factores que influyen en la eficacia erradicadora de los antimicrobianos, incluyen al pH gástrico, la biodisponibilidad, penetración tisular y actividad antibiótica. Por otro lado los efectos de los inhibidores de la bomba de protones sobre el m.o., la cual produce una inhibición de la ureasa bacteriana, parecen ser dosis dependiente y probablemente estén relacionados con la unión covalente de estos fármacos con los grupos sulfhídricos de la enzima, debido a que la bacteria puede en parte depender de la actividad de ureasa, tanto para su actividad patógena como para obtener sus requerimientos metabólicos. En cuanto a la acción directa, se ha establecido que el incremento del pH gástrico ejerce una mayor eficacia y concentración local de los antimicrobianos, disminuyendo el efecto de las inmunoglobulinas y preservando la función leucocitaria. (11,12,19)

ESQUEMA DE TRATAMIENTO	DOSIS
Inhibidor de la bomba de protones + Claritromicina + Amoxicilina	Dosis estandar 500 mg 1000 mg
Inhibidor de la bomba de protones + Claritromicina + Metronidazol	Dosis estandar 500 mg 400 mg
Ranitidina con citrato de bismuto + Claritromicina + Amoxicilina	400 mg 500 mg 1000 mg
Ranitidina con citrato de bismuto + Claritromicina + Metronidazol	400 mg 500 mg 400 mg

Cuadro 1. Esquemas de tratamiento de siete días contra la infección por *H. pylori*, más utilizados. Tomada de *Pylopac, Medley Mex. (2001)*

3.1.6. Epidemiología:

Los estudios epidemiológicos han mostrado que la infección por *H. pylori* ocurre en la población mundial, sin embargo su incidencia entre países desarrollados y en vías de desarrollo es significativamente diferente mostrando en los primeros de 0.5-1% su presencia en niños menores de 10 años y en los segundos 80% en niños de la misma edad.

La enfermedad ácido péptica es por definición crónica. Un 95-100% de los casos de úlcera duodenal está asociada a *H. pylori*. En México se ha detectado en el 95% de los casos.⁽⁵⁴⁾

Se considera, que el cáncer de estómago es la segunda neoplasia más frecuente en el mundo con más de 470,000 nuevos casos al año, lo que representa el 10% del total de tumores malignos reportados. Sesenta por ciento de esos pacientes se presentan en países denominados en vías de desarrollo. Las tasas de incidencia más altas son detectadas en China y en otros países del Este Asiático, así como en Rusia; este tumor es el más frecuente en hombres en países de Sudamérica.

En México, el carcinoma gástrico ocupa el segundo lugar como causa de muerte en pacientes que fallecen con cáncer. En el bienio 1993 -1994 se registraron 2,343 casos ocupando el quinto lugar por frecuencia, tercero en hombres y sexto en mujeres. Se estima que la tasa de mortalidad es de 5.5×10^{-5} .^(55,56)

Los estudios actuales muestran que prácticamente todas las personas (90% a 95%) con úlcera duodenal están infestadas por la bacteria, cuya presencia, asociada con gastritis crónica, incrementa hasta 12 veces el riesgo de desarrollar la entidad en un término de 10 a 20 años. Se calcula, además, que 60% a 70% de quienes padecen úlcera gástrica están colonizados por el germen.⁽⁵⁰⁾

A nivel mundial, el 50% de la población de 60 años padecen la enfermedad y es rara en los niños. En México, la prevalencia de la bacteria aumenta con la edad, se presenta en un 20% en niños de 1 año y 50% en niños menores de 10 años alcanzando más del 70% positivos en personas de 20 años, lo que indica que en nuestro país la infección por el m.o. se adquiere en edades tempranas.

Los síntomas comunes incluyen dispepsia, dolor abdominal, anemia, vómito y ocasionalmente masa palpable. Una vez infectada con *H. pylori* normalmente una persona continúa portando el m.o hasta que se usan medicamentos para curar la infección, que no siempre elimina completamente la bacteria. (36,46,56)

La ocurrencia de la infección por *H. pylori* se correlaciona más con el nivel socioeconómico que con la raza. Casi todas las personas con úlcera duodenal están infectadas y por el contrario es muy poco probable que la persona sin *H. pylori* llegue a desarrollar úlcera duodenal.

Los mecanismos específicos de transmisión de la bacteria siguen sin determinarse pero por el hecho de ser tan común la infección y su amplia distribución se ha postulado que tanto el agua como los animales son fuente de infección, sin embargo, la vía de transmisión que está claramente establecida es la oral-fecal, esto se sustenta en la identificación de *H. pylori* en heces reportada en los estudios realizados por Thomas y Cols. (1992), en los que se demostró su presencia en 1 adulto y 9/23 niños; o el de Kelly y cols. (1994) en 12/25 adultos, positivos comprobada por PCR prueba de urea y primers específicos Cag A. Se ha descartado la transmisión oral-oral en adultos, esto basado en la discordancia de infección en parejas, si bien se mencionan estudios en los cuales se comprobó la presencia de *H. pylori* en la cavidad oral, saliva y placas dentales por PCR, no se han recuperado en cultivo esto debido a que la saliva humana muestra actividad inhibitoria *in vitro* frente a la bacteria y parece estar relacionado con la presencia de la flora normal de la cavidad oral. Se mencionan en algunos trabajos, factores de riesgo propios del huésped, destacando el papel de la

herencia como determinante de la susceptibilidad a la infección, demostrado en investigaciones realizadas en pares de mellizos (57%), a demás del bajo nivel sociocultural, la pobreza, condiciones higiénico-sanitarias deficientes, alcoholismo, tabaquismo, entre otras (cuadro 2). (5,6,8,11,40)

La tasa de reinfección en adultos después de la erradicación son muy bajas (0.5-10% por año); sin embargo, en la población pediátrica son elevadas y este fenómeno posiblemente obedezca al seguimiento de hábitos higiénicos.

Principales factores de riesgo para contraer infección por <i>Helicobacter pylori</i>
* Condiciones insalubres
*Hacinamiento
*Consumo de agua contaminada
*Residir en comunidades cerradas
*Factores genéticos (gen HLS-DQA 1)
*Bajos niveles de vitamina C

Cuadro 2: Factores de riesgo para adquirir infección por *H. pylori*.
Modificado de Fytopac Medley, Méx. (2001)

3.2 ANTIMICROBIANOS

Desde el siglo XVII se han empleado varias sustancias químicas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, en 1889 Vuillemin, en un trabajo titulado *Antibiose et symbiose*, crea el término antibiosis para describir la lucha entre seres vivos para la supervivencia. Más tarde, Ward adopta esta palabra para describir el antagonismo microbiano. Con posterioridad, ya en plena era antibiótica, significó durante algún tiempo, sustancia extraída de seres vivos, ya fueren bacterias, hongos, algas, etc, con capacidad para anular la vida de diversos microorganismos, pero no fue sino hasta el siglo XX, que comienza la quimioterapia como ciencia con los estudios de Paul Ehrlich quien fue el primero en formular los principios de la toxicidad selectiva y reconocer las reacciones químicas específicas entre los microorganismos y los medicamentos ya que descubrió que las arsefaminas (compuestos con base en arsénico) atacan al *Treponema palidum*, causante de la sífilis en el hombre.^(7,9)

Durante el transcurso del siglo pasado la investigación quimioterapéutica se centró principalmente en las sustancias de origen microbiano. Además del desarrollo de la penicilina descubierta por Fleming en 1929, se dio el de otras sustancias como la estreptomycin, tetraciclina, cloranfenicol y otras. De esta manera el término AGENTE ANTIMICROBIANO implican a sustancias químicas sintetizadas parcial o totalmente en laboratorio que son capaces de inhibir el crecimiento y/o destruir microorganismos, por su parte el término ANTIBIÓTICO, del griego anti ("contra") y bios ("vida"), se refiere a una sustancia producida por un m.o la cual en bajas concentraciones tiene acción antimicrobiana, aunque generalmente ambos términos son empleados indistintamente para denotar fármacos naturales o sintéticos.^(7,23)

Los microorganismos que producen los diferentes antibióticos tienen una amplia distribución en la naturaleza, sin embargo, de los varios cientos producidos de forma natural que se han purificado sólo un mínimo de ellos han resultado lo suficientemente poco tóxicos como para ser utilizados en la práctica médica.

En la actualidad los de mayor uso se han obtenido de un grupo reducido de m.o que pertenecen a los géneros *Penicillium*, *Streptomyces*, *Cephalosporium*, *Micromonospora* y *Bacillus*.⁽⁴⁰⁾

3.2.1 Tipos de agentes antimicrobianos:

Desde el punto de vista práctico existen:

- **Desinfectantes:** sólo se aplican a sistemas inanimados y eliminan la carga microbiana total.
- **Sanitizantes:** sólo se aplican a sistemas inanimados y disminuyen la carga microbiana total.
- **Antisépticos:** reducen y controlan la presencia de microorganismos potencialmente patógenos, sólo se pueden aplicar externamente en seres vivos (piel y/o mucosas).
- **Antimicrobianos de uso sistémico:** reducen y controlan la presencia de microorganismos que han invadido los tejidos. Actúan en el organismo, pudiendo ser ingeridos (vía oral), absorbidos por piel (apósitos) y/o inyectados.

La mayoría de los antibióticos son moléculas complejas, con regiones hidrofóbicas que facilitan el transporte al interior de la célula. Muchos poseen varios anillos, algunos de los cuales mejoran la interacción de la molécula con la bacteria de manera que se pueden clasificar según su origen, efecto antimicrobiano, espectro de actividad y mecanismo de acción (cuadro 3). Respecto a este último es preciso tener presente que puede haber un cierto número de estadios entre el efecto inicial o primario de la droga y la consiguiente muerte de la célula. Además algunos agentes pueden tener más de un sitio primario de ataque o mecanismo de acción.^(43,40,57)

CLASIFICACION	TIPO	DEFINICIÓN
ORIGEN	Naturales	Apartir de m.o.
	Sintéticos	Síntesis química
	Semisintéticos	Modificación química de antimicrobianos naturales
EFECTO ANTIMICROBIANO	Bacteriostático	Impide el desarrollo del m.o. sin destruirlo
	Bactericida	Acción letal sobre el m.o.
ESPECTRO DE ACTIVIDAD	Amplio	Actúan sobre un gran núm. De especies microbianas, Ej: Tetraciclínas
	Intermedia	Actúan sobre un limitado núm de m.o. Ej: Macrólidos
	Reducido	Actúan sobre un núm pequeño de m.os. Ej: Polimicina
MECANISMO DE ACCION	Inhibición de la síntesis de la pared celular.	Inhibe la síntesis de peptidoglicano mediante la inhibición de la incorporación de la D-alanina al pentapéptico, y la inhibición de la transpeptidación que dan origen a la rigidez de la pared.
	Inhibición de la función de la membrana citoplasmática.	Ataques tóxicos, Interfieren en la integridad de metabolitos y nutrientes de las bacterias.
	Inhibición de la síntesis proteica.	Inhiben a nivel de RNA polimerasa
	Inhibición de la síntesis de ácidos Nucleicos.	Actúan en la fase de duplicación y transcripción, que daña la multiplicación y metabolismo de la célula.
	Transformaciones metabólicas en el citoplasma.	

Cuadro 3. Clasificación y descripción de antimicrobianos.

Los antibióticos más abundantes y los mejor estudiados, son los que interfieren con enzimas de la biosíntesis del peptidoglicano de las eubacterias, como los β -lactámicos, fosfomicina, cicloserina, vancomicina y bacitracina. También los que interfieren con la síntesis de proteínas en la función de ribosomas tanto en la iniciación (subunidad 30S) por ejemplo las tetraciclinas como en la elongación (subunidad 50S): cloranfenicol, eritromicinas, lincosamidas; en ambas con muerte bacteriana como los aminoglucosidos, (fig. 4).⁽⁴¹⁾

Así mismo la modificación química de las moléculas por biosíntesis ha constituido un método en el desarrollo de nuevos antimicrobianos, como los aminoglucósidos, el ácido paraminosalilico (PAS) y los nitrofuranos. Más recientemente otros como los β -lactámicos de nuevas estructuras, los fluoroquinolonas y macrólidos.^(23,40)



fig. 4. Sitios de acción de la mayoría de los agentes antimicrobianos. (tomado de Ketek, Aventis Pharma, México, 2001)

La eficacia de los fármacos antimicrobianos depende del grado de sensibilidad de los microorganismos blanco, de esta manera los antimicrobianos de uso sistémico deben reunir las siguientes características:

- Deben ser más bactericidas que bacteriostáticos
- Deben mantenerse activos en presencia de plasma y líquidos corporales
- Es deseable que sean efectivos frente a un amplio espectro de m.o.
- Los m.o. susceptibles no se deben volver resistentes genética o fenotípicamente.
- No deben ser tóxicos y los efectos colaterales adversos tienen que ser mínimos para el huésped.

3.2.2 Métodos para determinar la actividad antimicrobiana:

Los métodos de susceptibilidad o actividad antimicrobiana (antibiogramas), son técnicas *in vitro* bajo condiciones de laboratorio específicas y estandarizadas, que reflejan la capacidad de uno o más antibióticos frente a una población bacteriana e incluyen las pruebas de Difusión en agar (discos), Dilución en agar, Dilución en caldo (cinética de crecimiento), Métodos automatizados, E-test, ensayo enzimático y cromatografía.^(23,24)

3.2.2.1.- Difusión en agar:

Este método, que es el más frecuentemente usado, es también llamado de difusión por disco o de Kirby-Bauer es cuantitativo y requiere la medición de los diámetros de la zona de inhibición que suministran estimaciones reproducibles de la susceptibilidad de las bacterias a los antibióticos. Estos procedimientos estandarizados requieren el uso de concentraciones inoculadas estandarizadas. En este caso, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con diferentes concentraciones conocidas del antibiótico. Las placas se incuban por 16-18 horas a 35°C. Durante la incubación, el antibiótico difunde en forma radial desde el disco

a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco (formándose un gradiente de concentración), en un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio, el diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de susceptible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a las tablas publicadas por el National Committee for Clinical Laboratories Standards (NCCLS) La interpretación requiere la correlación entre el diámetro obtenido en el disco y la concentración del antimicrobiano en el disco. Si las recomendaciones para realizar este método son fielmente seguidas, las categorías se correlacionan muy bien con los resultados de los otros métodos.^(7,9,40)

3.2.2.2 Dilución en agar

Es considerado el método de referencia. En éste se pueden probar muchas cepas simultáneamente, por su capacidad de detectar heterogeneidad o contaminación microbiana y por su reproducibilidad. Aquí no se diluye el agar sino el antimicrobiano. De esta forma las placas que contienen una determinada concentración de un antibiótico son inoculadas con el microorganismo en estudio y luego incubadas por 16 a 18 horas. Después de la incubación, se examina si el organismo crece o no en cada una de las placas, con lo cual se obtiene la concentración mínima inhibitoria (CMI) para el antibiótico, en esta dilución el compuesto presenta un efecto bacteriostático. Si una cepa de *S.aureus* crece en una placa que contiene una concentración de oxalina de 0,06 µg/ml pero no crece en una placa con una concentración de oxalina 0,12 µg/ml, significa que la CMI de oxalina que se requiere para inhibir a ese organismo es 0,12 µg/ml.^(9,23,24,40)

3.2.2.3 Dilución en caldo.

En este caso se usan tubos o microplacas que contienen concentraciones crecientes de un determinado antibiótico. Dentro de un caldo de cultivo el

organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pocillos de la microplaca y se lee CMI después de la incubación, de la misma forma descrita anteriormente para el método de la dilución en agar. Adicionalmente, en este método se puede determinar la concentración mínima bactericida (CMB) la cual se obtiene por subcultivo de los volúmenes de los tubos hacia el medio libre de antibiótico y examinado para crecimiento bacteriano.^(7,9,23)

3.2.2.4 E-test.

Este método ha sido descrito recientemente y representa una sofisticada combinación de los anteriormente descritos. El E-test es más simple que otras técnicas para obtener una CMI. Utiliza una tira de plástico no poroso de 6 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones que van desde 0,016 µg/ml hasta 256 µg/ml. El protocolo para preparar el inóculo es el mismo que para la difusión en disco. Esta tira se pone sobre una placa de agar que ha sido inoculada con el organismo en estudio. Después de incubar la placa por 16 a 18 horas, se forma un área de inhibición de forma elíptica y simétrica, en la cual la CMI será el valor obtenido en el punto en el que el extremo de inhibición intersecciona con la tira y puede ser leída directamente. Ha sido utilizado en estudios de susceptibilidad en gérmenes problemáticos o con requerimientos especiales, como: *H. pylori*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* y m.o. anaeróbicos.

El E-test se considera como método alternativo para el estudio cuantitativo de la sensibilidad antimicrobiana del que cabe destacar su sencillez y buena correlación con la técnica estándar de dilución en agar para el estudio de CMI.^(14,24)

La meta principal del estudio de susceptibilidad es proveer al clínico algunas recomendaciones sobre la terapia que puede ser más apropiada en pacientes con una infección específica. No obstante, la correlación exacta entre los resultados *in vitro* y la respuesta clínica es muchas veces difícil de predecir, ya que existen

numerosos factores tanto del agente antimicrobiano como del hospedero y del microorganismo (cuadro 4) que influyen en su interacción en un determinado paciente.⁽⁹⁾

Factores del agente antimicrobiano	Factores del hospedero	Factores del microorganismo
Farmacocinética	Enfermedad de base	Virulencia
Unión a proteínas del plasma	Estado inmunológico	Alta concentración de microorganismos
Vías de administración	Formación de absceso	Infección mixta
Acción bacteriostática o bactericida	Presencia de cuerpo extraño	Desarrollo de resistencia durante el tratamiento
Concentración en el sitio de infección	Función renal o hepática	
	Cumplimiento del tratamiento	

Cuadro 4. Factores que influyen en los resultados de los antibiogramas y la respuesta clínica (modificada de referencia 24)

La metodología usada para realizar el estudio de susceptibilidad toma en consideración algunos de estos factores para determinar más eficientemente cómo un microorganismo podría responder *in vivo* a un determinado antibiótico. La reproducibilidad de estas pruebas es de ± 1 dilución y para evitar una gran variabilidad deben ser estandarizadas y controladas muy cuidadosamente. De esta manera las pruebas de sensibilidad mediante dilución son muy útiles en:

- 1.- El estudio de nuevos agentes antimicrobianos.
- 2.- Confirmación de resistencia a aminoglicósidos determinada por pruebas de difusión en discos.^(7,9,23,24)

3.2.3.- Resistencia bacteriana

La síntesis de agentes quimioterapéuticos artificiales y el descubrimiento y mejora de los antibióticos han supuesto en este siglo una auténtica revolución médica en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Sin embargo, la extrema versatilidad y adaptabilidad de los microorganismos ha impedido que la victoria humana sobre las bacterias patógenas haya sido total, muchas bacterias han desarrollado en los últimos decenios mecanismos que las protegen frente a muchos fármacos. Así la capacidad de resistencia a antibióticos que presentan los microorganismos, puede ser una característica intrínseca, o bien puede resultar de la presión selectiva que surge en un ambiente alterado por el uso indiscriminado o exagerado de antimicrobianos, como frecuentemente se observa en situaciones clínicas.⁽⁴³⁾

Para comprender en qué forma los microorganismos manifiestan resistencia a los diversos antibióticos, es importante conocer:

- Las propiedades de dichos compuestos
- La forma como son transportados al interior celular
- Las alteraciones que provocan en la célula bacteriana
- Las características que les confieren propiedades antibacterianas
- Su mecanismo de acción⁽⁴¹⁾

En este contexto, es necesario considerar conceptos como:

- **Cepa insensible.** Es aquella cuyo fenotipo silvestre le permite "resistir" de modo natural a un determinado antibiótico. La base de esta insensibilidad suele ser alguna estructura de la bacteria que actúa como barrera (como por ejemplo, la membrana externa de Gram-negativas, que dificulta el paso de muchos agentes antibacterianos).
- **Cepa resistente.** Es una variante surgida por cambios genéticos a partir de un fenotipo silvestre originalmente sensible

A partir de ese conocimiento será posible entender cómo ha evolucionado la bacteria para resistir y reproducirse en presencia de un antimicrobiano^(24,54)

3.2.3.1 Mecanismos genéticos de la resistencia microbiana.

Los cambios genéticos que explican la resistencia pueden producirse por varios mecanismos que involucran ya sea al **DNA** cromosomal, como en la mutación, o por la adquisición de material genético extracromosomal, por transducción, transformación o conjugación.

En la mutación, aparecen cambios en el cromosoma que pueden ser debidos al azar o a la influencia de agentes físicos o químicos. Las mutaciones génicas se dice que son espontáneas cuando ocurren sin intervención de procedimientos mutagénicos experimentales, además son aleatorias y afectan a un gen cualquiera con frecuencias dentro del rango de 10^{-5} a 10^{-10} por célula y división. De manera que el surgimiento de ciertas cepas patógenas resistentes a antibióticos se debe al fármaco que inhibe o mata las bacterias silvestres sensibles, pero no afecta a aquellas que por mutación espontánea hayan adquirido un alelo resistente, estos individuos se multiplican de modo que al final son los más prevalentes.^(7,23,40,41,57)

Más comúnmente, la alteración genética que condiciona la resistencia es producida mediante la adquisición por parte del microorganismo, de genes transportados en plásmidos extracromosomales, mediante transducción, transformación o conjugación.

Este mecanismo muestra el problema más serio, ya que:

- está muy extendido;
- puede conferir resistencia a varios antibióticos a la vez;

- a diferencia del mecanismo mutacional, no suele suponer una desventaja adaptativa (no disminuye la tasa de crecimiento de la bacteria ni le hace perder sus propiedades de virulencia).

Es un fenómeno de intercambio dependiente de contactos célula-célula y consiste en el pasaje de genes (determinantes R) desde una bacteria resistente a una sensible, a través del acoplamiento directo entre las bacterias mediante la formación de un pili sexual. Los determinantes R que pueden contener información para brindar resistencia a varios antimicrobianos a la vez y esto ocurre demasiado rápido, en un solo paso. Para que ocurra la conjugación entre bacterias y la formación del pili sexual, es necesaria la intervención de otro grupo de genes denominado factor de transferencia de la resistencia, sin los cuales no puede realizarse el proceso. El complejo determinante R más el factor de transferencia de la resistencia es conocido como factor R. La aparición de resistencia mediada por factores R es muy importante entre bacterias Gram negativas, en especial entre Enterobacterias. Entre los microorganismos capaces de transferir este tipo de resistencia a bacterias sensibles están *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella* y *Pseudomonas aeruginosa*. Por este mecanismo se produce resistencia a tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamidas, penicilinas y aminoglucósidos.

Aparte de los plásmidos R conjugativos existen otros no conjugativos, que sin embargo pueden ser transferidos entre distintas bacterias por otros medios:

- los plásmidos no conjugativos movilizables pueden ser transferidos por otro plásmido conjugativo compatible en la misma célula.
- por transducción : Un virus bacteriófago transfiere DNA extracromosomal bacteriano incorporado en su cubierta proteica, desde una bacteria insensible a una sensible, la cual adquiere la resistencia y la capacidad de transferirla a su descendencia, tal como se ha observado en cepas de *Staphylococcus aureus* que adquiere resistencia a las penicilinas. mediante bacteriófagos

- por transformación : el **ADN** desnudo del plásmido puede ser captado por una bacteria sensible receptora y como posee genes que codifican para resistencia, la bacteria se convierte en resistente para uno o más antimicrobianos

3.2.3.2 Mecanismos bioquímicos de resistencia bacteriana:

Los cambios genéticos producidos dan lugar a diversos tipos de alteraciones bioquímicas en el metabolismo bacteriano, las cuales pueden ser de tres tipos generales: cambios en el sitio de acción del antimicrobiano, producción de enzimas que modifiquen a la droga o disminución de la captación del antimicrobiano.

Se han demostrado cambios en el sitio de acción del antimicrobiano en los siguientes casos:

- a) Para aminoglucósidos, cambios en la proteína receptora de la subunidad 30S.
- b) Para beta lactámicos, alteraciones o aparición de nuevas proteínas fijadoras de penicilinas.
- c) Para eritromicina y clindamicina, metilación del RNA ribosomal en la subunidad 50S.
- d) Para quinolonas, alteraciones en la **DNA** girasa.
- e) Para trimetoprim, cambios en la dihidrofolato reductasa bacteriana.
- f) Para sulfonamidas, cambios en la dihidropteroico sintetasa.
- g) Para rifamicinas, alteraciones en la RNA polimerasa DNA dependiente.
- h) Para vancomicina, cambios en los péptidos de la pared celular bacteriana.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En lo relativo a la adquisición por parte de la bacteria de la capacidad de formar enzimas que inactiven a antimicrobianos, se conocen los siguientes casos:

- a) Para aminoglucósidos, la aparición de enzimas adenilantes, acetilantes y fosforilantes.
- b) Para cloramfenicol, la producción de acetiltransferasa.
- c) Para beta lactámicos, la destrucción de los antibióticos por enzimas beta lactamasas.

Finalmente, para los cambios bioquímicos que reducen la captación, ya sea porque disminuyen el ingreso o porque aumentan la salida o flujo del antimicrobiano, se han encontrado los siguientes casos: a) Aumento del flujo: para tetraciclinas, macrólidos y quinolonas, mediante la adquisición de nuevos sistemas de transporte en la membrana citoplasmática. b) Reducción del ingreso por disminución de la permeabilidad: para trimetoprim, quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol y beta lactámicos, por cambios en la constitución de la membrana celular externa. (9,40,43,57)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.3 CARBAMATOS

Originalmente los carbamatos se extrajeron del frijol del calabaz que crece en África oriental. Los extractos de este frijol contienen fisostigmina, un ester de metilcarbamato (Barón, 1991). Los carbamatos o uretanos son compuestos orgánicos que poseen una estrecha relación funcional con los carbonatos. Formalmente se trata de la monoamina del ácido carbónico. El ácido carbámico como tal no existe, porque se descarboxila espontáneamente:



en cambio si existen sus derivados llamados carbamatos, son compuestos sólidos y estables a temperatura ambiente, cuya estructura general es :

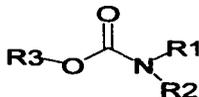


Fig. 5 Estructura química de carbamatos

Donde R₁, R₂, y R₃, pueden ser un alquilo o un anilo.

Como todo compuesto químico sintético los Carbamatos poseen importancia en la vida diaria en diferentes campos, su uso comenzó en los años cincuenta como insecticidas y aproximadamente 25 derivados de los carbamatos están en uso hoy como pesticidas y productos farmacéuticos en combinación con otros compuestos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se piensa que el modo de acción de los carbamatos al igual que el de los organofosforados en los insectos es inhibir la acción de la acetilcolinesterasa de la sinapsis nerviosa, en forma reversible de dicha enzima porque la unión enzima-carbamil es reversible. Los ditiocarbamatos tienen actividad antifúngica y herbicida, con poco efecto anticolinesterásico. También se han utilizado para el tratamiento de carcinomas avanzados. (17,18,28)

En estudios recientes se ha mostrado una actividad importante como antiparasitarios contra nematodos y como agentes antimicrobianos, un ejemplo de estos es la teltromicina (fig. 6) que posee un anillo de carbamato en C11-12. Logra su actividad antibacteriana al unirse con los ribosomas bacterianos inhibiendo la síntesis proteica, se ha reportado que su inclusión en la teliomicina le dá al antimicrobiano mayor afinidad del compuesto hacia la bacteria, de igual forma está registrada la actividad inhibitoria contra *E. coli* de los carbamatos en unión con quinolonas que inhiben la DNA girasa (fig.7). (42,59)

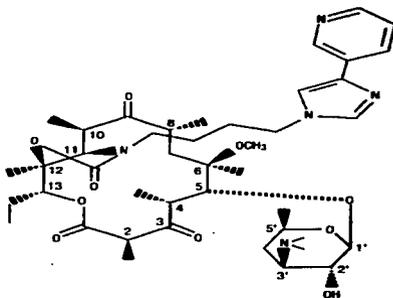


Fig. 6 Estructura de la teltromicina

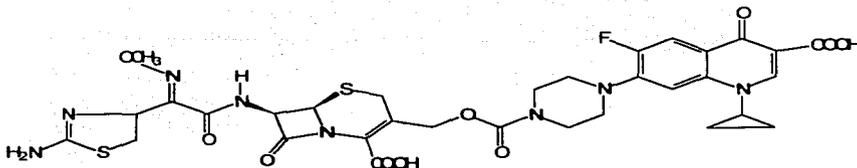


Fig 7. Estructura de cefalosponina 3'-quinolona-carbamato (Ro 24-4363). (tomada de referencia 42)

En la industria los carbamatos resultan derivados muy útiles para la identificación de alcoholes, además la formación de un carbamato también es esencial para la síntesis de los polímeros llamados poliuretanos que se utilizan como materia prima en la elaboración de productos como relleno de colchones, sillas, defensas para automóviles, etc.⁽¹⁸⁾

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.0 JUSTIFICACION

La infección por *H. pylori* es considerada en la actualidad como una de las más difundidas en el mundo y de importancia clínica. Ha adquirido creciente importancia en la medida que quedó demostrada su relación en algunas lesiones gastroduodenales y su inclusión por parte de la IARC en 1994 (grupo de estudio del cáncer, perteneciente a la Organización Mundial de la Salud) entre los agentes carcinógenos tipo 1. La eficacia del tratamiento de infección gástrica causada por *H. pylori*, puede ser reducido por la resistencia adquirida a varios fármacos sobre todo al MTZ y CTM, ampliamente utilizados en los distintos hallazgos de la infección, los cuales han creado resistencia en un (1-85%). Esto ha intensificado la búsqueda de antimicrobianos eficaces que permitan erradicar a esta bacteria del estómago.^(25,47) En este sentido es necesario evaluar más compuestos con potencial antimicrobiano como los derivados del ácido carbámico para definir si estos pueden ser utilizados en el control y erradicación de *H. pylori*.

5.0 HIPOTESIS

Si los derivados del ácido carbámico son agentes con actividad potencialmente antimicrobiana, es posible que estos compuestos recién preparados inhiban el crecimiento de *H. pylori*.

6.0 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Determinar la posible actividad inhibitoria contra *H. pylori* de productos químicos experimentales derivados del ácido carbámico en proceso de patente con número de oficio: DGAJ/SJPI/7985/00 de la Dirección General de Asuntos Jurídicos. Subdirección Jurídica de Propiedad Intelectual.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1.- Determinar la CMI contra *H. pylori* de 11 productos químicos experimentales derivados del ácido carbámico utilizando el método de Kirby-Bauer.
- 2.- Determinar la CMI contra *H. pylori* de 11 productos químicos experimentales derivados del ácido carbámico utilizando el método de dilución en agar,
- 3.- Comparar los métodos de Kirby-Bauer y dilución en agar, para las pruebas de susceptibilidad a *H. pylori*

7.0 MATERIAL Y METODOS

7.1 Cepas:

- a) Se utilizó una cepa de *H. pylori* ATCC 43504.
- b) La bacteria fue identificada realizando tinción de Gram y las pruebas bioquímicas de oxidasa, catalasa y ureasa.
- c) Se cultivó en agar *Campylobacter* (bioxon) suplementado con 5% de sangre desfibrinada de caballo incubando a 37°C bajo condiciones microaerofílicas utilizando para ello sobres generadores de CO₂ (Oxoid SR7), durante 3 días.

7.2. Compuestos a evaluar:

Los derivados del ácido carbámico utilizados contra *H. pylori* en este proyecto fueron: LQM908, LQM907, LQM906, LQM181, LQM905, LQM904, LQM903, LQM177, LQM902, LQM901, LQM996, sintetizados en el laboratorio de Química Medicinal de la FES-Cuautitlán, UNAM, a cargo del Dr. Enrique Ángeles Anguiano, cabe mencionar que la estructura de tales compuestos no puede ser divulgada debido a que están en trámite de patente con número de oficio: DGAJ/SJPI/7985/00 de la Dirección General de Asuntos Jurídicos. Subdirección Jurídica de Propiedad Intelectual.

7.2.1. Pruebas de solubilidad:

A todos los compuestos se les realizaron pruebas cualitativas de solubilidad utilizando como disolventes Dimetilsulfóxido (DMSO), acetona (ACT), y Agua.

7.3 Nefelómetro de Mc Farland

Se prepararon los tubos de la escala (0.5 a 10) del nefelómetro de Mc Farland, utilizando H₂SO₄ 1% y BaCl₂ 1%, de acuerdo al cuadro 5.

Tubo No.	H ₂ SO ₄ 1% (ml)	BaCl ₂ 1% (ml)	[m.o./ml] X10 ⁴	D.O (540 nm)
0.5	9.95	0.05	1	0.080
1	9.9	0.1	3	0.116
2	9.8	0.2	6	0.231
3	9.7	0.3	9	0.338
4	9.6	0.4	12	0.427
5	9.5	0.5	15	0.509
6	9.4	0.6	18	0.604
7	9.3	0.7	21	0.694
8	9.2	0.8	24	0.729
9	9.1	0.9	27	0.779
10	9.0	1.0	30	0.874

Cuadro 5. Escala del Nefelómetro de Mac Farland utilizada

7.4. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana:

7.4.1.- Método de Kirby-Bauer (difusión en disco)

Es el método de difusión con discos más utilizado en la práctica clínica, el cual ha sido aceptado por la Food and Drugs Administration (FDA) de USA y reportado como método estándar por la NCCLS descrito en el documento M2-A5 (1993).

7.4.1.1 Preparación de sensidiscos:

Para la preparación de sensidiscos se utilizó papel filtro (Watman N°1), de un tamaño de 7 mm de diámetro, estos se esterizaron en autoclave 15 minutos a 15 Lb de presión y 121°C.

Se preparó 1 ml de solución de cada compuesto, pesando 0.4096 mg de cada uno, para asegurar una concentración en el disco de 2048µg/5µl. De esta solución se realizaron diluciones dobles (Log₂) de cada uno de los compuestos con el disolvente ideal (cuadro 8) y se prepararon sensidiscos con un rango de concentraciones desde 2048 µg/disco a 8 µg/disco, para lo cual se impregnó cada

disco con 5 µl de cada dilución utilizando micropipetas semiautomáticas en condiciones estériles.

Se almacenaron a 4°C y se utilizaron dentro de los 3 días siguientes a su preparación.

7.4.1.2. Inoculación de *H. pylori* :

La cosecha del m.o. se realizó una vez que se verificó por pruebas bioquímicas la pureza del cultivo, de acuerdo al cuadro 6.

Prueba Bioquímica	Resultado
Tinción de Gram	Bacilos curvos Gram Negativos
Oxidasa	Positiva
Ureasa	Positiva
Catalasa	Positiva

Cuadro 6. pruebas Bioquímicas realizadas a *H. pylori* .

Se preparó una suspensión bacteriana con solución salina fisiológica estéril (SSF) ajustada a la turbidez visual comparable al estándar del tubo 0.5 del Nefelómetro de MacFarland (1 X 10⁸ UFC/ml).

Posteriormente se colocó 1 ml de la suspensión bacteriana sobre placas de agar para *Campylobacter* (Bioxon), los cuales fueron esparcidos completamente, y se colocaron los sensidiscos de la siguiente manera: por cada placa 3 discos de un mismo compuesto, cada uno con una dilución diferente más un disco control de disolvente. Esto se realizó por triplicado para cada dilución con los 11 compuestos, además se inocularon placas control de crecimiento (sin sensidiscos) de *H. pylori* por césped y por dilución.

Todas las placas se incubaron a 37°C en atmósfera microaerofílica utilizando sobres generadores de CO₂ (Oxoid SR7) durante 3 días.

7.4.1.3 Interpretación:

Se examinaron las placas y se midieron los diámetros de las zonas de inhibición de crecimiento con vernier, ya que proporciona una precisión de 1 mm. Los datos obtenidos se trataron estadísticamente determinando para cada halo de inhibición: media, desviación estándar y coeficiente de variación. Con estos datos se determina la sensibilidad o resistencia de *H. pylori* a los compuestos en estudio.²⁶

7.4.2 Método de dilución en agar:

La NCCLS en el documento M100-S9 (1999) recomienda un método de dilución en agar, de las pruebas de susceptibilidad *in vitro* contra *H. pylori* y se refiere a la incorporación de las sustancias a estudiar en el agar como si fueran soluciones acuosas.

7.4.2.1 Preparación de placas de dilución:

Se realizaron diluciones dobles de cada uno de los compuestos a partir de 2048 a 8 µg/ml utilizando como disolvente DMSO.

Se prepararon cajas de agar para *Campylobacter* suplementado con sangre de caballo defibrinada al 5%. Para ello se esterilizó previamente el medio bajo las condiciones antes descritas y una vez que alcanzó una temperatura entre 45 y 50°C, se incorporó la solución de cada una de las diluciones de los derivados del

ácido carbámico, se homogenizó y posteriormente se adicionó 1.5 ml de sangre desfibrinada de caballo y se homogenizó.

Se distribuyó en cajas petri estériles, dejándolas a prueba de esterilidad 24 horas. Finalmente se almacenaron a 4°C no más de 3 días.

7.4.2.2 Inoculación de *Helicobacter pylori*

Se preparó una suspensión bacteriana en SSF estéril ajustada a la turbidez visual comparable al estándar del tubo 2 del Nefelómetro de Mc Farland de una concentración aproximada de 6×10^8 m.o./ml y se inocularon por punteado 3 μ l de esta suspensión a todas las diluciones por triplicado.

Se incubó bajo las condiciones mencionadas para el método anterior durante 3 días.

7.4.2.3. Interpretación:

Se registró la presencia o ausencia de crecimiento de *H. pylori* en cada dilución. La placa de concentración a la cual se observó ausencia total del m.o. se interpretó como valores de CMI en μ g/ml.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8.0 RESULTADOS

8.1 Pruebas de solubilidad:

Los resultados de las pruebas de solubilidad a los compuestos derivados del ácido carbámico motivo de este estudio se muestran en el cuadro 7 en donde se observa que la mayoría de los compuestos son solubles tanto en DMSO como en ACT e insolubles en agua. La solubilidad se expresa como: muy soluble(++), soluble(+), e insoluble (-)

COMPUESTO	DMSO	ACT	AGUA
LQM908	+	++	-
LQM907	+	++	-
LQM906	+	++	-
LQM181	++	+	-
LQM905	++	+	-
LQM904	+	++	-
LQM903	++	+	-
LQM177	++	+	-
LQM902	+	++	-
LQM901	++	+	-
LQM996	+	++	-

Cuadro 7 : Se muestra la solubilidad de los compuestos derivados del ácido carbámico

Con estos datos se eligió el disolvente ideal para cada compuesto, el cual se utilizó para la preparación de sensibilizadores en la prueba de susceptibilidad antimicrobiana de Kirby-Bauer quedando de la siguiente forma:

ACETONA	DIMETILSULFOXIDO
LQM908	LQM181
LQM907	LQM905
LQM906	LQM903
LQM904	LQM177
LQM902	LQM901
LQM996	

Cuadro 8: Disolvente ideal para los derivados del ácido carbámico de acuerdo a las pruebas cualitativas de solubilidad

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8.2 Identificación del microorganismo

Después de 3 días de incubación a 37°C se examinaron las placas control de crecimiento y se realizaron las lecturas de las placas problema en cada método. De las primeras se identificó *H. pylori* por morfología colonial (colonias pequeñas translúcidas brillantes con una elevación convexa y borde entero) y mediante las pruebas bioquímicas: Catalasa (+), oxidasa (+) y ureasa rápida (+) (en los primeros 30 minutos de incubación) y por tinción de Gram: Cuando *H. pylori* crece en medios de cultivo pierde su estructura completamente espiral y adquiere una estructura algo más recta aunque sigue siendo curvo. Se observa de color rosa debido a su estructura de bacilo Gram negativo.

8.3 Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana:

8.3.1. Método de Kirby-Bauer (difusión en disco)

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad por el método de difusión en disco de los derivados del ácido carbámico en estudio, se muestran en un resumen estadístico (media geométrica (x), desviación estándar (d.s) y coeficiente de variación (c.v)) de los diámetros de los halos de inhibición en el cuadro 9. *H. pylori* resultó insensible en las concentraciones probadas a 2 de los 11 compuestos (18.18%) LQM903 y LQM177, este último inhibe a 2048 µg/ml con un halo de inhibición despreciable de 8.33 mm.

Nueve compuestos (81.82%) muestran en diferentes grados alguna actividad inhibitoria contra el m.o. y en su CMI presentan medias de los halos de inhibición de 12.33 a 14 mm de diámetro.

La CMI de LQM901 y LQM902 es de 256 µg/ml en el orden de dilución de 8Log₂. En 4 compuestos (36.36%) LQM908, LQM907, LQM906, LQM181, se obtuvo una CMI de 128 µg/ml (7Log₂).



COMPUESTO	ESTADISTICA	CONCENTRACION $\mu\text{g/ml}$								
		2048	1024	512	256	128	64	32	16	8
LQM908	X(m.m)	33.33	30	19.67	16.67	12.67	10.33	0	0	0
	d.s	0.58	1.00	0.58	1.53	0.58	0.58	0	0	0
	c.v	1.73	3.33	2.94	9.17	4.56	5.59	0	0	0
LQM907	X(m.m)	25.33	21.67	19.33	15.67	12.33	8.57	0	0	0
	d.s	0.58	1.15	0.58	0.58	0.58	0.58	0	0	0
	c.v	2.28	5.33	2.99	3.69	4.68	6.66	0	0	0
LQM906	X(m.m)	23.0	20.67	18.67	16.67	14.33	11.67	10.33	0	0
	d.s	1.00	1.15	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0	0
	c.v	4.35	5.59	3.09	3.46	4.03	4.95	5.590	0	0
LQM181	X(m.m)	24.33	22.67	19.33	15.67	12.67	9.33	0	0	0
	d.s	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0	0	0
	c.v	2.37	2.55	2.99	3.69	4.56	6.19	0	0	0
LQM905	X(m.m)	28.33	25.33	23.0	18.33	15.33	12.33	8.67	0	0
	d.s	0.58	0.58	1.00	0.58	0.58	0.58	0.58	0	0
	c.v	2.04	2.28	4.35	3.15	3.77	4.68	6.66	0	0
LQM904	X(m.m)	36.33	33.33	30.33	25.33	21.33	15.33	12.67	8.33	0
	d.s	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	1.15	0.58	0.58	0
	c.v	1.59	1.73	1.90	2.28	2.71	7.37	4.56	6.93	0
LQM903	X(m.m)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	d.s	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	c.v	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LQM177	X(m.m)	8.33	0	0	0	0	0	0	0	0
	d.s	0.58	0	0	0	0	0	0	0	0
	c.v	6.93	0	0	0	0	0	0	0	0
LQM902	X(m.m)	20.33	17.33	15.00	12.67	10.33	8.33	0	0	0
	d.s	0.58	0.58	0	0.58	0.58	0.58	0	0	0
	c.v	2.84	3.33	0	4.56	5.59	6.93	0	0	0
LQM901	X(m.m)	20.33	17.67	14.00	11.67	8.67	0	0	0	0
	d.s	0.58	0.58	1.00	0.58	0.58	0	0	0	0
	c.v	2.84	3.27	7.14	4.95	6.66	0	0	0	0
LQM996	X	N/D	N/D	N/D	28.33	23.33	17.67	13.66	8.33	0
	d.s				1.53	0.58	1.15	1.53	0.58	0
	c.v				5.39	2.47	6.54	4.29	6.93	0

Cuadro 9.- Resultados de los halos de inhibición en mm de *H. pylori* por acción de los derivados del ácido carbámico. Por el método de Kirby-Bauer. N/D= No Determinado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los compuestos con mayor actividad inhibitoria son el LQM905 con una CMI de 64 $\mu\text{g/ml}$ (6Log_2), el LQM904 y el LQM996 ambos con una CMI de 32 $\mu\text{g/ml}$ (5Log_2). Para el caso de LQM996, en concentraciones elevadas (512-2048 $\mu\text{g/ml}$), no se determinó el halo de inhibición ya que este fue demasiado grande.

8.3.2 Método de dilución en agar:

En este método se considera la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano para determinar la CMI de cada compuesto contra *H. pylori*. Los resultados de la actividad inhibitoria contra el m.o de los derivados del ácido carbámico en estudio se resumen en el cuadro 10 en el cual se reporta al LQM996 como el más potente con una CMI de 32 $\mu\text{g/ml}$. En general para los 11 productos se observa que coinciden en un 81.8% con respecto a los resultados obtenidos por el método anterior, ya que solo dos compuestos (LQM904 y LQM177) presentan diferencia de CMI en 1Log_2 con respecto a la obtenida en la técnica de Kirby-Bauer (cuadro 11).

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN $\mu\text{g/ml}$								
	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8
LQM908	-	-	-	-	-	+	+	+	+
LQM907	-	-	-	-	-	+	+	+	+
LQM906	-	-	-	-	-	+	+	+	+
LQM181	-	-	-	-	-	+	+	+	+
LQM905	-	-	-	-	-	-	+	+	+
LQM904	-	-	-	-	-	-	+	+	+
LQM903	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LQM177	-	+	+	+	+	+	+	+	+
LQM902	-	-	-	-	+	+	+	+	+
LQM901	-	-	-	-	+	+	+	+	+
LQM996	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Cuadro 10. Determinación de las CMI por el método de dilución en agar de los derivados del ácido carbámico contra *H. pylori*. Donde (+) indica desarrollo microbiano, (-) sin desarrollo microbiano

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

COMPUESTO	CMI (K-B) $\mu\text{g/ml}$	Dilución (Log ₂)	CMI (D.A) $\mu\text{g/ml}$	Dilución (Log ₂)
LQM908	128	7	128	7
LQM907	128	7	128	7
LQM906	128	7	128	7
LQM181	128	7	128	7
LQM905	64	6	64	6
LQM904	32	5	64	6
LQM903	s/a	s/a	s/a	s/a
LQM177	s/a	s/a	2048	11
LQM902	256	8	256	8
LQM901	256	8	256	8
LQM996	32	7	32	7

Cuadro 11: Datos comparativos de las CMI y dilución (Log₂) obtenidos en los métodos de Kirby-Bauer (K-B) y dilución en agar (D.A), donde s/a = sin actividad a las concentraciones utilizadas.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

9.0 DISCUSIÓN

La implicación de *H. pylori* como agente etiológico de gastritis y úlceras gastroduodenales ha provocado una auténtica revolución en el enfoque y la actitud terapéutica frente a estas enfermedades, colocando en un primer plano el empleo de agentes antimicrobianos. Actualmente la mejor opción para tratar la infección por *H. pylori* es la que incorpora dos antibióticos y un antisecretores. Hay varias combinaciones aceptadas en triple y cuadruple terapia combinando antisecretores con diferentes antibióticos como, amoxicilina, claritromicina, imidazoles, metronidazol y tetraciclina. Sin embargo la eficacia del tratamiento puede verse reducido tanto por la ocurrencia de la propia infección como por la resistencia adquirida a varios fármacos como el metronidazol (1-85%) y claritromicina (1-55%). Esta resistencia probablemente está relacionada con el uso previo de los fármacos, ya que el *H. pylori* adquiere rápidamente resistencia a compuestos como el metronidazol, esto de acuerdo a lo reportado por Piter J y col (1999). Este fenómeno ha aumentado la importancia de las pruebas de susceptibilidad contra *H. pylori* en busca de una combinación antibiótica eficiente o bien el estudio de nuevos antimicrobianos que permitan la erradicación del m.o. del estómago. Una de las limitantes de las pruebas *in vitro* de susceptibilidad contra *H. pylori* son sus requerimientos y condiciones especiales de crecimiento, que afectan directamente los resultados, por ello la NCCLS en su documento M100-S9 (1999) ha sugerido el método de dilución en agar ya que es tolerante a la atmósfera microaerofílica y a los tiempos prolongados de incubación que permiten la estable interacción del antimicrobiano con el m.o. en las pruebas *in vitro*. Así mismo algunos autores han empleado el método de difusión en disco, que es económico, rápido y fácil de realizar en los laboratorios de rutina, y se ha encontrado una alta correlación de resultados con relación a los obtenidos por el método de difusión en agar con un error del 1% reportado por Chaves y Gadanho (1999). El método de E-test y dilución en caldo también empleados disminuyen las variables a controlar en crecimiento del *H. pylori*, pero son poco rentables para

determinaciones rutinarias de aislados individuales por esta razón estos últimos no se emplearon en este estudio^(16,19,25,34,38,46,49,51)

Henriksen y col (1997) demostraron que las pruebas de resistencia dependen de la edad de las colonias utilizadas en los ensayos, siendo mayormente reproducibles los resultados cuando se utilizan colonias jóvenes (3 o 4 días), en nuestro trabajo se unificó la edad de las colonias a 3 días de incubación, partiendo siempre de un concentrado almacenado.⁽²⁰⁾

Los compuestos estudiados pertenecen a una familia de derivados del ácido carbámico (en proceso de patente) los cuales se diferencian entre sí por el sustituyente en la estructura base. Existen estudios con carbamatos en unión con quinolonas utilizados como antimicrobianos contra bacterias Gram negativas (*E.coli*) cuya actividad se atribuye a la inhibición de la DNA girasa, y más recientemente como sustituyente en la telitromicina (ketólido de nueva generación) inhibiendo la síntesis de proteínas. El mecanismo de acción de los compuestos no es materia de nuestro estudio, pero estos datos nos amplían el panorama sobre la importancia de estos nuevos compuestos como agentes antimicrobianos. Por ejemplo en la telitromicina se ha justificado la introducción de un anillo de carbamato en su cadena lateral, ya que, mejora las propiedades fisicoquímicas del ketólido, a demás de aumentar su afinidad por la bacteria lo que dá como resultado un incremento de la actividad bacteriana, lo cual apoya el presente estudio del empleo de los carbamatos como agentes antimicrobianos.^(42,59)

Con las pruebas de solubilidad realizadas a los 11 derivados del ácido carbámico se determinó que son insolubles en agua. Los compuestos LQM908, LQM907, LQM906, LQM904, LQM902 y LQM996, son más solubles en ACT y por ello se utilizó como disolvente para la elaboración de sensibilizadores, sin embargo, en la preparación de diluciones en medio de cultivo estos compuestos precipitaban por la presencia de agua y por ello se decidió trabajar todos los compuestos con DMSO para realizar el método de dilución en agar. El disolvente no afectó la

actividad de los compuestos y se comprobó con los cultivos control de disolvente en los cuales no hubo inhibición, además se obtuvo una correlación de 81.81% entre los métodos y una reproducibilidad de C.V. ≥ 10 aceptados para pruebas manuales. El 81.8% de estos derivados del ácido carbámico presentan alguna actividad inhibitoria contra *H. pylori*, incluso resultaron con mayor actividad contra la bacteria (CMI $\leq 256 \mu\text{g/ml}$) que la registrada contra otras bacterias Gram negativas (*E. Coli* con una CMI 426 $\mu\text{g/ml}$) estudiadas anteriormente.⁽²⁸⁾

Los resultados muestran que la CMI del compuesto LQM996 (32 $\mu\text{g/ml}$) que resultó ser el más activo frente a la cepa estudiada, es mayor que la reportada por otros autores para metronidazol (8 $\mu\text{g/ml}$) y claritromicina (1 $\mu\text{g/ml}$) bajo condiciones de crecimiento similares, sin embargo además de la actividad inhibitoria contra *H. pylori*, la importancia de estos nuevos compuestos radica en la baja toxicidad que presentan contra el hospedero en relación al metronidazol y otros antimicrobianos empleados.^(28,53)

De acuerdo a nuestra experiencia se recomienda el método de dilución en agar, ya que por tratarse de compuestos no comerciales, se involucran variables que dificultan la estandarización del método de Kirby-Bauer como el tamaño del disco, el poro del papel empleado y la apreciación en la lectura, el método de dilución en agar reduce estas variables y además se puede emplear para el estudio de múltiples cepas simultáneamente, lo cual sería uno de los objetivos para estudios posteriores sobre la potencia de los compuestos contra otras cepas de *H. pylori*.⁽⁵⁰⁾

10.0 CONCLUSIONES

- 1) Al evaluar la actividad antimicrobiana de 11 derivados del ácido carbámico contra *H. pylori* ATCC 43 504 se encontró que si inhiben a dicha bacteria, siendo el más activo el LQM996.
- 2) Las CMI, para *H. pylori* son semejantes por ambos métodos y solo para 2 compuestos el LQM904 y el LQM177 se obtuvo una diferencia de 1Log_2 de dilución entre los métodos.
- 3) Ambos métodos presentan buena correlación (81.8%) y reproducibilidad de resultados, pero se recomienda para estudios posteriores el método de dilución en agar, para las pruebas de susceptibilidad de *H. pylori* por ser un método accesible para el estudio simultaneo de más de una cepa.
- 4) El estudio de la actividad de los derivados del ácido carbámico, requiere en futuros trabajos el empleo de cepas de aislados clínicos, estudios bioquímicos y estudios *in vivo*, que involucren el posible mecanismo de acción.
- 5) Los compuestos en cuestión presentan actividad inhibitoria *in vitro* contra bacterias tanto Gram (+) como Gram (-) y dentro de este proyecto su utilización contra el crecimiento de *H. pylori* destaca su importancia en la baja toxicidad que presentan contra el huésped en relación a otros antimicrobianos utilizados en la infección.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

11.0 REFERENCIAS

- 1.- Talley, N.J. Ormand J.E., Carpenter H.A.. Triple therapy for *Helicobacter pylori* in non-ulcer dyspepsia. *Am J Gastroenterol* 1991; **86**:121-3
- 2.- Correa, P. Anatomía patológica de la infección por *Helicobacter pylori*. *Microbiología, clínica y tratamiento*. Mosby Doyma, Barcelona 1995; 73-83.
- 3.- Pelayo G., Pérez, Esteban A. Anticuerpos frente al *Helicobacter pylori* en personal de gastroenterología, pacientes y población sana. *Rev. Esp. Enf. Digest* 1991; **80**:233-6
- 4.- Algarra Felipe, Gujaro. *Helicobacter pylori*. Revisión actualizada. Ed. Sociedad valenciana de microbiología clínica. España 1999; pág. 1-15
- 5.- Li T.Ha, D.A. Ferguson and col. A newly developed PCR assay of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy, saliva, and feces. *Dig. Dis. Sci.* 1996; **41**:2141-2149
- 6.- Thomas J.E. et al. Isolation of *H. pylori* from human faeces. *Lancet* 1992; **340**:1194.
- 7.- Davis M.D. Bemanrd. *Tratado de microbiología*. Ed. Salvat, 2 edición, México, 1980
- 8.- Thomas, J.E. Epidemiology of infection. *Curr Op Gastroenterol* 1994; **10**: 7-11.
- 9.- Jawetz, Melnick y Adelberg. *Microbiología médica*, ED. Manual moderno, 15 ed. México. 1996 pág 279-281.
- 10.- Falk, Per. *Helicobacter pylori* can the mechanisms of pathogenesis guide us towards novel strategies for treatment and prevention?. *Journal of Internal Medicine* 1996; **240**(6): 319-332.
- 11.- Current european concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection. The Maastricht consensus Report. *EHPHG. Gut* 1997; **41** (1):8-13
- 12.- Sánchez Gonzalez J, et al. Diagnóstico y tratamiento oportunos de la infección por *Helicobacter pylori*: solución a un problema de salud. *Rev Mex Patol Clin* 1999; **46**(1): 4-13.
- 13.- López Brea, D. Domingo, et al. Tratamiento de la infección por *H. pylori*. *Revista Española de Quimioterapia*; 1997; **10**(2):64-68
- 14.- Recomendaciones del grupo MENSURA para la selección de antimicrobianos en el estudio de la sensibilidad y criterios para la interpretación del antibiograma. *Revista Española de*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 15.- Alarcón, et al. In vitro activity of omeprazole in combination with several antimicrobial agents against clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 937-940.
- 16.- Piccollomini, Raffeale, et. Al. Comparative Evaluation of the E test, Agar Dilution, and Broth, Microdilution for Testing Susceptibilities of *Helicobacter pylori* Strains to 20 antimicrobial Agents. *Journal of clinical microbiology* 1997;35(7):1842-1846..
- 17.- Primo, Yufera Eduardo. *Química orgánica básica y aplicada de la molécula a la industria*. Tomo I. Ed. Reverte, Barcelona 1996; Pág 605-607
- 18.- Odilón, A.s. Síntesis de carbamatos a partir de aminas aromáticas. FES-Cuatitlán UNAM, México,1993; 59pp
- 19.- Garrido, Antonio. (1999) Erradicación mediante triple terapia de *Helicobacter pylori* en pacientes ulcerosos. Papel de la endoscopia y la sensibilidad antibiótica. *Microbiología*. Hospital General de Riolinto, Huelva 1999;10(3):16-23
- 20.- Henriksen. T.H. A simple method for determining metronidazole resistance of *Helicobacter pylori*. *Journal of clinical microbiology* 1997;35(6):1424-1426.
- 21.- Buckley, MJ, et.al. Metronidazole resistance reduces efficacy of triple therapy and leads to secondary clarithromycin resistance. *Dig.Dis.Sci* 1997;42:2111-15
- 22.- Loffeld, R.J.L.F. A review of diagnostic techniques for *Helicobacter pylori* infection. *Dig Dis Sci* 1993; 11:173-80.
- 23.- Koneman, Allen y coll. *Diagnóstico microbiológico*, ED.Médica Panamericana, 3 edición. México 1998
- 24.- Palavecino, Rosales Elizabeth. Interpretación de los estudios de susceptibilidad antimicrobiana. *Boletín Escuela de Medicina*. Pontificia Universidad Católica de Chile, 1997; 26:156-160
- 25.- Kang y cols y Rozynek. XI Congreso de la Sociedad Europea de Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica. Turquía 2001; 83pp

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 26.- Canadian *Helicobacter pylori* Susceptibility Study 2000. Queen Elizabeth II Health Sciences Centre, Halifax, N.S. Canadá 2000;13(4):694-713
- 27.- Suplemento informativo 9. Documento No. M100-S9. Wayne, PAPA. NCCL, 1999
- 28.- Bernal Ayala. Evaluación de algunos productos derivados del ácido carbámico como agentes antimicrobianos. FES-Cuautitlán UNAM. México 2000;66 PP.
- 29.- Sociedad Iberoamericana de divulgación científica. Mecanismos celulares e inhibidores de la secreción ácida gástrica. *Drugs of Today*, París, Francia 1999;35(10):743-752,
30. Shatar, M.A., Simjee, A.E. y cols. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in Natal/KwaZulu, South Africa. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994; 6: 37-41
- 31.- Lee, A., Fox, J., Hazell, S. Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: A perspective. *Infect Immun*; 1993;61: 414-417.
- 32.- Goodwin, C.S., Armstrong, J.A. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*)₂ *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9: 1-13.
- 33.- Murray Pr, Kobayashi GS, Pfaller MA, Rosenthal KS. Microbiología Médica. 2ª edición. Ed. Harcourt Brace. Madrid 1997
- 34.-Teare, et al. Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *The Lancet* 1999;353(9148):242
- 35.- Mohammed, A..Et Al .Prevalence of *Helicobacter* (formerly *campylobacter*) *Pylori* infection in Saudia Arabia and comparison of those with and with out upper gastrointestinal symptoms. *The American Journal Or Gastroenterology* 1990;85 (8): 944-7.
- 36.- Slomianski, Arie. et al[13C] Urea breath test to confirm eradication of *Helicobacter Pylori*.*The American Journal Of Gastroenterology* 1995;90(92): 224-226

- 37.- Florentino Gómez, Martínez Ángeles, González Rodríguez. Eficacia de la combinación de la azitromicina, omeprazol y amoxicilina para la erradicación del *H. pylori* en úlceras gastroduodenales en una población de pacientes de la provincia de la Vega, en el periodo agosto-diciembre de 1999. La Vega, República Dominicana. 1999; 79pp
- 38.- *Revista Centroamericana de Gastroenterología y Endoscopia Digestiva* 1997;10 (2).
- 39.- Solli, A.H. Medical treatment of peptic ulcer disease. *JAMA* 1996;275: 622-629.
- 40.- Lenette, Edwin H. *Manual de microbiología clínica*.4ª.edición. Ed.Panamericana, México 1987; Pág 1194-1205
- 41.- www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/21_Micro.htmlIntro
- 42.- Georgapapadoku and A Bertasso. Mecanisms of action of cephalosprin 3'-quinolone esters, carbamates, and tertiary amines in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1993; 37(3):559-565
- 43.- Franklin T.J., G.A. Snow: Biochemistry of antimicrobial action (4th edition),. Chapman and Hall, Londres 1989; 305pp
- 44.- García Castillo. Efectividad de los antibióticos del cuadro básico del Hospital Central Norte de PEMEX frente a los microorganismos aislados de pacientes internos. FES-Cuautitlán UNAM. México. 2000;82pp
- 45.- www.helicobacterspain.com
- 46.- López Brea, et.al. A 9 year of clarithromycin and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* from Spanish children. *J. antimicrob. Chemother*; 2001;48:295-297.
- 47.- Kato M. y col. Regional differences in metronidazole resistance and increasing Clarithromycin resistance among *Helicobacter pylori* isolates from Japan. *Antimicrob. Agents Chemother* 2000; 44:2214-2216

- 48.- Pérez Pérez Guillermo. X congreso de la Asociación Panamericana de Infectología.
Guadalajara, Jal. México 2000; Pág 43-49
- 49.- XIII International Workshop on Gastrointestinal Pathology and *H. pylori*. Roma Italia 2000;
pág 27-38
- 50.- Susuki, et. Al. Production and application of new monoclonal antibodies specific for a fecal *Helicobacter pylori* antigen. *Clin.Diagn.Lab.Immunol*; 2002;9:75-78
- 51.- ILADIBA. Importancia de la infección por *Helicobacter pylori* en la úlcera gástrica.
Gastroenterology 1996;110:1244-1252
- 52.- Chavez Sandra, Gadanho Mario. Assesment of metronidazol susceptibility in *Helicobacter pylori*: Statistical validation and error rate analysis of breakpoints determined by the disk diffusion test. *Journal of clinical microbiology* 1999;37(5):1628-1631
- 53.- Ordaz P.C, Reyes L.M.E, Angeles A.E, Romero R.A. *In vitro* evaluation of carbamic acid derivatives as *E. histolytica* growth inhibitors. *J.Brasileiro de patologia*;2001;37(4):74
- 54.- Uribe Esquivel Misael, Segundo Morán villota. Impacto socioeconómico y costos del tratamiento de *H. pylori* en enfermedad ácido péptica. *Clinica De Gastroenterologia*.
Fundación Medica Sur.1998
- 55.- Parkin DM, Pisani P, Ferlay . Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer* 1993;54: 594-606.
- 56.-Dirección General de Epidemiología, Instituto Nacional de Cancerología, Asociación Mexicana de Patólogos. Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas en México. Morbilidad y Mortalidad, Bienio 1993-1994, tendencias 1985-1994. *Secretaría de Salud, México, 1996.*

- 57.- Peter J Jenks, Agnes. Exposure to metronidazole in vivo readily induces resistance in *Helicobacter pylori* and reduces the efficacy of eradication therapy in mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1999;43(4):777-781.
- 58.- Chirinos, Pacheco . Mecanismos de la resistencia microbiana. *Boletín. Facultad de Medicina. Universidad Católica de Santa María y San Agustín. Perú* 1997;26p.p.
- 59.- KeteK. *Aventis Pharma*, México 2001;65 p.p.
- 60.- Pylopac, *Medley*, México 2001;32 p.p.

LA BIBLIOTECA