



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE UN PROBIÓTICO EN LA
DENSIDAD BACTERIANA DE *Helicobacter pylori* EN
MUCOSA GÁSTRICA POR PCR TIEMPO REAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

STEPHANIE EURIDICE MORALES GUERRERO



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Prof. Adriana Guadalupe Mejía Chávez
VOCAL	Prof. Luciano Hernández Gómez
SECRETARIO	Prof. Gonzalo Castillo Rojas
1er. SUPLENTE	Prof. Yolanda López Vidal
2o. SUPLENTE	Prof. Antonia Isabel Castillo Rodal

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Programa de Inmunología Molecular Microbiana
Depto. de Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina, UNAM

ASESOR DEL TEMA

Dr. Gonzalo Castillo Rojas

SUPERVISOR TÉCNICO

Dra. Yolanda López Vidal

SUSTENTANTE

Stephanie Euridice Morales Guerrero



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, por ser mi segundo hogar y haberme brindado el conocimiento necesario para poder desarrollarme como una futura profesionista.

A la Dra. Yolanda López Vidal por permitirme unirme a su grupo de trabajo y por la confianza brindada para llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Gonzalo Castillo Rojas por la confianza, el apoyo y la constante supervisión brindada a lo largo del desarrollo del proyecto

Al Dr. Federico Uscanga Domínguez y al Servicio de Endoscopia del INCMNSZ, por su valiosa ayuda en la toma de las biopsias, sin las cuales este trabajo no se habría llevado a cabo.

Al Programa Transdisciplinario en Investigación y Desarrollo para Facultades y Escuelas del Macroproyecto “Nuevas Estrategias Epidemiológicas, Genómicas y Proteómicas en Salud Pública” dentro de la línea de investigación ENFERMEDADES INFECCIOSAS 10 SDEI.PTID.005.4 y al Proyecto CONACyT 78787 por la beca brindada durante la realización del proyecto. Este proyecto fue financiado por Nestlé México y CONACyT 50099M.



DEDICATORIAS

A mis padres, Carlos y Avelina, por su cariño y por su apoyo incondicional, particularmente en los momentos difíciles que hemos tenido que atravesar, por motivarme a seguir luchando. ¡Gracias! sin ustedes simplemente no habría llegado hasta aquí. Ahora pueden estar orgullosos de tener 3 hijos titulados.

A mis hermanos, Betzabé y Amílcar, quienes siempre se han preocupado por mí, gracias por cuidarme cuando sólo era un bodeque, por su cariño, por todos los consejos y también los regaños que siempre he tomado en cuenta.

A mi mis tíos Orlando, Alfredo, Lucía, Alfonso y Alicia, y a mis primos Fer, el Ale y Valeria porque mejor familia no podría haber pedido.

A Memmis, mi mejor amiga y mi hermana perdida, que siempre ha estado conmigo, apoyándome, dándome ánimos sin perder nunca la confianza en mí. Gracias por escuchar mis lloriqueos, por entender mis complicaciones existenciales y también por todas esas buenas anécdotas que hemos recabado a lo largo de nuestra amistad. ¡Recuerda que eres la número uno!

A Sergio, muchísimas gracias por todo lo que hemos compartido, por aguantar mis ataques de estrés, por escucharme y darme ánimos cuando me sentía pérdida o frustrada, por recordarme que no debo perder la confianza en mí y por ayudarme a crecer y darme cuenta de todo lo que puedo hacer. ¡Te quiero muchísimo min lille gubbe!

A mis queridos amigos de la facultad, mi ratilla favorita Myrna, Estibi pipetas, la señorita Pao, la experta en cabello Wishu, el hombre pelirrojo Memo, el impertinente de Kory, los fanses del americano Gabo, Rafa y Lalo, la deportista de Caro, Lulis y su inseparable jerga, Deneb, Chava, Cariño, Mau, Carmen, Vaquero, Xanat, Parlina, Emmanuel, Iván, Martín, el



otro Chava, Andreína. Mejores personas no pude encontrar en la facultad (bueno, tal vez si jaja). Gracias por esos desayunos en psicología, por ayudarme a acabarme mi comida, las pláticas en clase, las muy bien invertidas horas en la jardinera o junto al bote de basura, por todos los apodos que pusimos, los chistes ñoños, los datos inútiles, las reuniones en la casa de Memo o Rafa y todas esas cosas que simplemente hicieron que estos 5 años de carrera se convirtieran en la mejor etapa de mi vida. Y si, debajo de toda mi amargura los quiero mucho a todos y los considero mis mejores amigos.

A las chicas y chicos del PIMM, Dra. Maritoña, Gaby, Karen, Brenda, Viri, Paty, Mary, Lulú, Adriana, Alicia, Fu, Erick, Lalo, René, Paco, Jaques, Xavier, Simón, Cinthya, Valeria, Sr. Ricardo. Que desde el primer día me hicieron sentir parte del grupo, he aprendido mucho de todos ustedes. Gracias por hacer esas horas en el laboratorio menos pesadas y sobre todo muy divertidas.



ÍNDICE

	Pág.
Jurado asignado	i
Agradecimientos	ii
Dedicatorias	iii
Resumen	vi
Abreviaturas	vii
Introducción	1
• Características microbiológicas de <i>Helicobacter pylori</i>	1
• Epidemiología de la infección	3
• Ruta de Infección	5
• Factores de virulencia	6
• Fisiopatología de la infección	13
• Métodos de diagnóstico	15
• Tratamiento	18
• Probióticos	20
• PCR tiempo real	23
Justificación	25
Hipótesis	26
Objetivo general	27
Objetivos particulares	27
Metodología	28
• Selección de la población de estudio	28



• Extracción de DNA de biopsias gástricas	29
• Determinación de la densidad bacteriana de <i>Helicobacter pylori</i> en biopsias gástricas	30
• Análisis estadístico	31
Resultados	32
Discusión	41
Conclusiones	47
Perspectivas	48
Anexo I	49
Anexo II	50
Anexo III	53
Bibliografía	57



RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria gramnegativa cuyo único reservorio encontrado hasta el momento es el ser humano, en donde coloniza la mucosa gástrica. Se estima que cerca del 50% de la población mundial ha estado expuesta a dicha bacteria y la infección por *Helicobacter pylori* una vez adquirida es de tipo persistente. Si bien en la mayoría de los sujetos la infección es asintomática de por vida, se ha encontrado una asociación entre la infección con *Helicobacter pylori* y el desarrollo de diferentes patologías como son gastritis, úlcera péptica, linfoma tipo MALT y cáncer gástrico. Una alternativa en el control de la infección en sujetos con gastritis y que puede evitar el desarrollo de las patologías mencionadas es el uso de probióticos, los cuales han mostrado lograr disminuir la carga bacteriana de *Helicobacter pylori*, así como, la inflamación asociada a la infección. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la ingesta de una bebida láctea que contenía un probiótico en la densidad bacteriana de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas mediante la PCR en tiempo real. Los resultados obtenidos muestran que la ingesta de la bebida láctea que contenía el probiótico no tuvo un efecto significativo en la disminución de la densidad bacteriana de *Helicobacter pylori* en mucosa gástrica de sujetos con dispepsia y sin lesiones en tubo digestivo.



ABREVIATURAS

%	Por ciento
°C	Grados Centígrados
¹² C	Carbono 12
¹³ C	Carbono 13
ABL	Tirosin cinasa (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog)
AlpA, AlpB	Lipoproteínas asociadas a adherencia
BabA	Adhesina de unión al antígeno ABO de grupo sanguíneo
Cag-PAI	Isla de Patogenicidad <i>cag</i>
CagA	Proteína Asociada a la Citotoxina
CO ₂	Dióxido de Carbono
CLOtest	<i>Campylobacter</i> like Organism Test
Ct	Ciclo donde la fluorescencia rebasa el umbral (Treshold cycle)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FAO	Organización para la Agricultura y la Alimentación (Food and Agriculture Organization)
fg	Femtogramos
FRET	Transmisión de energía de fluorescencia por resonancia (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
H ₂ O	Agua
HopZ	Proteína de membrana externa
HpSA	Antígeno de <i>Helicobacter pylori</i> en heces (<i>Helicobacter pylori</i> Stool Antigen)
IARC	Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (International Agency for Research on Cancer)
IL-1 β	Interleucina 1beta
IL-8	Interleucina 8
INCMNSZ	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”



H&E	Tinción Hematoxilina-Eosina
kb	Kilo bases
kDa	Kilo Daltones
Le ^b	Antígeno de Lewis B
Le ^x	Antígeno de Lewis X
MALT	Tejido Linfoide Asociado a Mucosas
µm	Micrómetros
µL	Microlitros
N ₂	Nitrógeno
NF-κB	Factor de Transcripción Nuclear kappa B
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
O ₂	Oxígeno
OipA	Proteína inflamatoria de membrana externa
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pg	Picogramos
SabA	Adhesina de unión a ácido siálico
SRC	Tirosin cinasa
SST4	Sistema de Secreción Tipo 4
Th1	Células cooperadoras Tipo 1
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
VacA	Citotoxina vacuolizante



INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori, que anteriormente era conocido como *Campylobacter pylori*, fue descrito por primera vez por Warren y Marshall en la década de los ochenta [1, 2]. Es una bacteria gramnegativa que pertenece al género *Helicobacter* el cual se encuentra dentro de la subdivisión ϵ de *Proteobacterias*, en el orden *Campylobacterales* familia *Helicobacteraceae* [3].

Es una bacteria capaz de colonizar la mucosa gástrica y cuyo único reservorio encontrado hasta el momento es el ser humano [4, 5]. Esta bacteria ha tomado gran importancia debido a que se ha encontrado una asociación entre la infección con *H. pylori* y el desarrollo de cáncer gástrico (el cuarto tipo de cáncer más común y la segunda causa de muerte debida a neoplasias a nivel mundial) [6, 7], así como, de otras patologías gastrointestinales (gastritis crónica y úlcera péptica). Es por esto que, en 1994 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) dependiente de la Organización Mundial de la Salud (OMS) determinó que existen suficientes pruebas epidemiológicas para clasificar a *H. pylori* como un carcinógeno tipo 1 en humanos [6, 8].

Características microbiológicas de *Helicobacter pylori*.

Es un bacilo microaerófilico (requiere 5% de O₂, 10% de CO₂ y 85% de N₂), neutrófilo, no esporulado, cuyo crecimiento óptimo se da a un pH de 7 y a una temperatura de 37°C. Tiene un tamaño aproximado de 2-4 μm de largo y 0.5-1 μm



de ancho y posee de 2 a 6 flagelos lofótricos que le confieren motilidad a través de la mucosa gástrica [2].

Generalmente se encuentra en forma de espiral o como bacilo, sin embargo, también se ha observado que *H. pylori* puede presentarse en forma de U o en formas cocoides [3], dichas formas de la bacteria aparecen después de un cultivo prolongado *in vitro* o después de un tratamiento con antibióticos [3, 9], las formas cocoides no pueden ser cultivadas *in vitro* y se presume que son células muertas, aunque también se ha sugerido que pueden representar un estado viable no cultivable de la bacteria y que constituyen una forma resistente de esta [10], aunque la evidencia experimental que existe hasta el momento no permite aclarar si la bacteria puede revertir este estado cocoide hacia una forma de bacilo nuevamente [5].

H. pylori es una bacteria de crecimiento fastidioso *in vitro*, requiere de medios de cultivo complejos que son suplementados con sangre de carnero, sangre de caballo, suero fetal bovino o suero de caballo como fuentes adicionales de nutrientes.

Dentro de los medios sólidos utilizados para su cultivo se encuentran el Agar Brucella, Agar Columbia, Agar Casman, Gelosa Chocolate (GC) y Agar *Haemophilus* Test Medium (HTM); los medios líquidos más usados son caldo Brucella, Mueller-Hinton e Infusión cerebro-corazón (caldo BHI). El uso de antibióticos como la vancomicina (2 mg/L), trimetoprim (1 mg/L), y anfotericina B (5 mg/L) en los medios de cultivo facilita su aislamiento [2, 3].



En medios sólidos las primeras colonias comienzan a aparecer después de 3 días de cultivo, presentando una morfología con colonias amarillentas o traslúcidas lisas. Para el caso de los cultivos sin desarrollo en este tiempo, estos se deben incubar durante 7 a 10 días [11] para asegurarse del resultado negativo del cultivo, como se mencionó anteriormente en los cultivos viejos se observa la tendencia de *H. pylori* a presentarse en forma cocoide debido a la falta de nutrientes en el medio.

Epidemiología de la infección.

H. pylori es una bacteria ubicua, estudios epidemiológicos estiman que más del 50% de la población mundial ha estado en contacto con ella, sin embargo, se observan diferencias importantes entre los países desarrollados y los países en vías de desarrollo en la prevalencia, tasa de seroconversión y seroreversión, así como en las patologías asociadas a la infección [7].

En países en vías de desarrollo, la infección generalmente ocurre en la infancia temprana, a la edad de 5 años más del 20% de los niños están infectados, el pico de infección se alcanza en la adolescencia y para los 20 años, aproximadamente el 80% de la población está infectada. En contraste en los países desarrollados la infección es adquirida en la infancia tardía y en la adolescencia, con una prevalencia baja en menores de 10 años, llegando a su pico máximo en la edad adulta, en donde a los 30-40 años alcanza aproximadamente un 40% [12, 13] (Figura 1). La prevalencia en la población adulta se ha estimado en un 62% en



China y en América Central, 82% en Europa Oriental, 71% en Japón, en Estados Unidos es de un 53% a un 26% [7]. Cabe señalar que la prevalencia puede variar entre las diferentes subpoblaciones, siendo mayor en ciertas poblaciones étnicas, como asiáticos o africanos y en poblaciones de bajo estatus socioeconómico [13].



Figura 1. Seroprevalencia mundial de la infección con *Helicobacter pylori*. La prevalencia de la infección es menor en países desarrollados que en países en vías de desarrollo (Modificado de 14).

Estudios recientes muestran que la seroprevalencia de la infección por *H. pylori* va en disminución en los países desarrollados debido a que los factores que favorecen la diseminación de la infección se relacionan con el bajo nivel socioeconómico, condiciones sanitarias deficientes, hacinamiento y la presencia de familiares infectados, características que han ido desapareciendo en estos países [15].

En México, los estudios poblacionales realizados han identificado anticuerpos contra *H. pylori* en 50% de niños menores de 10 años y 80% de adultos mayores de 25 años [12, 16]. Por otro lado, además de los factores socioeconómicos, se ha encontrado evidencia de que algunos factores genéticos del hospedero favorecen el establecimiento de la infección, por ejemplo polimorfismos en genes, como el de la interleucina 1 (IL-1) influyen en la adquisición y persistencia de la infección [7].

Ruta de infección.

La ruta a través de la cual se da la transmisión de la infección no está bien establecida, sin embargo, como se mencionó anteriormente la bacteria tiene un tropismo único por el ser humano, por lo que la ruta de transmisión propuesta es por contacto persona-persona [5, 17], tanto vía oral-oral, gastro-oral o fecal-oral, lo cual se reafirmado por estudios realizados en los cuales se ha demostrado la presencia de la bacteria en saliva, vómito y heces [18, 19].

También se han hecho investigaciones para determinar si existen reservorios ambientales de la bacteria, algunos estudios han detectado la presencia de DNA de *H. pylori* en fuentes de agua [20]; sin embargo, no se ha logrado aislar al microorganismo en cultivo microbiológico de estas muestras [21], por lo que se ha sugerido que en estas condiciones, la bacteria se encuentra en un estado latente. Se ha planteado también, que los alimentos contaminados con el microorganismo son una fuente de infección [22, 23], sin embargo, aun no se tienen estudios que confirmen su papel en la transmisión de la infección.



La adquisición de la infección por *H. pylori* ocurre principalmente a edades tempranas como lo muestran los diversos estudios de seroprevalencia, y en la gran mayoría de los casos una vez establecida la infección en la mucosa gástrica ésta se mantiene de por vida; aunque, existen reportes de casos de la eliminación espontánea de la infección [13]. Sin embargo, existen pocos estudios de como ocurre el proceso de eliminación espontánea de la infección en estos sujetos.

Factores de virulencia de *Helicobacter pylori*.

H. pylori es un microorganismo que se ha adaptado para colonizar el estómago y sobrevivir en el ambiente hostil que existe en él, posee diversos factores de virulencia que le permiten colonizar el epitelio y dañar la mucosa gástrica [13], tales como: los flagelos, la ureasa, adhesinas, la citotoxina vacuolizante, la proteína asociada a la citotoxina, entre otros.

Los flagelos son una estructura importante en la morfología de la bacteria, que le permiten desplazarse a través de la mucosa gástrica, este desplazamiento se da desde el lumen gástrico en donde el pH es ácido, hasta el epitelio donde el pH es más alcalino, lo cual favorece su crecimiento. Este desplazamiento se da no solo por los flagelos, sino también por las señales quimiotácticas que la bacteria percibe sobre el pH del microambiente [5].

Los flagelos de *H. pylori* tienen un diámetro aproximado de 30 nm y consisten de un filamento de aproximadamente 12 nm de diámetro y están recubiertos de una capa, que es parte de la membrana externa de la bacteria, ésta cubierta es una



bicapa lipídica que contiene ácidos grasos característicos de los lipopolisacáridos y que permiten que los flagelos no sean degradados por el pH ácido del estómago [2, 24]. Además, se observa la presencia de un bulbo en la parte terminal del flagelo, el cual probablemente le permite al microorganismo adherirse a las células epiteliales gástricas [2].

La proteína FlgE de 78 kDa constituye el gancho del flagelo, el filamento está constituido por 2 subunidades de flagelina, las proteínas FlaA y FlaB de 53 y 54 kDa, respectivamente. FlaB se localiza cerca del gancho en la superficie celular, mientras que FlaA comprende el resto del filamento, ambas subunidades son requeridas para que el flagelo sea motil [2]. Estudios realizados con bacterias mutantes han mostrado que estas estructuras son de gran importancia en el proceso de colonización de la mucosa gástrica, ya que se ha observado que estas bacterias que no poseen flagelos son incapaces de colonizar a su hospedero [25].

Otro mecanismo importante por medio del cual *H. pylori* puede sobrevivir en el ambiente ácido del estómago, es la producción de la enzima ureasa, una hidrolasa, que metaboliza la urea gástrica en amoníaco y dióxido de carbono, lo que crea un microambiente alrededor de la bacteria, con un pH neutro que le es favorable para su crecimiento [26].

Esta enzima es una de las proteínas más importantes que expresa la bacteria, representando cerca del 10% del contenido total de proteínas [3], requiere como cofactor al Níquel y está constituida por 12 subunidades de UreA y 12



subunidades de UreB, las cuales tienen un peso molecular de 27 y 62 kDa, respectivamente; además, requiere las proteínas accesorias UreE, F, G y H, que permiten el ensamblaje de la enzima y la incorporación del Níquel al sitio activo de la enzima, la proteína UreI funciona como un canal transportador que permite regular la cantidad de urea que se encuentra en el citoplasma bacteriano [3, 26].

Una vez que *H. pylori* alcanzó el epitelio gástrico, este se une mediante las adhesinas que posee, tales como: la adhesina de unión al antígeno ABO del grupo sanguíneo (BabA), la adhesina de unión a ácido siálico (SabA), las lipoproteínas asociadas a adherencia (AlpA y AlpB), la proteína inflamatoria de membrana externa (OipA) y la proteína de membrana externa (HopZ). Esta adhesión a las células epiteliales le facilitan la colonización de la mucosa gástrica al microorganismo [25]. Las adhesinas mejor estudiadas son BabA, una proteína de 78 kDa que se une al antígeno Le^b del grupo sanguíneo Lewis, y SabA que se une al antígeno Le^x del grupo sanguíneo ya mencionado [5].

La bacteria se adhiere a las células secretoras de moco, que se ubican en la parte superior de las crestas gástricas, aunque, generalmente se adhiere en la región del antro gástrico donde el pH es menos ácido, también llega a colonizar la región del cuerpo gástrico, especialmente cuando hay una secreción de ácido baja [2].

Uno de los factores de virulencia más estudiados que se han encontrado es la citotoxina vacuolizante (VacA), la cual ejerce diferentes efectos en las células epiteliales después de ser secretada. VacA es expresado como una protóxina de aproximadamente 140 kDa, la cual posee variantes alélicas que permitieron su



clasificación en diferentes subtipos. En su región amino terminal contiene una secuencia señal o región “s” la cual se divide en s1 y s2, y se observa que el tipo s1 está importantemente asociado a úlcera duodenal y a cáncer gástrico. La región media es clasificada como la región “m” dividida en m1 y m2, en donde el subtipo m1 presenta una actividad vacuolizante mayor [27, 28]. La región carboxilo terminal está involucrada en el autotransporte de la toxina, dicha región es eliminada de la proteína madura, la cual tiene un tamaño de 88 kDa [5, 28].

Una parte de la proteína se mantiene asociada a la superficie de la bacteria, mientras que el resto se oligomeriza formando unos complejos que asemejan una flor [5]. VacA se une a las células formando poros en las membranas, también induce la pérdida de las uniones estrechas en el epitelio, lo cual le permite a los nutrientes atravesar la barrera de la mucosa y llegar hasta la bacteria [28].

VacA tiene efectos sobre el sistema inmune, se ha encontrado que induce la supresión de este, debido a que VacA bloquea la maduración del fagosoma en macrófagos [29], inhibe selectivamente la presentación de antígenos a células T [30], bloquea la proliferación de estas mismas células y disminuye los efectos de las células Th1, por su interacción con la calcineurina y el bloqueo de la señalización celular [31, 32].

Cuando VacA es internalizada se inserta en las membranas de los endosomas tardíos formando canales iónicos que alteran su composición, provocando un aumento en la permeabilidad intracelular y la formación de vacuolas [33, 34]. Se ha observado que, también promueve la apoptosis celular a través de la formación



de poros en las membranas mitocondriales, con la subsecuente activación de señales proapoptóticas. Induce también cambios en el citoesqueleto, así como la supresión de la proliferación y migración de células epiteliales [35, 36] (Figura 2), lo cual produce un daño en la estructura del epitelio gástrico.

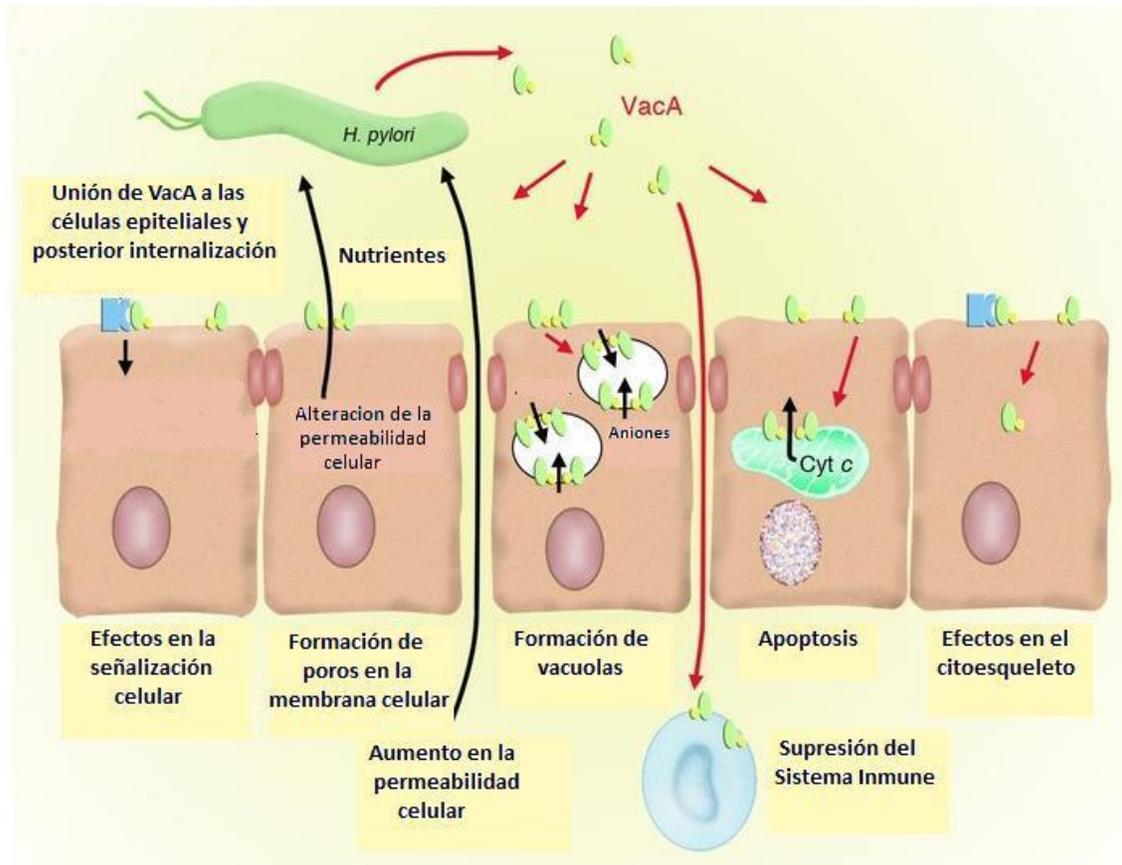


Figura 2. Efectos de la citotoxina vacuolizante (VacA) en las células epiteliales. La internalización de VacA por las células epiteliales le permite a la bacteria obtener nutrientes, además ejerce diferentes efectos en las células, lo cual altera la constitución del epitelio gástrico favoreciendo el desarrollo de patologías gástricas. [Modificado de 28].



Otro factor de virulencia importante asociado a *H. pylori*, es la isla de patogenicidad *cag* (*cag*-PAI), una secuencia cromosomal de 40 kb que contiene alrededor de 30 genes, algunos de los cuales codifican los componentes de un sistema de secreción tipo 4 (SST4) y para la proteína asociada a la citotoxina (CagA), (Figura 3). Este SST4 le permite exportar a CagA de la bacteria a las células epiteliales [13] y una vez dentro produce alteraciones en el citoesqueleto, que finalizan en cambios morfológicos en el epitelio gástrico [5].

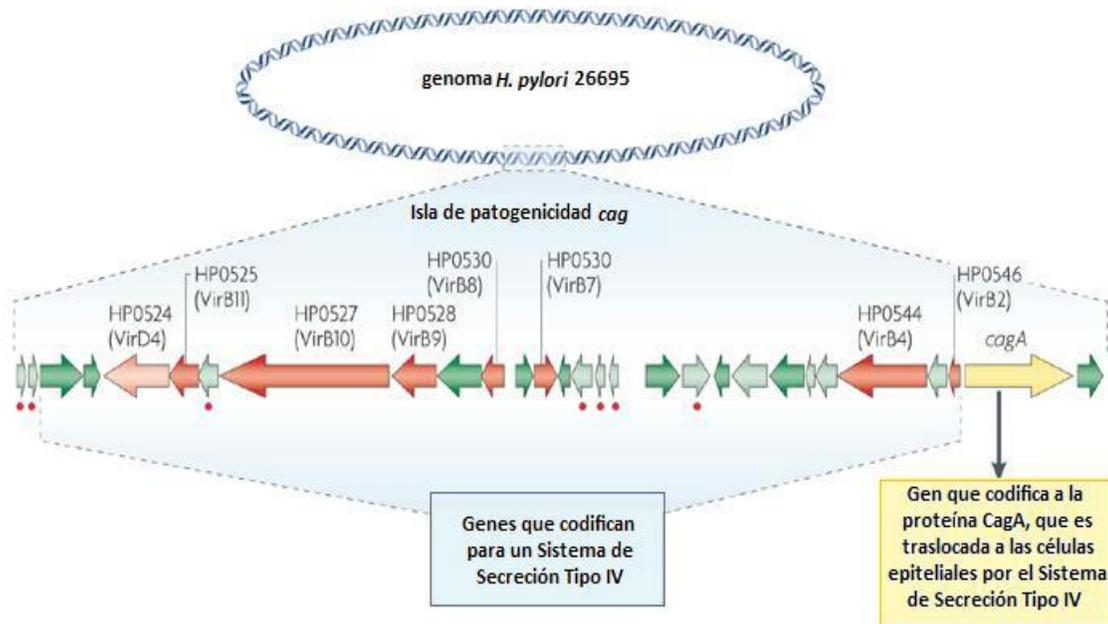


Figura 3. Estructura de *cag*-PAI. Este fragmento cromosómico tiene un tamaño de 40 kb y codifica aproximadamente para 30 genes involucrados en el ensamblaje del SST4 que permite la traslocación de CagA y la inducción de Il-8. Los genes marcados en rojo presentan similitud con el SST4 de *Agrobacterium tumefaciens*, los genes marcados en verde y rojo oscuro están involucrados en la producción de Il-8 por las células epiteliales, mientras que los marcados con rojo y verde claro no están involucrados en este proceso. Los genes marcados con un punto rojo no son requeridos para la traslocación de CagA, mientras que los que no están marcados son esenciales en este proceso [Modificado de 4].



CagA es una proteína de 145 kDa aproximadamente, la cual es reconocida por las células epiteliales como una molécula señaladora siendo fosforilada en sus residuos de tirosina en el extremo carboxilo. Una vez fosforilada, es capaz de interactuar con otras moléculas en las células epiteliales, lo que ocasiona un rearrreglo en el citoesqueleto, disrupción de las uniones estrechas y daño en el tejido, produciendo alteraciones en la morfología del epitelio. CagA también induce alteraciones en las vías de señalización celular, que provocan una proliferación y migración anormal de las células.

La forma sin fosforilar de CagA también interactúa con algunas proteínas del hospedero, produciendo cambios en la polaridad celular y activando una respuesta inflamatoria al inducir la producción de Il-8. De igual manera activa señales mitogénicas que favorecen el desarrollo de cáncer gástrico (Figura 4) [4, 5, 17, 27, 28].

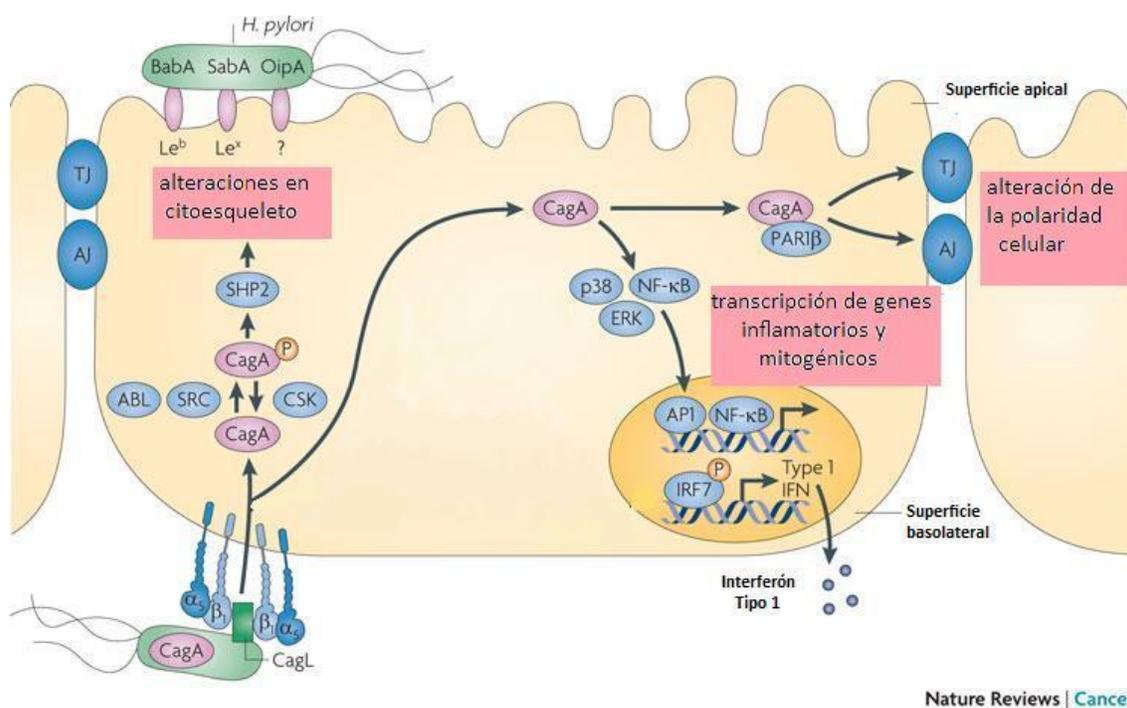


Figura 4. Efectos de la traslocación de CagA en las células epiteliales. Después de ser traslocada, CagA es fosforilada por la familia de cinasas SRC y ABL, conduciendo a rearrreglos en el citoesqueleto. CagA no fosforilada puede desencadenar diferentes vías de señalización, entre las que se encuentran la activación de NF- κ B y la alteración de las uniones estrechas, que contribuye a la pérdida de la estructura del epitelio gástrico. [Modificado de 27].

Si bien esta isla de patogenicidad (*cag*-PAI) no se encuentra presente en todas las cepas de *H. pylori*, su presencia está asociada al desarrollo de lesiones malignas [37].

Estos factores de virulencia del microorganismo son importantes en el desarrollo de las patologías gástricas asociadas a la infección, sin embargo, cabe mencionar que el riesgo de desarrollar dichas patologías, no solo son producto de la infección con *H. pylori*, sino también a factores propios del hospedero, como son: polimorfismos en genes relacionados con citocinas como IL-1 β , IL-8, TNF- α , etc. y a factores ambientales tales como: Ingesta baja de vitaminas antioxidantes, alta ingesta de sal, etc., que juegan un papel importante en la fisiopatogénesis de la infección por el microorganismo.

Fisiopatología de la infección.

La infección por *H. pylori* produce una gastritis superficial en los sujetos infectados, el grado de la gastritis y su distribución anatómica en el estómago son determinantes en la consecuencia clínica de la infección (Figura 5). Existen tres fenotipos gástricos asociados a la infección [5].



El primero es de tipo benigno, en el cual los sujetos infectados presentan una pangastritis en donde la secreción de ácido no se ve afectada. Este fenotipo se presenta en alrededor del 85% de los sujetos infectados, los cuales cursan una infección asintomática sin llegar a desarrollar una enfermedad gastrointestinal seria. Sin embargo, un pequeño porcentaje de estos sujetos tiene el riesgo de desarrollar linfoma tipo MALT [38].

El segundo fenotipo, el cual se presenta entre el 10 y 15% de los sujetos infectados, se caracteriza por una gastritis predominantemente en antro, se observa también una inflamación importante en esta región del estómago, además de altos niveles de gastrina y de producción de ácido. Este conjunto de alteraciones contribuyen al desarrollo de la úlcera péptica, particularmente, la úlcera duodenal.

El tercer fenotipo que se observa entre el 2 y 5% de los infectados se caracteriza por una gastritis predominante en el cuerpo gástrico, esta gastritis es de tipo atrófica, también se observa el desarrollo de aclorhidria, donde hay poca secreción de ácido, un aumento en los niveles de gastrina y de pepsinógeno I, éste fenotipo se encuentra asociado al desarrollo de cáncer gástrico [5, 13].

La gastritis observada en este fenotipo es producto de la secreción de citocinas proinflamatorias como la IL-1 β y el TNF- α , los cuales inhiben la secreción de ácido, provocando una alteración en la estructura y función de la mucosa gástrica, que produce una atrofia, la cual puede evolucionar hacia una metaplasia intestinal, displasia y finalmente cáncer gástrico [17].



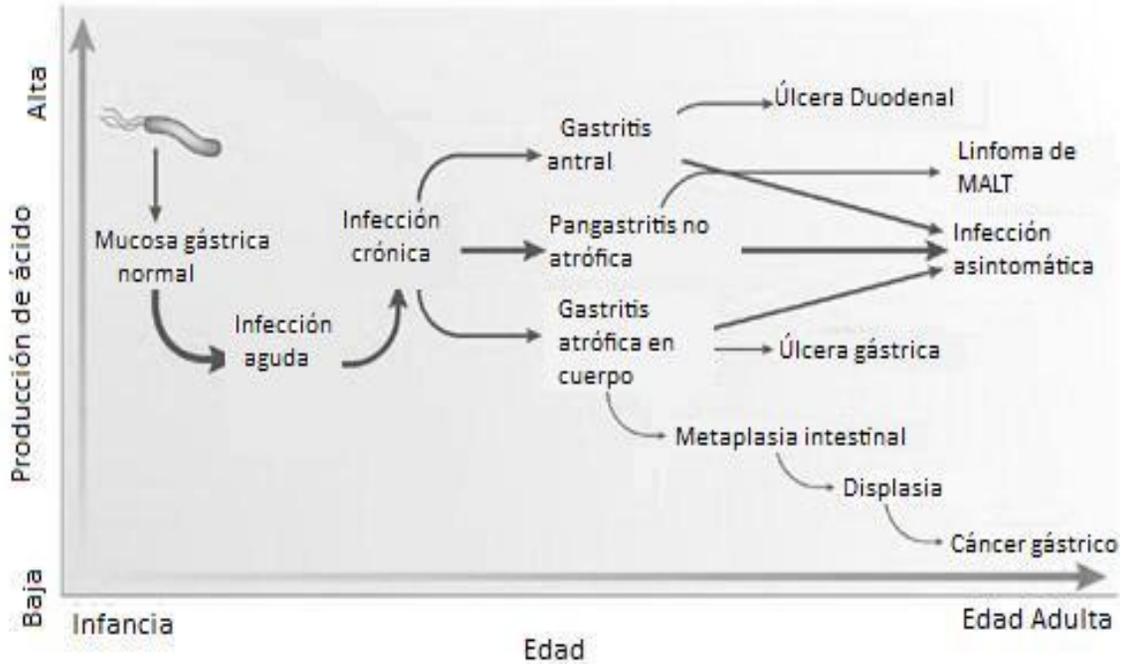


Figura 5. Curso clínico de la infección con *H. pylori*. La infección con *H. pylori* puede desencadenar diferentes patologías en el epitelio gástrico conforme avanza la edad y dependiendo de las alteraciones que se producen en la secreción ácida [Modificado de 15].

Cabe señalar que los 2 fenotipos asociados a patologías gástricas son independientes entre sí, y se ha observado que el desarrollo de úlcera duodenal protege a los individuos de desarrollar cáncer gástrico [5].

Métodos de diagnóstico.

El diagnóstico de la infección con *H. pylori* se realiza de 2 maneras generales, a través del uso de métodos invasivos, los cuales requieren de la obtención de una biopsia gástrica por medio de una endoscopia, y los métodos no invasivos, que no requieren de la toma de una biopsia [2, 3, 11]. Al momento de elegir el método de diagnóstico que se utilizará es importante tomar en cuenta el objetivo del



diagnóstico, ya que los diferentes métodos tienen una especificidad diferente y cada uno de ellos es adecuado bajo diferentes circunstancias [3].

Dentro de los métodos invasivos se encuentra la histología, en donde la biopsia se fija y se tiñe (H&E, Giemsa, Plata), para posteriormente, observarse al microscopio. Ésta metodología no solo permite observar la presencia de las bacterias en el tejido gástrico, si no también, determinar y clasificar el grado de inflamación o daño que existe en la mucosa producto de la infección [11]. Los resultados de sensibilidad varían entre un 95-96% con una especificidad del 94 al 97%, debido a que este método depende mucho de la calidad de la muestra así como de la habilidad y experiencia del patólogo que la analiza [11, 39].

Otro método clasificado como invasivo es la prueba rápida de la ureasa o CLOtest (*Campylobacter* "Like" Organism test), en la cual la biopsia colectada se coloca en un medio con urea y rojo de fenol. Cuando la bacteria está presente, el amoníaco producto de la degradación de la urea produce el cambio de color del indicador de amarillo a rojo, como consecuencia del aumento en el pH, en el caso de esta prueba los resultados de sensibilidad y especificidad son en general superiores al 90% [11, 40].

El cultivo bacteriano también se considera un método invasivo, ya que se realiza a partir del homogeneizado de una biopsia. Se utilizan diferentes medios de transporte como el caldo Brucella con 20% de glicerol, una vez que la biopsia se coloca en el medio esta se transporta inmediatamente al laboratorio. El cultivo bacteriano es una herramienta útil para determinar la susceptibilidad a



antimicrobianos, si bien la especificidad del cultivo es de un 100%, su sensibilidad varía entre el 50 y 100% [2].

Debido a la dificultad que representa la toma de una biopsia, se desarrollaron los métodos no invasivos de diagnóstico. Uno de los más utilizados es la prueba de urea en el aliento, cuyo fundamento también se basa en la capacidad de la bacteria de producir CO₂ como producto de la descomposición de la urea. El método consiste en ingerir urea marcada (¹³C), después de 30 minutos se toma una muestra de aliento, la cual es analizada con un espectrómetro de masas para determinar la cantidad de CO₂ marcado que fue exhalado, este valor se expresa en relación al carbono 12 (¹³C/¹²C) y los valores obtenidos se comparan con una muestra de aliento basal. La diferencia entre ambos valores se conoce como DBO (variación sobre la línea basal). La prueba del aliento tiene una buena sensibilidad y especificidad y generalmente es usada para dar un seguimiento al tratamiento contra la infección, un resultado positivo es indicativo de una infección activa. Este método presenta una sensibilidad y precisión que oscila en un 95% en ambos casos [11, 39, 40].

La serología es una prueba no invasiva que consiste en la determinación de anticuerpos anti-*H. pylori*, la detección de estos anticuerpos es un indicativo de la exposición a la bacteria, por lo que esta técnica tiene una utilidad en la realización de estudios epidemiológicos [3]. En caso de que esta prueba quiera ser utilizada como una herramienta de diagnóstico, es necesario que sea complementada con un cultivo o con un análisis que permita diferenciar entre una infección activa y una



no activa, tanto la sensibilidad como la especificidad de esta prueba son cercanos al 90%[11].

La prueba de antígeno de *H. pylori* en heces o HpSA (*Helicobacter pylori* stool antigen test), es otro método no invasivo utilizado en el diagnóstico de la infección, este método es un inmunoensayo enzimático que permite detectar la presencia de antígenos de la bacteria en muestras de heces. La prueba utiliza anticuerpos policlonales, que son adheridos a una microplaca, se hacen diluciones de la muestra, y se colocan en los pozos de la placa que ya tienen adheridos a los anticuerpos, esta se incuba durante 10 minutos y posteriormente, se determina por espectrofotometría la absorbancia de la muestra. La sensibilidad y especificidad de la prueba es comparable con la histología y la prueba de urea en aliento, sin embargo y no se utiliza como un método de rutina, a pesar de su bajo costo y fácil realización [2].

Tratamiento.

El tratamiento para la erradicación de la infección por *H. pylori* consiste en una terapia triple, en la cual se administra un inhibidor de la bomba de protones como el Omeprazol y un par de antibióticos. Los antibióticos utilizados como primera línea de tratamiento son la Amoxicilina (beta-lactámico) y la Claritromicina (macrólido). En caso de que esta terapia sea inefectiva se utilizan otras combinaciones de medicamentos en las que se incluyen el Subsalicilato de Bismuto, Metronidazol, Tetraciclina, Levofloxacino o Rifabutina [41].



El tratamiento tiene una efectividad del 90% aproximadamente, sin embargo, presenta algunas desventajas como el costo y los posibles efectos secundarios, así como, el desarrollo de resistencia a los antibióticos. Se ha observado además que mientras en los países desarrollados la incidencia de cáncer gástrico va en disminución, la incidencia de reflujo gastroesofágico y de carcinoma de esófago (esófago de Barrett) va en incremento, lo que ha planteado la posibilidad de que la presencia de *H. pylori* en el estómago sea benéfica para el hospedero [42], aunque en algunas circunstancias aún poco entendidas.

Dadas estas desventajas, el tratamiento únicamente está indicado en pacientes que presentan gastritis crónica atrófica o úlcera péptica y para aquellos sujetos que cursan una infección asintomática no se tiene una recomendación clara acerca de un tratamiento para eliminar la infección.

Si bien el porcentaje de sujetos en los cuales la infección desencadena una patología a nivel gástrico es bajo, cabe señalar que el desarrollo de alguna de estas patologías es un proceso que ocurre con el paso de los años (décadas) y depende de diferentes factores, tales como: factores ambientales (la dieta), factores genéticos asociados al hospedero (polimorfismos en genes de citocinas), el tipo de cepa con la que se está infectado (presencia de factores de virulencia), la extensión del proceso inflamatorio y la densidad de *H. pylori* en la mucosa gástrica. Por ello se han buscado alternativas no farmacológicas para controlar la densidad bacteriana y/o el grado de inflamación en el grupo de sujetos en los que la eliminación de la infección no está recomendada y que tienen la posibilidad de



desarrollar una patología, una de estas alternativas que ha sido investigada más a detalle son los probióticos.

Probióticos.

Los probióticos son definidos por la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), como preparaciones de microorganismos vivos o sus derivados que administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio al hospedero [43, 44].

Diferentes géneros de microorganismos se utilizan en la actualidad en la preparación de probióticos, entre ellos se encuentran: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Escherichia*, así como, algunas cepas de hongos levaduriformes como *Saccharomyces*, las bacterias más estudiadas como probióticos son las productoras de ácido, en especial la especie *Lactobacillus* [44].

Diferentes mecanismos han sido propuestos por medio de los cuales los probióticos ejercen su efecto benéfico en el hospedero: a través de la competencia por los sitios de adhesión y por los nutrientes con las bacterias patógenas, la producción de bacteriocinas y por la regulación de la respuesta inmune [45].

Diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* en modelos animales y en humanos se han llevado a cabo para determinar si el uso de probióticos tiene un efecto sobre *H. pylori*, si bien no se ha mostrado que el uso de estos elimine la infección, se ha determinado que la ingesta de probióticos tiene un efecto benéfico disminuyendo



la carga bacteriana del microorganismo y la inflamación asociada a la infección [42].

Estudios realizados *in vitro* han sugerido que la ingesta de probióticos como *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rhamnosus* fortalecen la barrera de la mucosa, aumentando la producción de mucina [46-48], la cual se ve disminuida en la gastritis asociada a *H. pylori*, el aumento en la producción de mucinas permite la regeneración de esta barrera, lo cual disminuiría la posibilidad de que *H. pylori* pueda adherirse al epitelio gástrico.

Como se describió con anterioridad la adhesión de *H. pylori* al epitelio es determinante en el desarrollo de la infección, estudios *in vitro* y en animales han mostrado que ciertas especies de lactobacilos inhiben la adhesión de *H. pylori* a las células epiteliales, ya sea a través de la producción de sustancias antimicrobianas, así como, por la competencia por los sitios de adhesión [42].

Se ha propuesto además, que los probióticos producen sustancias antimicrobianas contra *H. pylori*, algunas especies de lactobacilos sintetizan compuestos relacionados con la familia de las bacteriocinas [49], así como, productos de la fermentación láctica (ácido láctico, ácido acético y peróxido de hidrógeno), que disminuyen el pH gástrico, estos compuestos se han sugerido que podrían inhibir la actividad de la ureasa, enzima importante para la sobrevivencia de *H. pylori* en la mucosa del estómago [42].

Otro mecanismo importante por el que los probióticos ejercen su beneficio, es a través de la regulación de la respuesta inmune. Se sabe que la infección por *H.*



pylori produce la liberación de citocinas y quimiocinas, las cuales producen un proceso inflamatorio en la mucosa del estómago, que tiene como resultado una gastritis [7, 13, 50]. Los probióticos podrían interactuar con las células epiteliales, de manera que modulen la producción de citocinas, para favorecer la liberación de citocinas antiinflamatorias que reducirían la gastritis asociada a la infección por *H. pylori* [42]. Estudios *in vitro* y en modelos animales han mostrado que la ingesta de probióticos es capaz de balancear la producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, con una reducción de la inflamación en el epitelio gástrico [42], también estimulan la producción de inmunoglobulina A (IgA), estabilizando la mucosa [51]. Los estudios realizados animales, muestran que la ingesta de probióticos reduce la densidad bacteriana de *H. pylori*, sin embargo, esta disminución varía con la cepa de probiótico utilizada [52-54].

En los estudios realizados en humanos, la especie más utilizada ha sido *L. johnsonni*, y otras especies del género *Lactobacillus*, estos estudios han mostrado una disminución en la adherencia de *H. pylori* al epitelio y un aumento en la expresión de mucina [55-59]. Además, han mostrado que el efecto benéfico de los probióticos se mantiene aun después de que estos se dejaron de consumir [42].

Si bien en los estudios realizados no se ha determinado cual cepa de probióticos ofrece un mejor resultado en el tratamiento de la infección por *H. pylori*, han mostrado hasta el momento que el consumo de estos tiene un efecto favorable, las cepas de probióticos que mejores resultados han mostrado son: *L. johnsonni* y



L. casei, otras cepas que han resultado ser eficientes en el manejo de la infección por *H. pylori* son *L. brevis*, *L. gasseri*, *L. lactis*, entre otros [42].

PCR tiempo real.

La PCR en tiempo real permite monitorear el progreso de la reacción como ocurre, es decir que la secuencia amplificada se detecta en cada ciclo y no al final, como ocurre en la PCR punto final, en el cual la cantidad acumulada de una secuencia amplificada se detecta al término de un determinado número de ciclos. Para detectar de la secuencia amplificada comúnmente se utilizan como sistemas de detección, las sondas TaqMan[®], Molecular Beacons y agentes intercalantes del DNA, como el SYBR[®] Green.

El fundamento de las sondas TaqMan[®] se basa en la actividad de exonucleasa 5'-3' de la DNA Polimerasa. Esta sonda es un oligonucleótido específico para la secuencia que se desea amplificar, contiene unido en su extremo 5' un fluorocromo y en el extremo 3' un quencher (molécula que absorbe la fluorescencia emitida por el fluorocromo).

Cuando la sonda está intacta la proximidad entre el fluorocromo y el quencher reduce la fluorescencia del fluorocromo, mediante un efecto conocido como Transferencia de energía de fluorescencia por resonancia (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer). Cuando la sonda encuentra a la secuencia blanco, se alinea con ésta. El proceso de amplificación inicia, cuando la enzima Taq DNA Polimerasa comienza la amplificación y se encentra con la sonda, la actividad de



exonucleasa rompe la sonda y se libera el fluorocromo, emitiendo su fluorescencia, la cual es detectada por el equipo.

Las ventajas de utilizar este tipo de detectores es que la señal de fluorescencia que se detecta es específica para la secuencia amplificada, además de que permite detectar diferentes secuencias en una sola reacción. Al ir monitoreando el proceso de amplificación conforme ocurre en tiempo real, se eliminan los procesos post PCR (tales como: electroforesis en geles de agarosa, hibridación), lo que reduce el tiempo y costo de los ensayos [60]. Adicional a esto, la PCR en tiempo real permite la cuantificación de DNA blanco mediante el uso de una curva estándar [61].

Debido a que el cultivo de *H. pylori* es un proceso laborioso y que requiere de condiciones muy controladas de transporte y manejo de las muestras, la PCR en tiempo real es una metodología más adecuada para determinar la densidad bacteriana en biopsias gástricas [11], ya que las condiciones de manejo de la muestra son menos estrictas y su sensibilidad es mucho mayor comparada con el cultivo bacteriano.



JUSTIFICACIÓN

La frecuencia de infección por *Helicobacter pylori* en México y su relación con la posibilidad de desarrollar lesiones malignas es elevada. Estudios previos muestran que los probióticos son capaces de disminuir la densidad bacteriana del microorganismo y la inflamación ocasionada por la infección, por lo tanto, utilizarse como un tratamiento alternativo para el control de la infección en sujetos con dispepsia y sin lesiones en tubo digestivo, en quienes el tratamiento de erradicación no está indicado.



HIPÓTESIS

Los probióticos han mostrado tener un efecto sobre *Helicobacter pylori*, entonces, el consumo regular de estos permitirá disminuir la densidad bacteriana de *Helicobacter pylori* en la mucosa gástrica de sujetos con dispepsia y sin lesiones en tubo digestivo.



OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del uso regular de un probiótico sobre la densidad bacteriana de *Helicobacter pylori* en mucosa gástrica de sujetos con dispepsia y sin lesiones en tubo digestivo.

OBJETIVOS PARTICULARES

Realizar la cuantificación de la densidad bacteriana de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas de diferentes sitios anatómicos del estómago, pre y post consumo regular de un probiótico por PCR tiempo real.

Determinar el efecto del consumo regular de un probiótico sobre la densidad bacteriana de *Helicobacter pylori* en mucosa gástrica de sujetos con dispepsia y sin lesiones en tubo digestivo.



METODOLOGÍA

Los sujetos fueron reclutados en un ensayo clínico, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo de mayo de 2009 a agosto de 2010. El estudio se realizó en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ) y en el Programa de Inmunología Molecular Microbiana de la Facultad de Medicina de la UNAM. El estudio consistió en determinar el efecto del consumo regular de una bebida láctea fermentada con o sin un probiótico, sobre la densidad bacteriana de *H. pylori* en mucosa gástrica.

Selección de la población de estudio.

En el estudio se incluyeron sujetos que aceptaron y firmaron la carta de consentimiento informado y que eran positivos a la presencia de *H. pylori* por serología y por la prueba de urea en aliento, además de presentar síntomas de dispepsia no ulcerosa, sin otras patologías coexistentes.

Los criterios de inclusión al estudio fueron los siguientes: adultos con dolor en epigastrio, con sensación de distensión abdominal, náuseas, regurgitación, sin ingesta de antibióticos en el mes previo del estudio y sin intolerancia a lácteos. Se excluyeron del estudio a los sujetos que presentaban: patología gastrointestinal, presencia de erosiones, enfermedad ulcerosa, cáncer gástrico y a sujetos que usaron un inhibidor de la bomba de protones en las 2 últimas semanas previas al estudio.



Se eliminaron del estudio a los sujetos que tuvieron falta de apego al tratamiento, que hicieron uso de un inhibidor de la bomba de protones, que presentaron desarrollo de complicaciones asociadas a *H. pylori* o que tuvieron presencia de efectos adversos importantes.

Los sujetos fueron asignados de manera aleatoria al grupo probiótico (grupo al cual se le administró el probiótico) y al grupo placebo (grupo al que no se le administró el probiótico), en una relación 2:1. El tratamiento aplicado a los sujetos consistió en la ingesta diaria de una bebida láctea fermentada (con o sin probiótico) durante 4 semanas.

A todos los sujetos se les tomaron biopsias de la región del fondo, cuerpo y antro gástrico, previo al inicio del tratamiento con la bebida láctea fermentada (con y sin el probiótico), y posteriormente, al término del tratamiento se realizó una nueva toma de biopsias de las regiones del estómago anteriormente mencionadas. Dichas biopsias fueron colocadas de manera individual en tubos Eppendorf con 500 μ L de una solución estabilizadora de ácidos nucleicos (RNAlater; Ambion, Inc., Austin, TX) y se almacenaron a -70°C, hasta su procesamiento.

Extracción de DNA de biopsias gástricas.

Para la extracción del DNA de las biopsias, éstas se colocaron en un homogeneizador con 100 μ L de solución de RNAlater y se disgregó el tejido hasta tenerlo en suspensión, posteriormente, se añadieron otros 200 μ L de RNAlater y se mezclaron hasta tener una solución homogénea.



Se tomó una alícuota de 80 μL a partir de la cual se realizó la extracción de DNA utilizando el kit QIAmp DNA Mini (QIAGEN). El DNA se cuantificó y se determinó la relación 260/280, se prepararon alícuotas de 10 ng/ μL del DNA de cada biopsia.

Determinación de la densidad bacteriana de *Helicobacter pylori* en biopsias gástricas.

Para poder hacer la determinación de la densidad bacteriana, se realizó la extracción del plásmido UreB1 (ver Anexo I), con el cual se construyó la curva estándar utilizada en los ensayos de PCR tiempo real (ver Anexo II y III).

Los ensayos de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador 7500 (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System), usando placas de 96 pozos (Optical 96-well reaction plate, Applied Biosystems), en las cuales se colocaron la curva estándar, el control de reactivos (NTC, Negative Test Control) y la muestra de DNA pre y post tratamiento de cada sujeto estudiado (utilizando los reactivos y las condiciones de amplificación mencionadas en el Anexo II).

Al concluir la amplificación, para determinar el número de genomas bacterianos en cada biopsia se graficó el valor de Ct (Threshold cycle) en función del logaritmo del número de genomas bacterianos para cada punto de la curva estándar (ver Anexo III) y se interpolaron los valores de Ct obtenidos para cada biopsia.



Análisis estadístico.

Los resultados de la cuantificación de la densidad de *H. pylori* en mucosa gástrica de las diferentes regiones del estómago, se expresaron como medianas y percentilas. El análisis se llevo a cabo utilizando el programa GraphPad Prism 5. La comparación pre y post tratamiento con la bebida láctea fermentada con o sin el probiótico se hizo mediante una prueba t-pareada y las diferencias entre los grupos de estudio se analizaron mediante la prueba de Mann-Whitney, considerando un valor de $p < 0.05$, como estadísticamente significativo.



RESULTADOS

En el estudio se incluyeron un total de 113 sujetos positivos a la infección por *H. pylori*, que fueron asignados aleatoriamente al grupo probiótico y al grupo placebo en una relación 2:1. Por falta de adherencia o abandono al estudio, dieciséis sujetos fueron eliminados. En la tabla 1, se muestran las características demográficas de los 97 sujetos que participaron, se observa que la población mantiene una distribución con una relación 2:1 entre el grupo probiótico y el grupo placebo, de igual forma el promedio y el intervalo de edad de los sujetos incluidos es similar en ambos grupos. Se observa además una relación aproximada de 1.5 mujeres por cada hombre tanto en el grupo probiótico, como en el grupo placebo.

Tabla 1. Características demográficas de la población de estudio.

	Grupo probiótico	Grupo placebo	Total
Mujeres	38	20	58
Hombres	26	13	39
Población analizada	64	33	97
Edad ± DE*,	42.8 ± 10.0,	43.4 ± 11.7,	43.0 ± 10.6,
(Intervalo)	(24-75)	(21-65)	(21-75)

*DE: Desviación estándar



Determinación de la densidad bacteriana.

El número de genomas bacterianos presentes en cada biopsia se calculó interpolando el valor de Ct para cada muestra en la curva estándar, la cual se construyó en una gráfica del valor de Ct en función del logaritmo del número de genomas del plásmido UreB1 (ver Anexo III). La interpolación de los datos en la curva estándar se muestra en la Figura 6.

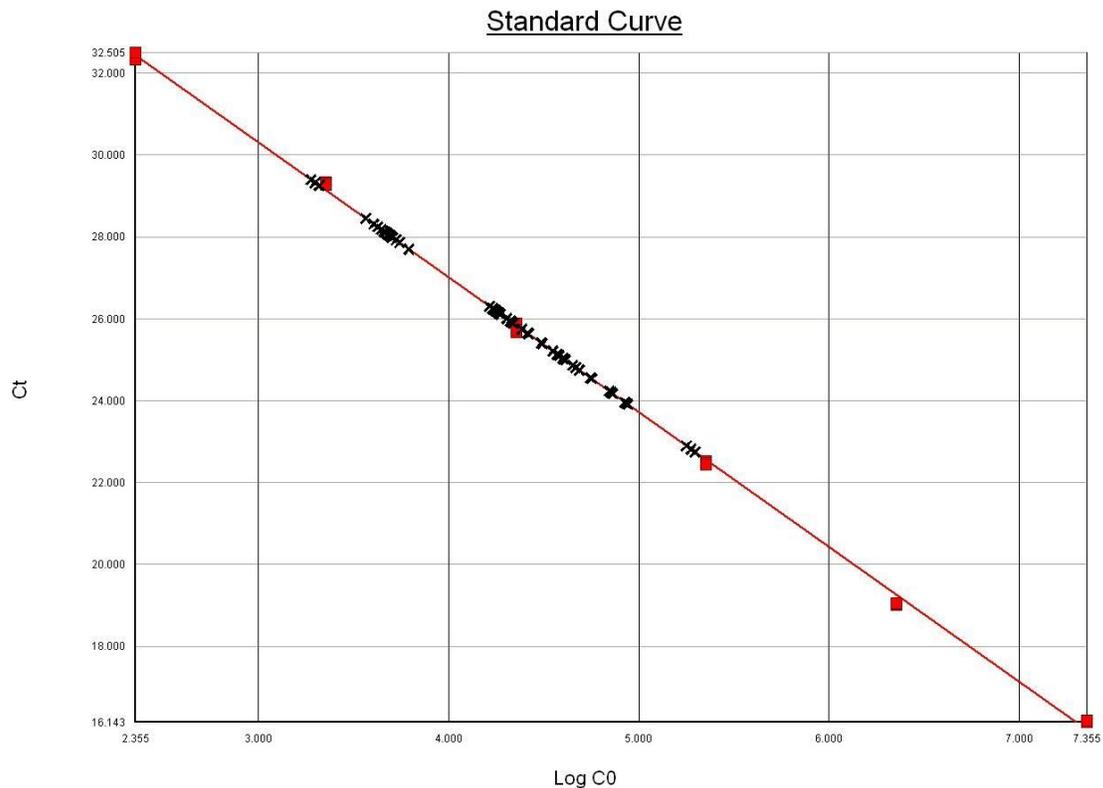


Figura 6. Determinación del número de genomas bacterianos. Se construyó la gráfica de la curva estándar usando el valor de Ct en función del logaritmo del número de plásmidos (línea y puntos rojos), sobre la cual se interpolaron los valores de Ct para cada muestra (cruces negras).



Se determinó la densidad bacteriana para cada región del estómago, previo al inicio del tratamiento y posterior a este, en la población general, sin separar a los sujetos por grupo probiótico o grupo placebo, la mediana y el intervalo de la densidad bacteriana se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Densidad bacteriana de la población de estudio, en cada región gástrica pre y post tratamiento.

	Región Anatómica		
	Fondo	Cuerpo	Antro
Pre tratamiento	21,135	38,763	25,303
Mediana (intervalo)	(0 – 531,534)	(0 – 517,764)	(0 – 263,126)
Post tratamiento	19,219	39,432	31,706
Mediana (intervalo)	(0 – 504,026)	(0 – 606,454)	(0 – 289,226)

Los resultados de la cuantificación de *H. pylori* en la población en general, muestran que la densidad bacteriana es mayor en la región del cuerpo que en el antro gástrico, sin embargo, la dispersión en los datos es menor en la región del antro (ver Figura 7), en donde se observa que el máximo en la densidad bacteriana es de 289,226 genomas bacterianos, a diferencia de la región del cuerpo en donde el máximo es de 606,454 genomas bacterianos.



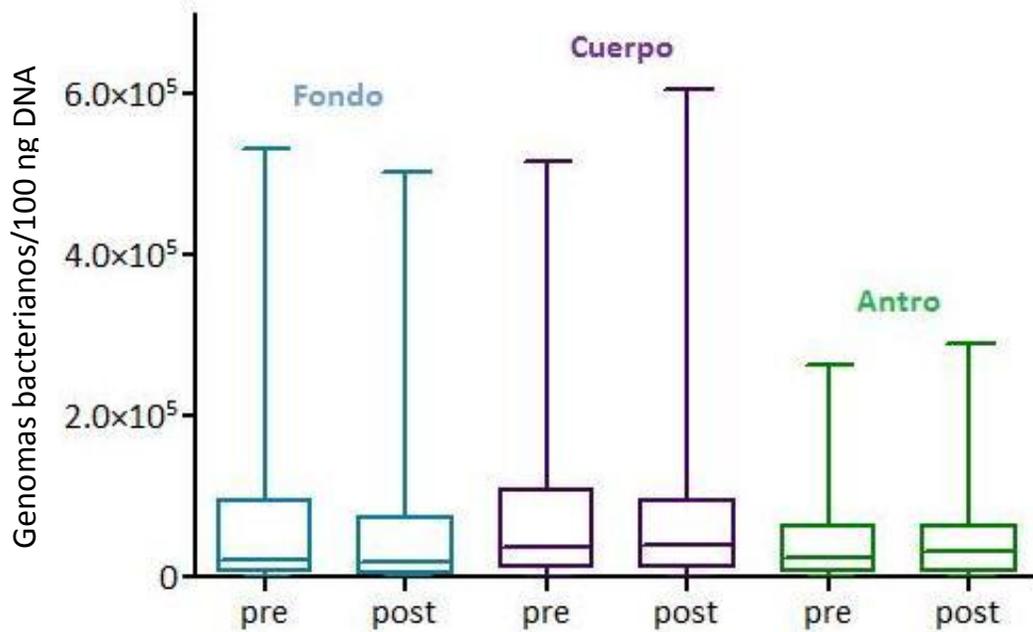


Figura 7. Densidad bacteriana de la población de estudio, en cada región gástrica pre y post tratamiento.

Después de analizar a la población general, ésta se separó en el grupo probiótico y el grupo placebo, y se realizó el análisis estadístico de la densidad bacteriana para cada región de estómago pre y post consumo regular de la bebida láctea.

El análisis de la región del fondo muestra que hay una disminución en la densidad bacteriana en el grupo placebo, mientras que, se observa un aumento aproximado de 2,500 genomas bacterianos posterior al tratamiento en el grupo probiótico (Tabla 3), sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas para ambos grupos. Al comparar la densidad bacteriana del grupo placebo vs el grupo probiótico tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estos (Figura 8).



Tabla 3. Densidad bacteriana pre y pos tratamiento para cada grupo analizado en la región del fondo gástrico.

	Grupo probiótico	Grupo placebo
Pre-tratamiento	21,135	23,528
Mediana (intervalo)	(0-531,534)	(0-387,156)
Post-tratamiento	23,929	11,631
Mediana (intervalo)	(0-504,026)	(0-337,290)

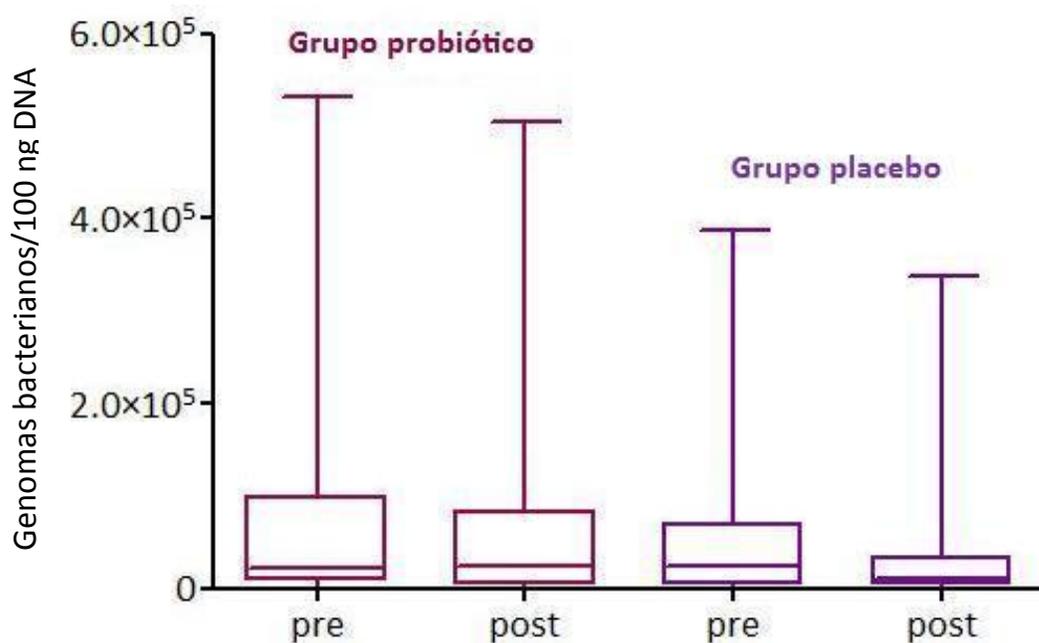


Figura 8. Densidad bacteriana pre y post tratamiento para los 2 grupos analizados en la región del fondo gástrico.

El valor de p para la prueba de t-pareada para el grupo probiótico en esta región del estómago tiene un valor de 0.0936, el cual es considerado un valor limítrofe.



En la región del cuerpo nuevamente se observa una disminución en la densidad bacteriana para el grupo placebo, mientras que para el grupo probiótico la densidad bacteriana aumenta después del tratamiento (Tabla 4), en ninguno de los casos estas diferencias son estadísticamente significativas.

El análisis del grupo placebo vs el grupo probiótico únicamente mostró una diferencia significativa en la densidad bacteriana post tratamiento ($p=0.0475$), sin embargo, esta diferencia es negativa, es decir, la ingesta del probiótico provocó un aumento en la densidad bacteriana, a diferencia de la bebida láctea sin probiótico. No se encontraron diferencias significativas en la densidad bacteriana pre tratamiento entre ambos grupos, lo que indica que los resultados post tratamiento son debidos a la ingesta de la bebida láctea fermentada y no a variables intrínsecas de la población (Figura 9).

Tabla 4. Densidad bacteriana pre y pos tratamiento para cada grupo analizado en la región del cuerpo gástrico.

	Grupo probiótico	Grupo placebo
Pre-tratamiento	43,139	34,641
Mediana (intervalo)	(0-517,764)	(0-168,898)
Post-tratamiento	47,328	16,755
Mediana (intervalo)	(0-606,454)	(0-314,298)



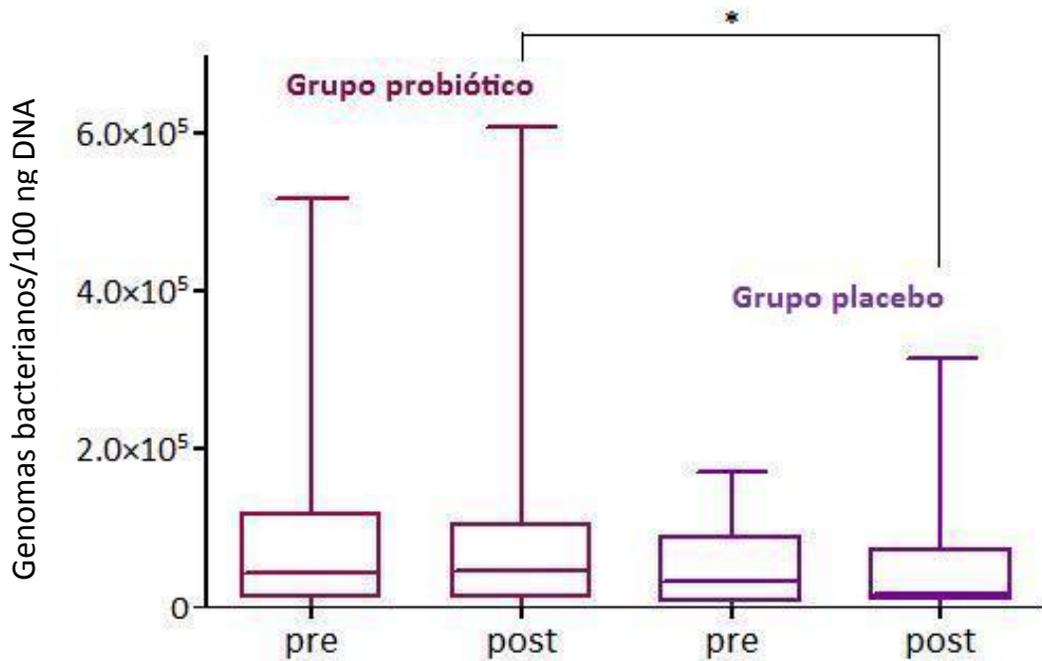


Figura 9. Densidad bacteriana pre y post tratamiento para cada grupo analizado en la región del cuerpo gástrico.

Finalmente, en la región del antro se observa un aumento en la densidad bacteriana posterior al tratamiento tanto en el grupo placebo como en el grupo probiótico (Tabla 5), al igual que en las otras regiones del estómago, estas diferencias no son significativas. Al comparar el grupo placebo con el grupo probiótico no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la densidad bacteriana entre ambos grupos pre y post tratamiento con la bebida láctea (Figura 10).



Tabla 5. Densidad bacteriana pre y post tratamiento para cada grupo analizado en la región del antro gástrico.

	Grupo probiótico	Grupo placebo
Pre-tratamiento	27,358	21,140
Mediana (intervalo)	(0-263,126)	(0-230,396)
Post-tratamiento	32,565	30,453
Mediana (intervalo)	(0-289,226)	(0-288,582)

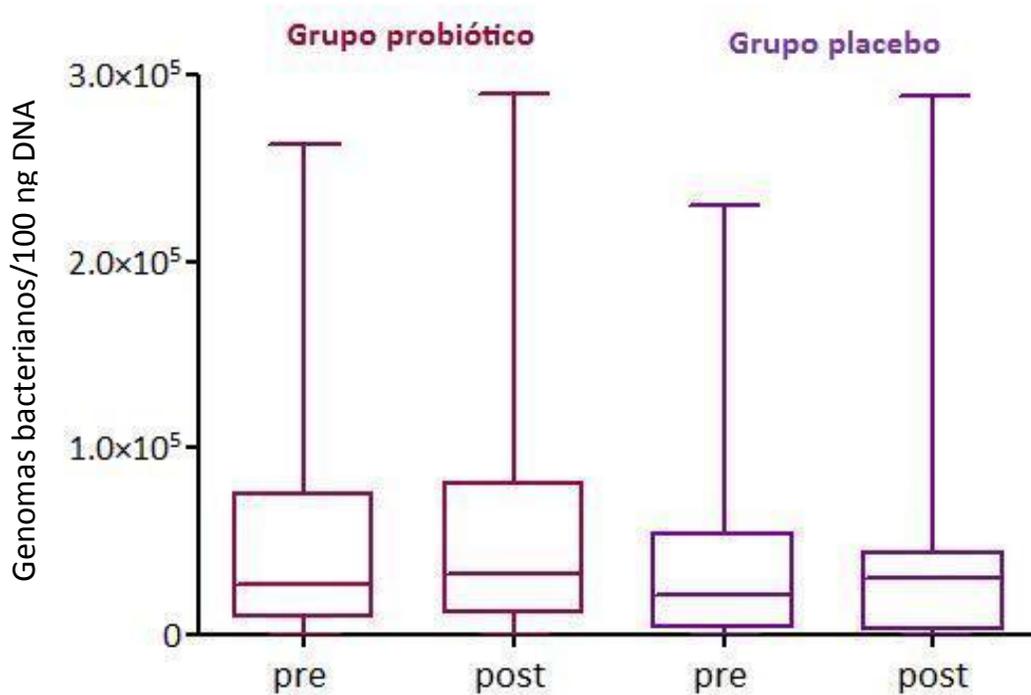


Figura 10. Densidad bacteriana pre y post tratamiento para cada grupo analizado en la región del antro gástrico.



Al realizar los ensayos de PCR en tiempo real del DNA obtenido de la bebida láctea con o sin probiótico, se obtuvieron resultados negativos en la amplificación, con lo cual se descartó que los resultados en la densidad bacteriana obtenidos posterior a la ingesta de la bebida láctea fueran resultado de la detección de un microorganismo diferente a *H. pylori*.



DISCUSIÓN

H. pylori es una bacteria que coloniza la región del antro gástrico en donde el ambiente es menos ácido y favorece su crecimiento. Esto ocurre en individuos en los cuales la secreción ácida es normal, sin embargo, cuando existe deficiencia en la producción de ácido, *H. pylori* coloniza otras regiones del estómago como el cuerpo y el fondo gástrico [2]. En nuestros resultados, se mostró una tendencia de *H. pylori* a colonizar con mayor frecuencia el cuerpo gástrico, por lo que el tipo de pacientes estudiados corresponde a la entidad clínica conocida como dispepsia.

Al analizar la población por densidad bacteriana en función de la región del estómago, se observó una gran dispersión intra e inter grupos, lo cual sería un indicativo de que la infección con *H. pylori* ha provocado una alteración en la secreción ácida en el estómago de los sujetos estudiados. El encontrar una menor dispersión en los datos de la densidad en el antro gástrico, indica que el número de genomas bacterianos presentes en esta región es más homogénea en la población general, mientras que, en las otras 2 regiones del estómago la dispersión de la densidad en la población es mayor, este resultado es atribuible a un diferente grado de alteración en la secreción ácida en cada sujeto, mientras la alteración en la secreción de ácido es mayor, el número de genomas bacterianos presentes en esta regiones será mayor.

En términos generales, se observa que la ingesta de la bebida láctea con el probiótico no disminuye la carga bacteriana de *H. pylori*, y que por el contrario, la ingesta regular de éste provocó un aumento en el número de genomas



bacterianos, estos resultados no son concordantes con lo publicado por otros investigadores, quienes observaron que la ingesta de probióticos tiende a disminuir la densidad bacteriana de *H. pylori* [52, 54-58]. Aunque existe aún una gran controversia entre los posibles beneficios del probiótico en la disminución de la carga bacteriana de *H. pylori* [55, 62], por lo que se deberán generar un mayor número de estudios que contribuyan a esclarecer su función.

Un dato importante acerca de los estudios que usaron probióticos para el control de la colonización gástrica de *H. pylori*, es que en casi todos ellos se utilizaron probióticos provenientes del género *Lactobacillus*, sin embargo, difieren en la cepa de la misma especie (por ejemplo: *L. acidophilus* LA5 y *L. acidophilus* LB); así como, también se usaron diferentes especies de *Lactobacillus*, como *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. paracasei*, etc.; de igual manera se utilizaron diferentes géneros como: *Bifidobacterium lactis* Bb12 o *Saccharomyces boulardii*; que han sido usado solos o en combinación y se han estudiado a diferentes concentraciones [63].

El esquema de consumo de los probióticos varía entre los estudios, su ingesta se ha realizado durante las comidas y antes de dormir [56], en algunos estudios el consumo se realizó dos veces al día [57, 58], tres veces al día [55] y hasta 7 veces al día [59], lo cual es altamente variable y no permite realizar una comparación entre los estudios.

Por otro lado, la mayoría de los estudios clínicos, se han centrado en niños y adultos dispépticos [63]. Wang *et al*, en 2004 [64], estudiaron el efecto de dos cepas de probióticos, con ingesta diaria durante 4 semanas, en 70 sujetos adultos



con dispepsia, este estudio reportó una disminución de la actividad de ureasa en aliento, estos datos están en controversia con nuestro estudio, probablemente estas diferencias son debidas al tipo de método utilizado para determinar la densidad bacteriana en mucosa gástrica.

Es importante señalar que en la mayoría de los estudios en los cuales se han probado probióticos para el control de la colonización por *H. pylori* en mucosa gástrica, el efecto del probiótico se determinó a través de la prueba de urea en aliento con Carbono13 (^{13}C) [63]. Valores de DOB $\text{C}^{13} >15$ (Variación sobre la línea basal) fueron usados como un predictor de gastritis severa [65] y baja tasa de erradicación del microorganismo [66], sin embargo, esta prueba no es una prueba cuantitativa que permita determinar el número de bacterias presentes en mucosa gástrica, así como, la distribución del microorganismo en las diferentes regiones anatómicas del estómago [11, 39], mientras que, la PCR en tiempo real da información de la cuantificación puntual del microorganismo en la muestra analizada, sin extenderla a todo el estómago.

Pantoflickova *et al.*, en su estudio determinó la densidad bacteriana mediante cultivo microbiológico a partir de biopsias de antro y cuerpo, en donde encontró una disminución en el grado de gastritis y en la densidad de *H. pylori* en la mucosa antral, no así en la de cuerpo, donde la gastritis y la densidad de *H. pylori* se mantuvo sin cambios [58], estos resultados son diferentes a las observaciones en nuestro estudio. Estas diferencias podrían ser producto del esquema de consumo del probiótico.



Estudios previos han evaluado la correlación de la prueba de urea en aliento, PCR en tiempo real, cultivo microbiológico e histología en la determinación de la densidad bacteriana de *H. pylori* en mucosa gástrica, se encontró una muy buena correlación entre la prueba de urea en aliento y la PCR en tiempo real, no así para los otros métodos; sin embargo, en muestras de mucosa gástrica con una densidad baja de *H. pylori* esta correlación disminuye de forma importante, debido a las diferencias en sensibilidad que la prueba de urea en aliento y la PCR en tiempo real presentan (94-96% y 98-100%, respectivamente) [39, 40].

Molnar *et al.*, han sugerido el uso de la PCR en tiempo real para la evaluación de casos en los cuales el resultado de la prueba de urea en aliento se encuentra en el área gris y en casos donde existen erosiones macroscópicas después de la erradicación de *H. pylori*; ya que la densidad bacteriana de *H. pylori* es suficientemente alta (y que puede contribuir al daño en la capa de células epiteliales) para ser detectada por PCR en tiempo real, sin embargo, es baja para ser detectada por la prueba de urea en aliento, prueba rápida de la ureasa, cultivo o histología [39]. La capacidad de determinar densidades bajas de *H. pylori* y su distribución anatómica en el estómago, representa una ventaja de la PCR en tiempo real [11, 61] y por lo tanto, el uso de esta técnica nos permitió evaluar el efecto de un probiótico en sujetos asintomáticos, siendo este el primer estudio que utiliza dicho método.

Es importante resaltar que tanto en este estudio como los previamente mencionados, únicamente se tomó una biopsia de cada región estudiada del



estómago, se ha propuesto que para tener una evaluación representativa del efecto del probiótico sobre la densidad bacteriana, es necesario analizar al menos 2 biopsias de cada región del estómago, debido a la tendencia de *H. pylori* de colonizar el estómago de manera irregular a lo largo del epitelio gástrico [11].

De igual manera debe considerarse que los estudios mencionados se realizaron en países desarrollados, en donde, la prevalencia de la infección es baja en niños y adultos [7, 63], a diferencia de la población analizada en este estudio, que es el primero que se realiza en una población donde la prevalencia de la infección es de alrededor del 80% en adultos mayores de 25 años [12], lo cual influyó de manera importante en el número de individuos que se analizaron, ya que en este trabajo la población de estudio fue mayor a los previamente publicados [63].

Adicional a lo ya mencionado, es importante considerar la viabilidad del probiótico en el estómago, se ha reportado que los probióticos pueden vivir durante algunas horas en el estómago a pesar de las condiciones ácidas presentes en este [42], estudios recientes, muestran que la viabilidad de los probióticos en las preparaciones hechas para el consumo humano se ve afectadas de manera importante si estas bebidas no se almacenan de manera correcta antes de ser ingeridas [67], esto se puede descartar ya que, las bebidas lácteas fueron transportadas y almacenadas adecuadamente con la finalidad de garantizar su sobrevivencia óptima para realizar este estudio.

Finalmente, estas diferencias en la seroprevalencia de *H. pylori*, en el número de sujetos incluidos en el estudio, la cepa de probiótico utilizada, la viabilidad de este



así como su régimen de consumo, deben ser considerados como factores importantes que influyeron en los resultados de este trabajo y su controversia con lo previamente reportada en otros estudios.



CONCLUSIONES

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real permitió la cuantificación de *Helicobacter pylori* en mucosa gástrica de sujetos con dispepsia y sin lesiones en tubo digestivo.

No existieron diferencias significativas en la densidad bacteriana de *Helicobacter pylori* post tratamiento en el grupo placebo.

Se observó una tendencia de incremento en la densidad bacteriana de *Helicobacter pylori* posterior a la ingesta regular del probiótico.



PERSPECTIVAS

La evaluación del efecto de los probióticos sobre *H. pylori* es controversial, esto es debido a que no existe homogeneidad entre los estudios, ya que fueron utilizadas diferentes cepas de probióticos, diferentes regímenes de consumo y principalmente diferentes métodos para determinar el efecto del probiótico sobre *H. pylori*, tales como histología, cultivo microbiológico y la prueba de urea en aliento, las cuales son subjetivas para determinar densidades bacterianas bajas. Por lo tanto, se propone realizar mayor número de estudios, en población con baja, como con alta incidencia de la infección, en donde se utilice la misma cepa, con el mismo régimen de consumo, en los cuales se utilicen la PCR en tiempo real para determinar el efecto del probiótico, cuyos resultados sean comparables y permitan definir el impacto del probiótico sobre *H. pylori*.



ANEXO I

Extracción del plásmido UreB1 a partir de una cepa recombinante.

Se creció la cepa recombinante de *E. coli* UreB1, la cual posee el plásmido TOPO-TA Cloning (Invitrogen) con un fragmento del gen *ureB* de *H. pylori* 26695 (ATCC 700324) insertado. La cepa se cultivó en 2 tubos con 10 mL de caldo Luria (Invitrogen) suplementado con 10 μ L Kanamicina (50 mg/mL) a 37°C durante 24 horas en agitación. Se cosechó por centrifugación y se realizó la extracción del plásmido utilizando el High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El plásmido extraído se cuantificó usando un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) y se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1%, a 75 volts, durante 45 minutos, para determinar la calidad de este. Se realizaron 4 extracciones de plásmido UreB1 obteniéndose los siguientes datos.

Tabla 6. Resultados de la cuantificación del plásmido UreB1 extraído.

Extracción	Absorbancia	260/280	260/230	ng/ μ L
1	0.360	1.77	1.32	23.6
2	0.250	1.83	1.30	16.2
3	0.400	1.83	1.76	35.3
4	0.396	1.88	1.64	32.4

Las extracciones se juntaron y se hizo una nueva cuantificación, obteniéndose una concentración final de 31.3 ng/ μ L, de este plásmido se realizaron diluciones seriadas 1:10; a partir de 20 pg/ μ L hasta 0.2 fg/ μ L de DNA plasmídico.



ANEXO II

Amplificación por PCR tiempo real.

Para los ensayos por PCR en tiempo real se utilizaron los iniciadores y la sonda específicos para amplificar una región del gen *ureB*. La secuencia de estos iniciadores y sonda se muestran a continuación.

Tabla 7. Secuencia de los iniciadores y sonda utilizados.

	Secuencia 5'- 3'
UreB Forward	TGCCACCACTTGGATAAAAGC
UreB Reverse	TTCCCATGTTCATGCAAAGTGT
Sonda TaqMan	6FAM TGATTCAAGGATCCGCC MGBNFQ*

*6FAM: 6-carboxifluoresceína; MGBNFQ: Minor Groove Binding Nonfluorescent Quencher

En la tabla 8 se indica el cóctel de amplificación utilizado para realizar los ensayos de amplificación.

Tabla 8. Cóctel de amplificación para los ensayos de PCR tiempo real.

	1 reacción
H₂O para PCR	2.7 µL
Master Mix	11.0 µL
UreB Forward	1.1 µL
UreB Reverse	1.1 µL
Sonda TaqMan[®]	1.1 µL
DNA (10 ng/µL)	5.0 µL



Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pozos (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems), en donde se colocaron la curva estándar, un control de reactivos y las biopsias pre y post tratamiento, todos ellos por triplicado.

Se realizaron alícuotas de 49 µL del cóctel, se mezclaron con 15 µL de DNA y se distribuyeron 20 µL de la mezcla en cada pozo de la placa, la cual se llevo al termociclador (7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems) bajo las condiciones de amplificación que se muestran a continuación.

Tabla 9. Condiciones de amplificación de los ensayos de PCR en tiempo real.

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	50°C	02:00
2	1	95°C	10:00
3	40	95°C	00:15
		60°C	01:00

Concluida la amplificación se analizaron las curvas obtenidas (Figura 11), para determinar el ciclo de amplificación en el cual la fluorescencia rebasó el umbral establecido (valor de Ct) para cada punto de la curva, así como, la desviación estándar entre cada triplicado.





Figura 11. Curva de amplificación del ensayo de PCR tiempo real.



Anexo III

Construcción de la curva patrón para los ensayos de PCR tiempo real.

La cantidad de DNA plasmídico utilizado en cada reacción se determinó de acuerdo a la concentración de las diluciones de DNA del plásmido UreB1 y el volumen utilizado en las reacciones de amplificación. Se determinó también el número de plásmidos presentes en cada punto de la curva con base en el número de pares de bases del plásmido y la masa equivalente a un par de bases [68]. El número de genomas bacterianos (plásmidos) en 1 fg de DNA se calculó de la siguiente forma:

$$1 \text{ pb} = 1.096 \times 10^{-21} \text{ g}$$

$$\text{Producto de PCR (UreB)} = 103 \text{ pb}$$

$$\text{Plásmido} = 3,931 \text{ pb}$$

$$\text{Plásmido con producto de PCR insertado} = 4,033 \text{ pb}$$

$$4033 \text{ pb} = 4.420 \times 10^{-18} \text{ g (masa de un plásmido)}$$

$$4.420 \times 10^{-18} \text{ g} - 1 \text{ plásmido}$$

$$10^{-15} \text{ g (1 fg)} - 226.24 \text{ plásmidos}$$

Con esta información, se calculó el número de genomas bacterianos presentes en cada punto de la curva estándar, los cuales se muestran en la siguiente tabla:



Tabla 10. Número de genomas bacterianos amplificados en cada punto de la curva estándar.

Cantidad de DNA	genomas bacterianos
100 pg	22,624,434
10 pg	2,262,443
1 pg	226,244
100 fg	22,624
10 fg	2,262
1 fg	226

Una vez calculado el número de genomas bacterianos amplificados, se determinó el valor de Ct para cada punto, los valores de Ct, así como, el coeficiente de variación para cada punto se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 11. Valor de Ct y coeficiente de variación (%CV) para cada punto de la curva estándar.

genomas bacterianos	Ct	%CV
22,624,434.0	15.76	4.8
226,2443.0	18.71	5.2
226,244.0	21.83	3.5
22,624.4	25.52	2.0
2,262.44	28.89	1.8
226.24	32.19	1.8



Con estos datos se construyó la curva estándar graficando el valor de Ct en función del logaritmo del número de genomas bacterianos (Figura 12).

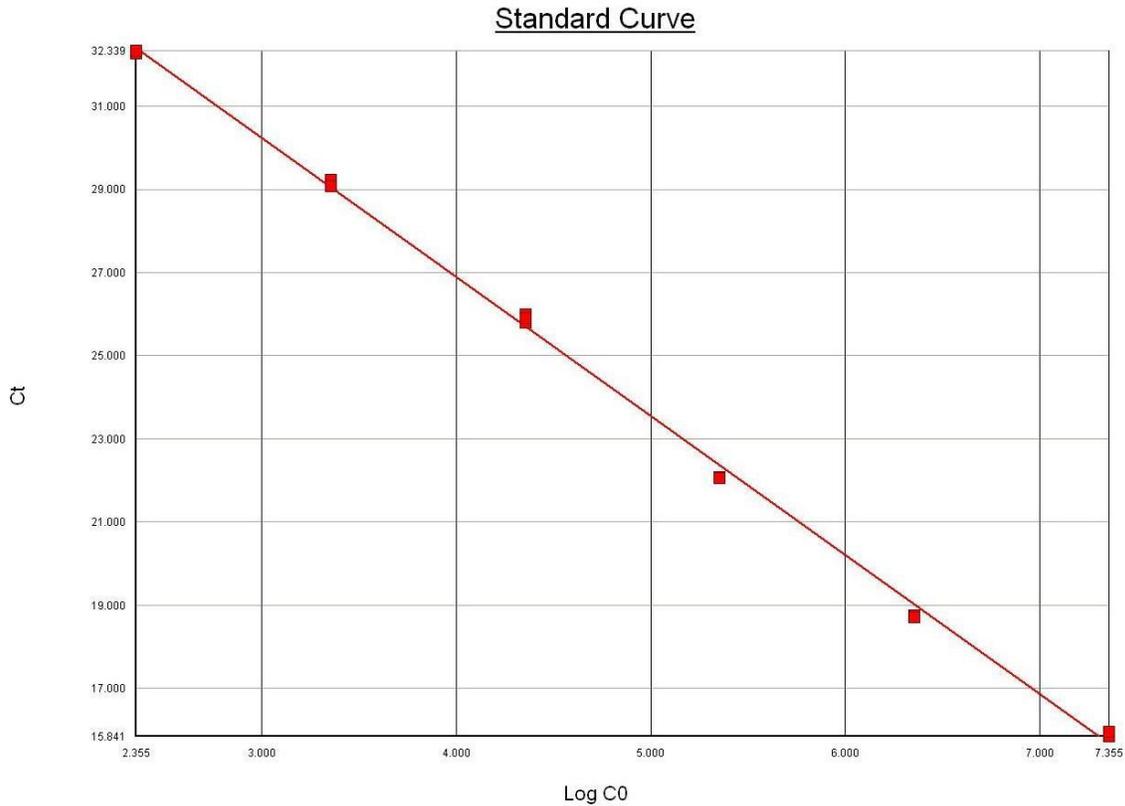


Figura 12. Construcción de la curva estándar con el plásmido ureB1.

Se determinó la pendiente de la recta, el intercepto y el coeficiente de correlación (r^2), así como, la eficiencia de amplificación.

La eficiencia de amplificación se determinó con base en la siguiente fórmula:

$$E = [10^{(-1/m)} * 100] / 2$$

Los valores de la pendiente (m), el intercepto, coeficiente de correlación (r^2) y eficiencia de amplificación (E) se muestran en la siguiente tabla.



Tabla 12. Datos obtenidos de la curva estándar.

	Promedio	Intervalo	DE*
M	-3.3453	(-3.8482 - -3.2102)	0.1257
Intercepto	39.9958	(38.8696 - 42.0031)	0.5886
r²	0.9943	(0.9317 - 0.9995)	0.0139
E	99.6291	(90.9566 - 102.4421)	2.3177

*DE: desviación estándar



BIBLIOGRAFÍA

1. Warren, J.R.M., B, *Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis*. Lancet, 1983. **1**(8336): p. 1273-5.
2. Mobley, H.L., G.L. Mendz, and S.L. Hazell, *Helicobacter pylori physiology and genetics*. 2001, Washington DC: ASM Press. 626.
3. Kusters, J.G., A.H. van Vliet, and E.J. Kuipers, *Pathogenesis of Helicobacter pylori infection*. Clin Microbiol Rev, 2006. **19**(3): p. 449-90.
4. Suerbaum, S. and C. Josenhans, *Helicobacter pylori evolution and phenotypic diversification in a changing host*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(6): p. 441-52.
5. Amieva, M.R. and E.M. El-Omar, *Host-bacterial interactions in Helicobacter pylori infection*. Gastroenterology, 2008. **134**(1): p. 306-23.
6. Crew, K.D. and A.I. Neugut, *Epidemiology of gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(3): p. 354-62.
7. Mbulaiteye, S.M., M. Hisada, and E.M. El-Omar, *Helicobacter pylori associated global gastric cancer burden*. Front Biosci, 2009. **14**: p. 1490-504.
8. IARC, *Schistosomes, Liver Flukes and Helicobacter pylori*. 1994, IARC.
9. Kusters, J.G., et al., *Cocoid forms of Helicobacter pylori are the morphologic manifestation of cell death*. Infect Immun, 1997. **65**(9): p. 3672-9.
10. Enroth, H., et al., *In vitro aging of Helicobacter pylori: changes in morphology, intracellular composition and surface properties*. Helicobacter, 1999. **4**(1): p. 7-16.
11. Megraud, F. and P. Lehours, *Helicobacter pylori detection and antimicrobial susceptibility testing*. Clin Microbiol Rev, 2007. **20**(2): p. 280-322.
12. Torres, J., et al., *A community-based seroepidemiologic study of Helicobacter pylori infection in Mexico*. J Infect Dis, 1998. **178**(4): p. 1089-94.
13. Konturek, P.C., S.J. Konturek, and T. Brzozowski, *Helicobacter pylori infection in gastric cancerogenesis*. J Physiol Pharmacol, 2009. **60**(3): p. 3-21.
14. Parkin, D.M., *International variation*. Oncogene, 2004. **23**(38): p. 6329-40.
15. Suerbaum, S. and P. Michetti, *Helicobacter pylori infection*. N Engl J Med, 2002. **347**(15): p. 1175-86.
16. Camargo, M.C., et al., *Determinants of Helicobacter pylori seroprevalence in Mexican adolescents*. Helicobacter, 2004. **9**(2): p. 106-14.
17. Peek, R.M., Jr. and M.J. Blaser, *Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(1): p. 28-37.
18. Ferguson, D.A., Jr., et al., *Isolation of Helicobacter pylori from saliva*. J Clin Microbiol, 1993. **31**(10): p. 2802-4.
19. Allaker, R.P., et al., *Prevalence of Helicobacter pylori at oral and gastrointestinal sites in children: evidence for possible oral-to-oral transmission*. J Med Microbiol, 2002. **51**(4): p. 312-7.
20. Mazari-Hiriart, M., et al., *Helicobacter pylori and other enteric bacteria in freshwater environments in Mexico City*. Arch Med Res, 2001. **32**(5): p. 458-67.
21. Hernández, N.I.O., *Detección y aislamiento de helicobacter pylori en muestras de agua de la Ciudad de México. tesis para obtener el título de Química Farmacéutica-Bióloga*. 2008, Facultad de Química, UNAM.
22. Klein, P.D., et al., *Water source as risk factor for Helicobacter pylori infection in Peruvian children*. Gastrointestinal Physiology Working Group. Lancet, 1991. **337**(8756): p. 1503-6.



23. Hopkins, R.J., et al., *Seroprevalence of Helicobacter pylori in Chile: vegetables may serve as one route of transmission*. J Infect Dis, 1993. **168**(1): p. 222-6.
24. Geis, G., et al., *Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of Helicobacter pylori*. J Med Microbiol, 1993. **38**(5): p. 371-7.
25. Algood, H.M. and T.L. Cover, *Helicobacter pylori persistence: an overview of interactions between H. pylori and host immune defenses*. Clin Microbiol Rev, 2006. **19**(4): p. 597-613.
26. Sachs, G., et al., *Acid acclimation by Helicobacter pylori*. Physiology (Bethesda), 2005. **20**: p. 429-38.
27. Polk, D.B. and R.M. Peek, Jr., *Helicobacter pylori: gastric cancer and beyond*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(6): p. 403-14.
28. Blaser, M.J. and J.C. Atherton, *Helicobacter pylori persistence: biology and disease*. J Clin Invest, 2004. **113**(3): p. 321-33.
29. Zheng, P.Y. and N.L. Jones, *Helicobacter pylori strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein*. Cell Microbiol, 2003. **5**(1): p. 25-40.
30. Molinari, M., et al., *Selective inhibition of li-dependent antigen presentation by Helicobacter pylori toxin VacA*. J Exp Med, 1998. **187**(1): p. 135-40.
31. Torres, V.J., et al., *Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin inhibits activation-induced proliferation of human T and B lymphocyte subsets*. J Immunol, 2007. **179**(8): p. 5433-40.
32. Gebert, B., et al., *Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation*. Science, 2003. **301**(5636): p. 1099-102.
33. Willhite, D.C. and S.R. Blanke, *Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity*. Cell Microbiol, 2004. **6**(2): p. 143-54.
34. Yamasaki, E., et al., *Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin induces activation of the proapoptotic proteins Bax and Bak, leading to cytochrome c release and cell death, independent of vacuolation*. J Biol Chem, 2006. **281**(16): p. 11250-9.
35. Pai, R., T.L. Cover, and A.S. Tarnawski, *Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin (VacA) disorganizes the cytoskeletal architecture of gastric epithelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **262**(1): p. 245-50.
36. Cover, T.L., et al., *Induction of gastric epithelial cell apoptosis by Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin*. Cancer Res, 2003. **63**(5): p. 951-7.
37. Blaser, M.J., et al., *Infection with Helicobacter pylori strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach*. Cancer Res, 1995. **55**(10): p. 2111-5.
38. Parsonnet, J., et al., *Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma*. N Engl J Med, 1994. **330**(18): p. 1267-71.
39. Molnar, B., et al., *Significantly elevated Helicobacter pylori density and different genotype distribution in erosions as compared with normal gastric biopsy specimen detected by quantitative real-time PCR*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2008. **20**(4): p. 305-13.
40. Kobayashi, D., et al., *Gastric mucosal density of Helicobacter pylori estimated by real-time PCR compared with results of urea breath test and histological grading*. J Med Microbiol, 2002. **51**(4): p. 305-11.
41. Dzieniszewski, J. and M. Jarosz, *Guidelines in the medical treatment of Helicobacter pylori infection*. J Physiol Pharmacol, 2006. **57** Suppl 3: p. 143-54.
42. Lesbros-Pantoflickova, D., I. Corthesy-Theulaz, and A.L. Blum, *Helicobacter pylori and probiotics*. J Nutr, 2007. **137**(3 Suppl 2): p. 812S-8S.



43. WHO and FAO, *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. 2001, FAO.
44. Gupta, V. and R. Garg, *Probiotics*. Indian J Med Microbiol, 2009. **27**(3): p. 202-9.
45. Lebeer, S., J. Vanderleyden, and S.C. De Keersmaecker, *Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens*. Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(3): p. 171-84.
46. Gotteland, M., S. Cruchet, and S. Verbeke, *Effect of Lactobacillus ingestion on the gastrointestinal mucosal barrier alterations induced by indometacin in humans*. Aliment Pharmacol Ther, 2001. **15**(1): p. 11-7.
47. Mack, D.R., et al., *Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of Lactobacillus strains to intestinal epithelial cells in vitro*. Gut, 2003. **52**(6): p. 827-33.
48. Mack, D.R., et al., *Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression*. Am J Physiol, 1999. **276**(4 Pt 1): p. G941-50.
49. Jack, R.W., J.R. Tagg, and B. Ray, *Bacteriocins of gram-positive bacteria*. Microbiol Rev, 1995. **59**(2): p. 171-200.
50. Beswick, E.J., G. Suarez, and V.E. Reyes, *H. pylori and host interactions that influence pathogenesis*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(35): p. 5599-605.
51. Vitini, E., et al., *Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria*. Biocell, 2000. **24**(3): p. 223-32.
52. Sgouras, D., et al., *In vitro and in vivo inhibition of Helicobacter pylori by Lactobacillus casei strain Shirota*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(1): p. 518-26.
53. Aiba, Y., et al., *Lactic acid-mediated suppression of Helicobacter pylori by the oral administration of Lactobacillus salivarius as a probiotic in a gnotobiotic murine model*. Am J Gastroenterol, 1998. **93**(11): p. 2097-101.
54. Coconnier, M.H., et al., *Antagonistic activity against Helicobacter infection in vitro and in vivo by the human Lactobacillus acidophilus strain LB*. Appl Environ Microbiol, 1998. **64**(11): p. 4573-80.
55. Cats, A., et al., *Effect of frequent consumption of a Lactobacillus casei-containing milk drink in Helicobacter pylori-colonized subjects*. Aliment Pharmacol Ther, 2003. **17**(3): p. 429-35.
56. Michetti, P., et al., *Effect of whey-based culture supernatant of Lactobacillus acidophilus (johnsonii) La1 on Helicobacter pylori infection in humans*. Digestion, 1999. **60**(3): p. 203-9.
57. Felley, C.P., et al., *Favourable effect of an acidified milk (LC-1) on Helicobacter pylori gastritis in man*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2001. **13**(1): p. 25-9.
58. Pantoflickova, D., et al., *Favourable effect of regular intake of fermented milk containing Lactobacillus johnsonii on Helicobacter pylori associated gastritis*. Aliment Pharmacol Ther, 2003. **18**(8): p. 805-13.
59. Gotteland, M. and S. Cruchet, *Suppressive effect of frequent ingestion of Lactobacillus johnsonii La1 on Helicobacter pylori colonization in asymptomatic volunteers*. J Antimicrob Chemother, 2003. **51**(5): p. 1317-9.
60. Espy, M.J., et al., *Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing*. Clin Microbiol Rev, 2006. **19**(1): p. 165-256.
61. Rutledge, R.G. and C. Cote, *Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(16): p. e93.
62. Wendakoon, C.N., A.B. Thomson, and L. Ozimek, *Lack of therapeutic effect of a specially designed yogurt for the eradication of Helicobacter pylori infection*. Digestion, 2002. **65**(1): p. 16-20.



63. Gotteland, M., O. Brunser, and S. Cruchet, *Systematic review: are probiotics useful in controlling gastric colonization by Helicobacter pylori?* Aliment Pharmacol Ther, 2006. **23**(8): p. 1077-86.
64. Wang, K.Y., et al., *Effects of ingesting Lactobacillus- and Bifidobacterium-containing yogurt in subjects with colonized Helicobacter pylori.* Am J Clin Nutr, 2004. **80**(3): p. 737-41.
65. Matthews, G.M., et al., *13C-urea breath test: reproducibility and association with the severity of Helicobacter pylori-associated antral gastritis.* J Gastroenterol Hepatol, 2005. **20**(2): p. 270-4.
66. Lai, Y.C., J.C. Yang, and S.H. Huang, *Pre-treatment urea breath test results predict the efficacy of Helicobacter pylori eradication therapy in patients with active duodenal ulcers.* World J Gastroenterol, 2004. **10**(7): p. 991-4.
67. Scharl, M., et al., *Dying in yoghurt: the number of living bacteria in probiotic yoghurt decreases under exposure to room temperature.* Digestion, 2010. **83**(1-2): p. 13-7.
68. Suaste Villanueva, R., *Helicobacter pylori y expresión de telomerasa, c-myc y sp1 en biopsias gástricas humanas. Tesis para obtener el grado de maestría en Ciencias Bioquímicas.* 2011, Facultad de Química, UNAM: México.

