

**Respuesta inflamatoria y respuesta inmune
específica a la infección por *Helicobacter pylori* en
niños y adultos**

M. en C. Margarita de la Luz Camorlinga Ponce.

Director de tesis: Dr. Javier Torres López.

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



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.

**EL TRABAJO EXPERIMENTAL DE ESTA TESIS SE LLEVÓ A CABO
EN EL LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA DE LA UNIDAD DE
INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS
DEL CMN SIGLO XXI DEL HOSPITAL DE PEDIATRIA DEL IMSS
BAJO LA DIRECCION DEL DR. JAVIER TORRES LÓPEZ.**

DEDICATORIAS

A Yunuén, Ileri y Rafael.

A mis padres y hermanos.

AGRADECIMIENTOS

**Al Dr. Javier Torres López
Al Dr. Guillermo Pérez Pérez
Al Dr. Martín Blaser
Al Dr. Onofre Muñoz Hernández**

Por su valioso apoyo y dirección durante la realización de esta tesis.

Al Comité tutorial:

**Dra. Lilian Yépez Mulia
Dra. Yolanda López Vidal
Dr. Javier Torres López**

**A los sinodales
Dr. Javier Torres López
Dra. Yolanda López Vidal
Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete
Dr. German Rubén Aguilar Gutiérrez
Dra. Gloria Soldevilla Melgarejo
Dra. Lilian Yépez Mulia
Dra. Bertha María Josefina González Pedrajo**

Por sus excelentes sugerencias durante la realización y escritura de esta tesis

INDICE

1. INTRODUCCIÓN

- 1.1 CARACTERÍSTICAS DE LA BACTERIA
- 1.2 EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN
 - 1.2.1 *Epidemiología*
 - 1.2.2 *Transmisión*
 - 1.3.1 *Gastritis no atrófica*
 - 1.3.2 *Úlcera gastroduodenal*
 - 1.3.3 *Cáncer Gástrico*
 - 1.3.4 *Linfoma gástrico*
- 1.4 PATOGÉNESIS
 - 1.4.2 *Factores de virulencia.*
- 1.5 RESPUESTA INMUNE
 - 1.5.1 *Inflamación aguda*
 - 1.5.2 *Inflamación crónica*
 - 1.5.3 *Interleucinas involucradas en la infección de Helicobacter pylori*
 - 1.5.4 *Respuesta inmune humoral*

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

- 2.1 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿COMO ES LA RESPUESTA HUMORAL A ANTÍGENOS DE *H. PYLORI* EN NIÑOS QUE TIENEN UNA INFECCIÓN TEMPRANA Y ADULTOS CON UNA INFECCIÓN CRÓNICA ?

3. HIPÓTESIS

4. OBJETIVO GENERAL

- 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

5. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

- 5.1 LUGAR DONDE SE REALIZÓ EL ESTUDIO
- 5.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO
 - 5.2.1 *Criterios de inclusión*
 - 5.2.2 *Criterios de exclusión*
 - 5.2.3 *Definición de infección*
Los niños y adultos se clasificaron como infectados cuando dieron positivo el cultivo o las pruebas de aliento e histología y no infectados cuando las tres pruebas fueron negativas.
- 5.3 MUESTRAS BIOLÓGICAS
 - 5.3.1 *Sangre*
 - 5.3.2 *Biopsias*
- 5.4 PACIENTES
 - 5.4.1 *Sueros de pacientes utilizados para la estandarización de ELISAs*
 - 5.4.2 *Sueros de pacientes usados para definir el valor de corte*
 - 5.4.3 *Sueros de pacientes usados como controles positivos*
 - 5.4.4 *Respuesta serológica a antígenos de H. pylori*
 - 5.4.5 *Expresión in situ de IL-8*
 - 5.4.6 *Detección de interleucinas en sobrenadantes de biopsias*
- 5.5 MÉTODOS
 - 5.5.1 *Cultivo de biopsias para aislar H. pylori.*
 - 5.5.2 *Métodos serológicos.*
 - 5.5.3 *Análisis histológico.*
 - 5.5.3 *Métodos de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica (Anexo I)*
 - 5.5.4 *Determinación de interleucinas en sobrenadante de la biopsia*

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

7. RESULTADOS

7.1 VALIDACIÓN DE LOS ENSAYOS SEROLÓGICOS

7.2 PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN EN NIÑOS CON DAR Y CONTROLES

7.3 RESPUESTA DE ANTICUERPOS SÉRICOS A CAGA Y UREASA EN NIÑOS.

7.4 RESPUESTA DE IGG SÉRICA A EXTRACTO TOTAL, CAGA Y UREASA EN NIÑOS Y ADULTOS CON ENFERMEDAD GASTRODUODENAL.

FIGURA 6. MAGNITUD (EN UNIDADES ELISA) DE LA RESPUESTA SÉRICA DE IGG A CAGA Y UREASA EN PACIENTES INFECTADOS CON H. PYLORI DE ACUERDO A LA EDAD

7.5 DETERMINACIÓN DE INTERLEUCINAS

7.5.1 Determinación de IL-8 "in situ"

7.5.2 Evaluación de los niveles de citocinas en sobrenadantes de biopsias.

8. DISCUSIÓN

9. CONCLUSIONES

8. BIBLIOGRAFÍA

ANEXO

RELACION DE FIGURAS**PAGINAS**

FIGURA 1.	Fotomicrografía de <i>H. pylori</i>	13
FIGURA 2.	Representación esquemática de la mucosa del estómago colonizada por <i>H. pylori</i>	21
FIGURA 3.	Imagen de microscopio electrónico de <i>Helicobacter pylori</i>	23
FIGURA 4.	Biopsias gástricas con tinción de hematoxilina-eosina	27
FIGURA 5.	Representación esquemática de la evaluación histológica de las biopsias de acuerdo al sistema Sydney	43
FIGURA 6.	Magnitud de la respuesta serológica de IgG a CagA y ureasa	53
FIGURA 7.	Expresión de IL-8 en biopsias de antro y cuerpo	55
FIGURA 8.	Determinación de IL8 por inmunohistoquímica en una biopsia de antro de un niño	56
FIGURA 9.	Determinación de IL-8 en biopsias de adultos	57
FIGURA 10.	Colonización del epitelio gástrico con <i>H. pylori</i> . Fotografía de microscopio de fluorescencia.	67

RELACION DE TABLAS	PAGINAS
	25
TABLA 1 Factores de virulencia de <i>H. pylori</i>	25
TABLA 2 Valor diagnóstico de ELISAs a diferentes antígenos de <i>H. pylori</i>	47
TABLA 3 Características del grupo de niños estudiados	48
TABLA 4 Respuesta humoral a diferentes antígenos de <i>H. pylori</i> en niños infectados	50
TABLA 5 Respuesta de IgG a extracto total, CagA y ureasa en niños y adultos con enfermedad gastroduodenal	52
TABLA 6 Evaluación de la inflamación gástrica en el antro y cuerpo de niños infectados y no infectados con <i>H. pylori</i>	59
TABLA 7 Evaluación de la inflamación gástrica en biopsias de adultos con enfermedad gastroduodenal.	61
TABLA 8 Relación de respuesta de IL-8, intensidad de colonización, niveles de anticuerpos IgG, y seropositividad a CagA, grado de infiltración mononuclear y de neutrófilos en niños infectados con <i>H. pylori</i> .	63
TABLA 9 Relación de respuesta de IL-8, intensidad de colonización, niveles de anticuerpos IgG, y seropositividad a CagA, grado de infiltración mononuclear y de neutrófilos en adultos con DNU	64
TABLA 10 Relación de respuesta de IL-8, intensidad de colonización, niveles de anticuerpos IgG, y seropositividad a CagA, grado de infiltración mononuclear y de neutrófilos en adultos con UD	65
TABLA 11 Relación de respuesta de IL-8, intensidad de colonización, niveles de anticuerpos IgG, y seropositividad a CagA, grado de infiltración mononuclear y de neutrófilos en adultos con UG	66
TABLA 12 Niveles de citocinas en mucosa gástrica de niños y adultos con enfermedad gastroduodenal	69

TABLA 13	Evaluación de inflamación gástrica en el antro de niños y adultos con infección por <i>Helicobacter pylori</i>	71
-----------------	--	----

ABREVIATURAS

BabA.	Adhesina de unión a antígeno Lewis
CagA.	Cytotoxin-associated protein
cagA.	Cytotoxin-associated gen
cagPAI.	Isla de patogenicidad
DAR.	Dolor abdominal recurrente
DNA.	Acido desoxirribonucleico
DNU.	Dispepsia no ulcerosa
Ig	Inmunoglobulina
IL-1.	Interleucina 1
IL-4.	Interleucina 4
IL-8.	Interleucina 8
IL-12.	Interleucina 12
IFNγ.	Interferon γ
TNFα.	Factor de necrosis tumoral α
LPS.	Lipopolisacarido
PMN	Polimorfonucleares
UD.	Úlcera duodenal

UG.

Úlcera gàstrica

VacA.

Vacuolating cytotoxin

vacA.

Vacuolating cytotoxin gen

1. Introducción

En 1983, Marshall y Warren describieron la presencia de bacilos espirales o curvos en cortes histológicos de 58 de 100 biopsias de antro gástrico de individuos con enfermedad gastroduodenal (Marshall y Warren, 1984). A partir de 11 de estas biopsias se cultivó con éxito una bacteria Gram negativa y microaerófila. El organismo aislado era semejante al género *Campylobacter* en muchos aspectos, incluyendo su morfología microscópica, el crecimiento en medios con sangre en condiciones microaerófilas, sensibilidad a metronidazol y contenido de G + C de 34%. En 1985, esta bacteria fue designada *Campylobacter pyloridis*, usando correctamente el latín se modificó el nombre a *Campylobacter pylori*, posteriormente se observaron diferencias entre el bacilo y los miembros del género *Campylobacter*: el número de flagelos, el contenido de ácidos grasos y la secuencia del RNAr, por lo que en 1989, seis años después de su descubrimiento, *C. pylori* fue transferido a un nuevo género y nombrado *Helicobacter pylori* (Goodwin y cols, 1989)

1.1 Características de la bacteria

El género *Helicobacter* comprende 20 especies. La especie tipo, *H. pylori*, es una bacteria Gram negativa no formadora de esporas. En cultivos jóvenes *H. pylori* se observa como bacilos curvos, después de tres a cinco días de incubación la bacteria se observa muy pleomórfica, bacilos espirales irregulares con forma de "S" ó en forma de "U". En cultivos viejos, *H. pylori* aparece con forma cocoide. El bacilo mide aproximadamente 0.5-1.0 X 2.5-5.0 µm; con 4 a 7 flagelos unipolares, por lo que es móvil, *H. pylori* crece en medios sólidos suplementados con 7 a 10% de sangre de carnero o caballo. Crece a 37°C en 2 a 7 días en condiciones de microaerofilia con 10% de CO₂. Las colonias tienen una apariencia convexa y translúcida, con un diámetro de 1-2 mm, en la mayoría de los casos las colonias están rodeadas por una zona de hemólisis ligera. Los aislamientos son caracterizados bioquímicamente por la presencia de ureasa, catalasa y oxidasa.



Figura 1. Fotografía de microscopia de barrido de *H. pylori*, donde se observa la forma de sacacorchos y los flagelos polares. Tomada de Lee and O' Rourke, 1993

1.2 Epidemiología y transmisión

1.2.1 Epidemiología

La infección bacteriana por *H. pylori* es cosmopolita y de carácter endémico, la prevalencia reportada varía ampliamente entre diferentes poblaciones. En los países desarrollados la prevalencia es aproximadamente del 40 al 60% y en los países en vías de desarrollo puede ser mayor del 80%, así también en estos países más del 50% de la población ya está infectada a los 10 años de edad mientras que en los países desarrollados sólo un 5 a 10% de los niños están infectados antes de los 10 años de edad (Roosendaal, 1997). La tasa de adquisición de nuevas infecciones entre adultos en países desarrollados es baja (<1% por año), lo cual sugiere que los adultos adquirieron la infección en la niñez. Un ejemplo de prevalencia en un país desarrollado es Estados Unidos, donde la infección por *H. pylori* está presente en menos del 10% de los niños menores de 12 años de edad y entre el 50 al 60% de personas mayores de 60 años (Doodley y cols, 1989).

En México, en un estudio realizado por Torres y colaboradores en 1998, en el que se determinó la seroprevalencia a *H. pylori* en 11,605 sueros representativos de la población mexicana, se estableció una prevalencia de 66% de infección en la población general. La distribución de la prevalencia por grupos de edad observada fue la siguiente: 25% en el grupo de 1-4 años, 43% de 5-9 años, 55% en 10-14 años y 65% en los grupos de 65 años y mayores, más del 80% de los adultos estaban infectados a los 25 años de edad y la seroprevalencia se mantuvo sin cambio para edades mayores.

En algunos países desarrollados la prevalencia a la infección ha disminuido en las últimas décadas. Rehnberg-Lailo y colaboradores, en 2001, compararon la prevalencia de la infección por *H. pylori* en tres periodos diferentes (1969-73, 1983 y 1995) en mujeres de 20 a 34 años de edad en distintas poblaciones de Finlandia y encontraron una disminución del 38% al 12%. En un estudio en otra población finlandesa realizado en 2002 por Pérez-Pérez y colaboradores, se determinó la presencia de anticuerpos anti-CagA en sueros colectados en 1974 y en 1993, demostrándose que la prevalencia de cepas CagA+ declinó del 34% al 8% entre los periodos estudiados.

1.2.2 Transmisión

La ruta exacta de transmisión de *H. pylori* no es conocida. Las fallas para aislar el bacilo de reservorios diferentes al humano sugieren que el contacto directo de persona a persona es la forma más probable de adquirir al microorganismo. La importancia del contacto cercano esta apoyada por el hecho de que la prevalencia de la infección por *H. pylori* se encuentra incrementada significativamente en los miembros de las familias de niños infectados con *H. pylori*, comparada con miembros de familias de niños no infectados, lo que sustenta que la transmisión ocurre principalmente dentro del ambiente familiar (Mitchell y cols, 1996)

El riesgo relativo de que un niño se infecte con *H. pylori* es aproximadamente ocho veces mayor cuando la madre está infectada y aproximadamente 4 veces más si es el padre quien está infectado (Rothenbachern y cols, 2002). La mayoría de los estudios apoyan la transmisión intrafamiliar como mecanismo de infección ya que algunos reportes han encontrado cepas de *H. pylori* idénticas entre miembros de una familia (Mitchell y cols, 1996).

El hombre es el reservorio natural de *H. pylori*, aunque se han sugerido otras fuentes, incluyendo gatos domésticos, agua, vegetales. En el área de la Ciudad de México, se detecto, RNAr 16S de *H. pylori* por reacción en cadena de la polimerasa en 42% de las muestras de agua para uso humano analizadas (Mazari-Hiriart M, 2001).

Se han propuesto varias rutas para la transmisión de *H. pylori*, en ellas se incluyen la ruta gastro-oral, oral-oral y fecal-oral. La presencia de *H. pylori* en el jugo gástrico de más del 58% de pacientes infectados plantea la posibilidad de que el reflujo del jugo gástrico puede representar una forma de transmisión del organismo, la regurgitación de material gástrico y

vómito son comunes en la niñez y pueden favorecer la transmisión gastro-oral (Mitchell y cols., 1996). Parsonnet y colaboradores aislaron *H. pylori* en el 100% de las muestras estudiadas a partir de adultos en quienes se indujo el vómito y de las muestras del aire tomadas cerca de estos sujetos durante el vómito recuperaron al organismo en el 37.5% de los casos.

Utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) hay evidencias de que *H. pylori* puede recuperarse de algunos sitios de la boca y saliva (Li y cols, 1996).

Existe poca concordancia de la infección entre parejas, en las que se esperaría una transmisión oral-oral. Los resultados de estos estudios no han sido concluyentes por lo que la ruta de transmisión oral-oral para *H. pylori* sigue sin confirmarse (Leung y cols, 1999).

Para apoyar la transmisión fecal-oral, *H. pylori* ha sido aislado de heces (Thomas y cols, 1992; Nelly y cols, 1994), demostrándose que el organismo puede pasar por el tracto gastrointestinal y permanecer viable. Sin embargo, otros investigadores no han tenido éxito en el cultivo de la bacteria de heces siguiendo el método de Thomas, por lo que se ha sugerido que el grupo de niños Gambianos de donde este investigador cultivó el bacilo, estaban desnutridos y el tiempo de tránsito fecal fue reducido, lo que benefició el cultivo de *H. pylori* de la materia fecal de este grupo particular (Thomas y cols, 1992).

Entre los factores de riesgo que existen para adquirir la infección con *H. pylori*, se han reportado los siguientes: a) el sexo, Goodman y colaboradores en 1996, encontraron que la prevalencia de la infección es mayor en los hombres que en las mujeres, pero otros estudios sugieren que hombres y mujeres están infectados en la misma proporción (Replogle y cols., 1995), b) la raza, ya que en algunos estudios se ha reportado una mayor prevalencia de la infección en poblaciones hispanas y afro-americanas comparadas con poblaciones blancas y c) condiciones socioeconómicas, varios estudios han mostrado que el nivel socioeconómico bajo está asociado con un incremento en la prevalencia de infección por *H.pylori*, en particular el nivel socioeconómico de un individuo durante la niñez se considera que es determinante para el desarrollo de la infección (Malaty.,1994; Van Zanten, 1994).

1.3 Manifestaciones clínicas

La colonización del estómago por *H. pylori* induce invariablemente inflamación o gastritis. En la mayoría de los casos, la infección permanece asintomática durante toda la vida del individuo. Cuando la infección, y por lo tanto la inflamación, están presentes por años en un individuo, se incrementa el riesgo de que se presenten enfermedades asociadas a gastritis tales como úlcera duodenal, úlcera gástrica, adenocarcinoma gástrico o linfoma gástrico primario de células B (Maltoma). Del total de individuos infectados, se estima que un 10 a un 20% presentarán úlcera péptica en algún momento, mientras que menos del 1% desarrollarán cáncer gástrico (Peek y Blaser, 2002; Stoicov y cols, 2004).

1.3.1 Gastritis no atrófica

La gastritis histológicamente es definida como una reacción inflamatoria de la mucosa que puede ser aguda o crónica.

Los síntomas asociados con la patología gástrica en las etapas tempranas de la infección han sido documentados en dos estudios con voluntarios, quienes ingirieron el microorganismo, a consecuencia de esta infección se presentaron síntomas dispépticos en una a dos semanas, que estuvieron caracterizados por náusea y dolor abdominal y después de ocho días se desarrollaron gastritis e hipoclorhidria.

Aún cuando los síntomas dispépticos se resuelven espontáneamente en los casos de infección aguda, la infección por *H. pylori* en el estómago persiste en la mayoría de los casos si no son tratados.

En niños, diferentes trabajos han mostrado la asociación de *H. pylori* y gastritis crónica antral. La observación de que la gastritis se cura con la erradicación de *H. pylori* es una evidencia de su papel etiológico en la gastritis de este grupo de edad (Ozen y cols, 2001).

El papel de *H. pylori* en niños con dolor abdominal recurrente (DAR) sigue siendo controversial. El termino DAR se define por la presencia de al menos tres episodios discretos de dolor abdominal, con severidad suficiente para provocar la interrupción de actividades normales y que ocurren durante tres meses o más en el año previo al examen clínico.

Cerca del 10% de los niños con DAR tiene etiología orgánica diferente o simultánea a *H. pylori*, por ejemplo en afecciones pulmonares o enfermedades gastrointestinales diferentes a úlcera péptica. Ozen y colaboradores en 2001, encontraron que el 60.3% de los niños con DAR fueron *H. pylori* positivos y los síntomas desaparecieron en 87% de los niños

después de la erradicación, comparado con 41% de los niños que no erradicaron. Por el contrario, Wewer y colaboradores en 2001, en un estudio de tratamiento doble ciego en niños con DAR infectados con *H. pylori*, no encontraron evidencias de relación entre DAR y *H. pylori*.

1.3.2 Úlcera gastroduodenal

H. pylori es responsable de la mayoría de las úlceras gastroduodenales, aproximadamente el 90-95% de las úlceras duodenales y 70-75% de las úlceras gástricas son atribuibles a la infección con el bacilo. Los estudios serológicos han demostrado que pacientes infectados con *H. pylori* tienen de 3.2 a 10 veces más riesgo de desarrollar úlcera que los pacientes no infectados (Blaser, 1998). Existen evidencias de que la úlcera se cura después de la erradicación del bacilo (Blaser y Atherton, 2004).

En niños, la úlcera es poco frecuente, la mayoría de éstas se encuentran localizadas en el duodeno mientras que las úlceras gástricas son extremadamente raras en esta población. Semejante a lo observado en adultos, la úlcera duodenal en ausencia de *H. pylori* es poco común en los niños, a menos que estén recibiendo tratamiento con anti-inflamatorios no esteroideos (Gold, 2000).

1.3.3 Cáncer Gástrico

Apoyándose en diversos estudios epidemiológicos, *H. pylori* es considerado la principal causa de adenocarcinoma gástrico distal. Un estudio serológico (EUROGAST, 1993) en el que participaron 13 países de diversos continentes, mostró una fuerte correlación entre la prevalencia de cáncer gástrico y la prevalencia de la infección, incrementándose seis veces el riesgo de padecer cáncer gástrico en la población infectada por *H. pylori*. Asimismo, tres estudios serológicos prospectivos (Forman, 1994; Parsonnet, 1997; Nomura, 1991) confirmaron que los pacientes infectados con *H. pylori* tienen un riesgo de desarrollar cáncer gástrico de 3 a 6 veces mayor al de la población no infectada. Basándose en evidencias epidemiológicas, *H. pylori* fue designado como carcinógeno tipo I por la Organización Mundial de la Salud en 1994.

1.3.4 Linfoma gástrico

Otro proceso maligno asociado a la infección por *H. pylori* es el linfoma tipo MALT (mucosa-associated lymphoid tissue), que es un proceso poco frecuente en el cual los

tumores gástricos surgen de la proliferación de linfocitos B. *H. pylori* está presente en los pacientes con linfoma gástrico más frecuentemente que en los controles.

Adicionalmente, se ha comprobado que la erradicación de la bacteria induce regresión del linfoma MALT en un 70 a 80% de los casos (Wotherspoon, 1998).

1.4 Patogénesis

1.4.1 Factores involucrados en la colonización y la persistencia de *H.pylori*

Para colonizar el tracto gastrointestinal las bacterias tienen que sobrevivir en el ambiente hostil del estómago, *H. pylori* sobrevive y coloniza la mucosa gástrica a través de una combinación de factores propios de la bacteria (figura 2) y el hospedero.

H. pylori posee mecanismos que le permiten sobrevivir en el ambiente ácido del lumen hasta alcanzar el epitelio gástrico. Impulsado por sus flagelos y su morfología helicoidal, el microorganismo se desplaza a través de la capa de moco, la cual cubre y protege las células epiteliales en la mucosa gástrica. El movimiento de *H. pylori* hacia la mucosa del estómago es guiado por factores quimiotácticos los cuales incluyen urea y iones de bicarbonato (Montecucco y Rappuoli, 2001).

Para mantener un microambiente neutro en el estómago, la bacteria produce una ureasa muy activa, característica del género, que se ha considerado como un factor de virulencia de gran importancia (Del Giudice, 2001)

La ureasa es una enzima citoplásmica, esencial para la colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori*, consiste de dos subunidades, UreA y UreB, ensambladas en una estructura terciaria formada por seis monómeros de Ure A y seis de Ure B, la enzima cataliza la hidrólisis de urea formando NH_3 y CO_2 . El amonio forma una nube que neutraliza el ácido del citosol y periplasma y crea una capa neutra rodeando la superficie bacteriana (Fig. 2) (Montecucco y Rappuoli 2001).

Las cepas de *H. pylori* ureasa negativas no pueden colonizar cerdos gnotobióticos, lo cual prueba que la ureasa es un factor importante en la iniciación de la infección o en permitir la sobrevivencia del bacilo en la mucosa gástrica (Eaton, 1991).

El hecho de que la ureasa sea una proteína muy abundante en *H. pylori* (5% a 10% del contenido de proteínas), hace que sea un poderoso inmunógeno, su papel en la colonización y su participación en la patogenicidad de la bacteria, la han convertido en un

candidato a vacuna. La inmunización oral con ureasa asociada con adyuvantes, se ha usado en experimentos de vacunación para prevenir la infección con *H. pylori* o *H. felis* en ratones, mostrando una protección significativa en los ratones desafiados (Del Giudice y cols, 2001).

No se ha demostrado que la ureasa *per se* sea pro inflamatoria, pero al amonio producido se le atribuye que puede proteger a la bacteria del sistema inmune del hospedero por inactivación de la cascada del complemento (Del Giudice y cols, 2001). Sin embargo, concentraciones altas de amonio pueden contribuir a la lisis de células epiteliales y favorecer ulceración. Usando fracciones de ureasa semipurificada se ha reportado que es muy inmunogénica y que induce títulos altos de IgG e IgA sérica en pacientes con enfermedad ácido péptica (Futagami, 1998).

H. pylori reside principalmente en la capa de moco gástrico (98%), un número bajo (2%) de los bacilos se unen al epitelio gástrico (Yoshiyama y Nakasawa, 2000) y se ha observado por microscopía electrónica que durante la adherencia, *H. pylori* se ubica en las uniones intercelulares de las células del epitelio gástrico (Noach y cols, 1994). Se considera a *H. pylori* una bacteria no invasiva, aunque existen reportes que muestran la invasión del bacilo a las células epiteliales (Noach y cols, 1994; Semino-Mora y cols, 2003).

La adherencia es un requisito indispensable en muchas bacterias para que se lleve a cabo la colonización de las mucosas. En el caso de *H. pylori*, las bacterias con mejores propiedades de adherencia podrían ser más resistentes para su eliminación del estómago. Se han identificado factores de adherencia en cepas virulentas que tienen la habilidad de unirse a moléculas Lewis b presentes en las células del epitelio gástrico. BabA (*histo-blood group antigen-binding activity*), es un factor de adherencia expresado en un subgrupo de cepas de *H. pylori*. Estudios recientes han demostrado la relevancia clínica de BabA, la cual es codificada por el gen *babA2*. Las cepas *babA2* positivas fueron encontradas de manera significativa, asociadas con úlcera o cáncer gástrico (Gerhard y cols, 1999). Así, la adherencia de *H. pylori* no sólo favorece la colonización de la mucosa gástrica sino también participa en el desarrollo de la enfermedad (Guruge y cols, 1998).

El lipopolisacárido (LPS) de *H. pylori* posee características que favorecen la persistencia en el hospedero y que quizá contribuyan al daño tisular. La bacteria sintetiza y expresa en su

LPS antígenos del hospedero, particularmente los antígenos de superficie Lewis^x y Lewis^y, lo que le permite al microorganismo evadir la respuesta inmune y permanecer por más tiempo en los tejidos del paciente. Este mimetismo antigénico también puede inducir la producción de anticuerpos que reconocen células del hospedero y originar daño por respuesta autoinmune.

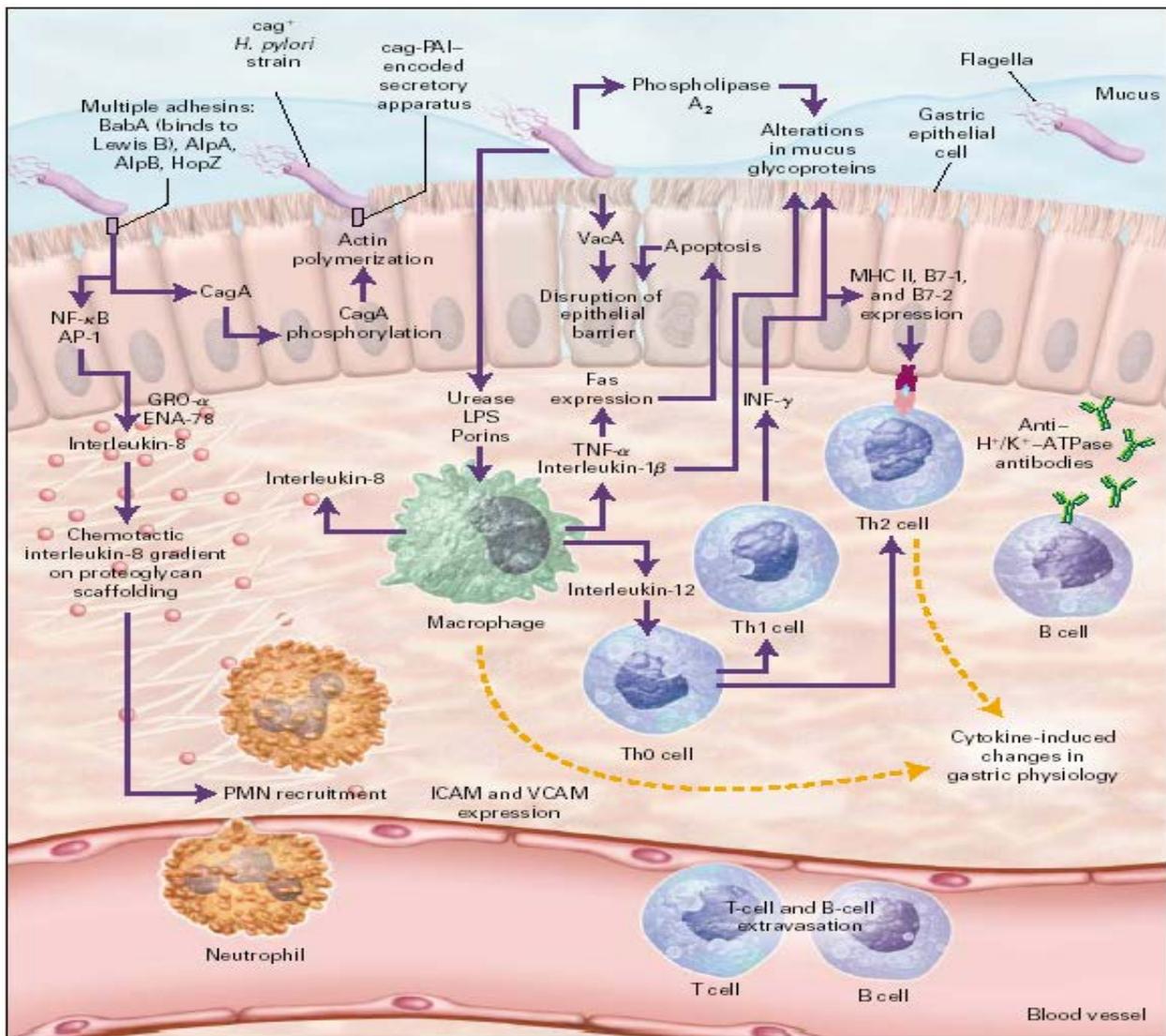


Figura 2. Representación esquemática de la mucosa del estómago colonizada por *H. pylori*, mostrando los principales factores de virulencia involucrados en colonización e inflamación (Suerbaum y Michetti, 2002)

1.4.2 Factores de virulencia.

1.4.2.1 Citotoxina vacuolizante (VacA)

La existencia de una toxina producida por *H. pylori* fue descrita por Leunk. Esta toxina induce la formación de vacuolas en células eucariotas, las cuales acumulan el colorante rojo neutro para su demostración y cuantificación.

Posteriormente a la proteína se le llamó citotoxina vacuolizante (VacA) y a la fecha ha sido purificada y caracterizada. La toxina VacA tiene una estructura hexamérica o heptamérica,

es activada por exposición al ácido y es resistente a pH bajo (Cover y Blaser, 1992). La citotoxina es codificada por el gen *vacA* que se encuentra en todas las cepas de *H. pylori*. Este gen tiene una estructura en mosaico y en la región de la secuencia señal, se han reconocido 2 familias alélicas principales llamadas s1 y s2, el tipo 1 puede subdividirse en s1a, s1b y s1c; por otra parte, la región media puede dividirse en dos posibles tipos de alelos, m1 y m2 (Atherton, 1995). El descubrimiento de múltiples genotipos de *vacA* y el uso del método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificarlos, han permitido realizar diversos estudios de la asociación entre los genotipos de *vacA* y la enfermedad. En estudios con humanos, las cepas con alelos tipo s2 rara vez se han asociado con enfermedad (Atherton y cols, 1995). Las cepas con alelos s1/m1 y s1/m2 se han llegado a asociar con enfermedad, debido a que los pacientes con cáncer y úlcera péptica usualmente presentan los tipos s1/m1 de *vacA* (Atherton y cols, 1995; Atherton y cols, 1997).

1.4.2.2 CagA y la isla de patogenicidad (cagPAI)

Los primeros estudios con *H. pylori* mostraron que las cepas de individuos con las patologías gástricas más severas, como úlcera péptica y cáncer gástrico, producían la toxina VacA y un antígeno codificado por el gen *cagA* (*cytotoxin-associated gene*), en tanto que las cepas de los individuos con gastritis carecían de actividad de VacA y no expresaban CagA (Covacci y cols, 1993; Tummuru y cols, 1993).

Censini y colaboradores, mostraron en 1993 que el gen *cagA* se localiza en un fragmento de DNA cromosomal, adquirido por transferencia horizontal, llamado la isla de patogenicidad *cag* (*cagPAI*). Esta isla es una región insertada en el gen de la glutamato racemasa, con una longitud de 40 kb y que contiene 27 genes involucrados en virulencia y en daño a la mucosa gástrica. Varios genes de la isla tienen homología con un sistema de secreción tipo IV, que en otras especies de procariotes funciona como un conducto para exportar proteínas a través de las membranas bacterianas. Las cepas *cagA*⁺ transportan a la proteína CagA dentro de las células epiteliales por el sistema de secreción tipo IV, en el interior celular CagA es fosforilada por enzimas celulares lo que le permite participar en la polimerización de la actina dando como resultado la formación de pedestales, a los cuales la bacteria se une estrechamente formando un pedestal (Fig.3) (Montecocu y Rappuoli, 2001; Covacci y cols, 1993).

Las cepas poseen la *cagPAI* completa, se denominan cepas *cagA*⁺ o no tienen *cagPAI*, se conocen como *cagA*⁻, o tienen solo partes de la *cagPAI*.



Figura 3. Imagen de microscopio de barrido de *Helicobacter pylori* en unión estrecha con el epitelio gástrico humano (Tomada de Lee and O' Rourke, 1993)

CagA es una proteína de aproximadamente 120 a 128 kDa. Entre el 70 al 80% de las cepas aisladas en países desarrollados expresan CagA (CagA⁺). En algunos países orientales como Japón y Corea, la frecuencia de cepas *cagA*⁺ puede alcanzar el 100%; en México en adultos con úlcera péptica se ha observado una frecuencia de 81% de cepas *cagA*⁺ (González y cols, 2000).

Los grupos de Peek en 1995 y Censini en 1996, reportaron que la infección con cepas de *H. pylori cagA*⁺ estaba asociada significativamente con una mayor inflamación gástrica y úlcera péptica que aquellas infecciones producidas por cepas de *H. pylori cagA*⁻.

Kolho y colaboradores, en 1999 estudiaron la correlación entre el *status* CagA y el grado de inflamación en 39 niños infectados; este grupo confirmó que los niños con anticuerpos anti- CagA tenían inflamación más severa en el antro y un incremento importante en la densidad de células mononucleares, comparados con los niños sin anticuerpos anti- CagA. La caracterización genética de *vacA* y *cagA* en cepas aisladas en México, ha permitido conocer que la co-infección con múltiples cepas de *H. pylori* es frecuente en población mexicana (Morales-Espinosa R, 1999; González-, 2001)

1.4.2.3 Bab A.

Uno de los genes recientemente vinculado con la virulencia de *H. pylori* es *babA2*. Este gen codifica una adhesina que interactúa con las células epiteliales gástricas. A pesar de que se observa una mayor patogenicidad en las cepas portadoras de este gen ocurre lo mismo que con los demás genes de virulencia: por sí solos no se han relacionado con alguna enfermedad en particular, pero sí parece ser que a mayor número de genes de virulencia acumulados por una bacteria, mayor es el riesgo de desarrollar una enfermedad gástrica. Así sucede, por ejemplo, con las cepas portadoras de los genes *babA2*, *cagA* y *vacA s1m1*, que están asociadas significativamente a una mayor posibilidad de producir metaplasia intestinal (Zambon, 2003), al contrario de lo que se presenta en individuos infectados con cepas *cagA*⁻, *vacA s1m1* y *BabA2*⁻, quienes en menos del 10% mostraron metaplasia intestinal (Prinz y cols, 2003).

En la Tabla 1, se muestran algunos de los factores de virulencia de *H. pylori* descritos en la actualidad, la función asignada dentro de la relación huésped-parásito entre esta bacteria con el paciente colonizado y la distribución de cada uno de estos factores dentro de las poblaciones de *H. pylori*.

Tabla No 1. Factores de virulencia descritos en *H. pylori*

Factor de virulencia	Función	Distribución
Ureasa	Regular el pH ácido del estómago	Todas las cepas
Flagelos	Movilidad	Todas las cepas
NAP	Activación de neutrófilos	Todas las cepas
BabA	Adhesina para Lewis b	Cepas tipo I
LPS	Baja toxicidad	Todas las cepas
Lewis X y Y	Mimetismo molecular	Algunas cepas
VacA	Citotoxicidad	Todas las cepas
CagPAI	30 genes, Sistema de secreción tipo IV	Cepas tipo I
CagA	Antígeno inmunodominante	Cepas tipo I
cagE	Inducción de IL-8	Cepas tipo I
OipA	Proteína de membrana externa	Algunas cepas

1.5 Respuesta Inmune

1.5.1 Inflamación aguda

Marshall en 1985, mediante la ingestión voluntaria de un cultivo de *H. pylori*, describió por primera vez la gastritis aguda provocada por el microorganismo. Este investigador refirió, clínica e histológicamente, en base a su propia experiencia, que la fase crónica de la gastritis asociada al bacilo puede estar precedida por una fase aguda.

La inflamación de la mucosa gástrica fue detectada una semana después de la ingestión de la bacteria, los cambios histopatológicos mostraron presencia masiva de neutrófilos polimorfonucleares, linfocitos, células plasmáticas y escasos eosinófilos en lámina propia, acompañados por edema e hiperemia de la mucosa (Marshall, 1985).

En esta etapa de la inflamación, el número de células mononucleares, linfocitos y células plasmáticas tiende a aumentar con el desarrollo de la infección, pueden observarse sólo en

la mucosa antral y progresivamente se van extendiendo al cuerpo gástrico. Adicionalmente, existe una proliferación bacteriana intensa y la inflamación gástrica se presenta con un periodo breve de síntomas gastrointestinales (Correa y Miller, 1998).

En este mismo proceso, se observan cambios en la superficie epitelial incluyendo depleción del moco, exfoliación celular y cambios regenerativos sinciciales. Durante este tiempo hay desarrollo de hipoclorhidria. Después de pocas semanas, se establece la fase crónica y la respuesta inflamatoria se mantiene como una gastritis superficial crónica (Correa y Miller, 1998).

1.5.2 Inflamación crónica

La inflamación crónica de la mucosa es esencialmente asintomática, la gran mayoría de la población infectada no presenta manifestaciones clínicas. Sin embargo, como consecuencia de la inflamación gástrica persistente con *H. pylori*, en algunos individuos pueden evolucionar otros cambios más severos. Los diferentes cuadros observados están determinados por una serie de interacciones complejas entre la bacteria, el hospedero y el medio ambiente (Correa, 2005).

Estudios histopatológicos de la mucosa gástrica en poblaciones de alto riesgo han revelado una serie de lesiones las cuales aparentemente representan un conjunto continuo de cambios, desde una mucosa normal hasta un carcinoma gástrico de tipo intestinal, el proceso completo toma por lo menos dos décadas (Correa y cols, 1990). El espectro de la enfermedad comprende gastritis superficial, gastritis crónica, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal y displasia, en orden de incremento a la gravedad (Correa, 1991).

Figura 4

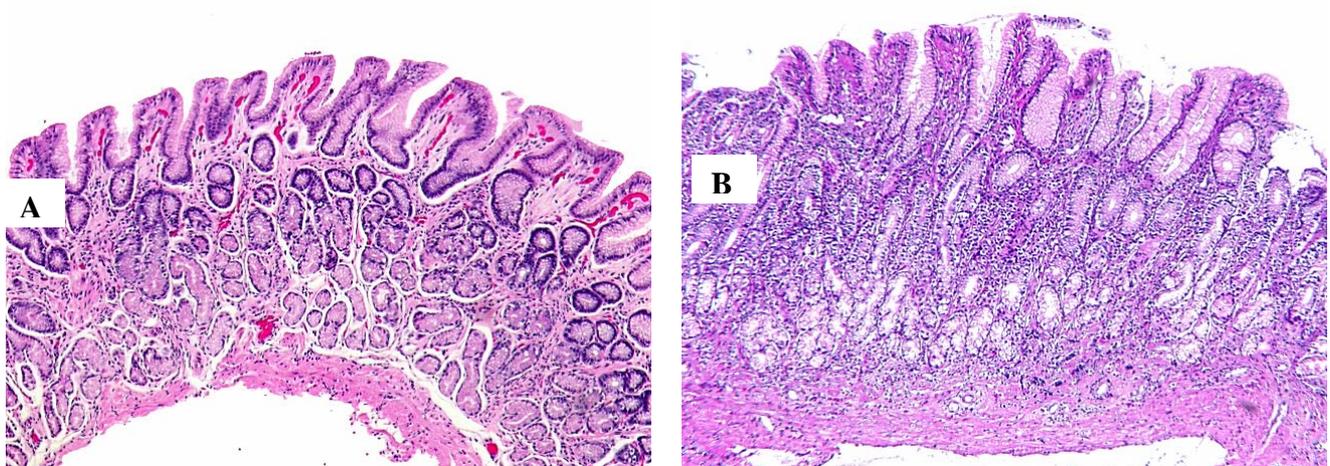


Figura 4. Biopsias con tinción de hematoxilina-eosina. A. Biopsia de mucosa gástrica normal. B. biopsia de gastritis astral de un paciente infectado con *H. pylori*. (Imágenes tomadas de biopsias de pacientes de esta tesis.)

La presencia de *H. pylori* afecta a todos los componentes de la mucosa gástrica, es decir a las células epiteliales superficiales, a los cuellos glandulares y a las propias glándulas. El grado de lesión de las células epiteliales superficiales varía considerablemente entre los pacientes, mientras en algunos es casi imperceptible, en otros se observa destruido gran parte del citoplasma y hay depleción de mucina en la capa epitelial. Cuando la lesión celular epitelial es muy grave puede observarse a la lámina propia expuesta a la luz gástrica. Estas erosiones representan probablemente los estadios iniciales de las úlceras pépticas. Las glándulas gástricas del antro, mucosa oxíntica y la unión del antro con el cuerpo se pierden y frecuentemente son sustituidas por glándulas metaplásicas con fenotipo intestinal (Correa, 1990).

H. pylori provoca infiltración de la mucosa gástrica con linfocitos, células plasmáticas, monocitos- macrófagos y leucocitos polimorfonucleares, estas células infiltran lámina propia. Los leucocitos polimorfonucleares emigran desde los capilares del estroma a través de la capa epitelial, hacia la luz gástrica y se pueden acumular en la luz foveolar. La presencia de leucocitos polimorfonucleares se define como gastritis crónica activa (Correa, 1991).

Una vez que se establece la infección crónica, la respuesta inmune es constante, permaneciendo los títulos de anticuerpos IgG contra Extracto total de *H. pylori* estables por más de 20 años a menos que se erradique la infección (Pérez-Pérez, 2002).

En el infiltrado inflamatorio entre niños y adultos, se han reportado algunas diferencias. En adultos, el infiltrado generalmente consiste de monocitos y neutrófilos. En niños, hay incremento importante de células mononucleares como macrófagos y es frecuente observar gastritis folicular (Torres y cols, 2000).

Otras células que participan en procesos inflamatorios, son las células cebadas. Son difíciles de observar en preparaciones histológicas de rutina y por lo mismo se les ha dado poca importancia en el proceso inflamatorio, asociado a *H. pylori*. En un estudio reciente, Nakajima y colaboradores, 2004, confirmaron con inmunohistoquímica, la presencia de

células cebadas en lámina propia, en pacientes japoneses infectados con *H. pylori*. Matsuo y colaboradores, 2003, por su parte observaron que la densidad de las células cebadas era significativamente mayor en los pacientes con úlcera que en los pacientes con gastritis. El número de las células cebadas disminuyó considerablemente después de la erradicación del bacilo.

La presencia de células inflamatorias en el sitio de inflamación puede explicarse por la producción de quimiocinas producidas por células epiteliales de la mucosa gástrica en respuesta a la infección, estas quimiocinas atraen a los neutrófilos, mismos que también producen quimiocinas, además de las producidas por células mononucleares. Las quimiocinas son mediadores tempranos de respuesta inflamatoria y son inducidas por bacterias, virus o parásitos y muestran actividad quimiotáctica para los leucocitos y monocitos. Existen más de 20 miembros de esta superfamilia y todos ellos se encuentran involucrados directa o indirectamente en respuestas inflamatorias. Las quimiocinas se clasifican en dos grandes familias con base al arreglo de los primeros dos o cuatro residuos conservados de cisteína. En las quimiocinas C-X-C, las dos primeras cisteínas se encuentran separadas por un aminoácido (X), mientras que en las quimiocinas C-C las cisteínas se encuentran adyacentes una a otra. Las quimiocinas que secreta el epitelio gástrico en respuesta a la infección bacteriana y que tienen propiedades de atracción de neutrófilos son IL-8 y GRO- α . *In vitro*, la expresión de IL-8 en células epiteliales gástricas es regulada positivamente por TNF- α y la IL-1, ambas citocinas son producidas por la mucosa gástrica en respuesta a la infección por *H. pylori* (Crabtree y cols, 1994 y Blaser y Smith, 1999).

Se ha informado que los mRNA de la IL-8 y la IL-1, se expresan tempranamente durante la infección, mientras que el TNF α , el GM-CSF y la MCP-1, se expresan tardíamente. Este patrón sugiere que la IL-8 atrae neutrófilos en una fase temprana y posteriormente se incrementa la migración de monocitos dentro de la lámina propia de la mucosa gástrica (Jung y cols, 1997).

1.5.3 Interleucinas involucradas en la infección de *Helicobacter pylori*

Bodger y Crabtree, 1998, fueron los primeros en demostrar que IL-8 es producida por el epitelio gástrico, tanto *in vitro* como *in vivo*. IL-8 es un modulador clave de la inducción de

migración y activación de neutrófilos en la mucosa gástrica infectada por *H. pylori*. Es producida por las células epiteliales gástricas en respuesta a la infección y su expresión es inducida por la adhesión de la bacteria a la superficie celular. Múltiples genes contenidos en la isla de patogenicidad *cag* (*cagPAI*) parecen estar involucrados en inducir la respuesta de IL-8 a la adhesión de *H. pylori* a las células epiteliales. La activación del factor de transcripción nuclear- κ B (NF- κ B) se ha asociado con esta respuesta. Los intermediarios reactivos de oxígeno, cuya producción se incrementa en la infección por la bacteria, podrían también modular la expresión de esta quimiocina en la mucosa gástrica (Shimada y Terano, 1998).

H. pylori es una bacteria no invasiva, por lo tanto no penetra en las células ni en los tejidos, es probable que el proceso inflamatorio inicial sea propiciado directamente por factores secretados por la bacteria como ureasa, citotoxina o por la presencia de la isla de patogenicidad.

Las cepas de *H. pylori* que poseen la isla *cagPAI* inducen gastritis más severa y aumentan el riesgo de desarrollar úlcera péptica y cáncer gástrico. Un mecanismo específico mediante el cual las cepas *cagA* positivas podrían ejercer este efecto es mediante la regulación de la producción de IL-8. *H. pylori* puede inducir la formación de pedestales y en contacto con células epiteliales gástricas activa múltiples cascadas de transducción de señales que regulan la secreción de IL-8, incluyendo la vía de NF- κ B y la de protein-kinasas, eventos que dependen de la presencia de genes en la isla *cagPAI* (Peek y Blaser, 2002).

Estudios como los de Ando y cols (1996) y Peek y cols (1995) han demostrado que las cepas *cagA* positivas de *H. pylori*, pero no las *cagA* negativas, inducen la secreción de IL-8, tanto *in vivo* como *in vitro*. Más aún, la mutagénesis de genes de *cagPAI* suprime la capacidad de inducción de la IL-8, por lo que estos genes han sido asociados con la capacidad de inducción de inflamación de la bacteria. Sin embargo, *cagA* por sí solo, no parece ser un marcador inflamatorio de *H. pylori* (Audibert y cols, 2000).

Los homogenados de tejido han demostrado niveles elevados de IL-8 en la mucosa gástrica de pacientes con infección por *H. pylori*. Mediante el método de ELISA, los niveles gástricos de IL-8, correlacionan con la severidad histológica de la gastritis asociada a la infección.

Las biopsias gástricas de pacientes infectados por cepas *cagA* positivas muestran infiltración de monocitos y polimorfonucleares más severa, co-expresando RNAm de IL-8 e

iONS. La IL-8 y el exceso de óxido nítrico (NO) pueden jugar un papel importante en la patogénesis de las enfermedades duodenales asociadas a *H. pylori* (Li y cols, 2000).

Los datos sobre la producción de citocinas en mucosa gástrica de niños infectados con *H. pylori*, son pocos. El trabajo de Guiraldes y cols, 2001 mostró un incremento significativo de IL1 β , IL-8 y TNF α en mucosa gástrica de niños de 5 a 18 años de edad infectados con *H. pylori*.

Yamaoka y colaboradores, 1998, estudiaron la expresión de varias quimiocinas diferentes a IL-8 en biopsias gástricas de pacientes adultos. Encontraron que la infección con *H. pylori* estaba asociada con incremento de la expresión de RNA mensajero para IL-8, Gro α , RANTES y MIP-1 α . Asimismo IL-8 y GRO α mostraron niveles incrementados con la infección.

Las citocinas pro-inflamatorias e inmunoregulatoras inducidas por *H. pylori*, pueden influir en la naturaleza de la respuesta local de las células T. Los linfocitos T cooperadores (Th), inician como células Th 0, después de activarse se diferencian en tres subgrupos: i) Th1 que secretan principalmente interleucina-2(IL-2) e interferón γ (IFN γ) ii) Th2, secretan IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 iii) recientemente se ha descrito la población de células Th3, estas células se caracterizan por la secreción del factor de crecimiento tumoral TGF- β (Parkin y Cohen, 2001).

Estudios *in vitro* han mostrado que productos de la bacteria como la ureasa, el LPS y algunos extractos proteicos, tienen la capacidad de modular la respuesta inmune dirigiendo hacia la expresión de citocinas de tipo Th1 como son IFN- γ e IL-12 e inhibiendo la expresión de citocinas de tipo Th2 como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. Una respuesta polarizada de tipo Th1, aunada a una producción de citocinas pro-inflamatorias puede ser el origen del daño al tejido debido a una mayor producción de IFN γ lo cual resulta en una mayor activación de macrófagos, neutrófilos y basófilos (Holk y cols, 2003), estas células efectoras pueden dañar al tejido por la liberación de radicales libres de oxígeno, óxido nítrico y enzimas proteolíticas.

Los resultados de diferentes trabajos publicados, apoyan que una respuesta celular predominantemente de tipo Th1 está asociada con formas más severas de la enfermedad ulcero- péptica y cuando predomina la respuesta de tipo Th2, la inflamación puede estar limitada a gastritis sin daño significativo al tejido. Se ha sugerido que en la infección con *H.*

pylori la manipulación del balance Th1/Th2 podría ser útil para futuras estrategias terapéuticas (D'Elíos y cols, 1997).

1.5.4 Respuesta inmune humoral

Usualmente, posteriormente a la adquisición de *H. pylori*, hay una rápida respuesta inmune innata y adquirida incluyendo la generación de respuesta humoral local y sistémica (Blaser y Atherton, 2004). Sin embargo, la producción de anticuerpos no conduce a la erradicación de la infección pero puede contribuir al daño tisular (Suerbaum y Michetti, 2002).

Una respuesta de anticuerpos efectiva contra *H. pylori* debería consistir preferentemente de anticuerpos locales, los cuales deberían ser capaces de llegar al epitelio gástrico donde se localizan las bacterias. Aún cuando varios estudios han mostrado que la infección con *H. pylori* induce niveles altos de anticuerpos séricos específicos para antígenos del bacilo, pocos estudios han evaluado la respuesta gástrica de anticuerpos. Rathbone y colaboradores en 1986, fueron los primeros en demostrar la presencia de IgA específica para *H. pylori* en el jugo gástrico de personas infectadas con este organismo. Sobala y colaboradores en 1991, describieron un caso de infección aguda con *H. pylori*, así como la respuesta inmune local y sistémica; utilizando inmunoblot y ELISA advirtieron que la respuesta inmune local fue evidente antes de la respuesta sistémica, este grupo de investigadores encontraron una fuerte respuesta local de IgM e IgA en la fase aguda de la infección (día 14). A pesar de la respuesta local de anticuerpos, la infección es crónica y la bacteria permanece en el estómago por décadas, a menos que se erradique la infección con tratamiento antimicrobiano. El periodo de tiempo tan largo de colonización por la bacteria demuestra que *H. pylori* puede evadir la respuesta inmune del hospedero (Blaser y Atherton, 2004).

En relación a la respuesta sistémica humoral a extracto total del bacilo, se ha investigado la presencia de las tres clases de inmunoglobulinas (IgA, IgG e IgM) en el suero de pacientes infectados y no infectados por *H. pylori*. Los estudios concuerdan en que la IgG contra extracto total de *H. pylori* se detecta en más del 95% de los pacientes infectados y en menos del 1% de los no infectados. Mientras que los resultados obtenidos para IgA fueron 81% y 6% en infectados y no infectados, respectivamente. Los anticuerpos IgM han sido demostrados en 5 a 10% de los pacientes infectados y se observan de forma transitoria durante la fase aguda y rara vez durante la fase crónica de la infección, no hay reportes sobre la presencia de IgM en pacientes no infectados (Granberg y cols, 1993).

La respuesta de IgG específica involucra las cuatro subclases de IgG; la mayor respuesta está dada por las subclases de IgG1 e IgG2. Los pacientes adultos con úlcera duodenal tienen una respuesta de tipo IgG2 más alta que los pacientes sin úlcera (Bontkes, 1992). Mientras que en suero de niños infectados, Dzierzanowska-Fangrat y colaboradores en 2003, observaron una frecuencia mayor de IgG1 en niños con úlcera duodenal y con dispepsia no ulcerosa.

El análisis del patrón de reconocimiento de antígenos durante el periodo de la infección de aguda a crónica, ha mostrado que en niños la respuesta inicial de anticuerpos es a antígenos de bajo peso molecular. Sin embargo, en adultos la respuesta a estos antígenos ocurre tardíamente (Mitchell y cols, 1996).

Las proteínas Ureasa, CagA y VacA, además de participar en la patogenicidad de *H. pylori*, son antígenos que inducen una importante respuesta inmune en el hospedero (Blaser, 1999). No obstante, pocos estudios han evaluado la respuesta humoral a los antígenos de la bacteria. El primer antígeno de alto peso molecular reconocido por IgG es la proteína CagA y esta respuesta ha sido fuertemente asociada con úlcera duodenal y cáncer gástrico (Cover y cols, 1995). Asimismo, la seropositividad para anti-CagA fue de 88% (28 de 32) para pacientes con úlcera duodenal y sólo 56% (22 de 39) para pacientes con dispepsia no ulcerosa. Los estudios en niños sugieren que la presencia de cepas de *H. pylori cagA*⁺ (47%) es menos frecuente que en los adultos (González, 2000). Además, se ha observado que en niños la infección con *H. pylori cagA*⁺ se relaciono con mayor inflamación y densidad de colonización en la mucosa antral que en los infectados con cepas *cagA*⁻ (Dzierzanowska-Fangrat y cols, 2002).

Respuesta inflamatoria y respuesta inmune específica a la infección por *Helicobacter pylori* en niños y adultos

Helicobacter pylori (*H.pylori*) coloniza más del 50% de la población mundial e invariablemente causa gastritis crónica en los individuos infectados.

La infección por *H pylori*, generalmente se adquiere en la niñez y permanece como una infección crónica a lo largo de la vida del sujeto infectado. Cuando la infección se adquiere a menor edad, se incrementa el riesgo de que en el adulto se presente úlcera péptica, ó adenocarcinoma gástrico. Para el desarrollo de enfermedad asociada a *H.pylori* contribuyen factores de la bacteria, del hospedero y el medio ambiente.

Entre los factores bacterianos que se han asociado con enfermedad severa, el más estudiado es el gen *cagA*, este gen forma parte de una isla de patogenicidad (*cagPAI*). Las cepas de *Hp* con *cagPAI* están más asociadas a úlcera péptica o cáncer gástrico. La ureasa es una enzima que participa en la colonización de la bacteria al epitelio y se encuentra en todas las cepas de *H pylori*.

Las proteínas ureasa, y CagA además de participar en la patogenicidad de *H.pylori*, son antígenos que inducen una importante respuesta inmune en el hospedero.

En adultos la infección con *Hp* estimula una respuesta tipo Th1 asociada con niveles elevados de citocinas pro-inflamatoria tales como IFN γ e IL-2. Además se ha observado el aumento en los niveles de IL-8, una citocina altamente quimioattractante para neutrófilos. A pesar de que la infección con *H pylori* inicia en la niñez pocos estudios se han realizado en este grupo de edad.

El estudio de la respuesta inmune a la infección en niños que han tenido infección por meses o pocos años, comparada con adultos que han tenido la infección por décadas, nos ayudará a definir factores que influyen en la colonización por el bacilo y en la respuesta inmunológica del hospedero.

Objetivo General. Evaluar la respuesta humoral e inflamatoria en niños y adultos infectados con *H.pylori*.

Material y Métodos. Población de estudio: Niños y adultos con indicación de endoscopia de tubo digestivo alto. A los pacientes se les tomaron tres biopsias de antro, 1 de cuerpo y 3 mL de sangre venosa. Una biopsia de antro se procesó para cultivo, la segunda biopsia de antro y la de cuerpo fue fijada en parafina y teñida con hematoxilina-eosina para evaluación histológica, la tercera se usó para determinar niveles de interleucinas

Serología: Se determinó IgG para extracto total de *H. pylori*, proteína CagA y ureasa en suero de niños y adultos infectados y no infectados con *Hp* por ELISA.

Biopsias: a) Se determinó por inmunofluorescencia e inmunohistoquímica la presencia de *Hp* e IL-8 en biopsias gástricas. b) Se realizó ELISA en sobrenadantes de biopsia de antro para determinar los niveles de IL-8, IL-12, IFN γ , IL-10, IL-4 y c) Se realizó análisis histológico utilizando el criterio de Sydney.

Resultados.

En niños infectados con *H.pylori* se encontró una seroprevalencia a CagA de 46.9 % y 16.2% a ureasa, en adultos la seroprevalencia a CagA fue de 78.9% y a ureasa 59%.

Al comparar la frecuencia de infección por *H. pylori* en niños con DAR y sanos de nivel socioeconómico y edad similares, los niños con DAR mostraron una frecuencia de infección de 65% vs 48% en niños sanos ($p=0.009$).

La respuesta sérica de IgG a CagA es mayor en los niños que en los adultos y esta respuesta tiende a disminuir con la edad; en cambio la respuesta sérica de IgG a ureasa es menor en los niños y aumenta al incrementarse la edad.

Los niños infectados presentaron una infiltración mononuclear leve a moderada y los adultos con gastritis o úlcera péptica, moderada a severa, tanto en antro como en cuerpo gástrico. En el antro pero no en el cuerpo, la intensidad de colonización con *Hp* correlacionó con infiltración de neutrófilos y mononucleares.

La presencia de IL-8 *in situ* en biopsias gástricas de niños y adultos se observó en el epitelio gástrico. Los niños infectados y los adultos con úlcera péptica mostraron los niveles más altos de la citocina (*in situ* y en los sobrenadantes de las biopsias). Los niños sin infección mostraron en el epitelio gástrico la presencia débil de la IL-8.

En los niños con infección asociada a *H pylori*, se incrementaron significativamente ($p<0.05$) los niveles de IL-8 e IL-10, pero no IL-12, IFN γ e IL-4, cuando comparamos con los niveles de los niños sin infección. Los adultos con UD mostraron aumento en los niveles de IL-8, IL-12, IFN γ , e IL-4 pero no en IL-10, en comparación con los adultos con DNU. Los niños mostraron los niveles más altos de citocinas en los sobrenadantes de las biopsias.

Conclusiones.

1. En la infección natural con *H pylori* la proteína CagA es una buena inmunógena y la proteína ureasa es una inmunógena pobre.

2. Los niños infectados con *H pylori* presentan una infiltración mononuclear y de neutrófilos leve, mientras que los adultos presentan una infiltración moderada a severa.
3. En la mucosa gástrica de los niños, la presencia de *H pylori* esta asociada con niveles altos de IL-8 principalmente en células epiteliales. En adultos con úlcera péptica los niveles de IL-8 se encuentran incrementados en relación a los niveles observados en adultos con DNU.
4. Los niños infectados con *H pylori* presentan incremento en los niveles de IL-8 e IL-10, los adultos con úlcera duodenal muestran mayores niveles de IL-8, IL-12, IFN γ e IL4 que los adultos con dispepsia no ulcerosa.

ABSTRACT

Colonization of the gastric mucosa with *Helicobacter pylori* invariably leads to inflammation followed by acute or chronic non-atrophic gastritis. Subsequently, some patients may develop duodenal ulcer, gastric ulcer, or even gastric cancer. The infection is usually acquired during childhood, although expression of disease does not occur in most cases until adulthood. The presence of the organism causes gastric inflammation in all individuals; with time this chronic inflammation may lead to injury of the gastric mucosa.

Little is known about *H. pylori* infections and immune response to urease and CagA in symptomatic children and adults. Few studies have reported the association of the intensity of *H. pylori* colonization, IL-8 expression and there are few pediatric studies evaluating the type and level of cytokine expression in the gastric mucosa.

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for diagnosis of *H. pylori* infection using whole cell extracts was validated. The IgG antibody responses against recombinant CagA and urease were studied in healthy children, children with RAP and adults with gastrointestinal symptoms. Moreover, we studied children, and adults with dyspeptic symptoms for *H. pylori* infection with immunofluorescence technique and for IL-8 with an immunohistochemical assay. Cytokine levels were determined by specific ELISAs in gastric antral biopsy homogenates, and inflammatory cell infiltration was scored using the modified Sydney system.

The whole-cell extract ELISA had a sensitivity of 85% and specificity of 87%. Children with RAP were more infected with *H. pylori* than were healthy control subjects; however, IgG and IgA CagA seropositivity was lower among those with RAP than among asymptomatic children (34% and 23% vs 76% and 55%, respectively; $p < 0.0001$).

We found in *H. pylori* positive children, a seroprevalence of 46.9% to CagA and 16.2% to urease, whereas in *H. pylori* -positive adults, a seroprevalence of 78.9% to CagA and 59% to urease.

In *H. pylori*-infected children, mild mononuclear cell infiltration was found in 50%, and no neutrophils in 40% of cases. In the antrum, the intensity of colonization correlated with neutrophil and mononuclear cell infiltration. The IL-8 response was significantly higher in the antrum ($p < 0.05$) and corpus ($p < 0.02$) of infected children, and adults with ulcer, IL-8 was localized mainly in the surface and crypts of the epithelium. Cytokine levels were determined by specific ELISAs in gastric antral biopsy homogenates, and inflammatory cell

infiltration was scored using the modified Sydney system. Among the children studied, the presence of *H. pylori* was associated with significantly higher levels of IL-8 and IL-10 compared with *H. pylori*-negative children (22.0 ± 17.0 vs 13.0 ± 13.5 ; $P=0.03$ and 7.7 ± 11.4 vs 3.2 ± 4.0 ; $P=0.05$ respectively). The levels of all cytokines tested were significantly higher in children than in adults. Among adults, DU patients had significantly higher levels of IL-8, IL-12, IFN γ and IL-4 as compared with NUD patients ($P<0.05$).

H. pylori positive children showed mild to moderate gastritis in 87% of cases. In contrast, all the *H. pylori*-negative children presented only mild inflammation or normal mucosa ($p<0.001$). All 60 adults were histologically positive for *H. pylori*; inflammation score was mild in 13%, moderate in 40% and severe in 47%. No differences in severity of the gastric inflammation were observed for the adults between NUD and DU.

Conclusions: In children, the magnitude of the response to CagA was significantly higher and the response to urease was significantly lower than those in adults. In *H. pylori* infected children, and adults with ulcer had a higher IL-8 response. The levels of IL-8 and IL-10 were higher in infected children. Among adults, DU patients had significantly higher levels of IL-8, IL-12, IFN γ and IL-4 as compared with NUD patients ($P<0.05$).

2. Planteamiento del problema

Helicobacter pylori coloniza persistentemente el estómago de más del 50% de la población mundial. La colonización con *H. pylori* invariablemente causa gastritis crónica en todos los individuos infectados, pero solamente una minoría presenta sintomatología. Se ha estimado que 10 a 20% de los individuos infectados desarrollan úlcera péptica y 1 a 2% desarrollan cáncer gástrico.

Se han realizado diversos estudios para analizar la respuesta inmune humoral a extracto total de *H. pylori* o a antígenos semi-purificados de la bacteria, pero no se ha estudiado la respuesta humoral a antígenos de *H. pylori* relacionados con su virulencia como las proteínas CagA y ureasa. Asimismo, han sido poco estudiadas en adultos y sobre todo en niños, las características de la respuesta inflamatoria de la mucosa gástrica infectada.

El estudio de la respuesta inmune y las características de la respuesta inflamatoria del hospedero a la infección con *H. pylori* en niños con la infección por meses o pocos años, comparada con adultos con la infección por décadas, nos ayudará a definir la respuesta humoral y celular que participa en la infección con *H. pylori* y permite su cronicidad y en algunos casos el desarrollo de las diferentes formas de enfermedad (gastritis no atrófica, úlcera péptica ó cáncer gástrico).

2.1 Preguntas de investigación

¿Como es la respuesta humoral a antígenos de *H. pylori* en niños que tienen una infección temprana y adultos con una infección crónica ?`

¿Como es la respuesta inflamatoria en niños y adultos infectados con *H. pylori*?

3. Hipótesis

1. Los niños infectados con *H. pylori* tendrán una respuesta inmune humoral contra ureasa (antígeno de colonización) mayor que la observada en adultos. Mientras que los adultos tendrán una respuesta mayor a CagA (antígeno asociado a inflamación).
2. Los niveles de interleucinas pro-inflamatorias serán mayores en adultos con DNU o úlcera péptica que en niños infectados con *H. pylori*.
3. Los niños infectados con *H. pylori* presentarán gastritis no atrófica de leve a moderada; mientras que adultos infectados presentarán gastritis crónica antral activa severa.

4. Objetivo general

Evaluar la respuesta humoral y celular en niños y adultos infectados con *Helicobacter pylori*.

4.1 Objetivos específicos:

1. Evaluar y comparar la respuesta inmune humoral, contra antígenos de *H. pylori*, entre niños y adultos con enfermedad gastroduodenal.
2. Comparar los niveles gástricos de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en niños y adultos infectados con *H. pylori*.
3. Describir y comparar las características histológicas de la mucosa gástrica, entre niños y adultos infectados con *H. pylori*.

Descripción general del estudio

El estudio se desarrollo en varias etapas, iniciando con la estandarización y validación de ELISA para IgG e IgA a tres antígenos de *H. pylori*. Se determinó la presencia de IgG e IgA, en suero de niños y adultos. Posteriormente se determinó la presencia de interleucinas (IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, IFN γ) en las biopsias de los pacientes. En todos los pacientes se evaluó el grado de infiltración gástrica de células mononucleares y de neutrofilos.

5. Pacientes, material y métodos

5.1 Lugar donde se realizó el estudio

Este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de bacteriología de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, CMN S XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social.

5.2 Población de estudio

La población de estudio estuvo constituida por casos consecutivos atendidos en los servicios de Gastroenterología de los Hospitales de Pediatría y de Especialidades del CMN Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. Se estudiaron pacientes que cumplieron los criterios de inclusión y exclusión que se señalan a continuación.

5.2.1 Criterios de inclusión

Niños. Pacientes de 6 meses a 17 años de edad que ingresaron al Hospital de Pediatría con diagnóstico de dolor abdominal recurrente (DAR).

Adultos. Pacientes con enfermedad ácido péptica de 18 a 70 años que ingresaron al servicio de gastroenterología del Hospital de Especialidades del CMN Siglo XXI.

Los pacientes fueron sometidos a endoscopia de tubo digestivo alto por motivos diferentes a los del presente estudio. Se solicitó el consentimiento del padre o tutor en pacientes pediátricos y el consentimiento del adulto para participar en el estudio.

5.2.2 Criterios de exclusión

Pacientes que recibieron antibióticos o sales de bismuto en el último mes previo a la endoscopia, mujeres embarazadas, pacientes con Inmunodeficiencias como sida, leucemias y neoplasias o pacientes con alguna enfermedad crónica diferente de gastritis.

5.2.3 Definición de infección

Los niños y adultos se clasificaron como infectados cuando dieron positivo el cultivo o las pruebas de aliento e histología y no infectados cuando las tres pruebas fueron negativas.

5.3 Muestras biológicas

5.3.1 Sangre

De cada paciente pediátrico o adulto, se tomaron dos biopsias de antro y dos de cuerpo. Se recolectó una muestra de 2 mL de sangre de cada paciente, se obtuvo el suero y se conservó a -20°C hasta su uso.

5.3.2 Biopsias

Por medio de una endoscopia, el gastroenterólogo tomó 3 biopsias de antro y 2 de cuerpo. La primera biopsia de cada sitio fue puesta en solución salina para cultivo de *H. pylori*, la segunda biopsia de antro y cuerpo fue puesta en formalina amortiguada al 10%, se fijó en parafina para realizar cortes y análisis histológico. En 60 niños y adultos una biopsia de antro fue congelada inmediatamente a -70°C en tubos estériles para la determinación de citocinas por ELISA y cuantificación de proteínas.

5.4 Pacientes

Se incluyeron las muestras clínicas de los pacientes pediátricos y adultos que cubrieron los criterios antes descritos.

5.4.1 Sueros de pacientes utilizados para la estandarización de ELISAs

Se realizó la validación del ELISA con sueros de 50 niños (edades 2-17 años) que asistían a consulta por DAR al servicio de Gastroenterología del Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI. Por indicación del gastroenterólogo se les tomaron muestras de biopsia y sangre. De estos niños, 20 estuvieron infectados y 30 no infectados, sus muestras de suero se utilizaron en las determinaciones que se describen a continuación.

5.4.2 Sueros de pacientes usados para definir el valor de corte

Se usó el suero de los 30 pacientes negativos a infección con *H. pylori*, para estudiar la respuesta de IgG a extracto total y de IgG e IgA a CagA y ureasa. Todas las determinaciones se realizaron en 6 días diferentes. El valor de corte se definió como el valor promedio más tres desviaciones estándar (DE) de la densidad óptica (DO) de los 30 sueros de los pacientes no infectados.

5.4.3 Sueros de pacientes usados como controles positivos

Se utilizaron 120 sueros de niños y adultos para diagnosticar la infección con *H. pylori* usando ELISA para extracto total y se seleccionaron 30 sueros con la DO mayor al valor de corte establecido. Con estos sueros seleccionados se hizo una mezcla y fueron usados como sueros control positivo depositándolos en cuatro pozos de la placa de 96 pozos, fueron incluidos en cada uno de los ensayos de ELISA realizados. Para expresar el resultado en unidades ELISA (UELISA), se definieron las Unidades-ELISA como el cociente del valor de DO de la muestra entre el valor de corte de la placa. Un valor mayor o igual a 1 unidad ELISA fue considerado positivo.

5.4.4 Respuesta serológica a antígenos de *H. pylori*

Población pediátrica. Se estudiaron un total de 352 niños (edad promedio 9.5 ± 3.9 años): 242 con DAR, 89 con dispepsia no ulcerosa (DNU), 21 con diagnóstico desconocido.
Población adulta: 293 individuos (edad promedio 48.1 ± 15.9 años): 143 con úlcera péptica, 150 con DNU.

5.4.5 Expresión in situ de IL-8

Población pediátrica: 45 niños: 21 niños infectados con *H. pylori* (edad promedio 11 ± 3.5 años) y 24 niños no infectados (edad promedio 10 ± 3.7 años).
Población adulta: 44 pacientes infectados con *H. pylori* (20 mujeres y 24 hombres) de los cuales 15 presentaron DNU (edad promedio de 49.7 años), 15 con úlcera duodenal, con edad promedio de 49.9 años y 14 con úlcera gástrica, con edad promedio de 57.5 años.

5.4.6 Detección de interleucinas en sobrenadantes de biopsias

Población pediátrica: Quedó constituida por un total de 60 pacientes pediátricos con dolor abdominal crónico y 60 adultos con enfermedad gastroduodenal.

La población pediátrica incluyó biopsia antral de: 30 niños infectados con *H. pylori* (edad promedio 11.7 ± 4.0 , intervalo 4-17 años) y 30 niños no infectados (Edad promedio 10.6 ± 4.0 años, intervalo 2-17 años). La población adulta incluyó 30 pacientes adultos con dispepsia no ulcerosa (DNU) (edad promedio 38.3 ± 10.6 , intervalo 22-69 años y 30 con úlcera duodenal (UD), (Edad promedio 41.4 ± 13.2 años, intervalo 20-69 años), todos los adultos estaban infectados con *H. pylori*.

La concentración de interleucinas en sobrenadantes, se realizó únicamente en una biopsia de antro, ya que no fue posible obtener una biopsia más de cuerpo.

5.5 Métodos

5.5.1 Cultivo de biopsias para aislar *H. pylori*.

Una biopsia de antro y una de cuerpo fueron homogenizadas con solución salina al 0.9% en un homogenizador de vidrio, 50 μ l se inocularon en medio de gelosa sangre de carnero (BBL, Becton Dickinson, Cockeysville, USA) al 5%, con (vancomicina 10 mg/L, Trimetoprim 5 mg/L, anfotericina 5mg/L) y sin antibióticos, las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera de 9 % de CO₂ durante 2 a 7 días. Se consideró un cultivo positivo cuando se observaron colonias características de *H. pylori* en los medios de cultivo. Se identificó al bacilo de la forma convencional observando la morfología colonial, la morfología microscópica y las pruebas bioquímicas características, principalmente ureasa, catalasa y oxidasa positivas. Las cepas identificadas como *H. pylori* se conservaron en caldo Brucella (BBL, Becton Dickinson, Cockeysville, USA) con glicerol al 15% a -70°C.

5.5.2 Métodos serológicos.

5.5.2.1 Antígenos

Se utilizaron tres antígenos diferentes en esta tesis: extracto total, CagA y ureasa. El extracto total se obtuvo de una mezcla de tres cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes mexicanos, un niño y dos adultos. Los antígenos CagA y ureasa fueron péptidos recombinantes donados por OraVax, Cambridge, MA.

5.5.2.2 ELISAs para IgG e IgA

Se utilizó ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) para estudiar la presencia de IgG e IgA en suero. La técnica fue desarrollada y estandarizada en el laboratorio. Se hicieron

cinco determinaciones séricas: IgG anti-extracto total de *H. pylori*, IgG e IgA anti-CagA y anti-ureasa. Se determinaron las concentraciones óptimas de los antígenos utilizados y las diluciones de suero y conjugado. Las concentraciones finales usadas a lo largo de este trabajo fueron las siguientes: 0.5 (µg/pozo para IgG de extracto total, 0.1 (µg/pozo para IgG de CagA y 0.5 (µg/pozo para IgA de CagA, IgG e IgA de ureasa. Adicionalmente, se determinaron las diluciones óptimas de suero para cada uno de los ensayos, quedando las diluciones finales empleadas a lo largo del trabajo como se describen a continuación: 1:1000 para IgG de extracto total, 1:200 para IgG de CagA; 1:400 para IgG de ureasa; 1:50 para IgA de ureasa y CagA.

El método de ELISA utilizado fue similar para los tres antígenos evaluados. Se depositó el antígeno en microplacas de 96 pozos, diluido en regulador de carbonatos, pH 9.6 a 4°C toda la noche. Se lavaron tres veces con regulador de fosfatos adicionado de tween 20 al 0.5%. Posteriormente se bloquearon las placas con leche descremada al 2.5%, en regulador de fosfatos pH 7.4, durante 1h. Se adicionó el suero en la dilución correspondiente y se incubó a 37° C, durante 1h. Enseguida se adicionó el anticuerpo secundario que fueron anticuerpos monoclonales anti-IgG o anti-IgA conjugados con fosfatasa alcalina (Southern Biotech, Birmingham, AL) diluido 1:1000 y se incubaron a 37°C durante 1h. El sustrato usado fue p-nitrofenilfosfato a una concentración de 1mg/mL (Southern Biotech). Terminado el periodo de incubación se leyó la absorbancia a 405 nm (iEMS Analyser, Labsystems, Finland).

5.5.3 Análisis histológico.

Una biopsia de antro y una de cuerpo de cada paciente fueron incluidas en parafina y teñidas con hematoxilina-eosina para evaluar el grado de inflamación usando el sistema modificado de Sydney.

5.3.1 Evaluación morfológica de la mucosa gastroduodenal.

Se utilizó el criterio establecido en el Sistema de Sydney (Dixon y cols, 1996). Este criterio se basa en las características topográficas y morfológicas para generar datos clínicos reproducibles útiles para el diagnóstico histológico. En este sistema se evalúa la colonización, la infiltración de neutrófilos y mononucleares así como el grado de atrofia y metaplasia intestinal. Los resultados se emiten con un valor numérico que equivale a la siguiente escala: 0= normal, 1= leve, 2= moderado y 3= severo (Figura 5). Las biopsias

fueron evaluadas en el Departamento de Patología del Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI por un solo patólogo, sin que el evaluador conociera el origen de la muestra o el cuadro clínico del paciente.

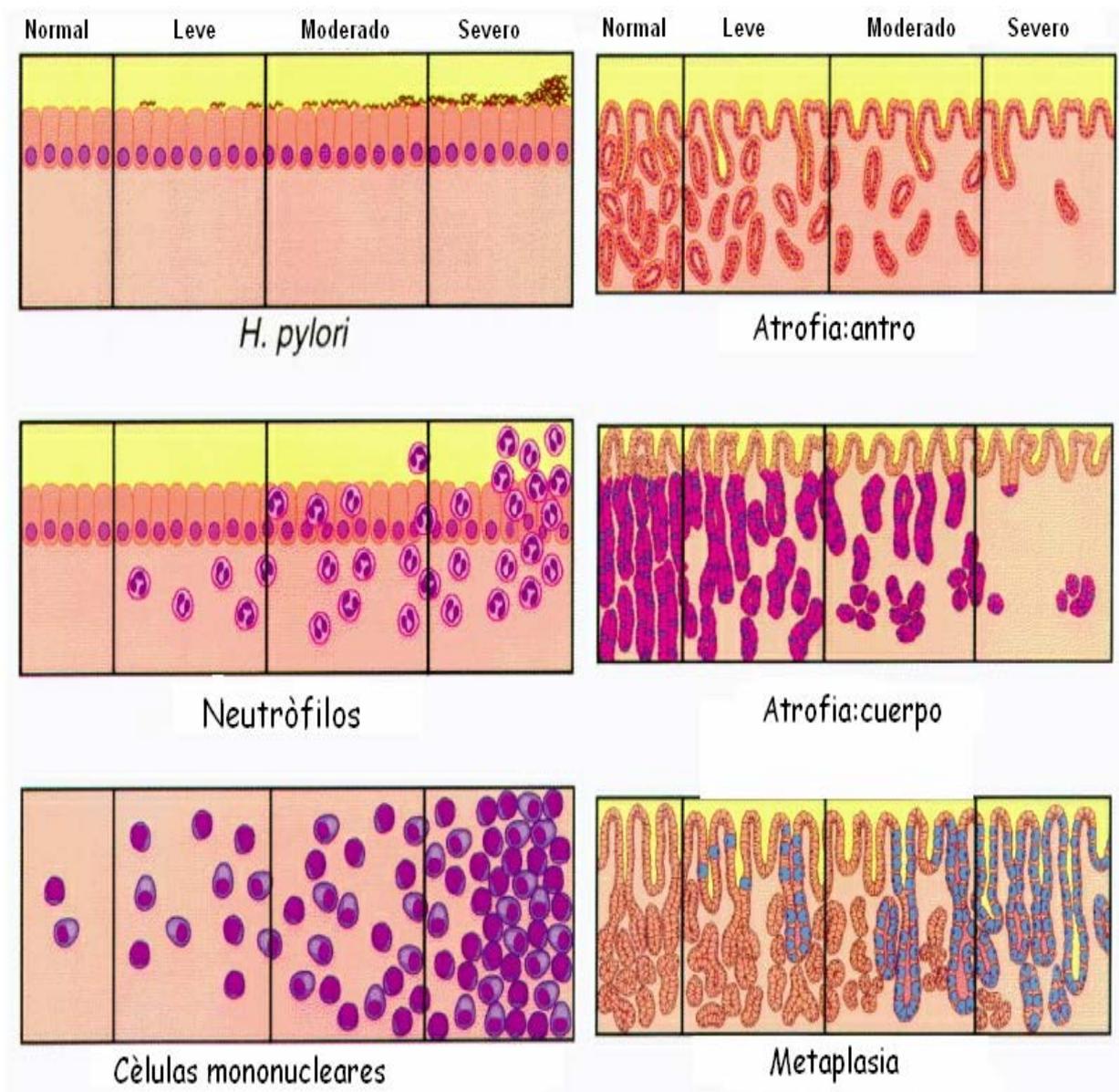


Figura 5. Representación esquemática de la evaluación histológica de las biopsias de acuerdo al sistema Sydney (Dixon y cols, 1996)

5.5.3 Métodos de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica (Anexo 1)

5.5.3.1 Cuantificación de *H. pylori* por inmunofluorescencia

La detección de *H. pylori* se realizó en cortes histológicos de las biopsias fijadas en parafina. Como anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo anti-*H. pylori* y como anticuerpo secundario un anticuerpo de cabra anti-conejo con fluoresceína. Las imágenes fueron analizadas con el software KS300 (Carl Zeiss). Los resultados fueron expresados como un porcentaje del área total (μm^2) teñida para *H. pylori*. Se evaluaron 5 campos de antro y 5 de cuerpo y se calculó el promedio \pm la desviación estándar.

5.5.3.2 Cuantificación de IL-8 por inmunohistoquímica

Se estudiaron cortes de biopsias fijadas en parafina, usando inmunohistoquímica con peroxidasa. Se utilizó como anticuerpo primario un anticuerpo de cabra anti-IL-8 humana, como anticuerpo secundario un anticuerpo de conejo anti-cabra conjugado con peroxidasa. La unión antígeno-anticuerpo se visualizó usando 3,3 diaminobencidina–hidroclorada. Se contratiñó con hematoxilina y las imágenes fueron analizadas con el software KS300 (Carl Zeiss). Los resultados fueron expresados como un porcentaje del área total (μm^2) teñida para IL-8. Se evaluaron 5 campos de antro y 5 de cuerpo y se calculó el promedio \pm la desviación estándar.

5.5.4 Determinación de interleucinas en sobrenadante de la biopsia

Para determinar los niveles de citocinas la biopsia se colocó en 600 μl de regulador de fosfatos Dulbecco (Gibco BRL, Grand Island, NY), fue macerada con un homogenizador automático de tejidos, los sobrenadantes obtenidos se centrifugaron a 12,000 rpm, durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente 50 μl del sobrenadante fueron utilizados para la determinación de los niveles de cada una de las siguientes interleucinas (IL-4, IL-10, IL-8, IL-12 e IFN- γ), mediante ELISA, utilizando kits comerciales (Cytoscreen Immunoassay Kit, Biosource International, Camarillo CA).

La determinación de la concentración de proteínas de las biopsias se realizó por el micrométodo comercial (Pierce, Rockford IL).

Cada ensayo se realizó por duplicado y el resultado final fue el promedio de ambos ensayos. El resultado de las citocinas se expresó como pg de citocina/ μg de proteína.

6. Análisis estadístico

Se usó la prueba de χ^2 y razón de momios (OR) con un intervalo de confianza de 95% para estudiar las diferencias de respuesta entre niños y adultos a los antígenos evaluados. Las diferencias en la magnitud de la respuesta inmune, entre los valores de intensidad de IL-8 o niveles de interleucinas entre los diferentes grupos se analizaron con la prueba de t student.

La prueba exacta de Fisher y χ^2 se usaron para analizar diferencias en la severidad de la inflamación entre los niños infectados y sin infección con *H. pylori* y entre los adultos con DNU, UD y UG. Se usó el coeficiente de correlación de Spearman para calcular la correlación entre la severidad de la inflamación y la respuesta de IL-8, la intensidad de colonización y respuesta de IgG. A lo largo del estudio se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

7. Resultados

La población pediátrica incluyó un total de 352 niños infectados con *H. pylori* y niños sin infección (Edad promedio 9.5 años, intervalo 2-17 años). La población adulta incluyó 293 pacientes adultos con dispepsia no ulcerosa (DNU), 45 con úlcera duodenal (UD) y 14 con úlcera gástrica (UG), en las tablas 2 y 4 se muestran las características de la población estudiada.

Tabla 2. Características generales de la población estudiada

Grupo	<i>H. pylori</i>	Diagnostico	n	Edad \pm DS, en años
Niños	+ y -	DAR	352	9.5 \pm 3.9 (2-17)
	+	DAR	130	9.1 \pm 3.9 (1-17)
	-	DAR	222	9.0 \pm 4.0 (1-16)
Adultos	+	DNU	293	48.1 \pm 15.9 (20-78)
	+	Úlcera duodenal	45	50 \pm 13.4 (22-73)
	+	Úlcera gástrica	14	57 \pm 13.8 (33-83)

DAR dolor abdominal recurrente, DNU dispepsia no ulcerosa

7.1 Validación de los ensayos serológicos

En la tabla 3, se describe la valoración diagnóstica de los ensayos inmunoenzimáticos para extracto total, ureasa y CagA estandarizados al inicio de este estudio. Se incluyen los resultados de sensibilidad y especificidad de ELISAs para IgG de extracto total, ureasa y CagA. También se incluyen los resultados de IgA para ureasa y CagA. La ELISA para IgG de extracto total mostró los mejores resultados, una sensibilidad de 85% y una especificidad de 87%. La ELISA para IgG con ureasa tuvo una especificidad y valor predictivo de 100%, pero tuvo la sensibilidad más baja (23%). La respuesta de IgG e IgA a CagA mostró buena especificidad (97 y 90% respectivamente), aunque la sensibilidad fue baja (83 y 33% respectivamente)

Tabla 3. Valor diagnostico de ELISAs a diferentes antígenos de *H. pylori* para detección de infección en suero.

Antígeno	Sensibilidad*	Especificidad**	Valor Predictivo Positivo	Valor Predictivo Negativo
Extracto Total de <i>H. pylori</i> IgG	85	87	81	90
Ureasa recombinante IgG	23	100	100	68
IgA	28	83	50	66
CagA recombinante IgG	83	97	94	91
IgA	33	90	67	69

*Calculado con 20 niños infectados con *H. pylori* (Promedio de edad \pm DS. 12 \pm 3.2 años) ** Calculado de 30 niños no infectados con *H. pylori* (Promedio de edad \pm DS. 7.5 \pm 5.1 años.)

7.2 Prevalencia de la infección en niños con DAR y controles

La detección de IgG contra extracto total por ELISA se utilizó para diferenciar entre individuos infectados con *H. pylori* y sin infección.

Se estableció la prevalencia de la infección con *H. pylori* en 82 niños con DAR y 246 controles asintomáticos pareados por edad y sexo. Los niños con DAR se encontró que estuvieron más infectados que los niños sanos y esta diferencia fue estadísticamente significativa (65% vs 48%, $p=0.009$) (Tabla 4). Los niños con DAR presentaron mayor prevalencia de infección con *H. pylori* que los controles sanos (65% vs 48%, $p=0.009$).

Tabla 4. Características del grupo de niños estudiados

	Dolor abdominal recurrente (n= 82)	Controles sanos (n= 246)	Valor de p
Infectados con <i>H. pylori</i>	53(65%)	117(48%)	0.009 ^a
Promedio de edad de los infectados (rango)	9.1 ± 3.9(1-17)	10.6 ± 3.7(2 -17)	0.012 ^b
Mujeres infectadas	58.5%	65.5%	>0.1

^a Prueba de χ^2 , ^b Prueba de t

7.3 Respuesta de anticuerpos séricos a CagA y ureasa en niños.

En la tabla 5, se presenta la respuesta inmune de IgG e IgA a los antígenos CagA y ureasa en los niños infectados con *H. pylori*. Entre los niños infectados, asintomáticos o sanos, se encontró una respuesta significativamente mayor de IgG ($p < 0.001$) e IgA ($p < 0.001$) al antígeno CagA que los niños con DAR. La respuesta de IgG a ureasa también fue mayor en el grupo de los controles sanos que en el grupo de los niños con DAR ($p < 0.01$). La respuesta de IgA a ureasa no fue significativamente diferente entre los dos grupos estudiados.

Asimismo, se observó que la magnitud de la respuesta inmune de IgG e IgA, anti-CagA entre niños con DAR e infectados y los controles sanos fue significativamente mayor en el grupo de los controles sanos que en el grupo de los niños con DAR para IgG (6.25 ± 5.4 vs 3.28 , $p < 0.05$), para IgA (2.69 ± 3.7 vs 1.51 ± 2.7). La magnitud de la respuesta a ureasa fue similar entre ambos grupos de niños estudiados tanto para IgG como para IgA.

Tabla 5. Respuesta humoral sérica a diferentes antígenos de *H. pylori* en niños infectados ^a

Respuesta Inmune	No(%) de Niños seropositivos		
	Dolor Abdominal Recurrente	Controles Sanos	Valor de p
CagA			
IgG	18 (33.9)	89 (76.1)	0.0001
IgA	12 (22.6)	64 (54.7)	0.0001
Ureasa			
IgG	10 (18.9)	45 (38.5)	0.01
IgA	11 (20.8)	35 (29.9)	0.2

^a ***Infección se definió como una respuesta positiva de IgG a extracto total***

7.4 Respuesta de IgG sérica a extracto total, CagA y ureasa en niños y adultos con enfermedad gastroduodenal.

Se evaluó la respuesta de IgG a los tres antígenos de *H. pylori* en sueros de niños y adultos con enfermedad gastroduodenal, por medio del ELISA previamente estandarizado y validado. En total se estudiaron 645 pacientes, incluyendo 352 niños con un promedio de edad de 9.5 ± 3.9 años y 293 adultos con edad promedio de 48.1 ± 15.9 años (Tabla 2).

La infección por *H. pylori* se detectó en el suero de 130 niños (36.9%), entre los infectados 61(46.9%) tenían anticuerpos contra CagA y 21 (16.2%) tenían anticuerpos contra ureasa. Entre 293 adultos estudiados, 261(89.1%) estaban infectados, entre estos, 206 (78.9%) tenían anticuerpos contra CagA y 154 (59%) tenían anticuerpos contra ureasa.

Se incluyeron en el estudio niños con DAR y con DNU, como observamos en la tabla 5, los niños de ambos grupos tuvieron porcentajes de infección similares (35.5% y 34.8% respectivamente). Sin embargo, la respuesta de IgG a CagA y ureasa fue mayor en el grupo de niños con DNU. En adultos, el porcentaje de infección fue similar entre el grupo con ulcera duodenal o DNU, las respuestas de IgG a CagA y ureasa no mostraron diferencias significativas entre estos dos grupos de adultos infectados.

Tabla 6. Respuesta de IgG sérica a extracto total, CagA y ureasa en niños y adultos con enfermedad gastroduodenal

Grupo estudiado y diagnóstico	No de pacientes	No(%) de seropositivos para IgG contra:		
		Extracto Total	CagA	Ureasa
Niños				
DAR	242	86 (35.5)	40 (46.5) ^a	9(10.5) ^b
DNU	89	31 (34.8)	21 (67.7)	8(25.8)
Adultos				
UD	143	129 (89.6)	108 (83.7)	72 (55.8)
DNU	150	133 (86.7)	99 (74.4)	83 (62.4)

^a p = 0.04, DAR vs DNU; ^b p = 0.07, DAR vs DNU

La magnitud de la respuesta sérica de IgG a CagA y ureasa por grupo de edad, se muestra en la Figura 6. La magnitud de la respuesta serológica a CagA y ureasa fue diferente entre los niños y adultos. Los niños manifestaron una respuesta sérica anti-CagA mayor y una baja respuesta a ureasa, esta respuesta se modificó con la edad y en los adultos la respuesta sérica a CagA disminuyó después de los 30 años de edad, notándose en los adultos de mayor edad (> 70 años) la menor magnitud de respuesta sérica a este antígeno. En contraste, en los adultos, la magnitud de la respuesta sérica a ureasa a partir de los 30 años de edad mostró incremento, alcanzando un máximo en el intervalo de 60 a 70 años.

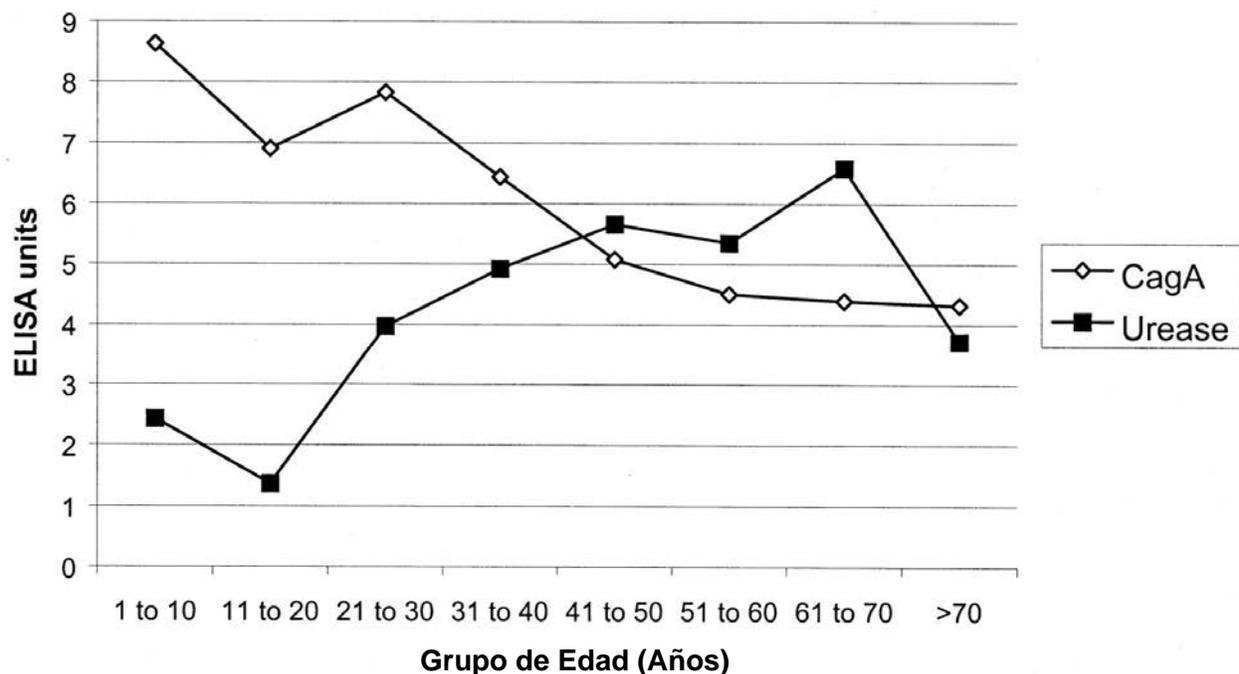


Figura 6. Magnitud (en unidades ELISA) de la respuesta sérica de IgG a CagA y ureasa en pacientes infectados con *H. pylori* de acuerdo a la edad

7.5 Determinación de interleucinas

7.5.1 Determinación de IL-8 “in situ”

7.5.1.1 Intensidad de la expresión de IL-8 “in situ” en biopsias gástricas de niños y adultos

En la figura 8, se muestra la intensidad de la expresión de IL-8 (marcada con peroxidasa, se observa en color café claro) en biopsias de antro y cuerpo de niños y adultos. La intensidad de expresión fue significativamente mayor en los niños infectados con *H. pylori* que en los niños sin infección, tanto en antro como en cuerpo. La mayor expresión de IL-8 se observó en la superficie de las células epiteliales y en algunas células mononucleares infiltrando lámina propia. Los niños no infectados mostraron la presencia débil de la IL-8 en el epitelio (Figura 8c).

El marcaje de IL-8 no siempre co-localizó con *H. pylori*, hubo áreas del tejido epitelial que presentaron colonización con *H. pylori* en regiones distintas a las que se observaba la presencia de la interleucina.

En los adultos, la producción de IL-8 fue mayor en los grupos con UD y UG en comparación con los que presentaron DNU. Estas diferencias se observaron en biopsias de antro y cuerpo y fueron estadísticamente significativas ($p < 0.001$) (Figura 7B).

De forma similar a lo observado en las biopsias de los niños, las biopsias de adultos mostraron la mayor expresión de IL-8 en las células epiteliales (Figuras 9a-9c).

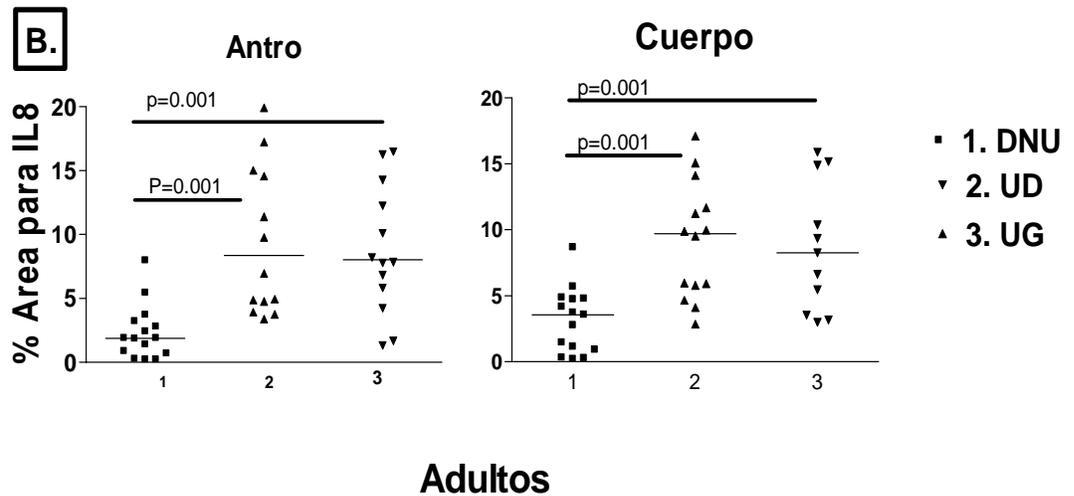
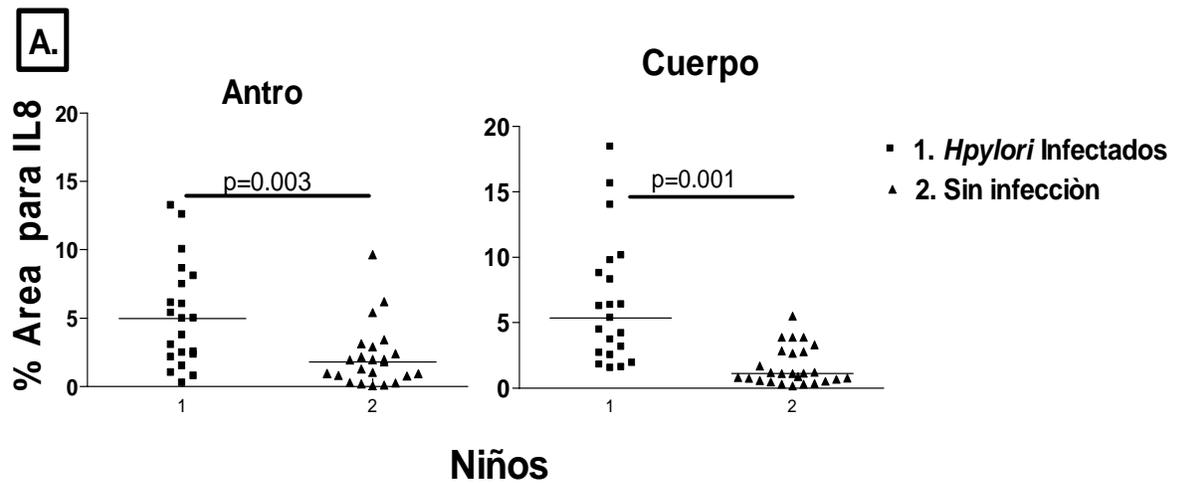


Figura 7. Expresión de IL-8 en biopsias de antro y cuerpo A.1. De niños infectados y 2. Niños sin infección con *H. pylori*, B. adultos con 1. DNU (dispepsia no ulcerosa, 2. UD (úlceras duodenales), y 5. UG (úlceras gástricas). Se muestra el porcentaje de área teñida para IL-8. Las barras representan la mediana de los resultados obtenidos.

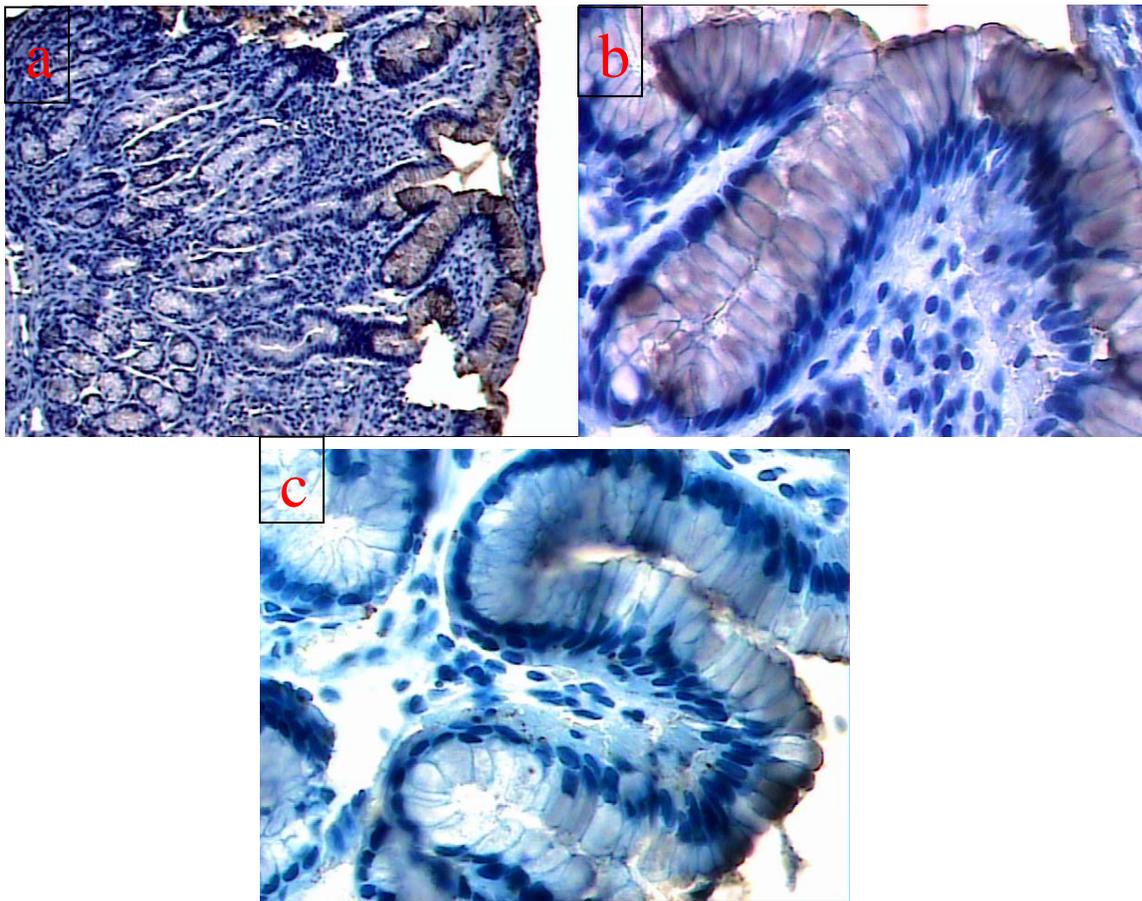


Figura 8. Determinación de IL8 por inmunohistoquímica en una biopsia de antro de una niña infectada con *H. pylori*. a) Se observa que la localización de IL-8 es predominantemente en el epitelio y esta concentración va disminuyendo hacia el interior del tejido, (10X), b) Detalle de la misma biopsia donde se observa que la reacción para IL-8 se localiza prácticamente en todo el citoplasma de las células epiteliales y particularmente en el extremo que da hacia la luz del

epitelio gástrico (40X).c). Biopsia de antro de un niño sin infección con *H. pylori*, se observa una ligera marca de IL-8.

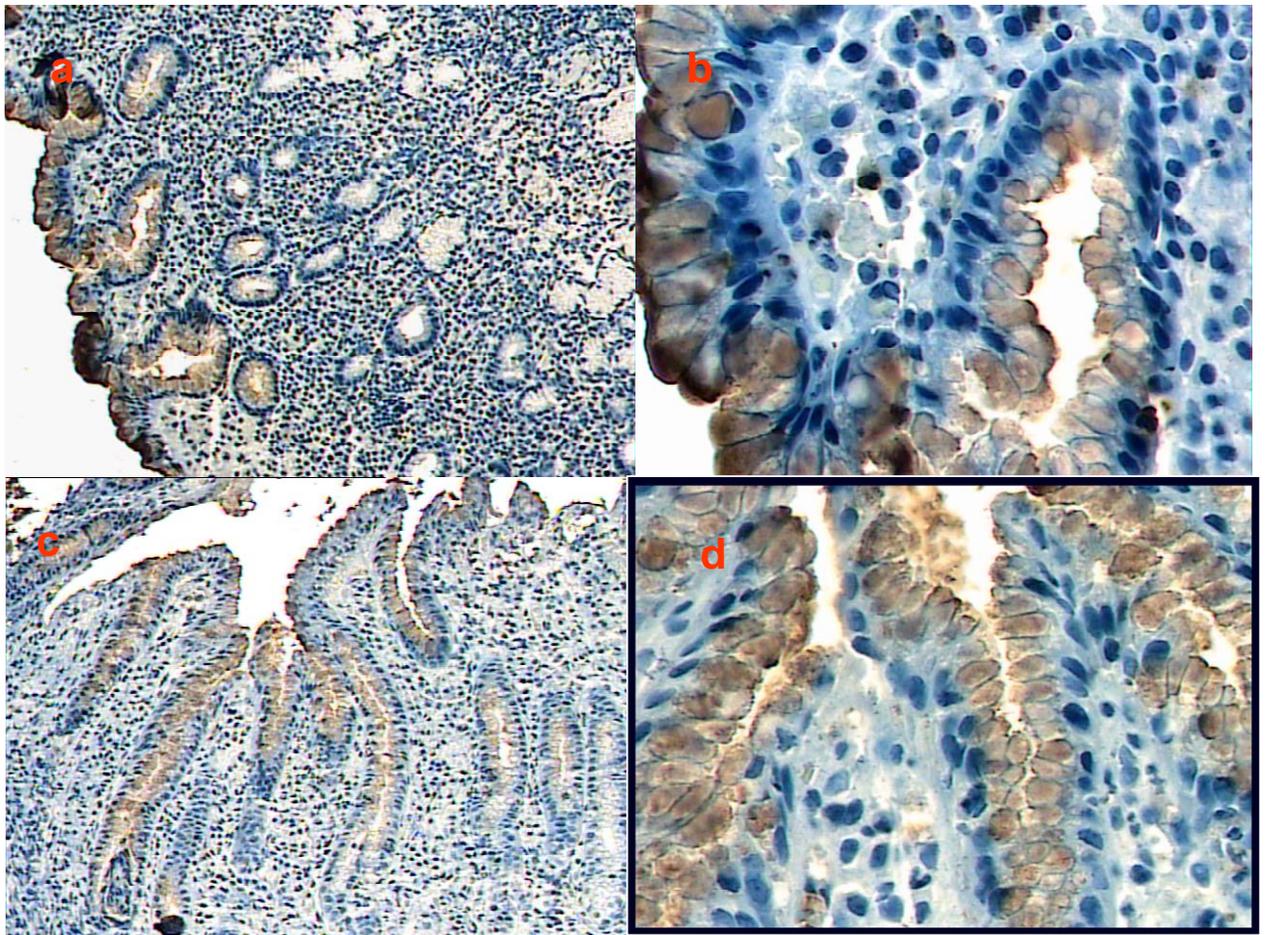


Figura 9. Determinación de IL-8 en biopsias de adultos infectados. a) y b) paciente con gastritis crónica, se observa la presencia de IL-8 (marcada con peroxidasa en color café) en el epitelio, además se puede observar un infiltrado denso de mononucleares y la presencia normal de

glándulas de la mucosa (objetivo 10X y 40X), c y d) Biopsia de paciente con úlcera duodenal, donde se observa la presencia de IL-8, así como un infiltrado de mononucleares, atrofia de las glándulas y cambio en la morfología de las células epiteliales por regeneración celular (objetivo 10X y 40X).

7.5.1.2 Evaluación histopatológica en biopsias de niños

En la tabla 7, se muestran las características de la infiltración celular analizadas de acuerdo al sistema Sydney (Figura 5) en las biopsias gástricas de los niños infectados y no infectados. El grado de cronicidad e inflamación está dado por el infiltrado mononuclear y la actividad de la gastritis por el infiltrado de neutrófilos.

En relación a la infiltración mononuclear (inflamación), se observó infiltración leve en la mayoría de los niños sin infección (92%) y en la mitad de los niños infectados (52%) con *H. pylori*. Estas observaciones fueron semejantes en biopsias de antro y cuerpo gástricos.

En los niños sin infección, no hubo infiltración con neutrofilos y eosinofilos en biopsias de antro, mientras que en cuerpo la infiltración con ambas estirpes celulares fue leve.

Los niños infectados con *H. pylori* no presentaron la presencia de neutrófilos en el antro y cuerpo en 43% de los casos. En el resto de los niños, las biopsias de antro mostraron infiltración leve o moderada-severa de neutrófilos en 24% y 33% de los casos respectivamente. En biopsias de cuerpo se observó infiltración leve en el 50% de las muestras, mientras que presentaron infiltración moderada-severa solo un 10% de los casos.

Tabla 7. Evaluación de la inflamación gástrica en el antro y cuerpo de niños infectados y sin infección con *H. pylori*

	Antro, No (%)		Cuerpo, No (%)	
	<i>H.pylori</i> ⁺	<i>H.pylori</i> ⁻	<i>H.pylori</i> ⁺	<i>H.pylori</i> ⁻
Mononucleares				
Normal	0	1 (4)	0	1 (4)
Leve	11 (52)	22 (92)	10 (48)	22 (92)
Moderado-severo	10 (48)	1 (4)	11 (52)	1 (4)
Neutrófilos				
Normal	9 (43) ^a	23 (96) ^a	9 (40) ^a	23 (96) ^a
Leve	5 (24)	1 (4)	10 (50)	1 (4)
Moderado-severo	7 (33)	0 (0)	2 (10)	0 (0)
Eosinófilos				
Normal	6 (29)	0 (75)	5 (24) ^a	19 (79) ^a
Leve	14 (67)	1 (25)	16 (76)	5 (21)
Moderado-severo	1 (5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

^aP<0.001. Infectados vs sin infección. Determinado por prueba exacta de Fisher

7.5.1.3 Evaluación histopatológica en biopsias de antro y cuerpo de adultos

En los adultos con DNU, se observó infiltración mononuclear moderada o severa en más de la mitad de los casos (Tabla 8). Los adultos con úlcera duodenal mostraron en cerca del 70% de los casos la presencia severa de células mononucleares en el antro gástrico. Los casos de úlcera gástrica mostraron infiltración mononuclear severa en antro en el 50% de los casos.

La presencia de neutrófilos en los adultos con DNU fue moderada en el antro del 50% de los casos y leve a moderada en el cuerpo de más del 70 % de los casos. En el antro de los pacientes con UD se observó infiltración con neutrófilos severa en la mitad de las biopsias de antro, a diferencia de lo observado en las biopsias de cuerpo de los pacientes con UD o con UG en las que la infiltración con neutrófilos fue leve en más del 50% de las biopsias.

Al comparar a los niños infectados con los adultos con DNU el grado de inflamación fue mayor en los adultos únicamente en la región del antro ($p < 0.01$) y el infiltrado de neutrófilos fue mayor en los adultos sólo en la región del cuerpo ($p > 0.05$).

Tabla 8. Evaluación de la inflamación gástrica en biopsias de adultos con enfermedad gastroduodenal.

	Antro, No (%)			Cuerpo, No (%)		
	DNU n=15	UD n=15	UG n=14	DNU n=15	UD n=14	UG n=12
Cèlulas Mononucleares						
Normal	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Leve	0 (0)	0 (0)	1 (7)	3 (20)	5 (36)	5 (42)
Moderada	7 (47)	5 (33.3)	6 (43)	10 (67)	7 (50)	4 (33)
Severa	8 (53)	10 (66.6)	7 (50)	2 (14)	2 (14)	3 (25)
Neutrófilos						
Normal	1 (7)	0 (0)	2 (14)	2 (14)	2 (14)	1 (8)
Leve	3 (20)	4 (27)	2 (14)	7 (47)	8 (57)	7 (58)
Moderado	8 (53)	3 (20)	5 (36)	5 (33)	2 (14)	2 (17)
Severo	3 (20)	8 (53)	5 (36)	1 (7)	2 (14)	2 (17)

Dispepsia no ulcerosa (DNU), úlcera duodenal (UD), úlcera gástrica (UG)

7.5.1.4 Correlación entre severidad de inflamación y otras variables en niños infectados

En la tabla 9, se presenta la relación entre la severidad de la infiltración mononuclear con la respuesta de IL-8, la intensidad de colonización y los niveles de anticuerpos IgG anti-*H. pylori* y anti-CagA en muestras de niños infectados con *H. pylori*.

En el antro, los niveles de IL-8 fueron mayores en niños con infiltración mononuclear y de neutrófilos severa, mientras que en el cuerpo la respuesta de IL-8 fue más alta en los casos con infiltración mayor de neutrófilos, aunque estas diferencias no fueron significativas. Adicionalmente se observó que en el antro la intensidad de la colonización estuvo asociada significativamente con mayor severidad de la infiltración

mononuclear, de neutrófilos y con más altos niveles séricos de IgG, aunque esto no fue estadísticamente significativo. Hubo mayor respuesta sérica de IgG a CagA en niños con infiltración de neutrofilos severa en antro y cuerpo que sin neutrofilos o con infiltración leve.

7.5.1.5 Correlación entre severidad de inflamación y otras variables en adultos con enfermedad gastroduodenal

En las tablas 10, 11 y 12 se muestra la relación entre severidad de infiltración mononuclear y de neutrófilos con respuesta de IL-8, intensidad de colonización, niveles de IgG anti-*H. pylori* y anti CagA en adultos con DNU, UD y UG respectivamente.

Los adultos con DNU (tabla 10) que presentaron infiltración mononuclear moderada-severa en cuerpo mostraron intensidad de IL-8 y colonización similares a las demostradas en los adultos con infiltración leve. Sin embargo, si se observaron diferencias en los niveles séricos de IgG y respuesta sérica de IgG a CagA. Los casos con mayor infiltración mononuclear presentaron mayores niveles séricos de IgG, y mas casos con serología de IgG a CagA positivos, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

La infiltración moderada-severa con neutrófilos, correlacionó con mayor intensidad de IL-8, mayores niveles de IgG y de respuesta a CagA en antro, pero no se encontró significancia estadística. En antro, los resultados entre los diferentes niveles de infiltración fueron similares.

En la tabla 10, se observa, que en cuerpo, tanto en infiltración mononuclear leve como en moderada-severa resultados similares en intensidad de IL-8, hay un incremento en intensidad de colonización y niveles séricos de IgG contra extracto total de *H. pylori*, en pero esto no fue estadísticamente significativo. En infiltración de neutrófilos de antro, la intensidad de IL-8 es mayor, pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, posiblemente por las diferencias en el número de casos. En el cuerpo, la única diferencia importante fueron mayores niveles séricos de IgG contra *H. pylori* en infiltración severa comparada con infiltración normal o leve.

Los pacientes con UG, e infiltración mononuclear leve (tabla 12), manifestaron resultados de correlación con IL-8 e intensidad de colonización similares a los obtenidos con los pacientes con infiltración moderada-severa.

Los casos con infiltración de neutrófilos normal o leve en antro, presentaron diferencias en la respuesta de IL-8, notándose mayor respuesta con mayor infiltración pero esta diferencia no fue significativa. Asimismo en cuerpo, no se notó relación entre las variables estudiadas y la severidad de la infiltración.

Tabla 9. Relación de respuesta de IL-8, intensidad de colonización, niveles de anticuerpos IgG contra *H. pylori*, y seropositividad a CagA, vs grado de infiltración mononuclear y de neutrófilos en niños infectados con *H. pylori*.

		Antro					Cuerpo				
	No.	IL-8 %/ μm^2 tejido	Intensidad De Colonización %/ μm^2 tejido	Niveles séricos de IgG	Respuesta sérica a CagA+/ No total de casos incluidos	No.	IL-8 %/ μm^2 tejido	Intensidad De Colonización %/ μm^2 tejido	Niveles séricos de IgG	Respuesta sérica a CagA+/ No total de casos incluidos	
Mononuclear											
Leve	11	4.2±3.6	0.06±0.09	1.7±1.3	5/9	10	7.9±4.6	0.23±0.6	2.5±2. 6	5/8	
Moderado-severo	10	6.1±3.9	0.55±0.52 ^a	3.2±2.6	7/9	11	5.3±4.9	0.27±0.6	2.3±1. 8	6/10	
Neutrófilos											
Normal	9	4.2±3.8	0.05±0.1	1.6±1.2	3/9	9	4.4±4.5	0.08±0.2	2.3±2. 6	3/7	
Moderado-severo	12	5.8±3.7	0.43±0.5 ^b	3.0±2.5	7/12	12	8.1±4.6 ^c	0.38±0.72	2.5±1. 9	8/11	

Tabla 10. Correlación de respuesta de IL-8, intensidad de colonización, niveles de anticuerpos IgG séricos contra *H. pylori*, y seropositividad a CagA vs grado de infiltración mononuclear y de neutrófilos en adultos con DNU infectados con *H. pylori*.

Antro				Cuerpo			
IL-8	Inten- sidad de colonización	N	Respuest a sérica	IL-8	Inten- sidad de Colonización	N	Respuest a sérica
%	De colonización %/ μm^2 tejido		a	%/ μm^2 tejido	De Colonización		a
			No				No
			total				total
			de		%/ μm^2 tejido		de
			casos				casos
			includ os				includ os

monuclear

Leve					2.5	0.1±	2	2/3
					±	0.		
					2	1		
					.			
					8			
Moderado-severo	2.	0.12	3	10/15	3.3	0.22	4	8/11
	:	±			±	±		
	:	0.			2	0.		
	:	2			.	3		

utrófilos

Normal	1.	0.11	0	0/1	0.7	0.02	3	0/2
	!				1	±		
					±	0.		
					0	0		
					.	0		
					6	3		
Leve	0.	0.28	3	2/3	3.3	0.19	2	5/7
	!	±			±	±		
	:	0.			1	0.		
	(4			.	3		
	.				9			
	!							
Moderado-severo	3.	0.06	4	7/12	3.7	0.23	5	4/6
	(±			±	±		

:	0.	3	0.
:	0	.	2
.	7	0	0
:			

a, p=0.025 leve vs.moderado-severo; b,p=0.026 normal vs moderado-severo; p=0.08 normal vs. moderado-severo.

Tabla 11. Correlación de respuesta de IL-8, intensidad de colonización, niveles de anticuerpos IgG séricos contra *H. pylori*, seropositividad a CagA vs grado de infiltración mononuclear y de neutrófilos en adultos con UD infectados con *H. pylori*.

Antro				Cuerpo			
IL-8	Intensidad de Colonización	Niveles de anticuerpos IgG séricos	Respuesta	IL-8	Intensidad de Colonización	Niveles de anticuerpos IgG séricos	Respuesta
%/μm ² tejido	%/μm ² tejido	%/μm ² tejido	Mononuclear	%/μm ² tejido	%/μm ² tejido	%/μm ² tejido	Mononuclear
			Neutrófilos				Neutrófilos
			CagA				CagA
			IL-8				IL-8
			Intensidad de Colonización				Intensidad de Colonización
			Niveles de anticuerpos IgG séricos				Niveles de anticuerpos IgG séricos
			Respuesta				Respuesta

c
a
s
o
s
in
cl
ui
d
o
s

nonuclear

Leve					7.5±	0.009±	4.	4/5
					3	0.		
					.	00		
					0	1		
Moderado-severo	10	0.03±0	3.	12/15	10.0	0.022±	3.	8/9
	.	.1			±	0.		
	(5	02		
	:				.			
	(0			
	.							
	:							

itrófilos

Normal

7.7±

0.003±

3.

2/2

2

0.

.

00

5

4

Leve

8.

0.004±

4.

2/3

8.3±

0.016±

4.

6/7

0.

;

4

0.

00

;

.

02

3

;

3

(

Moderado-severo

10

0.04±0

3.

10/11

11.7

0.023±

3.

4/4

.0

;

±

0.

1

;

5

02

;

.

.

0

(

Tabla 12. Correlación de respuesta de IL-8, intensidad de colonización, niveles séricos de IgG, seropositividad a CagA vs grado de infiltración mononuclear y de neutrófilos en adultos con UG infectados con *H. pylori*.

Antro					Cuerpo				
N	IL-8 %/μm ² tejido	Intensidad De Colonización %/μm ² tejido	Niveles séricos de IgG	Respon- sividad a CagA / Not total- mente de- casi- os	N	IL-8 %/μm ² tejido	Intensidad De Colonización %/μm ² tejido	Niveles séricos de IgG	Respon- sividad a CagA / Not total- mente de- casi- os

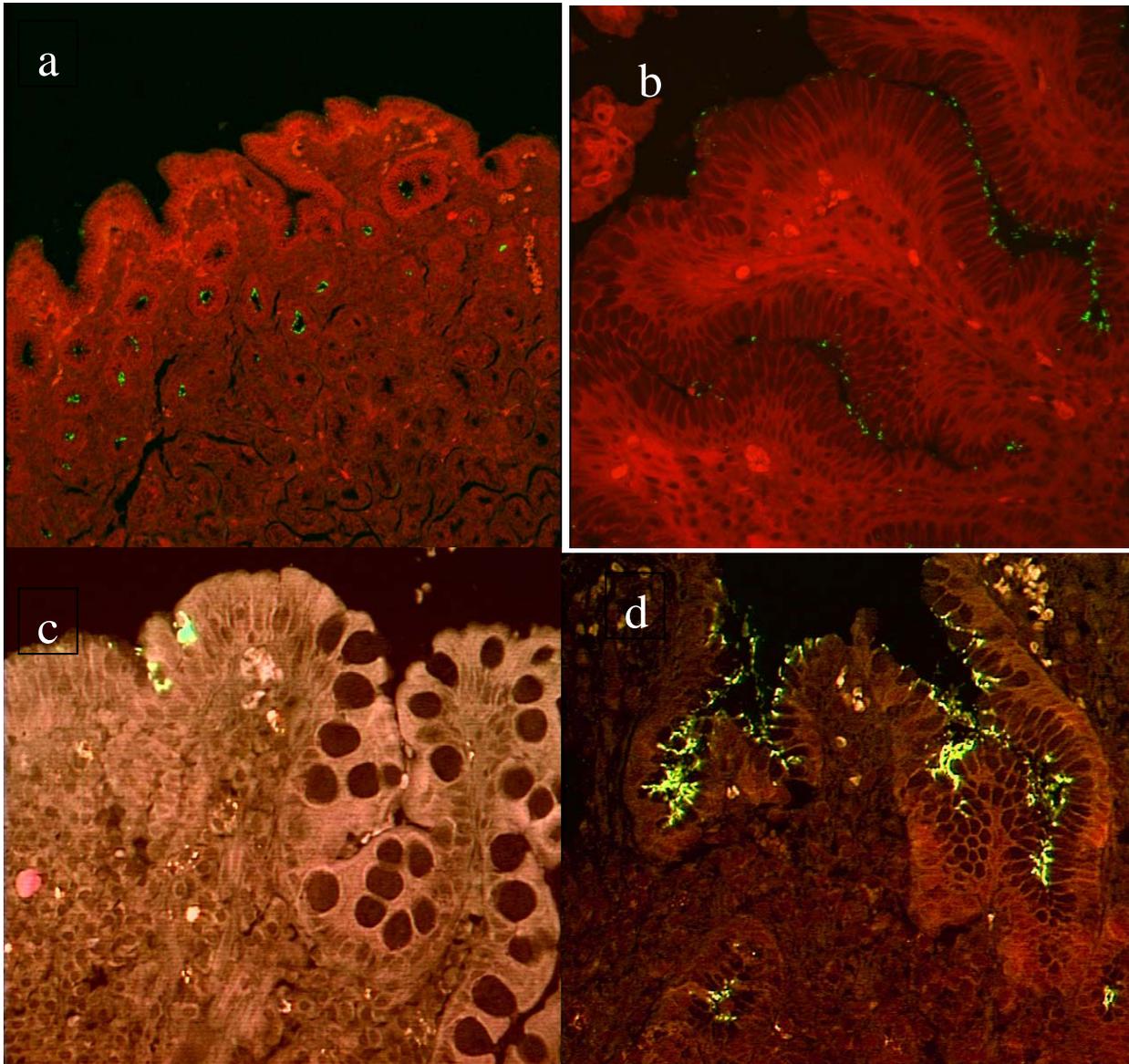


Figura 10. Colonización del epitelio gástrico con *H. pylori*. Tinción de inmunofluorescencia para *H. pylori*, marcado con FITC. (a) Glándulas gástricas (b) epitelio gástrico (c) se observa la presencia de metaplasia y colonización con *H. pylori* en una zona libre de metaplasia. (d) Se la presencia abundante de *H. pylori* (marcado con FITC) en el epitelio gástrico. Fotografías tomadas en el microscopio confocal, de biopsias de pacientes incluidos en esta tesis.

7.5.2 Evaluación de los niveles de citocinas en sobrenadantes de biopsias.

7.5.2.1 Niveles de citocinas.

Los niveles de citocinas en antro gástrico de niños y adultos se muestran en la tabla 12. Entre los niños la presencia de *H. pylori* estuvo asociada con niveles significativamente más altos de IL-8 e IL-10, comparados con los niños negativos a *H. pylori*. Los niveles de IL-8, IL-12, IFN γ , IL10 e IL-4 fueron significativamente más altos en niños que en adultos ($p < 0.01$). Entre los adultos, los pacientes con UD tuvieron niveles significativamente más altos de IL-8, IL-12, IFN γ e IL-4, que los pacientes con DNU ($p < 0.05$). En contraste, los niveles de IL-10 fueron más bajos en los pacientes con UD que en los pacientes con DNU ($p < 0.05$).

Adicionalmente, se buscó la relación entre los niveles de citocinas y el grado de inflamación, pero no se demostró que existiese una asociación significativa entre estas variables.

En los niños infectados, la presencia de *H. pylori* estimuló la inducción de IL8, comprobado *in situ* y en los sobrenadantes de las biopsias por ELISA.

Los adultos con UD, mostraron mayores niveles de IL-8 que con DNU, también se comprobó este resultado *in situ* y en sobrenadantes de las biopsias por ELISA.

Tabla 13. Niveles de citocinas en mucosa gástrica de niños y adultos con enfermedad gastroduodenal

Niveles de citocinas, mediana \pm ES (pg/ μ g de proteína)							
Grupo	Status	n	IL-8	IL-12	IFN γ	IL-10	IL-4
<i>H. pylori</i>							
Niños	DNU						
	<i>Hpylori</i> ⁺	30	17.5 \pm 3.1 ^{ab}	14.8 \pm 2.6	7.8 \pm 1.4	3.8 \pm 2.0 ^{ab}	5.0 \pm 0.7
	DNU						
	<i>Hpylori</i> ⁻	30	10.6 \pm 2.5	11.7 \pm 3.0	8.4 \pm 2.0	1.4 \pm 0.7	3.8 \pm 1.4
	Todos	60	14.0 \pm 2.0 ^d	12.9 \pm 2.0 ^d	8.3 \pm 1.2 ^d	2.3 \pm 1.1 ^d	4.7 \pm 0.76 ^d
Adultos	DNU						
		30	5.9 \pm 1.2 ^c	2.6 \pm 0.77 ^c	1.0 \pm 0.42 ^c	1.4 \pm 0.28 ^c	2.6 \pm 0.31 ^c
	UD						
		30	16.1 \pm 1.8	11.1 \pm 1.86	3.3 \pm 0.58	0.59 \pm 0.14	4.2 \pm 0.46
	Todos	60	9.5 \pm 1.2	4.1 \pm 1.1	1.8 \pm 0.4	0.99 \pm 0.16	3.4 \pm 0.3

Todos los adultos incluidos en el estudio estuvieron infectados con *H. pylori*

^a p<0.05; Niños *Hp*⁺ Vs *Hp*⁻

^b p<0.001; Niños *Hp*⁺ vs. Adultos DNU

^c p<0.05; Adultos DNU vs. UD

^d p<0.05; Todos los niños vs. Todos los adultos

7.5.2.2 Resultados histológicos de antro de los niños con DAC y adultos con gastritis y UD, con determinación de interleucinas en sobrenadante de la biopsia

La tabla 14, muestra el número y porcentaje de niños y adultos con los diferentes grados de infiltrado mononuclear, infiltrado de neutrófilos y presencia de folículos linfoides en antro gástrico. Una vez más, de forma semejante a los reportes histológicos de los niños en los que se estudio IL-8 *in situ*, la mayoría de los niños infectados con *H. pylori* presentaron una inflamación leve o moderada (87%). En contraste, todos los niños sin *H. pylori* presentaron una mucosa normal o con inflamación leve (100%, $p < 0.001$). De los niños infectados, el 54% mostró infiltrado leve de neutrófilos y 46% mostraron presencia de neutrófilos moderada-severa, mientras que el 100% de los niños *H. pylori* negativos no presentaron neutrófilos en sus biopsias. Los folículos linfoides se observaron en el 65% de los niños infectados con *H. pylori*, mientras que en los niños sin infección, se observaron sólo en el 12% de los casos ($p < 0.001$).

Todos los adultos incluidos en el estudio, fueron histológicamente positivos a la presencia de *H. pylori*. El grado de inflamación gástrica entre los adultos con DNU o con UD fue similar, cerca del 90% presentaron inflamación moderada-severa. Los pacientes con DNU mostraron menor presencia de neutrófilos que los pacientes con UD. De los adultos con DNU 53% presentaron actividad moderada y de los adultos con UD se observó en el 66.6% actividad o presencia de neutrófilos severa. Entre los adultos no se observaron diferencias importantes en la presencia de folículos linfoides (66.6 vs. 76.6%).

Cuando comparamos la intensidad de inflamación entre los niños *H. pylori*⁺ y los adultos con DNU, encontramos que hubo más adultos con inflamación severa que los niños, DNU (46%) vs niños infectados (14%, $p < 0.05$), la presencia de neutrófilos fue semejante entre niños infectados y adultos DNU. En contraste, los adultos con UD tuvieron mayor inflamación e infiltración de neutrófilos que los otros grupos.

Tabla 14. Evaluación de inflamación gástrica en el antro de niños y adultos con infección por *Helicobacter pylori*

	Niños con DNU		Adultos	
	<i>H pylori</i> ⁺ No (%)	<i>H pylori</i> ⁻ No (%)	DNU No(%)	DU No(%)
Mononucleares				
	No = 28	No = 30	No = 30	No = 30
Normal-leve	13 (46)	30 (100)	4 (13.3)	1 (3.3)
Moderado	11(39)	0	12 (40)	14 (46.6)
Severo	4 (14) ^a	0	14 (46) ^a	15 (50)
Neutrofilos				
	No = 28	No = 30	No = 30	No = 30
Normal-leve	15 (54)	30 (100)	8 (26.6)	6 (20)
Moderado	6 (21)	0	16 (53.3)	4 (13.3)
Severo	7 (25)	0	6 (20)	20 (66.6)
Folículos linfoides	16(57) ^b	3(11.5)	20(66.6)	23(76.6)

^ap < 0.05

^bp=0.005(niñosHp+ vs Hp-)

DNU= Dispepsia no ulcerosa, UD= Úlcera duodenal

8. DISCUSIÓN

La infección con *H. pylori* generalmente causa gastritis crónica no atrófica, en niños y adultos. Sin embargo, el tipo de enfermedad gastroduodenal asociada al bacilo en niños es diferente a la de los adultos. En niños sometidos a endoscopia, frecuentemente se encuentra nodularidad antral, rara vez se observa úlcera péptica y nunca se observa cáncer gástrico, mientras que en los adultos es poco frecuente la nodularidad antral y se puede observar con mayor frecuencia úlcera duodenal o gástrica y cáncer gástrico (Blaser y Atherton, 2004; Torres y cols, 2000). A la fecha no se comprenden en su totalidad los mecanismos que intervienen en los diferentes esquemas de enfermedad e histopatológicos entre niños y adultos en los estados tempranos y tardíos de la infección y el propósito de este trabajo es conocer más acerca de estos mecanismos y su modulación.

Para el diagnóstico invasivo de *H. pylori* es necesaria la realización de una endoscopia, la cual representa molestias y algunos riesgos para el paciente. El diagnóstico preciso de la presencia de *H. pylori* es un aspecto importante en el manejo de los pacientes con síntomas gastrointestinales y tiene relevancia no sólo en la determinación de la presencia de la bacteria, sino también la detección de los factores de virulencia. Dentro de los métodos no invasivos, la serología para detección de anticuerpos IgG contra antígenos de extracto total de la bacteria es una de las técnicas más empleadas disponiendo de ensayos inmunoenzimáticos como ELISA (*Enzyme-linked immunoabsorbent assay*) el cual es un procedimiento fácil, económico y ampliamente útil.

Existen en el mercado una gran variedad de pruebas de ELISA para el diagnóstico de la infección por *H. pylori*, que en su mayoría han sido evaluadas en países desarrollados. Estos ensayos comerciales frecuentemente son caros y varios estudios que han evaluado este tipo de pruebas indican que lo ideal es que deben ser realizados con antígeno de cepas locales para incrementar la sensibilidad del procedimiento (Hoang y cols, 2004)

La valoración de la sensibilidad y especificidad de la ELISA de IgG contra *H. pylori* son altamente variables, entre 30% a 100%. En esta variabilidad de los datos influyen principalmente la edad de la población estudiada y los antígenos empleados por lo que se sugiere que al usar una ELISA se valide previamente el método en la población que se va a evaluar (Taha y cols, 1993; Hoang y cols, 2004). Considerando estos antecedentes, al

iniciar este trabajo se validó la ELISA con cepas aisladas de pacientes mexicanos y con los sueros de la misma población.

En este estudio, se validó la prueba de ELISA con sueros de población pediátrica, usando tres antígenos diferentes de *H. pylori*: extracto total y los antígenos recombinantes CagA y ureasa. El extracto total de *H. pylori* utilizado en el ensayo fue preparado con una mezcla de tres cepas mexicanas, lo que ofrece ventajas en la ELISA validada, ya que se han reportado diferencias genotípicas y fenotípicas entre las cepas de *H. pylori* de diferentes poblaciones del mundo (Alm y Trust, 1999; Bodhidatta y cols, 1993).

La sensibilidad y especificidad de las ELISAs de este estudio fueron similares a las obtenidas en otros estudios con niños usando ensayos de ELISA comerciales con extracto total de *H. pylori* como antígeno (Crabtree y cols, 1993) y más bajas a las obtenidas con adultos (Kindermann y cols, 2001). Oliveira y colaboradores, en 1999, evaluaron la sensibilidad de ELISA para IgG de extracto total de *H. pylori* en el suero de 130 niños sometidos a endoscopia. Encontraron que la sensibilidad del ensayo fue 44.4% con sueros de niños de 2 a 6 años de edad, en niños de 7 a 11 años de edad fue de 76.7% y la sensibilidad se incrementó a 93% en el ensayo con el suero de niños de 12 a 16 años. Estos resultados apoyan que la sensibilidad del ELISA varía con la edad de los pacientes. En adultos se consiguen mejores resultados, como los obtenidos por Romero-Gallo y colaboradores en 2002, quienes informaron una sensibilidad y especificidad de 95% y 97% respectivamente. Las discrepancias de los resultados entre niños y adultos pueden deberse a diferencias en la respuesta inmune. Los niños más jóvenes tienen menos tiempo de infección, mostrando títulos más bajos de anticuerpos. Se ha demostrado que estas variaciones en el reconocimiento al antígeno se modifican con la edad observándose respuestas más homogéneas a mayor edad (Mitchell y cols, 1996).

De las 5 pruebas validadas en este estudio, la ELISA para IgG de extracto total y CagA fueron las que presentaron la mejor sensibilidad y especificidad (Tabla 3). IgG sérica anti-CagA por su buena sensibilidad y especificidad podría ser buena prueba para detectar evidencia serológica de infección por *H. pylori*, junto con la ELISA para extracto total, aproximadamente el 60% de las cepas infectantes son CagA positivas. Por otra parte el ensayo con ureasa mostró una baja sensibilidad, asociada a una elevada especificidad. En la sensibilidad obtenida en los ensayos influyó el uso de cultivo e histología como estándar de oro; en los niños, sobre todo en los de menor edad, el cultivo tiene baja

sensibilidad, porque la colonización con el bacilo es pobre, también es importante considerar el tiempo de infección, que en el caso de la población pediátrica es corto para generar una respuesta inmune a la ureasa. Se sabe que hay transferencia placentaria de anticuerpos maternos de tipo IgG contra *H. pylori*, que disminuyen después del año de edad (Blecker, 1994). Sin embargo, aun no se valora la transferencia placentaria de anticuerpos contra las proteínas CagA y Ureasa.

DAR es un problema infantil que ocasiona visitas frecuentes al pediatra, la causa orgánica se conoce sólo en el 10% de los casos (Ozen y cols, 2001). Algunos estudios han reportado una asociación entre *H. pylori* y DAR (Chong y cols, 1995; Ozen y cols, 2001), mientras que otros no encuentran esta correlación (Macarthur y cols, 1995).

En este estudio, cuando comparamos la frecuencia de infección por *H. pylori* entre niños con DAR y niños sanos, de la misma población, con edad y nivel socioeconómico similares, los niños con DAR mostraron una frecuencia de infección de 65% vs 48% en niños sanos, esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p= 0.009$), por lo que en los niños con DAR parece haber asociación con la presencia de *H. pylori*. Esto es similar a lo reportado en otros estudios, donde han descrito que la prevalencia de *H. pylori* reportada en niños con DAR alcanza hasta un 81% (Macarthur y cols, 1995). Así como, las publicadas con niños de otros países en vías de desarrollo como en Turquía que informaron de prevalencias de 60.3% en niños con DAR infectados y 20.8% en los niños sin infección (Ozen y cols, 2001).

Los resultados de diversos trabajos y el presente estudio apoyan la asociación entre infección por *H. pylori* y DAR basados en el hecho de que la sintomatología se resuelve después del tratamiento (Chong y cols, 1995). Otros autores no han encontrado asociación entre DAR e infección con *H. pylori* (Hardikar y cols, 1996; van der Meer SB y cols, 1992). Se desconoce si los niños con DAR e infección con *H. pylori* representan una entidad clínica diferente a la de niños con DAR pero sin infección con el bacilo. Hacen falta otros estudios para aclarar la asociación de DAR con infección por *H. pylori* en niños.

La frecuencia de respuesta IgG a extracto total de *H. pylori* entre 2 grupos de niños con DAR (Tablas 5 y 6) que fueron examinados con cuatro años de diferencia, presentan discrepancias entre ambos grupos, estas pueden deberse a que cuando se realizó el análisis de los sueros con mayor número de niños (tabla 6), estos ya habían recibido tratamiento de erradicación, antes de incluirse en el estudio pero permanecían

sintomáticos; en niños mexicanos con síntomas gastrointestinales es común la inflamación del estómago y el duodeno (Yáñez y cols, 2001). O bien otra posibilidad es que la incidencia de infección con *H pylori* esté disminuyendo en nuestra población, como ha ocurrido en otros países (Pérez-Pérez, 2002) pero para confirmar esto requeriríamos de nuevos estudios.

La importancia de determinar la presencia de infección por *H pylori* en estos niños con DAR y sobre todo aquellos infectados con cepas *cagA+*, radica en el hecho que si se adquiere la infección en la niñez y no es tratada, la infección permanece como una infección crónica en la mucosa gástrica durante toda la vida, este niño en la edad adulta dependiendo de la cepa infectante y de las características genéticas del hospedero puede llegar a desarrollar alguna enfermedad gastroduodenal severa como úlcera duodenal, gástrica o cáncer.

La proteína CagA de *H. pylori* es un antígeno inmunodominante, la seropositividad a este antígeno permanece mientras la colonización con *H pylori* persista y aún después de la erradicación de la bacteria. El diagnóstico de la infección con cepas de *H. pylori*, CagA positivas se basa en la detección del gen en las bacterias aisladas o la presencia de anticuerpos séricos tipo IgG contra la proteína CagA. Los ensayos con suero son mas sensibles para la detección de cepas *cagA+* que la detección del gen en los aislados, porque los pacientes pueden estar infectados con múltiples cepas (Cover y cols, 1995; Yahav y cols, 2000).

Varios autores han establecido la relación entre la presencia de cepas de *H pylori cagA+* con inflamación más severa de la mucosa gástrica que con las cepas *cagA-*. Además, la presencia de cepas *cagA+* está asociada con mayor riesgo de padecer úlcera péptica, gastritis atrófica y cáncer gástrico (Cover y cols, 1995; Peek y cols, 2004).

Diferentes trabajos han reportado una alta correlación entre los genotipos de *H. pylori* y la respuesta inmune del hospedero contra las proteínas relacionadas con la virulencia de la bacteria, por ejemplo Garza-González y cols, 2002 encontraron una buena correlación entre la detección del gen *cagA* y la detección de anticuerpos anti-CagA por la técnica de ELISA, (Kappa 0.680, IC 95% 0.403-0.756) por lo que un resultado positivo experimentalmente confirmó la infección con cepas de *H. pylori cagA+* . (Garza-González, 2002). En niños existen pocos estudios y no ha sido posible confirmar esta relación. Sin embargo, Kolho y cols, 1999 encontraron en un grupo de niños con DAR, infectados con

H. pylori, que la presencia de IgG e IgA sérica anti-CagA se asociaba a mayor inflamación que los niños sin anticuerpos contra CagA.

En nuestro trabajo, estudiamos niños con DAR y apareamos por edad con niños asintomáticos, y fue inesperado encontrar que los niños asintomáticos tuvieron una respuesta sérica de IgA e IgG a CagA significativamente más alta que los niños con DAR. Igualmente, la magnitud de la respuesta sérica de IgA e IgG a CagA fue significativamente más alta en los controles asintomáticos que en los niños con DAR. Datos publicados sobre población pediátrica han estimado la prevalencia de cepas cagA positivas o anticuerpos en suero anti-CagA en niños sintomáticos entre 33 a 80% (Alarcón, 2000; González, 2001). Otros trabajos, de forma semejante a lo encontrado en nuestro estudio, describen una alta prevalencia de anticuerpos séricos tipo IgG anti-CagA en niños asintomáticos, Kato y cols, 2000, informaron de 80.5% de prevalencia de anticuerpos en niños asintomático.

En los niños la respuesta humoral inicial es a antígenos de bajo peso molecular y los niños con DAR podrían estar en la fase temprana de la infección y aun no presentan respuesta a los antígenos de mayor peso molecular como CagA. Estos resultados indican que en México muchos niños asintomáticos (76%) están infectados con cepas de *H. pylori* cagA+ y que cagA podría no ser un marcador de cepas virulentas en México, pero es conveniente considerar que la enfermedad es crónica y que la enfermedad podría manifestarse en la edad adulta. Asimismo, la adquisición de *H. pylori* en la niñez es uno de los factores principales de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico (Bedoya y cols, 2003)

A pesar de que se conocen las manifestaciones clínicas de la fase crónica o tardía de la infección por *H. pylori*, se tiene escasa e inconsistente información de la respuesta inmune humoral en las fases tempranas y especialmente en la fase aguda. El dolor abdominal puede ser un síntoma de la fase aguda de la infección con *H. pylori*, por lo que los niños con DAR pueden representar la fase aguda de la infección.

En uno de los pocos trabajos que se han publicado sobre la fase aguda de la infección con *H. pylori*, Mitchell y colaboradores, 1996, estudiaron transmisión intrafamiliar de *H. pylori*. Este estudio con solo dos casos, es un ejemplo de lo que ocurre en el inicio de la infección. El investigador reportó una respuesta de IgM en niños y padres. El caso reportado fue el de un niño con presencia de vómito y dolor abdominal repentino. El hermano gemelo se diagnosticó 9 días más tarde, por histología. Posteriormente se probó con RAPD que los gemelos, estaban infectados con la misma cepa de *H. pylori*. Los niños mostraron

seroconversión al antígeno CagA en dos diferentes tiempos, uno de los gemelos respondió al antígeno CagA en el día 63 y el otro en el día 857, lo que nos habla de variabilidad en la respuesta inmune entre los dos niños.

En esta tesis, cuando analizamos la magnitud de respuesta sérica a CagA, en relación con la edad (Figura 6), encontramos que la magnitud de respuesta serológica a CagA más alta fue la observada en niños. Esta respuesta disminuyó con la edad, y los adultos mayores de 70 años expresaron la menor magnitud de respuesta de IgG sérica a CagA.

Se sabe que los niveles de anticuerpos observados, reflejan la intensidad de la interacción entre la población de *H. pylori* y las células de la mucosa gástrica, ya que las cepas cagA+ están en contacto más íntimo con el epitelio que las cepas cagA-, ubicándose en la vecindad inmediata de las células epiteliales o en los espacios intercelulares (Camorlinga y cols, 2004).

A lo largo de décadas de infección y como un proceso lento, la densidad de *H. pylori* va disminuyendo, a consecuencia de los cambios que va sufriendo la mucosa infectada y esto se refleja en la disminución de la magnitud de IgG sérica anti-CagA con la edad (Karrnes y cols, 1991), o bien, podría reflejar una selección de cepas con un sistema de secreción tipo IV incompleto (Odenbreit y cols, 2000). Resultados similares a los nuestros fueron observados en un trabajo realizado con adultos de la India, los autores estudiaron individuos de 30 a más de 50 años de edad y encontraron que los títulos de anticuerpos contra CagA fueron menores en los individuos de mayor edad. (Romero-Gallo y cols, 2002).

La ureasa fue el otro antígeno estudiado. Es una de las proteínas más abundantes de *H. pylori*, corresponde a más del 6% de la proteína soluble total de la bacteria, y está localizada en la superficie bacteriana. Por su función en la colonización y en la patogénesis de la infección ha sido una proteína ampliamente investigada como un antígeno potencial para el desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas contra la infección por *H. pylori* (Del Giudice y cols, 2001). Hasta ahora algunos estudios han documentado la respuesta humoral contra este antígeno en modelo animal y pocos estudios se han realizado para estudiar la respuesta inmune a ureasa durante la infección natural en adultos y niños. En el presente estudio, encontramos que tanto niños con DAR como niños sanos mostraron una respuesta sérica pobre de IgG e IgA séricas a ureasa. La respuesta más baja fue en niños menores de 10 años. Esta respuesta se incrementó con la edad, advirtiéndose los niveles más altos en los adultos mayores de 60 años. No obstante, sólo el 60% de los adultos desarrollaron anticuerpos séricos tipo IgG anti-ureasa.

En los estudios con modelos animales los resultados obtenidos inoculando ratones con ureasa han sido prometedores, aunque para inmunizar los ratones se usaron junto con la enzima adyuvantes, lográndose protección en el 60 a 100% de los animales, dependiendo de la cepa de ratón y el adyuvante empleado. Estos resultados fueron parcialmente apoyados con estudios en monos Rhesus, ya que los monos inmunizados con ureasa no fueron protegidos totalmente. Los resultados en monos y los obtenidos en nuestro estudio nos sugieren que la ureasa se comporta como un inmunógeno pobre, ya que sólo el 59% de los adultos mostraron respuesta a este antígeno (Solnick y cols, 2004).

En estudios con humanos se han obtenido resultados promisorios usando ureasa como antígeno pero también se ha requerido de la administración de adyuvantes, como la toxina termolábil de *E. coli* ó *S. enterica serovar typhimurium*, para tener una buena respuesta sérica inmune de tipo IgA. (Prinz y cols, 2003).

El incremento en la respuesta inmune a ureasa, al aumentar la edad nos indica que se requieren décadas de infección natural para desarrollar una respuesta humoral importante, por lo que el uso de este antígeno en vacunas para prevenir infección por *H. pylori* requerirá de la adición de adyuvantes o de otros antígenos para mejorar la respuesta inmune en el hospedero.

En el análisis histopatológico de la mucosa gástrica se ha observado que la gastritis asociada a *H. pylori*, está caracterizada por infiltración de la mucosa con células inflamatorias. La migración y activación de estas células está asociada a la expresión de citocinas. Los mecanismos involucrados en la inflamación de la mucosa gastroduodenal, la producción de citocinas y la respuesta inflamatoria, dependen del tiempo de infección con *H. pylori*. Por lo tanto, las manifestaciones clínicas y los cambios histopatológicos de la mucosa difieren de manera importante entre niños y adultos infectados con *H. pylori* (Drumm y cols, 2000). A pesar de que se conoce que la infección inicia en la niñez, existen pocos estudios enfocados a estudiar la respuesta inflamatoria en esta edad, así como su relación con intensidad de colonización y con cepas *H. pylori* cagA+.

Las biopsias gástricas de los adultos infectados con *H. pylori* muestran un incremento de células de inflamación aguda (neutrófilos) y crónica (células plasmáticas, eosinófilos y linfocitos) en lámina propia. Los adultos pueden presentar, úlceras, depleción del moco, atrofia y metaplasia intestinal, en cambio los niños rara vez presentan metaplasia intestinal o atrofia (Whitney y cols, 2000).

En este trabajo, observamos que la gran mayoría (90%) de los niños no infectados presentaron inflamación leve. Los niños incluidos en el estudio tienen DAR, por este motivo se les realizó endoscopia, por lo tanto fue difícil encontrar biopsias de mucosa gástrica sin inflamación.

En los niños infectados, la inflamación estuvo asociada a una infiltración mononuclear leve en el 50% de los casos, el resto de los niños mostró una inflamación de moderada a severa. Mientras que los adultos estudiados mostraron una infiltración mononuclear de moderada a severa en la mayoría de los casos. En los adultos no pudimos tener biopsias de pacientes sin infección con *H. pylori*, debido a que no sería ético realizar endoscopia en personas asintomáticas.

Observamos que los adultos, más que los niños, tienden a desarrollar infiltración de neutrófilos en respuesta a la infección con *H. pylori*. Los polimorfonucleares son células que se observan en la fase inicial del proceso inflamatorio gástrico en voluntarios en los que se indujo la infección con *H. pylori*, por lo que no es raro observarlos en los niños que tienen poco tiempo de infección con el bacilo, pero en este trabajo los observamos con más frecuencia en los adultos, aunque a diferencia de otros estudios en nuestra población la infiltración con neutrófilos es leve o moderada. (Meining y cols, 1996; Whitney y cols, 2000).

Tampoco observamos en la mucosa gástrica de los niños positivos a *H. pylori* la presencia de lesiones pre-cancerosas como atrofia o metaplasia como ha sido reportado en otros estudios de población pediátrica (Meining y cols, 1996; Guarner y cols, 2004). En cambio, en algunas biopsias de adultos, se observaron atrofia y metaplasia leves, estos cambios se consideran lesiones pre-neoplásicas y se atribuyen a la presencia crónica de *H. pylori* en el estómago (Correa y cols, 1991)

La presencia de folículos linfoides mostró una diferencia estadísticamente significativa entre los niños infectados y los no infectados lo que sugiere que la hiperplasia linfoide es una respuesta a la infección con *H. pylori* en este grupo de edad. Entre los adultos con DNU y UD encontramos que la presencia de folículos linfoides fue similar en ambos grupos. Estos hallazgos coinciden con lo reportado en estudios previos (Krauss-Etschmann y cols, 2005).

En general, podemos decir que en nuestra población los niños infectados mostraron inflamación leve y presencia pobre de neutrófilos, con la evolución de la infección la

respuesta inflamatoria persistente y es más severa como pudimos confirmar en los resultados obtenidos con los adultos, quienes presentaron, inflamación moderada o severa. Hay estudios como el de Meining y colaboradores, que reportaron que el 80% de los niños tenían inflamación y presencia de neutrofilos moderada o severa. Ellos concluyeron que la gastritis era más severa y activa en la niñez. Estas diferencias entre sus resultados y los nuestros pueden deberse a diferencias entre las poblaciones estudiadas, a los criterios de análisis histológicos empleados o al tipo de cepa infectante. Para estudiar la evolución de la inflamación desde el inicio hasta la edad adulta sería necesario realizar un estudio prospectivo a largo plazo, sin que los individuos infectados recibieran ningún tratamiento aún cuando lo requiriesen, lo cual no sería factible ni ético.

Otro aspecto importante que se debe considerar es que México es un país con riesgo moderado de cáncer gástrico y de acuerdo a lo publicado por Bedoya y cols, en 2003, la población infantil de países con alto riesgo de cáncer gástrico como Colombia muestran mayor severidad en la infiltración con PMN y linfocitos que los niños de zonas de bajo riesgo de cáncer, por lo que nuestros resultados en niños son más comparables a los de países con bajo riesgo de cáncer que de alto riesgo.

La presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica se comprobó con inmunofluorescencia, el bacilo mostró una distribución irregular en el epitelio gástrico (Figura 10), similar a lo publicado en adultos donde se habla de una colonización heterogénea o en parches (Dunn y cols, 1997). La bacteria se observó adherida a la superficie de las células epiteliales o en el moco que cubre el epitelio, también se advirtió en la luz de las glándulas hacia la lámina propia, de tal forma que encontramos zonas con alta densidad bacteriana y áreas libres de la bacteria. Esta observación fue similar en biopsias de niños y de adultos. En las zonas de las biopsias de adultos con metaplasia intestinal o atrofia no se apreció colonización con el bacilo.

Cuando comparamos el grado de colonización entre niños y adultos no obtuvimos diferencias importantes, en ambos grupos hay biopsias con abundante colonización y otras con escasa presencia del bacilo. Las biopsias de los niños mostraron mayor colonización en el antro que en el cuerpo, sin embargo, esto no fue significativo ($p > 0.2$). Tampoco encontramos diferencias significativas en el grado de colonización con *H. pylori* entre los adultos estudiados (DNU y UD). En todos los pacientes la presencia de *H. pylori* en el estómago estuvo acompañada simultáneamente de inflamación.

En la búsqueda de respuestas sobre factores del hospedero que intervienen en la defensa del organismo frente a la bacteria, se ha estudiado el papel de IL-8, una quimiocina, que actúa como quimioattractante en la patogénesis de la gastritis induciendo la migración de PMN frente a la infección por *H. pylori*, IL-8 es producida por diferentes células como macrófagos, células T, fibroblastos y células epiteliales (Crabtree y cols, 1994). Pocos estudios (Guiraldes y cols, 2001; Shimisu, 2004) han determinado niveles de IL-8 en niños infectados con *H. pylori* y ninguno ha reportado la presencia *in situ* de IL-8 en biopsias de niños infectados y no infectados. Los niños se consideran un excelente modelo natural de la infección temprana con *H. pylori*, ellos generalmente no usan alcohol, drogas anti-inflamatorias o tabaco, los cambios tempranos en la mucosa gástrica infectada con *H. pylori* y en la inducción de respuesta inmune ocurren a esta edad y son pobremente conocidos.

En este trabajo, se evaluó en población pediátrica y en adultos la expresión de IL-8 *in situ* y en sobrenadantes de biopsias.

La expresión *in situ* de IL-8 en niños estuvo incrementada significativamente con la presencia de *H. pylori* ($p < 0.05$) y esta citoquina estaba localizada en el epitelio gástrico, apoyando lo reportado en adultos por Crabtree y cols, 1994.

Los niños sin infección, a pesar de no tener la presencia del bacilo mostraron niveles bajos de IL-8 (*in situ* y en sobrenadantes), esto sugiere una expresión constitutiva de IL-8 en la mucosa gástrica en ausencia de *H. pylori* que puede deberse a que los niños estudiados tienen un proceso inflamatorio. Los niños del estudio infectados y sin infección son sintomáticos con algún problema gastroduodenal, por este motivo fueron sometidos a endoscopia. Ya ha sido publicado anteriormente la presencia de IL-8 en epitelio de mucosa gástrica normal de adultos (Lindholm y cols, 1998).

Es interesante que los niños infectados (que presentaron niveles altos de IL-8), mostraron asociación con infiltración de neutrófilos y con infiltración mononuclear severa como ha sido observado en adultos (Ando y cols, 1996) o con niños (Shimizu y cols, 2004). Sin embargo, hubo 9 niños infectados sin infiltración con neutrófilos y con niveles más altos de IL-8 que los no infectados (4.2 ± 3.8 vs $2.08 \pm 2.2\%$ área teñida).

Los niños infectados presentaron niveles mayores de IL-10, esta citocina es reguladora de la inmunidad innata e interfiere con la producción de mediadores inflamatorios como IL-8 y

podría estar inhibiendo la atracción de neutrofilos en la mucosa gástrica (Mege y cols, 2006).

Respecto a los adultos, los pacientes con UD ó UG mostraron mayor expresión de IL-8 *in situ* comparado con adultos con DNU, esto es similar a lo reportado por Ando y cols en 1996 y por Lindholm y cols, 1998. Si bien, el primer autor determinó IL-8 por ELISA, Lindholm y cols lo determinaron por inmunohistoquímica como en este estudio.

Los niveles en suero de IgG contra extracto total de *H. pylori* estuvieron asociados con incremento en infiltración mononuclear y de neutrofilos en antro pero no en cuerpo, aunque esto no fue significativo.

En los adultos se ha reportado una correlación importante entre la infección con cepas *H. pylori* cagA⁺ con mayores niveles de IL-8 y mayor inflamación gástrica (Peek y cols, 1996). Nosotros observamos que entre los niños con mayor grado de inflamación hubo más seropositivos a CagA que entre los niños con inflamación leve. Sin embargo, a diferencia de los estudios con adultos, la seropositividad a CagA no estuvo asociada significativamente con inflamación en antro o cuerpo. Hay reportes en niños en los que asocian mayor inflamación con la presencia de cepas cagA⁺ (Queiroz DM, 2000), pero otros autores como nosotros no encuentran esta asociación (Mitchell y cols, 1999) Serían necesarios otros estudios con mayor número de pacientes para confirmar estos hallazgos. Queiroz y colaboradores en 2000, también reportaron que la mayoría de los niños infectados presentaban inflamación moderada o severa; en contraste en este trabajo casi el 50% de los niños presentaron infiltración mononuclear leve, y sin infiltración con neutrofilos, a pesar de ser seropositivos a CagA. Por lo tanto en la población de niños de este estudio, la infección con *H. pylori* esta asociada con una respuesta inflamatoria pobre, aun con la presencia de cepas cagA⁺. Los cambios de la mucosa gástrica en los niños representa la respuesta inflamatoria temprana comparada con la respuesta crónica de los adultos.

El incremento en la producción de citocinas pro-inflamatorias en gastritis asociada a *H. pylori* ha sido documentada en varios estudios ya publicados como el de Crabtree en 1991 y D'Elios en 1997. Crabtree reportó un incremento en los niveles de TNF α e IL-6 en adultos con gastritis e infectados con *H. pylori* comparando los niveles en controles no infectados. Resultados semejantes han sido publicados por otros autores como Noach en 1994, Peek en 1995 y Yamaoka en 1996. De estos trabajos con adultos se propuso que la

secreción de interleucinas pro-inflamatorias tales como $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IFN\gamma$, $IL-12$ e $IL-8$ son importantes en el proceso inflamatorio asociado a la infección con *H. pylori*.

En niños existen pocas publicaciones que hayan evaluado el perfil de citocinas asociado a la infección con *H. pylori*, pero ellas coinciden en que la infección induce la producción de citocinas pro-inflamatorias tipo Th1, que es similar a lo encontrado en adultos (Guiraldes, 2001; Kutukuler, 1997).

En este estudio encontramos que en los niños infectados, la presencia de *H. pylori* incrementó significativamente los niveles de $IL-8$ e $IL-10$, comparados con los niños no infectados. Mientras que entre los adultos con UD observamos incrementos en los niveles de $IL-8$, $IL-12$, $IFN\gamma$ e $IL-4$ comparados con adultos con DNU.

Los niños infectados presentaron niveles más altos de $IL-10$ que los niños no infectados. $IL-10$ es una citocina reguladora de la inmunidad innata e interfiere con la producción de mediadores inflamatorios como $IL-8$ o los producidos por macrófagos o neutrófilos (Mege y cols, 2006),

Los niños infectados, presentaron incremento en los niveles de $IL-10$, sugiriendo que la respuesta predominante en este grupo de edad es Th2. La liberación de $IL-10$ podría ser protectora, limitando el daño al tejido causado por otras citocinas asociadas a la inflamación. $IL-10$ es una importante citocina tipo Th2, anti-inflamatoria, que regula negativamente el aumento de la respuesta pro-inflamatoria. En los niños incluidos en este estudio pudimos ver que el grado de inflamación es mas bien leve a moderado y con poca infiltración de neutrófilos a pesar de niveles altos de $IL-8$. En cambio, los adultos mostraron inflamación severa en la mitad de los individuos estudiados y no tuvieron elevación en los niveles de $IL-10$.

La participación de $IL-10$ en la inflamación causada por *H. pylori* ha sido reportada en varias publicaciones. En un trabajo realizado por Sutton y colaboradores, empleando ratones *knock-out* $IL-10^{-/-}$, se propuso que el aumento en la secreción de esta citocina podría ser un intento por controlar la inflamación, posiblemente por el control de la secreción de $IFN\gamma$.

La misma situación podría ocurrir en humanos, Bodger y colaboradores reportaron la producción más alta de $IL-10$ en personas infectadas con *H. pylori* comparándolas con no infectadas o con personas con gastritis sin la infección. En esa publicación, la $IL-10$

estuvo asociada con la severidad de la inflamación y los autores propusieron que el incremento en la secreción de esta citocina puede ser un intento del hospedero para controlar la inflamación.

En este estudio, fue interesante encontrar que los niveles de IL-8 en los sobrenadantes de las biopsias fueron significativamente más altos en los niños infectados que en los adultos con UD o DNU ($p < 0.001$).

Los resultados que observamos en los niños son diferentes a los observados por Shimizu y cols, 2004, quienes encontraron en el antro de niños infectados con *H. pylori*, niveles significativamente más altos de IFN γ e IL-8 que en los no infectados, asimismo en este estudio encontraron que los niveles de IL-4 fueron similares entre infectados y no infectados.

También vimos que a diferencia de lo reportado en adultos, la infección con *H. pylori* en los niños no aumentó los niveles de IL-12 e IFN γ .

En este estudio, los niños no infectados presentaron la presencia de IL-8 e IL-10, aunque en niveles bajos. Posiblemente por un proceso inflamatorio ajeno a *H. pylori* Respecto a IL-12, IFN γ e IL-4, tanto los niños infectados como los no infectados mostraron niveles similares.

Pero si comparamos con los adultos, los niños infectados o no infectados, tuvieron niveles más altos de las cinco citocinas estudiadas. Esto puede deberse a que los niños no infectados tenían algún proceso inflamatorio diferente al causado por la infección con *H. pylori*, como comentamos anteriormente, o bien sin excluir la posibilidad de que alguno haya tenido *H. pylori* con erradicación espontánea, aunque este es un evento poco frecuente, (Torres y cols, 2000), pero que puede ocurrir en los niños y no se sabe cuánto tiempo toma a la mucosa gástrica normalizar los cambios ocasionados por la infección.

Diversos estudios de adultos con úlcera péptica muestran predominantemente un perfil de citocinas tipo Th1 por el incremento en IL-12, IFN γ y TNF α pero no en IL-4, mientras que en los pacientes con gastritis se observa incremento en IFN γ e IL-4.

En nuestro trabajo encontramos que los adultos con UD, mostraron una respuesta de citocinas tipo Th1, al compararlos con los adultos con DNU quienes muestran un incremento importante en IL-12 e IFN γ confirmando los resultados de Lindholm y cols. y D'Elis y cols. Estos resultados sugieren que en la mucosa gástrica de los pacientes con UD

asociada a la presencia de *H. pylori* predomina una respuesta tipo Th1 y puede ser un factor importante de la enfermedad.

Semejante a lo reportado por otros autores en estudios con adultos, los niveles de citocinas alcanzados en los niños *H. pylori*+ de este estudio, correlacionaron con la severidad de la inflamación gástrica (Peek y cols, 1995; D'Elíos y cols, 2005).

La presencia de cepas de *H. pylori* cagA+ ha sido asociada a un incremento en el riesgo de úlcera péptica, en nuestro estudio la mayoría de los adultos con UD y DNU fueron CagA positivos (86.6% y 76.6% respectivamente) determinada por serología.

A diferencia de otros estudios en adultos, nosotros no encontramos correlación entre los niveles de IL-8, IL-12, IFN γ , IL-10 y la respuesta de IgG a CagA. Tampoco encontramos correlación entre la inflamación y la seropositividad a CagA como ha sido reportado en otras poblaciones.

En resumen, los datos presentados en esta tesis aportan conocimientos sobre la respuesta inmune sérica y de mucosa gástrica a la infección por *H. pylori* en las etapas tempranas de una infección crónica en niños y adultos infectados con *Helicobacter pylori*.

9. CONCLUSIONES

1. Los niños infectados con *H. pylori* tienen respuesta sérica de tipo IgG e IgA a CagA, menor en niños con Dolor Abdominal Recurrente que en niños sanos.
2. En los niños infectados con *H. pylori* la respuesta sérica de IgG a CagA fue significativamente mayor y la respuesta sérica a ureasa fue significativamente menor que la presentada por los adultos.
3. En la infección natural con *H.pylori*, CagA es un buen inmunógeno y ureasa es un inmunógeno pobre.
4. Los niños infectados con *H. pylori* presentaron una infiltración mononuclear y de neutrófilos leve, mientras que los adultos presentan una infiltración moderada a severa.
5. En la mucosa gástrica de los niños, la presencia de *H. pylori* esta asociada con niveles altos de IL-8 principalmente en células epiteliales. En adultos con úlcera péptica los niveles de IL-8 se encuentran incrementados en relación a los niveles observados en adultos con DNU.
6. Los niños infectados con *H. pylori* presentan incremento en los niveles de IL-8 e IL-10, los adultos con úlcera duodenal muestran mayores niveles de IL-8, IL-12, IFN γ e IL4 que los adultos con dispepsia no ulcerosa.

En conclusión, el presente estudio, indica que los niños con una infección temprana con *H. pylori* presentan una respuesta humoral e inflamatoria diferente la expresada en la infección crónica de los adultos infectados y con sintomatología gastroduodenal. La menor respuesta sérica observada en los niños puede indicar una disminución en la presencia de cepas *H. pylori* cagA positivas.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Alarcon T, Martínez MJ, Urruzuno P, Cilleruelo ML, Madruga D, Sebastian M, Domingo D, Sanz JC, Lopez-Brea M. Prevalence of CagA and VacA antibodies in children with *Helicobacter pylori*-associated peptic ulcer compared to prevalence in pediatric patients with active or nonactive chronic gastritis. Clin Diagn Lab Immunol.2000;7:842-844.
2. Alm R, Trust T. Analysis of the genetic diversity of *Helicobacter pylori*: the tale of two genomes. J Mol Med. 1999; 77: 834 – 846.
3. Ando T, Kusugami K, Ohsuga M, Shinoda M, Sakakibara M, Saito H, Fukatsu A, Ichiyama S, Ohta M. Interleukin-8 activity correlates with histological severity in *Helicobacter pylori* associated antral gastritis. Am J Gastroenterol. 1996. 91; 1150-1156.
4. Ando T, Pérez-Pérez G, Kusugami M, Ohsuga M, Boch K, Blaser MJ. Anti Cag A immunoinmunoglobulin responses correlate with interleukin-8 induction in human gastric mucosal biopsy culture. Clin Diagn Lab Immunol. 2000; 5:803-809.
5. Atherton JC, Cao P, Peek R, Tummuru M, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. J Biol Chem.1995.270; 17771-17777.
6. Atherton JC, Peek R, Tham T, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology.1997; 112:92-99.
7. Audibert C, Janvier B, Grignon B, Salaün I, Burucoa C, Lecron J Fauchère J. Correlation between IL-8 induction, cagA status and vacA genotypes in 153 French *Helicobacter pylori* isolates . Res Microbiol.2000; 151:191-200.
8. Bedoya A, Garay J, Sanzon F, Bravo LE, Bravo JC, Correa H, Craver R, Fonham E, Dux JX, Correa P. Histopathology of gastritis in *Helicobacter pylori* infected children from populations at high and low gastric câncer risk. Hum Pathol. 2003 Mar; 34:206-213.
9. Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastric diseases. BMJ.1998;316:1507-1510.
10. Blaser MJ. Hypothesis: the changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans; implications for health and disease. J Infect Dis.1999.179; 1523-1530.
11. Blaser MJ, Smith PD. Persistent mucosal colonization by *Helicobacter pylori* and the induction of inflammation. In Gallin J and Snyderman R eds. Inflammation: Basic

principles and clinical correlates. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999; 1107-1116.

12. Blaser MJ, Atherton J. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest.* 2004. 113: 321-333.
13. Blecker U, Lanciers S, Keppens E, Vandenplas Y. Evolution of *Helicobacter pylori* positivity in infants born from positive mothers. *J. Pediatr gastroenterol Nutr* 1994;19:87-90.
14. Bodhidatta L, Hoge CW, Churnratanakul S, Nirdnoy W, Sampathanukul P, Tungtaem C, Raktham S, Smith CD. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in a developing country: comparison of two ELISAs and a seroprevalence study. *J Infect Dis.* 1993;168:1549-1553
15. Bodger K, Crabtree JE. *Helicobacter pylori* and gastric inflammation. *Br Med Bull.* 1998.54:139-150.
16. Bontkes HJ, Veenendaal RA, Pena AS, Goedhard JG, vanDuijn W, Kuipers J. IgG subclass response to *Helicobacter pylori* in patients with chronic active gastritis and duodenal ulcer. *Scand J Gastroenterol.* 1992; 27: 129-133.
17. Camorlinga M, Carolina Romo, Gerardo González-Valencia, Onofre Muñoz, y Javier Torres. Topographical localization of *cagA* positive and *cagA* negative *Helicobacter pylori* strains in the gastric mucosa; an *in situ* hybridization study. *J Clin Pathol.* 2004; 57: 822-828.
18. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P. *cag*, pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1996; 93:1468-1453.
19. Chong SK, Lou Q, Asnicar MA, Zimmerman SE. *Helicobacter pylori* infection in recurrent abdominal pain in childhood: comparison of diagnosis test and therapy. *Pediatrics.* 1995; 96:211-215.
20. Correa P, Haenzel W, Cuello C, Zavala D, Fortham E, Zarama G, Collazos T, Ruiz B. Gastric precancerous process in a high risk population: cross sectional studies. *Cancer Res* 1990; 50:4731-4736.
21. Correa P, Miller MJ. Carcinogenesis, apoptosis, and cell proliferation. *Br Med Bull* 1998; 54: 151-162.
22. Correa P. New strategies for the prevention of gastric cancer: *Helicobacter pylori* and genetic susceptibility. *J Surg Oncol.* 2005;90:134-138.
23. Correa P. The epidemiology of gastric cancer. *World J Surg.* 1991;5:228-234

24. Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. Proc Natl Acad Sci. 1993; 90:5791-5795.
25. Cover TL, Blaser MJ. Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. J Biol Chem. 1992; 15:10570-10575.
26. Cover TL, Glupczynski Y, Lange, Burette A, Tummuru M, Perez G Blaser MJ. Serologic detection of infection with *cagA Helicobacter pylori* strains. J Clin Microbiol. 1995:1496-1500.
27. Crabtree JE, Shallcroos TM, Heatley RV, Wyatt JL. Mucosal tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 in patients with *Helicobacter pylori* associated gastritis. Gut. 1991; 32: 1473-1477.
28. Crabtree JE, Farmery SM, Lindley JD, Figura N, Peichl P, Tompkins DS. Cag cytotoxic strains of *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric epithelial cells. J Clin Pathol. 1994. 47:945-950.
29. D'Elis MM, Manghetti M, Almerigogna F, Amedie A, Costa E, Burroni D. Different cytokine profile and antigen-specificity repertoire in *Helicobacter pylori* specific T cell clones from the antrum of chronic gastritis patients with or without peptic ulcer. Eur J Immunol. 1997; 27:1751-1755
30. Del Giudice G. The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. Ann Rev Immunol. 2001; 19:523-563.
31. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification, and grading of gastritis. The up-dated Sydney system. Am J Surg Pathol. 1996; 20: 1161-1181.
32. Dooley CP, Cohen H, Fitzgibbons PL, Perez-Perez G, Blaser M. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histological gastritis in asymptomatic persons. N Engl J Med. 1989; 321:1562-1566.
33. Drumm B, Koletzko S, Oderda G. *Helicobacter pylori* infection in children: a consensus statement. European Pediatric task Force on *Helicobacter pylori*. J. Pediatr Gastroenterol Nutr. 2000; 30:207-213.
34. Dunn BE, Cohen H, Blaser M. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev. 1997; 10: 720-741.
35. Dzierzanowska- Fangraf K, JE Crabtree, Rozynek E, Dura W, Celińska-Cedro D, Wojda U, Dzierzanowska D. *Helicobacter pylori cagA* genotype and density of colonization in

- relation to gastric inflammation in children. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2002; 14: 1303-1307.
36. Dzierzanowska- Fangraf K, Raeiszadeh M, Dzierzanowska D, Gladkowska M, Celinska-Cedro D. IgG subclass response to *Helicobacter pylori* and cagA antigens in children. *Clin Exp Immunol.* 2003; 134:442-446.
 37. Eaton KA, Brooks CL, Morgan DR, Krakowka S. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun.* 1991; 59:2470 –2475.
 38. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. The EUROGAST Study Group. *Lancet.* 1993; 341:1359-1362.
 39. Forman D, Webb P, Parsonet J. *H. pylori* and gastric cancer. *Lancet.* 1994; 343:243-244.
 40. Futagami S, Takahashi H, Norose Y, Kobayashi M. Systemic and local immune responses against *Helicobacter pylori* urease in patients with chronic gastritis: distinct IgA and IgG productive sites. *Gut.* 1998; 43:168-175.
 41. Garza-González E, Pérez-Pérez G, Tijerina R, Maldonado H, Bosques F. Genotipos de *Helicobacter pylori* y su asociación con la respuesta inmune del hospedero. *Rev Gastroenterol Mex.* 2002; 67:156- 160.
 42. Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Rad R, Schepp W, Miehlke S, Classen M, Prinz C. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc Natl Acad Sci.* 1999; 96:12778-12783.
 43. Gold B. The disease spectrum of: The immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol.* 2000; 54:615-640.
 44. Gonzalez VG, Atherton JC, Muñoz O, Dehesa M, La Garza AM, Torres J. *Helicobacter pylori* vacA and cagA genotypes in Mexican adults and children. *J. Infect Dis.* 2000; 182:1450-1454.
 45. Goodman K J, Correa P, Tengana H J, Ramirez H, Delany JP, Guerrero O, Quiñones M L, Collazos T. *Helicobacter pylori* infection in the Colombian Andes: a population-based study of transmission pathways. *Am J Epidemiol;* 1996; 144:290-299.
 46. Granberg C, Mansikka A, Lehtonen OP, Kujari H, Gronfors R, Nurmi H, Raiha I, Stahlberg MR, Leino R. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by using pyloriset EIA-G and EIA-A for detection of serum immunoglobulin G(IgG) and IgA antibodies. *J Clin Microbiol.* 1993; 31:1450-53.

47. Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins D, Sly L, McConnell W, Harper WS. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen as *Helicobacter pylori*, and *Helicobacter mustelae*, respectively. *Int J Syst Bacteriol.* 1989; 4:397-405.
48. Guarner J, Bartlett J, Whistler T, Pierce D, Owens M, Kreh R, Czinn S, Gold BD. Can preneoplastic lesions be detected in gastric biopsies of children with *Helicobacter pylori* infection?. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004; 37:309-314.
49. [Guiraldes E](#), [Duarte I](#), [Pena A](#), [Godoy A](#), [Espinosa MN](#), [Bravo R](#), [Larrain F](#), [Schultz M](#), [Harris P](#). Proinflammatory cytokine expression in gastric tissue from children with *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001; 33:127-132.
50. Guruge J L, Falk PG, Lorenz RG, Dans M, Wirth HP, Blaser MJ, Berg DE, Gordon JI. Epithelial attachment alters the outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Proc Natl Acad Sci.* 1998; 95: 3925-3930.
51. Hardikar W, Feekery C, Smith A. *Helicobacter pylori* and recurrent abdominal pain in children. *J. Pediatr Gastroenterol.* 1996; 22:148-152.
52. Harris PR, Godoy A, Arenillas S, Riera F, Garcia D, Einisman H, Pena A, Perez-Perez G. CagA antibodies as a marker of virulence in Chilean patients with *Helicobacter pylori* infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003; 37: 596-602.
53. Hoang TT, Wheeldon TU, Bengtsson C, Cam D, Sorberg M, Granstrom M. Enzyme linked immunosorbent assay for *Helicobacter pylori* needs adjustment for the population investigated. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:627-630.
54. Holck S, Norgaard A, Bennedsen M, Permin H, Norn S, Andersen LP. Gastric mucosal cytokine responses in *Helicobacter pylori*-infected patients with gastritis and peptic ulcers. Association with inflammatory parameters and bacteria load. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003; 25; 36:175-180.
55. Karnes W, Samlof M, Siurala M, Kekki M, Sipponen P, Kim SW, Walsh JH. Positive serum antibody and negative tissue staining for *H. pylori* in subjects with atrophic body gastritis. *Gastroenterology.* 1991; 101:167-174.
56. Krauss-Etschmann S, Gruber R, Plikat K, Antoni I, Demmelmair H, Reinhardt D, Koletzko S. Increase of antigen-presenting cells in the gastric mucosa of *Helicobacter pylori* infected children. *Helicobacter.* 2005; 10:214-222.
57. Kolho KL, Karttunen R, Heikkilä P, Lindhal H, Rautelin H. Gastric inflammation is enhanced in children with CagA-positive *Helicobacter pylori* infection. *Pediatr Infect Dis J.* 1999; 18:337-341.

58. Kindermann A, Konstantopoulos N, Lehn N, Demmelmair H, Koletzko S. Evaluation of two commercial enzyme immunoassays, testing immunoglobulin G (IgG) and IgA responses, for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children. J Clin Microbiol. 2001; 39:3591-3596.
59. Kutukuler N, Aydogdu S, Göksen D, Caglayan S, Yacyi R. Increased mucosal inflammatory cytokines in children with *Helicobacter pylori* associated gastritis. Acta Pediatr. 1997; 86: 928-31.
60. Lee A and O'Rourke J. Ultrastructure of *Helicobacter* organisms and possible relevance for pathogenesis. Goodwin CS and Worsley BW eds. In *Helicobacter pylori*. Biology and Clinical Practice. CRC Press, Boca Raton, Fla.1993, 37-62.
61. Leunk RD. Production of cytotoxin by *H. pylori*. Rev Infect Dis. 1991. S8:S686-S689.
62. Leung W, Lin SR, Ching JY, To F, Ng EK, Chan FK, Lau J Y, Sung JJ. Isolation of *Helicobacter pylori* from vomitus in children and its implications in gastro-oral transmission. Am J Gastroenterol. 1999. 94:2881-2884.
63. Lindholm C, Quiding M, Lonroth H, Hamlet A, Svennelholm AM. Local cytokine response in *Helicobacter pylori*-infected subjects. Infect Immun. 1998; 66: 5964-5971.
64. Li C, DA Ha, Ferguson A, Chi DS, Zhao R, Patel R, Krishnaswamy, Thomas E. A newly development 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.
65. Li C, Pigmatelli B, Osshima H. Coexpression of interleukin-8 and inducible nitric oxide synthase in gastric mucosa infected with *cagA+* *Helicobacter pylori*. Dig Dis Sci. 2000; 45: 55-62.
66. Luzzza F, Contaldo A, Imeneo M, mancuso M, Pensabene L, Giacontti L, La Vecchia AM, Costa MC, Strisciuglio P, Décimo C, Pallone F, Guandalini S. Testing for serum IgG antibodies to *Helicobacter pylori* cytotoxin-associated protein detects children with higher grades of gastric inflammation. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1999; 29: 302-7.
67. Macarthur C, Saunders N, Feldman W. *Helicobacter pylori*, gastroduodenal disease, and recurrent abdominal pain in children. JAMA. 1995; 273: 729-734.
68. Malaty HM, Engstrand L, Pedersen NL, Graham DY. *Helicobacter pylori* infection: Genetic and environmental influences. Ann Intern Med. 1994; 120: 982-86.
69. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet. 1984; 16:1311-1315.

70. Marshall B. *Helicobacter pylori* in peptic ulcer: have Koch's postulates been fulfilled?. *Ann. Med.* 1985; 27: 565-568.
71. Matsuo T, Ikura Y, Ohsawa M, Ogami M, Kayo S, Yoshimi N, Hai E, Naruko T, Ohishi M, Higuchi K, Arakawa T Mitchell HM, Hazell SL, Bohane TD, Ueda M. Mast cell chymase expression in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Histopathology.* 2003; 43:538-549.
72. Mazari-Hiriart M, Lopez-Vidal Y, Castillo-Rojas G, Ponce de Leon S, Cravioto A. *Helicobacter pylori* and other enteric bacteria in freshwater environments in Mexico City. *Arch Med Res* 2001; 32: 458-467.
73. Meining A, Behrens R, Lehn N, Bayerdorffer E, Stolte M. Different expression of *Helicobacter pylori* gastritis in children: evidence for a specific pediatric disease? *Helicobacter.* 1996; 1:92-97.
74. Mege JL, Meghari S, Hostettre A, Capo C, Roault D. The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Infection. Lancet.* 2006; 6:557-569.
75. Mitchell HM, SL Hazell, T Kolenikow, J Mitchell, Frommer D. Antigen recognition during progression from acute to chronic infection with *cagA* positive strains of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* 1996; 64:1166-1172.
76. Mitchell HM, Hazell SL, Bohane TD, Hu P, Chen M, Li Y. The prevalence of antibody to CagA in children is not a marker for specific disease. *J. Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1999. 28:71-75
77. Montecucco C, Rappuoli R. Living dangerously: How *Helicobacter pylori* survive in the human stomach. *Nature Rev.* 2001; 2:457-465.
78. Morales-Espinosa R, Castillo-Rojas G, Gonzalez- Valencia G, Ponce de Leon S, Cravioto A, Atherton JC, Lopez -Vidal Y. Colonization of Mexican patients by multiple *Helicobacter pylori* strains with different *vacA* and *cagA* genotypes. *J. Clin. Microbiol.* 1999. 37:3001-3004
79. Nakajima S, Bamba N, Hattori T. Histological aspects and role of mast cells in *Helicobacter pylori*-infected gastritis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004; 20 Suppl 1:165-170.
80. Noach LA, Rolf TM, Tytgat GN. Electron microscopic study of association between *Helicobacter pylori* and gastric and duodenal mucosa. *J Clin Pathol.* 1994; 47: 699-704.
81. Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Pèrez-Pèrez G, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N England J Med.* 1991; 325:1132-1136.

82. Nurgalieva Z, Conner S, Opekun A, Zheng C, Elliott S, Ernst P, Osato M, Estes M, Graham D. B-Cell and T-Cell Immune Responses to Experimental *Helicobacter pylori* Infection in Humans. *Infect Immun*. 2005; 73: 2999–3006.
83. Oliveira AM, Rocha GA, Queiroz DM, Mendes EN, Carvalho AS, Ferrari TC, Nogueira AM. Evaluation of enzyme linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children from different age groups with and without duodenal ulcer. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1999; 28:157-161.
84. Onderbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fisher W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 2000. 287; 1497-1500.
85. Ozen H, Dinler G, Akyon Y. *Helicobacter pylori* infection and recurrent abdominal pain in Turkish children. *Helicobacter*. 2001; 6:234-238.
86. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet* 2001;357: 1777-1789
87. Parsonnet J, Friedman GD, Orentlich N, Vogelstein H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* strains. *Gut*. 1997; 40:297-301.
88. Peek R, Miller GG, Tham KT, Perez-Perez G, Zhao X, Atherton JC, and Blaser MJ. Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to *cagA+* *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest*. 1995; 71:760-770.
89. Peek Jr RM, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:28-37.
90. Peek Jr RM. Clandestine intracellular delivery of *Helicobacter pylori* CagA: guess who's coming to dinner? *Gastroenterology* 2004; 127:669-672.
91. Pérez Pérez GI, Saloma A, Kosunen TU. Evidence that *cagA (+)* *Helicobacter pylori* strains are disappearing more rapidly than *cagA (-)* strains. *Gut*. 2002, 50:295-298.
92. Prinz C, Hafsı N, Volland P. *Helicobacter pylori* virulence factors and the host immune response: implications for therapeutic vaccination. *Trends Microbiol*. 2003; 11:134-138.
93. Queiroz DM, Mendez EN, Carvalho AS. Factors associated with *H. pylori* infection by a *cagA* positive strain in children. *J. Infect Dis*. 2000; 181:626-630.
94. Rathbone BJ, West AP, Wyatt JI, Johnson AM, Tompkins DS, Heatley RV. *Campylobacter pyloridis*, urease and gastric ulcers. *Letter. Lancet*. 1986; 2:400-403.

95. Rehnberg-Lailo L, Rautelin H, Koskela P. Decreasing prevalence of *Helicobacter pylori* antibodies in Finland, with reference to the decreasing incidence of gastric cancer. *Epidemiol Infect.* 2001; 26:37-42.
96. Replogle ML, Glaser S, Hato RA, Parsonnet J. Biological sex as a risk factor for *Helicobacter pylori* infection in healthy young adults. *Am J Epidemiol.* 1995; 142:856-863.
97. Romero-Gallo J, Pérez-Pérez G, Novick R, Kamath P, Norbu T, Blaser MJ. Responses of Endoscopy Patients in Ladakh, India, to *Helicobacter pylori* Whole-Cell and CagA Antigens. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9: 1313–1317.
98. Roosendaal R, Kuipers EJ, Buitenwerf J, van Uffelen C, Meuwissen SG, van Kamp GJ. *Helicobacter pylori* and the birth cohort effect: evidence of a continuous decrease of infection rates in childhood. *Am J Gastroenterol.* 1997; 92: 1480-1484.
99. Rothenbacher D, Winkler M, Gonser T, Adler G, Brenner H. Role of infected parents in transmission of *Helicobacter pylori* to their children. *Pediatr Infect Dis J.* 2002; 21:674-679.
100. Semino-Mora C, Doi QS, Marty A, Simko V, Carlstedt I, Dubois A. Intracellular and interstitial expresión of *Helicobacter pylori* virulence genes in gastric precancerous intestinal metaplasia and adenocarcinoma. *J Infect Dis.* 2003; 187:1165-77.
101. Shimizu T, Haruna H, Ohtsuka Y, Kaneko K, Gupta R, Yamashiro Y. Cytokines in the gastric mucosa of children with *Helicobacter pylori* infection. *Acta Pediatr* 2004; 93:322-326.
102. Sobala GM, Crabtree JE, Dixon MF, Schorah CJ, Taylor JD, Rathbone BJ, Heatley RV, Axon AT. Acute *Helicobacter pylori* infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology, and gastric juice ascorbic acid concentrations. *Gut.* 1991; 32:1415-1418.
103. Stoicov C, Saffari R, Cai X, Hasyagar C, Houghton J. Molecular biology of gastric cancer: *Helicobacter* infection and gastric adenocarcinoma: bacterial and host factors responsible for altered growth signaling. *Gene.* 2004; 341:1-17.
104. Solnick JV, Canfield DR, Hansen L, Torabian SZ. Immunization with Recombinant *Helicobacter pylori* Urease in Specific-Pathogen-Free Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*). *Infect Immun.* 2000; 68:2560-2565.

105. Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. N England J Med. 2002; 347:1175-1186.
106. Sutton P, Kolesnikow T, Daron S, Wilson J, Lee A. Dominant no responsiveness to *Helicobacter pylori* infections associated with production of interleukin 10 but not gamma interferon. Infect. Immune.2000; 68:4802-4804.
107. Taha AS, Reid J, Boothmann P, Gemmell CG, Lee FD, Sturrock RD, Russell RI. Serological diagnosis of *Helicobacter pylori*-evaluation of four tests in the presence or absence of non-steroidal anti-inflammatory drugs. Gut. 1993; 34:461-465.
108. Thomas JE, Gibson GR, Darboe MK, Dah A, Weaver LT. Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. Lancet.1992; 340:1194-1195.
109. Torres J, Leal-Herrera Y, Pérez-Pérez G, Gómez A, Camorlinga –Ponce M, Cedillo-Ribera R, Tapia-Conyer R, Muñoz O. A community-based seroepidemiological study of *Helicobacter pylori* infection in México. J Infect Dis.1998; 178:1089-1094.
110. Torres J. Aspectos epidemiológicos y clínicos de la infección por *H. pylori* en niños. Rev Gastroenterol Mex. 2000; 65 (supl 2):13-19.
111. Tummuru MK, Cover T, Blaser M. Cloning, and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. Infect Immun. 1993; 61:1799-1809.
112. Van der Meer SB, Forget PP, Loffeld RJ. The prevalence of *H. pylori* serum antibodies in children with recurrent abdominal pain. Eur J Pediatr. 1992; 151:799-801.
113. Wewer V, Andersen LP, Paerregaard A, gernow A, Hansen HJ, Matzen P, Krasilnikoff PA. Treatment of *Helicobacter pylori* in children with recurrent abdominal pain. Helicobacter.2001; 6:244-248.
114. Whitney AE, Guarner J, Hutwagner L, Gold B. *Helicobacter pylori* gastritis in children and adults: Comparative histopathologic study. Ann Diagn Path. 2000; 4:279-285.
115. Wotherspoon AC. Gastric lymphoma of mucosa- associated lymphoid tissue and *Helicobacter pylori*. Annu Rev Med. 1998; 49; 289-299.
116. Yamaoka Y, Kita M, Kadama T, Sami N, Tanahashi T, Kashima K, Imanishi J. Chemokines in the gastric mucosa in the gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. Gut. 1998; 42: 609-617.
117. Yañez P, Madrazo-de la Garza, Pérez-Pérez GI, Cabrera L, Muñoz O, Torres J. Comparison of invasive and non-invasive methods for the diagnosis and evaluation of eradication of *Helicobacter pylori* infection in children. Arch Med Res 2000; 31:415-417.

118. Yoshiyama H, Nakasawa T. Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. *Microb Infect.* 2000; 2:55-60.
119. Zambon CF, Navaglia F, Basso D, Rugge M, Plebani M. *Helicobacter pylori* babA2, cagA, and s1 vacA genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. *J Clin Pathol.* 2003; 56:287-291.

Anexo 1

DETERMINACION DE IL-8 POR INMUNOHISTOQUIMICA.

- Desparafinar los cortes durante 15 min. a 65°C.
- Sumergir los cortes en las siguientes soluciones:
 - Xileno 3 min.
 - Xileno 3 min.
 - Xilol-alcohol enjuague.
 - Etanol absoluto 3 min.
 - Etanol 96% 3 min.
- Sumergir los cortes en la solución de recuperación antigénica Dako, Carpinteria, CA), calentar en baño maría a ebullición durante 30 min. Repetir este paso cambiando la solución del recuperador antigénico.
- Enfriar los cortes a temperatura ambiente y lavar con agua corriente.
- Sumergir los cortes en la solución de bloqueo de peroxidasa endógena durante 1.5 h.
- Sumergir los cortes en etanol al 96% durante 5 min.
- Lavar tres veces con agua destilada.
- Colocar en cada corte 50µl del bloqueador universal e incubar en cámara húmeda durante 45 min.
- Realizar un segundo bloqueo con PBS-albúmina durante 15 min. en cámara húmeda.
- Lavar tres veces con PBS 1X.
- Colocar 50 µl del anticuerpo primario anti-IL8 (anticuerpo IgG policlonal en cabra (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) diluido 1:50 en PBS 1X, e incubar en cámara húmeda toda la noche a temperatura ambiente.
- Lavar tres veces con PBS 1X.
- Colocar 50 µl del anticuerpo secundario, Ig G anti-cabra en conejo acoplado a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) diluido 1: 100 en PBS, en incubar en cámara húmeda durante 2 h.
- Lavar tres veces con PBS 1X.

- Revelar con la solución de 3,3 diaminobenzidina tetrahidroclorada (Sigma, St Louis, MO) hasta desarrollo de color y parar la reacción sumergiendo los cortes en PBS 1X.
- Contrastar con hematoxilina durante 5 min. y lavar con agua corriente.
- Diferenciar en la solución de LiCO₃ y lavar con agua corriente.
- Deshidratar realizando el paso 2 pero en sentido contrario.
- Montar con resina y sellar las preparaciones con barniz.

DETECCION DE *H. pylori* POR INMUNOFLUORESCENCIA.

- Desparafinar los cortes durante 15 min. a 65°C.
- Sumergir los cortes en las siguientes soluciones:
 - Xileno 3min.
 - Xileno 3 min.
 - Xilol-alcohol enjuague.
 - Etanol absoluto 3 min.
 - Etanol 96% 3 min.
- Sumergir los cortes en la solución de recuperación antigénica y calentar en baño maría a ebullición durante 30 min.
- Enfriar los cortes a temperatura ambiente y lavar con agua corriente.
- Colocar en cada corte 50µl del suero de caballo al 20% e incubar en cámara húmeda durante 50 min. a temperatura ambiente.
- Colocar a cada corte 50µl del bloqueador universal e incubar en cámara húmeda durante 30 min.
- Lavar 3 veces con PBS-Tween y una vez con PBS 1X.
- Colocar 50 µl del anticuerpo primario anti- *H.pylori* (IgG anti *H. pylori*, DAKO, Carpintería, CA) diluido 1:50 en PBS 1X, e incubar en cámara húmeda toda la noche a temperatura ambiente.
- Lavar 3 veces con PBS-Tween y una vez con PBS 1X.
- Colocar 50 µl del anticuerpo secundario conjugado con FITC (Zymed Laboratorios, San Francisco, CA) diluido 1: 100 en PBS, e incubar en cámara húmeda durante 2 h.
- Lavar 3 veces con PBS-Tween y una vez con PBS 1X.
- Contrastar con azul de evans durante 15 segundos y lavar con PBS 1X.

Montar con vecta-shield y sellar las preparaciones con barniz